

Die Bedeutung des Flavin-Redoxzustands und der C-terminalen
Proteindomäne für die Struktur und das Interaktionsverhalten des
pflanzenähnlichen Cryptochroms CryP aus
Phaeodactylum tricornutum

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Julia Krischer

aus

Frankfurt am Main

Frankfurt am Main (2022)

(D30)

Vom Fachbereich Biowissenschaften der

Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Sven Klimpel

Gutachter: Erstgutachterin Prof. Dr. Claudia Büchel
Zweitgutachter Prof. Dr. Jens Wöhnert

Datum der Disputation: 31.01.2023

Inhaltsverzeichnis

Die Bedeutung des Flavin-Redoxzustands und der C-terminalen Proteindomäne für die Struktur und das Interaktionsverhalten des pflanzenähnlichen Cryptochroms CryP aus	1
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	1
Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Die Bedeutung von Licht für den Modellorganismus <i>P. tricornutum</i>	1
1.2 Photorezeptoren	4
1.2.1 Die circadiane Uhr	5
1.2.2 Phytochrome	6
1.2.3 Rhodopsine.....	8
1.2.4 LOV-Photorezeptoren	8
1.2.5 BLUF-Photorezeptoren.....	10
1.3 Die Cryptochrom-Photolyase-Familie	10
1.3.1 Die FAD-Photochemie	13
1.3.2 Photolyasen.....	15
1.3.3 Cryptochrome.....	17
1.4 Photorezeptoren in <i>P. tricornutum</i>	22
1.5 Zielsetzung	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Mikrobiologische und molekulargenetische Methoden	27
2.1.1 Zellkultivierung von <i>P. tricornutum</i>	27
2.1.2 Zellkultivierung von <i>E. coli</i>	28
2.1.3 Isolation von Plasmiden.....	28
2.1.4 Isolation von genomischer DNA (gDNA) aus <i>P. tricornutum</i>	29
2.1.5 Isolation von RNA aus <i>P. tricornutum</i>	29
2.1.6 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	30
2.1.7 Reverse Transkription und Quantitative Real-time-PCR (qRT-PCR).....	30
2.1.8 Restriktion von Plasmid-DNA	31
2.1.9 Auftrennung von DNA-Fragmenten per Agarose-Gelelektrophorese.....	31
2.1.10 Klonierung von Expressionsvektoren für die heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i> ..	31
2.1.11 Transformation von <i>E. coli</i>	34
2.1.12 Verwendete Plasmide	34
2.2 Proteinbiochemische und spektroskopische Methoden	36
2.2.1 Heterologe Proteinexpression und -isolation	36

Inhaltsverzeichnis

2.2.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	37
2.2.3	Wechsel zwischen den Flavin-Redoxzuständen in CryP	37
2.2.4	Cryptochrom-Belichtung	38
2.2.5	Blue Native PAGE	38
2.2.6	Diskontinuierliche SDS-PAGE	39
2.2.7	Zweidimensionale PAGE	40
2.2.8	Western Blotting und Immunodetektion	40
2.2.9	Analyse des CryP-Oligomerisierungsverhaltens	41
2.2.10	Analyse des CryP- Interaktionsverhaltens mittels zweidimensionaler PAGE	42
2.2.11	Analyse der Interaktion von CryP-PHR mit der CTE mittels zweidimensionaler PAGE .	42
2.2.12	Analyse der CryP-Proteinstruktur mittels partieller Proteolyse	42
2.2.13	Analyse des lichtabhängigen CryP-Abbaus	43
2.2.14	Absorptionsspektroskopie	44
2.2.15	Fluoreszenzspektroskopie.....	44
2.2.16	Bioinformatische Anwendungen	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Sequenz- und Strukturvergleich von CryP mit bekannten CPF-Vertretern.....	45
3.2	Spektroskopische Charakterisierung von CryP-Mutanten mit Einfluss auf die FAD- Redoxchemie und das MTHF-Bindungsverhalten	49
3.2.1	FAD-Photoreduktion und -Oxidation im CryP-Wildtypprotein und CryP-PHR.....	51
3.2.2	FAD-Photoreduktion und -Oxidation in CryP_W342F.....	56
3.2.3	FAD-Photoreduktion und -Oxidation in CryP_N417C	57
3.2.4	FAD-Photoreduktion und -Oxidation in CryP_W231A	58
3.3	Das CryP-Oligomerisierungsverhalten	63
3.4	Sequenzcharakterisierung der PHR-Domäne und der C-terminalen Erweiterung von CryP.	66
3.5	Untersuchungen zur Konformation von PHR und CTE	68
3.6	Das CryP-Interaktionsverhalten	73
3.7	Diurnaler Transkriptionsrhythmus von <i>cryp</i> und den CryP-Interaktions-partnern <i>ID42612</i> und <i>bola</i>	79
3.8	Lichtinduzierte CryP-Degradation	81
4	Diskussion	85
4.1	Cryptochrom-Signaltransduktions-Modelle	85
4.2	Die CryP-Struktur	87
4.2.1	Die oligomere CryP-Struktur ist ähnlich zu pCRYs und unabhängig vom FAD- Redoxzustand	87
4.2.2	Die C-terminale Erweiterung von CryP bindet unabhängig vom FAD-Redoxzustand an die PHR	89

Inhaltsverzeichnis

4.2.3	CryP bindet MTHF in einer Bindetasche vergleichbar zur CPDIII-Photolyase aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	91
4.3	Die CryP-Redoxchemie	96
4.3.1	Die FAD-Redoxchemie in CryP ist ähnlich zu CPD-Photolyasen und wird von der FAD-N5-proximalen Position sowie der CTE reguliert	96
4.3.2	Die FAD-Redoxchemie in CryP ermöglicht eine duale Funktion in einem Photolyase- oder Phototropin-ähnlichen Modell.....	103
4.3.3	Die kanonische Trp-Triade ermöglicht eine schnelle FAD-Photoreduktion und ist wichtig für die Stabilität von CryP	105
4.4	Ebenen der CryP-Regulation.....	109
4.4.1	Die CryP-Transkriptmenge und -Proteinmenge werden lichtabhängig reduziert	109
4.4.2	Spezifische Proteininteraktionen bestimmen die CryP-Wirkung	112
4.5	Modell zur CryP-Wirkweise	115
5	Zusammenfassung.....	117
6	Literatur.....	119
Anhang	143

Abkürzungsverzeichnis

8-HDF	8-Hydroxy-5-Desazariboflavin	EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
(6-4)-PL	Pyrimidin-Pyrimidon (6-4)- Photolyase	FAD	Flavinadenindinukleotid
Abb	Abbildung	FMN	Flavinmononukleotid
aCRY	tierisches Cryptochrom	fRL	Dunkelrotlicht
APS	Ammoniumperoxodisulfat	FTIR	Fourier-Transformations-Infrarot
AS	Aminosäure	HDX-MS	Wasserstoff-Deuterium- Austausch- Massenspektrometrie
ATP	Adenosintri-phosphat	IMAC	Immobilisierte-Metallionen- Affinitätschromatographie
AUREO	Aureochrom	IPTG	Isopropyl- β -D- thiogalactopyranosid
β -DDM	Dodecyl- β -D-maltosid	LOV	<i>Light-oxygen-voltage</i>
BL	Blaulicht	MTHF	Methenyltetrahydrofolat
BLUF	<i>Blue-Light Using Flavin</i>	NLS	Kernlokalisationssequenz
BN	Blue Native	NTE	N-terminale Erweiterung
bp	Basenpaare	PAA	Polyacrylamid
BSA	Bovines Serumalbumin	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
bZIP	<i>Basic leucine zipper</i>	PCI	Phenol-Chloroform- Isoamylalkohol
cDNA	komplementäre DNA	PCR	Polymerasekettenreaktion
CoIP	Koimmunopräzipitation	pCRY	pflanzliches Cryptochrom
CPD-PL	Pyrimidin-Cyclobutan-Dimer- Photolyase	PHOT	Phototropin
CPF	Cryptochrom-Photolyase- Familie	PHR	<i>Photolyase homologous region</i>
CRY	Cryptochrom	PHY	Phytochrom
CRY-DASH	<i>Drosophila-Arabidopsis- Synechocystis-Homo- Cryptochrom</i>	PL	Photolyase
CryPfullyred	CryP gebunden an FADH ⁻	PVDF	Polyvinylidenfluorid
CryPox	CryP gebunden an FADox	qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
CryPsemired	CryP gebunden an FADH [•]	RL	Rotlicht
CTE	C-terminale Erweiterung	RNA	Ribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
DPH	Diatomeen-Phytochrom	SEC	<i>Size-Exclusion-Chromatographie</i>
DTT	Dithiothreitol		

Abkürzungsverzeichnis

ssDNA	einzelsträngige DNA
Tab	Tabelle
TMED	Tetramethylethylenediamine
TX-100	Triton X-100
UV	Ultraviolett
UV-Vis	ultraviolettes und sichtbares Licht
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
ZTL	ZEITLUPE

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung von Licht für den Modellorganismus *P. tricornutum*

Das auf die Erde einstrahlende Sonnenlicht wird von Lebewesen in zweierlei Hinsicht genutzt. Einerseits dient Licht phototrophen Organismen als essentielle Energiequelle während der lichtabhängigen Reaktion der Photosynthese, andererseits stellt es für alle Organismen eine wesentliche Informationsquelle über aktuelle Umweltbedingungen dar. Dabei sind die Intensität und die spektrale Zusammensetzung des Lichts stetigen wetter-, tageszeit- und jahreszeitbedingten Schwankungen unterworfen (Kirk 2011). Während sessile terrestrische Lebewesen in Abhängigkeit vom Wuchsort und von gegenseitigen Schatten- bzw. Reflektionswirkungen entweder um Licht konkurrieren oder sich vor intensiver Strahlung schützen, werden die Lichtverhältnisse in aquatischen Ökosystemen darüber hinaus durch eine Reihe weiterer Faktoren beeinflusst. Natürliche Wasserbewegungen wie Tiden und Strömungen bewirken eine ständige vertikale und horizontale Durchmischung von im Wasser gelösten Partikeln und chromophorhaltiger organischer Materie sowie eine wechselnde Konzentration und Zusammensetzung von photosynthetischen Organismen (Kirk 2011). Im Vergleich zu terrestrischen Habitaten ist unter Wasser die Lichtintensität somit generell geringer und variieren die Lichtabsorption und -streuung stark. Zudem nimmt die Absorption von Licht mit Wellenlängen kleiner als 250 nm und größer als 650 nm mit steigender Wassertiefe zu, was zu einer Anreicherung von blaugrünem Licht zwischen 400 und 500 nm führt (Abb.1.1; Depauw et al. 2012).

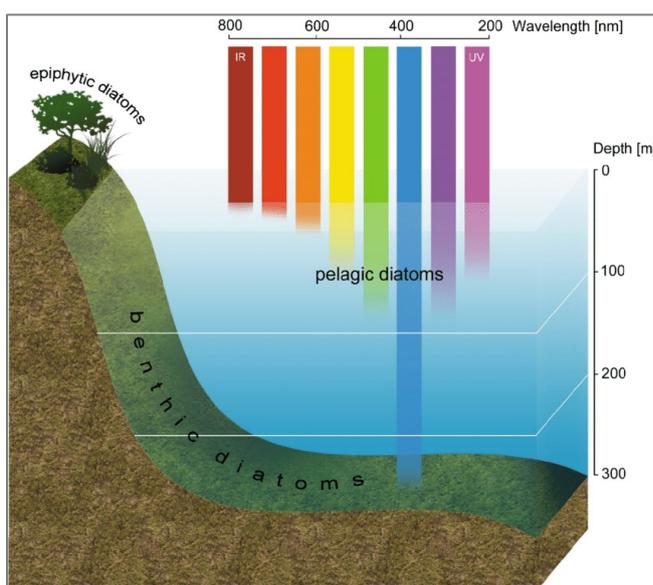


Abb. 1.1: Spektrale Zusammensetzung des Lichts in Abhängigkeit von der Wassertiefe in aquatischen Habitaten. In Wassertiefen über 100 m dominiert blaugrünes Licht zwischen 400 und 500 nm (Kuczynska et al. 2015).

Einleitung

Die stetigen Schwankungen der spektralen Komposition und die ungleiche Verteilung des Lichts in aquatischen Habitaten haben in den photoautotrophen Einzellern des marinen Phytoplanktons evolutionäre Anpassungen zur Optimierung des Photosyntheseapparats und der nicht-photosynthetischen Lichtperzeption hervorgerufen (Jaubert et al. 2017). Innerhalb des Phytoplanktons, das sich aus Cyanobakterien und eukaryotischen Mikroalgen multiphylogenetischen Ursprungs zusammensetzt, bilden Diatomeen (Kieselalgen) eine herausragende Gruppe (Vargas et al. 2015; Caron et al. 2017). Sie sind mit ihrer photoautotrophen Lebensweise für 20 % der globalen CO₂-Assimilation verantwortlich und damit ein wichtiger Puffer gegen die globale Erwärmung (Falkowski et al. 1998; Smetacek 1999; Tirichine und Bowler 2011). Die eukaryotischen einzelligen Mikroalgen können Süß- und Salzwasser sowie terrestrische Ökosysteme besiedeln (Abb. 1.1; Kuczynska et al. 2015).

Die Entstehung von Diatomeen ist auf ein sekundäres Endosymbioseereignis zurückzuführen, bei dem eine photoautotrophe Rotalge von einer eukaryotischen, heterotrophen Wirtszelle als Plastid integriert wurde, wobei dieser Endosymbiose vermutlich die Aufnahme einer Grünalge vorausging (Abb. 1.2 A; Moustafa et al. 2009). Als Folge der sukzessiven endosymbiotischen Ereignisse in Verbindung mit fortwährenden Gentransfers, -verlusten und -modifikationen (z.B. Duplikationen) sowie zusätzlichen horizontalen Gentransfers weisen Diatomeen ein genomisches Mosaik auf, sodass im Nukleus Gene mit Ursprung von beiden heterotrophen Wirten, Cyanobakterien, Grünalgen, Rotalgen, Bakterien und Viren gefunden werden können (Bowler et al. 2008; Tirichine und Bowler 2011; Hopes und Mock 2005-2010; Parks et al. 2018; Rastogi et al. 2020).

Als weitere Folge der einzelnen Endosymbiosen weisen Diatomeen komplexe Plastiden mit vier Hüllmembranen auf. Diese enthalten Thylakoide in Form von plastidendurchspannenden Dreierbändern ohne Grana-Stroma-Differenzierung. Der photosynthetische Elektronentransport zwischen den einzelnen Redoxkomponenten und Photosystemen ist vergleichbar mit Cyanobakterien. Fucoxanthine und Chlorophyll *c* sind als akzessorische Pigmente Bestandteil der Fucoxanthin-Chlorophyll-Proteinkomplexe (FCPs) in den Lichtsammelkomplexen (Gundermann und Büchel 2014). Die diploiden Diatomeen-Zellen bilden eine Zellhülle (Frustel) aus Siliciumdioxid mit einer speziesspezifischen Nanostruktur aus (Daboussi et al. 2014).

Das erste vollständig sequenzierte Genom aus der Gruppe der radiär symmetrischen, zentrischen Diatomeen wurde für *Thalassiosira pseudonana* annotiert, aus der der Gruppe der bilateral symmetrischen, pennaten, Diatomeen wurde das Genom von *Phaeodactylum tricornutum* als erstes sequenziert (Armbrust et al. 2004; Bowler et al. 2008).

Phaeodactylum tricornutum (*P. tricornutum*) wurde erstmals 1897 von Bohlin in den Stockholmer Schären (Bandskär bei Runmarö, Schweden) isoliert und beschrieben. Die komplette Genomsequenz wurde von Bowler et al. (2008) veröffentlicht. Bei einer Genomgröße von 27,4 Mbp verteilt auf 33

Einleitung

Chromosomen wurden knapp 10 400 hypothetische Gene annotiert (Montsant et al. 2005; Bowler et al. 2008; Vardi et al. 2008). *P. tricornutum* ist eine pleomorphe pennate Diatomee. Die Zellen können abhängig von den äußeren Wachstumsbedingungen einen spindelförmigen, triradiären oder ovalen Morphotyp annehmen (Abb. 1.2 B; Martino et al. 2007; Martino et al. 2011). Dabei ist *P. tricornutum* eine atypische Diatomee, da das Wachstum nicht obligat an das Siliziumangebot gekoppelt ist. Nur die ovale Form weist eine leichte Silicahülle auf (Scala et al. 2002; Vardi et al. 2008). Im Gegensatz zu anderen Diatomeenarten wurde für *P. tricornutum* bisher keine sexuelle Reproduktion beobachtet, die vegetativen Zellen vermehren sich nach einer mitotischen Kernteilung (Falciatore et al. 2020).

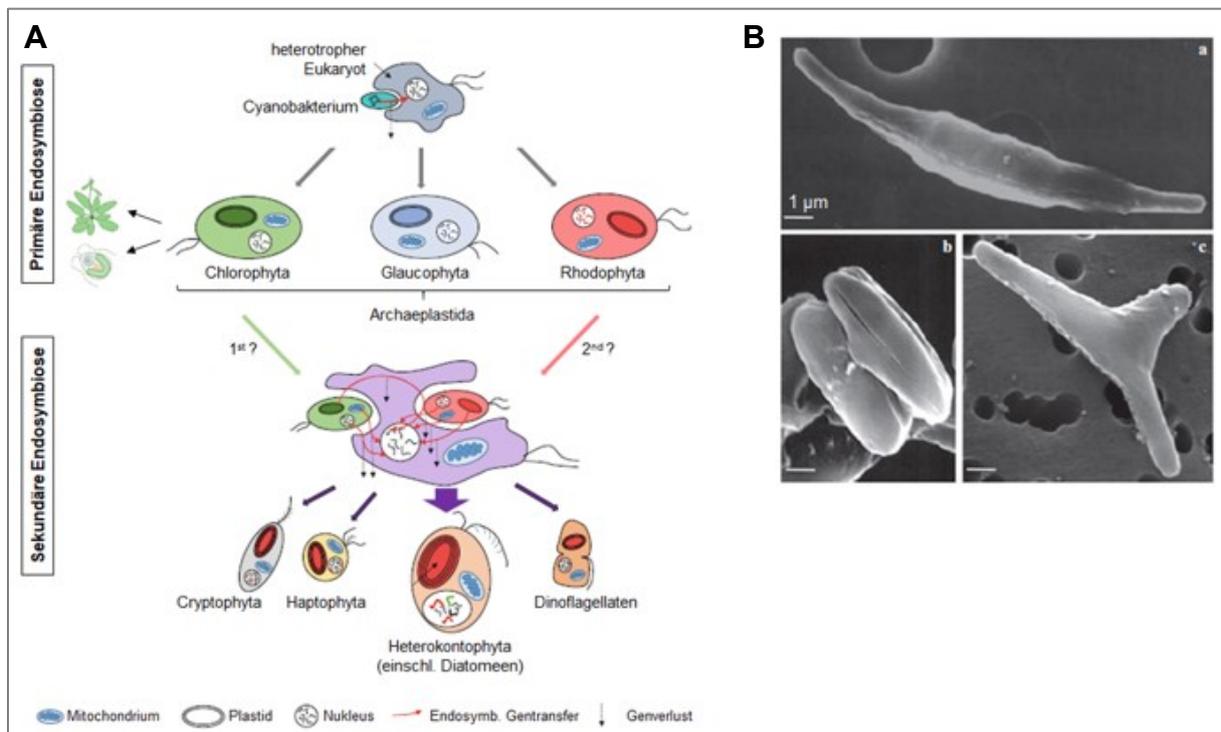


Abb. 1.2: Evolutionärer Ursprung von Diatomeen und Morphotypen von *P. tricornutum*. (A) Während Archaeplastiden aus einer primären Endosymbiose hervorgegangen sind, die zur Ausprägung von Chloroplasten mit zwei Hüllmembranen geführt hat, sind Diatomeen aus der sekundären Endosymbiose zwischen einem heterotrophen Eukaryoten und einer Rotalge entstanden, der vermutlich die Aufnahme einer Grünalge vorausging (Moustafa et al. 2009). Abb. verändert nach Hopes und Mock (2005-2010). (B) SEM-Aufnahme der verschiedenen *P. tricornutum*-Morphotypen. Oben fusiform, unten links oval, unten rechts triradiär (Martino et al. 2007).

Als Modellorganismus dient *P. tricornutum* nicht nur der Erforschung grundlegender biochemischer Prozesse in Diatomeen, sondern besitzt auch kommerziellen Nutzen, z.B. als Futtermittel in Aquakulturen, Produzent mehrfach ungesättigter Fettsäuren sowie Pigmenten und Antioxidantien für Pharmazie und Kosmetik oder in Silizium-basierter Nanotechnologie (Apt et al. 1996; Sasso et al. 2012; Daboussi et al. 2014; Falciatore et al. 2020). Der biotechnologische Nutzen von *P. tricornutum* wird durch die geringe Genomgröße, relativ kurze Generationszeit sowie das Wachstum unter einfachen

Kulturbedingungen auf definiertem synthetischem Minimalmedium unterstützt. Zudem sind Protokolle zur nuklearen Transformation (Biolistik: Apt et al. 1996; Falciatore et al. 1999; Konjugation: Karas et al. 2015; Elektroporation: Niu et al. 2012; Miyahara et al. 2013; Zhang und Hu 2014; Xie et al. 2014), zum Gene Silencing (RNA-Interferenz: Mello und Conte 2004; Riso et al. 2009) und zur gezielten Genomeditierung (TALEN: Daboussi et al. 2014; CRISPR/Cas: Nymark et al. 2016; Stukenberg et al. 2018; Ribonukleoproteine: Serif et al. 2018) etabliert. Dies schließt bekannte funktionelle Promotoren, Selektionsmarker und Reportergene ein (Apt et al. 1996; Falciatore et al. 1999; Falciatore et al. 2020; Zaslavskaja et al. 2001; Siaut et al. 2007; Sakaue et al. 2008; Seo et al. 2015; Slattery et al. 2018).

1.2 Photorezeptoren

Als Teil des marinen Phytoplanktons weisen Diatomeen eine Reihe spezifischer Photorezeptoren zur nicht-photosynthetischen Lichtperzeption auf, die als evolutionäre Anpassung zur Besetzung ihrer ökologischen Nische betrachtet werden (Hegemann 2008; Oliveri et al. 2014).

Photorezeptoren sind Pigment-Protein-Komplexe, die Licht bestimmter Wellenlängen absorbieren und das Lichtsignal in zelluläre Signalkaskaden umwandeln (Phototransduktion; Duanmu et al. 2017). Die Absorptionseigenschaften einzelner Rezeptoren decken in ihrer Gesamtheit das solare Spektrum auf der Erde zwischen 350 und 750 nm ab (Abb. 1.3; Möglich et al. 2010).

Die Mehrheit der Photorezeptoren weist eine strukturelle Gliederung in einzelne funktionelle Domänen auf. Photosensordomänen (*Input*-Domänen) enthalten konservierte Bindepositionen für Chromophore und vermitteln demnach die Lichtabsorption. Diese Domänen sind über α -Helices oder gestreckte Proteinschleifen mit einer oder mehreren Effektor-domänen (*Output*-Domänen) verbunden. Diese Domänen sind vielgestaltig und bestimmen die spezifische Funktion des Rezeptors, indem sie katalytische Aktivität und/oder Interaktionsflächen für nachgeschaltete Komponenten des Signalwegs besitzen (Möglich et al. 2010).

Strukturell basiert die Absorptionsfähigkeit von Pigmenten auf einem System konjugierter Doppelbindungen mit delokalisierten π -Elektronen (Ferguson und Branch 1944). Die Länge des π -Systems bestimmt den spektralen Absorptionsbereich. Innerhalb des Rezeptorkomplexes kann die Anregungsenergie des Chromophors durch Isomerisierung, die Bildung kovalenter Bindungen oder Elektronentransferprozesse umgewandelt werden (Möglich et al. 2010). Verbunden mit der primären Photochemie des Chromophors sind lokale Konformationsänderungen um die Chromophor-Bindetasche, die zu langlebigeren Rearrangements im Holoprotein und somit zur Modulation nachgeschalteter Protein-Protein- oder Protein-DNA-Interaktionen führen (Losi und Gärtner 2011; Zoltowski und Gardner 2011; Kottke et al. 2018).

Einleitung

Das Aktionsspektrum einzelner Photorezeptoren kann auf Basis von Genomannotationen jedoch nicht vorhergesagt werden. Ihre Aktivität ist rezeptor- und umgebungsspezifisch und kann nur durch empirische Untersuchungen analysiert werden (Jaubert et al. 2017).

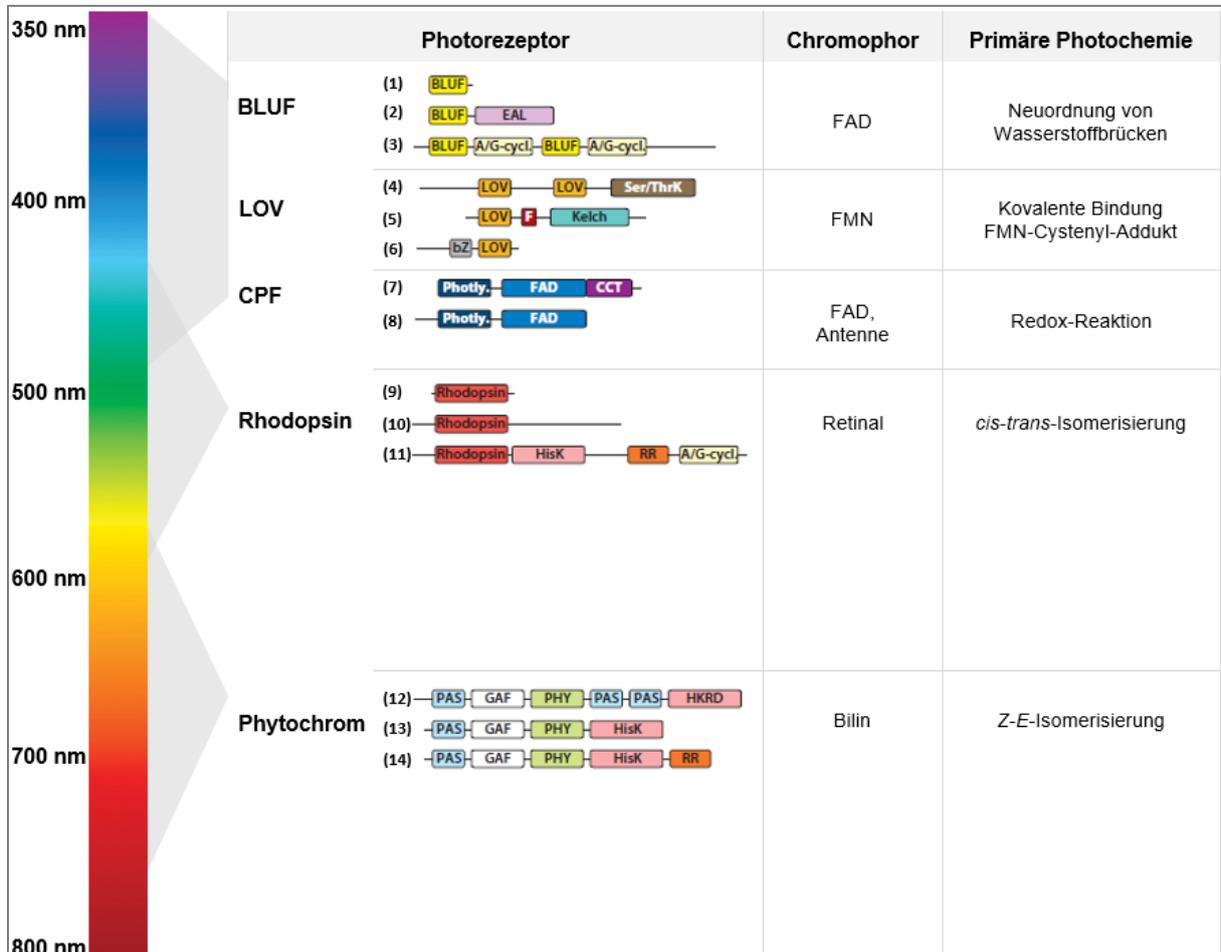


Abb. 1.3: Domänenaufbau, Chromophorbindung und primäre Photochemie repräsentativer Photorezeptoren. Die Abkürzungen der modularen Domänen sind A/G-cycl adenylate/ guanylate cyclase, bZ basic zipper, CTT cryptochrome C-terminal domain, EAL diguanylate phosphodiesterase, F F-box, FAD photolyase α domain, GAF GAF domain, HisK histidine kinase, HKRD histidin kinase-related domain, Kelch Kelch repeat, PAS PAS domain, PHY phytochrome, Photly photolyase α/β domain, RR response regulator, Ser/ThrK serine/threonine kinase. Dargestellt ist der Domänenaufbau der Photorezeptoren (1) *Synechococcus elongatus* TII0078, (2) *Klebsiella pneumoniae* BlrP1, (3) *Euglena gracilis* photoactivated adenylyl cyclase α , (4) *Arabidopsis thaliana* phototropin 1, (5) *Arabidopsis thaliana* ZEITLUPE, (6) *Vaucheria frigida* aureochrome 1, (7) *Arabidopsis thaliana* cryptochrome 1, (8) *Arabidopsis thaliana* cryptochrome 3, (9) *Acetabularia acetabulum* rhodopsin, (10) *Chlamydomonas reinhardtii* channelrhodopsin 2, (11) *Chlamydomonas reinhardtii* chlamyopsin-5, (12) *Arabidopsis thaliana* phytochrome A, (13) *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophytochrome. (14) *Rhodospseudomonas palustris* bacteriophytochrome 5. Verändert nach Möglich et al. (2010).

1.2.1 Die circadiane Uhr

Circadiane Rhythmen können in Bakterien über Pflanzen und Tiere gefunden werden. Sie umfassen einen täglichen Rhythmus von circa 24 h in Bezug auf Verhalten und Physiologie (Cashmore 2003). Es

befähigt Organismen zur Antizipation periodischer Änderungen in der Umwelt und verschafft ihnen damit einen Überlebensvorteil (Pittendrigh 1993; Czeisler et al. 1999). Kern der circadianen Maschinerie ist ein zentraler Oszillator, der einen selbsterhaltenden Rhythmus unabhängig von externen Reizen generiert (Abb. 1.4; Noordally und Millar 2015). Über mehrere, miteinander vernetzte Transkriptions-Translations-Rückkopplungsschleifen aktiviert ein Transkriptionsaktivator die Synthese eines Transkriptionsrepressors (Sancar 2003). Der Repressor unterdrückt seine eigene Synthese, wobei posttranslationale Modifikationen (z.B. Phosphorylierungen und Ubiquitinierungen) seine Stabilität und Lokalisation beeinflussen. Die zeitliche Verzögerung von Aktivator- und Repressorwirkung resultiert in einer Periode von circa 24 h. Neben seiner Selbsterhaltung steuert der zentrale Oszillator verschiedene physiologische Prozesse (*Outputs*). Dies kann auf transkriptioneller Ebene durch die Expression circadian regulierter Gene oder durch (post-) translationale Modifikation mit Einfluss auf Proteinstabilitäten und -lokalisationen erfolgen (Mehra et al. 2009). Als Ergebnis werden über den Tag verteilte und getaktete Aktivitätsmaxima einzelner Genprodukte erzeugt. Der zentrale Oszillator wird in *Input*-Signalwegen mit den äußeren Umweltrhythmen synchronisiert. Hierdurch kann die Phase und Amplitude der *Output*-Prozesse variiert werden. Wichtigster externer Stimulus zur Synchronisation der circadianen Uhr ist Licht, das von Photorezeptoren wahrgenommen und in einem Signalweg an den zentralen Oszillator geleitet wird (Lopez et al. 2021).

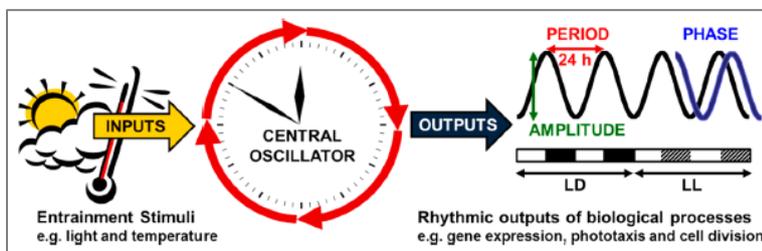


Abb. 1.4: Das circadiane System (Noordally und Millar 2015).

1.2.2 Phytochrome

Phytochrome (PHY) erfassen Licht im roten und dunkelroten Lichtbereich (RL und fRL) zwischen 600 bis 750 nm und sind in photosynthetischen sowie nicht-photosynthetischen Bakterien, Pilzen, Cyanobakterien, diversen Algen und Landpflanzen aktiv (Rockwell und Lagarias 2020). In Diatomeen wurden spezifische Diatomeen-Phytochrome (DPH) nachgewiesen (Petersen et al. 2022).

Die N-terminale photosensorische Domäne setzt sich aus konservierten konsekutiven PAS (*Period-Arnt-Single minded*), GAF (*cGMP phosphodiesterase/ adenylyl cyclase/ FhIA*) und PHY (*Phytochrome specific*) -Modulen zusammen (Abb. 1.3, Duanmu et al. 2014). Konservierte Cysteine im PAF- oder GAF-Modul vermitteln die kovalente Thioesterbindung des Chromophors in Form des linearen Tetrapyrrols

Einleitung

Bilin. Abhängig von der Spezies sind unterschiedliche Bilin-Derivate gebunden, so tragen Bakteriophytochrome Biliverdin IX α , Cyanobakterien-eigene PHYs Phycocyanobilin und pflanzliche PHYs Phytychromobilin (Kottke et al. 2018). Dies ruft verschiedene Absorptionseigenschaften einzelner PHYs basierend auf verschiedenen Substituenten und N-Protonierungen an den Pyrrolringen und Netzwerken an Wasserstoffbrücken hervor (Rockwell et al. 2014; Kottke et al. 2018). Der C-terminale Proteinbereich setzt sich rezeptorabhängig aus einer variablen Anzahl und Kombination unterschiedlicher Module zusammen, die in Form von ATPasen, Histidin-Kinasen, Guanylat-Cyclasen oder Phosphodiesterasen enzymatische Aktivität aufweisen und daher an der Signaltransduktion beteiligt sind (Duanmu et al. 2014).

PHYs treten in den RL- bzw. fRL-abhängigen Konformationen Pr bzw. Pfr auf. Dabei stellt Pr die physiologisch inaktive Dunkelform dar, die nach Bestrahlung mit RL in die aktive Pfr-Form übergehen kann. Dieser Prozess ist reversibel durch eine Bestrahlung mit fRL oder eine Dunkelreversion (Möglich et al. 2010). Auf molekularer Ebene wird die Photokonversion durch eine Z-E-Isomerisierung zwischen Pyrrolring C und D in Folge der Photoexzitation des Bilins ausgelöst. Dies bewirkt eine Rotationsbewegung des Bilins gefolgt von proteinintrinsischen Protonentransfers, die sich auf eine Änderung der Proteinkonformation ausweiten und damit den Rezeptor aktivieren (Rockwell et al. 2006).

Am Beispiel der PHYs aus *Arabidopsis thaliana* kann in Folge der Rezeptoraktivierung eine dynamische nukleo-cytoplasmatische Relokalisation beobachtet werden (Huq et al. 2003). Im Dunkeln befinden sich die PHYs im Cytoplasma, das Kernlokalisierungssignal (NLS) im PAS-Modul und die C-terminale Kinase-Output-Domäne sind verdeckt. Ausgelöst durch die photoinduzierte Konformationsänderung wird die NLS freigelegt und die Kinasedomäne aktiviert, sodass die Pfr-Form in den Nukleus migrieren kann. Dort treten als Reaktion auf Kinase-gesteuerte Phosphorylierungen spezifische Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren ein, die zu RL- bzw. fRL-abhängigen Änderungen der Genexpression führen. Pflanzliche PHYs sind obligate Dimere, wobei *A. thaliana* PHYA Homodimere bildet und lichtinduziert über den Proteasom-Weg abgebaut wird. Dagegen sind *A. thaliana* PHYB-F im Licht stabil und können Heterodimere bilden (Chen et al. 2003; Sharrock und Clack 2004).

Eine Rezeptorinaktivierung wird demnach über eine selektive PHY-Degradation oder eine Dunkelreversion erreicht. Letztlich basiert die PHY-Signalwirkung auf dem Verhältnis inaktiver Pr- zu aktiver Pfr-Form, die durch die umgebende Lichtzusammensetzung bestimmt wird. Da rotes Licht in terrestrischen Habitaten aufgrund der Absorption photosynthetischer Organismen nur abgeschwächt die Bodenschichten erreicht, werden durch PHYs photomorphogenetische Prozesse zur Schattenvermeidung hervorgerufen. Auch in aquatischen Habitaten wird langwelliges Licht durch die Absorption der Wassersäule stark abgeschwächt, sodass PHYs hier als Wasseroberflächensensoren betrachtet werden (Rockwell et al. 2014).

1.2.3 Rhodopsine

Rhodopsine können in Organismen aller Domänen nachgewiesen werden und sind vor allem als Photorezeptoren im visuellen System von Tieren bekannt (Möglich et al. 2010). Das Opsin-Apoprotein besteht aus sieben Transmembranhelices in einer Fass-ähnlichen Anordnung. In deren Mitte ist Retinal als Chromophor über eine Schiff'sche Base an die ϵ -Aminogruppe eines konservierten Lysins kovalent gebunden (Ernst et al. 2014). Der Absorptionsbereich einzelner Rhodopsine variiert in Abhängigkeit einiger variabler Aminosäuren (AS) um das Retinal, die die Polarität des Apoproteins und damit den Protonierungszustand des Chromophors und die Protein-Chromophor-Wechselwirkungen beeinflussen (Deisseroth und Hegemann 2017). Hierdurch können Rhodopsine in ihrer Gesamtheit ein breites Spektrum über 400 bis 650 nm von blaugrün bis orange-rot erfassen. Die primäre Photochemie nach Exzitation des Chromophors basiert auf einer thermal reversiblen *trans-cis*- (mikrobielle Rhodopsine) bzw. *cis-trans*- (tierische Rhodopsine) Photoisomerisierung des Retinals. Nach einer folgenden Deprotonierung der Schiff'schen Base durch konservierte Aspartate oder Glutamate werden weitere opsin-intrinsische Protonentransfers induziert, die abhängig vom Rhodopsin-Typ verschiedene Signaltransduktionswege einleiten (Inoue et al. 2014).

Mikrobielle Rhodopsine können als licht-aktivierte Protonen-Pumpen, Ionen-Kanäle oder Lichtsensoren wirken (Grote et al. 2014). Bakteriorhodopsine als Protonen-Pumpen nutzen die opsinintrinsischen Protonentransfers nach Photoexzitation zum Aufbau eines elektrochemischen Gradienten, der eine ATP-Synthase antreibt. In Channelrhodopsinen im Augenfleck einzelliger Grünalgen wie *Chlamydomonas reinhardtii* führt die Photoisomerisierung in Verbindung mit den intrinsischen Protonenverschiebungen zu einer geänderten Anordnung der Transmembranhelices, was einen selektiven Kationenkanal öffnet und die Membran durch einen gerichteten Kationenstrom depolarisiert (Nagel et al. 2003). Dies steuert phototaktische Bewegungen. In Lichtsensor-Rhodopsinen führen Konformationsänderungen der Transmembranhelices zur Aktivierung eines intrazellulären Signaltransduktionsproteins (Ernst et al. 2014).

Tierische Rhodopsine sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Die retinalinduzierte Konformationsänderung des Rezeptors nach Photoexzitation führt zur Aktivierung eines G-Proteins und damit verbundenen *second messenger* Transduktionswegen (Rosenbaum et al. 2009).

1.2.4 LOV-Photorezeptoren

Phototropine, ZEITLUPE und Aureochrome sind Rezeptoren für Blaulicht (BL) mit unterschiedlicher phylogenetischer Verbreitung, die als gemeinsames Strukturmerkmal LOV (*light-oxygen-voltage*)-Domänen aufweisen (Losi und Gärtner 2011). LOV-Domänen sind eine Untergruppe der PAS (*Period-Arnt-Single minded*)-Domänen, bilden eine kompakte Tertiärstruktur aus $\alpha\beta$ -Faltungen und binden

Einleitung

Flavinmononukleotid (FMN) als chromophore Gruppe (Christie et al. 1999). Daher sind LOV-Photorezeptoren wie die meisten Blaulichtrezeptoren Flavoproteine. FMN absorbiert zwischen 350 und 470 nm im UV-A- bis BL-Bereich mit einem Maximum bei 450 nm (Losi 2007). Als primäres photochemisches Ereignis führt die Exzitation des Chromophors in Folge von Blaubelichtung zur reversiblen Knüpfung einer kovalenten Bindung zwischen C(4a)-FMN und der Thiolgruppe eines konservierten Cysteins (Christie et al. 1999; Salomon et al. 2000; Toyooka et al. 2011; Kerruth et al. 2014). In Folge der lichtabhängigen Bildung des FMN-Cystenyl-Thioaddukts rotieren der FMN-Isoalloxazinring und die Seitenkette eines konservierten Glutamins, sodass sich neue Wasserstoffbrücken zwischen dem Chromophor und dem Apoprotein ausbilden. Hierdurch werden Änderungen der LOV-Sekundärstruktur, insbesondere Entfaltungen der α und β -Helix am N- bzw. C-terminalen Bereich der LOV-Domäne induziert (Crosson und Moffat 2001). Dies führt abhängig von den Effektor-domänen der LOV-Rezeptortypen zu verschiedenen Signaltransduktionswegen.

Phototropine (PHOT) sind in Grünalgen und Landpflanze vertreten (Li et al. 2015). Sie weisen neben zwei konsekutiven N-terminalen LOV-Domänen eine Serin/Threonin-Kinase-Effektor-domäne am C-terminalen Ende auf (Christie et al. 2015). Im dunkeladaptierten Ruhezustand liegt PHOT1 aus *A. thaliana* in einer geschlossenen Konformation im Cytosol vor. Die lokalen BL-induzierten Sekundärstrukturänderungen der LOV-Domäne führen zu einer Freilegung und damit Aktivierung der Kinase-Domäne. Einhergehend mit PHOT-Autophosphorylierungen werden verschiedene BL-Adaptionen ausgelöst (Pfeifer et al. 2010). In *A. thaliana* werden infolge von Phosphorylierungskaskaden die Öffnung der Stomata und phototrope Wachstumsprozesse induziert (Briggs und Christie 2002; Christie et al. 2011; Takemiya et al. 2013). In *C. reinhardtii* werden PHOT-abhängig der sexuelle Lebenszyklus und die Expression von Photosynthese-Genen reguliert (Huang und Beck 2003).

ZEITLUPE -Rezeptoren (ZTL) sind ausschließlich in Landpflanzen vertreten. C-terminal zur LOV-Domäne weisen ZTL eine F-Box-Domäne und sechs Kelch-*Repeats* auf (Ito et al. 2012). F-Box-Domänen vermitteln die Interaktion mit E3-Ubiquitin-Ligasen und regulieren damit die lichtabhängige Degradation von Transkriptionsfaktoren und Komponenten der circadianen Uhr (Kim et al. 2007; Ito et al. 2012). ZTL könne sowohl im Nukleus als auch im Cytosol lokalisiert sein (Takase et al. 2011).

Aureochrome (AUREO) sind spezifisch für Stramenopile, darunter Diatomeen, Xanthophyceae und Phaeophyceae, die aus der sekundären Endosymbiose zwischen einem heterotrophen Eukaryot und einer Rotalge hervorgegangen sind (Abb. 1.2 A, Moustafa et al. 2009; Jungandreas et al. 2014; Petersen et al. 2021). Im Gegensatz zu den anderen Photorezeptortypen weisen AUREOs eine invertierte

Domänenanordnung mit einer C-terminalen photosensorischen LOV-Domäne und einer N-terminalen bZIP (*basic leucine zipper*)-Effektordomäne (Crosson et al. 2003; Dröge-Laser et al. 2018) auf. AUREOs sind lichtaktivierte Transkriptionsfaktoren mit nuklearer Lokalisation (Takahashi et al. 2007; Kroth et al. 2017). Die photoinduzierten Konformationsänderungen der LOV-Domäne übertragen sich auf die bZIP-DNA-Bindedomäne, was die Affinität dieser für die Promotoren der Zielgene erhöht (Takahashi et al. 2007). Die bZIP-Domänen binden als Dimer an ihre Erkennungssequenzen und auch die LOV-Domänen sind zur Dimerisierung befähigt, wie bereits für PHOTs beschrieben wurde (Kao et al. 2008b). Für die Lichtabhängigkeit der Dimerisierung und der LOV-bZIP-Wechselwirkungen gibt es jedoch verschiedene, bisher nicht bewiesene Modelle (Banerjee et al. 2016; Heintz und Schlichting 2016).

1.2.5 BLUF-Photorezeptoren

BLUF-Rezeptoren sind BL-aktivierte Flavoproteine in Prokaryoten und niederen Eukaryoten wie Euglenozoa und Pilzen, können jedoch nicht in Pflanzen gefunden werden (Losi und Gärtner 2011). Die BLUF (*Blue-Light Using Flavin*)-Domäne besitzt einen Ferredoxin-ähnlichen Kern mit einer kompakten Struktur aus α -Helices und β -Faltblättern, in der oxidiertes Flavinadenindinukleotid (FAD) nicht-kovalent gebunden ist (Anderson et al. 2005). Infolge einer BL-Anregung des FAD überträgt ein konserviertes Tyrosin ein Elektron auf FAD. Aufgrund verschobener Elektronendichten löst diese kurzweilige Radikalpaar-Bildung Rotationen in nahegelegenen Aminosäureresten und eine Neuordnung von Wasserstoffbrücken aus, bevor das Radikalpaar rekombiniert. Diese Neuordnung von Wasserstoffbrücken stellt das primäre photochemische Ereignis dar, der FAD-Redoxzustand bleibt im Ruhe- und Signalzustand oxidiert (Gauden et al. 2006). Die Art der Effektordomäne variiert, häufig sind sie als Adenylat-Cyclasen oder Phosphodiesterasen enzymatisch aktiv und an *second messenger*-Signaltransduktionswegen beteiligt (Anderson et al. 2005).

Die Cryptochrom-Photolyase-Familie (CPF) stellt die dritte große Gruppe BL-aktivierter Flavoprotein-Rezeptoren dar und wird im folgenden Kapitel ausführlich beschrieben.

1.3 Die Cryptochrom-Photolyase-Familie

Mitglieder der Cryptochrom-Photolyase-Familie (CPF) sind BL-absorbierende Flavoproteine mit hoher Sequenzhomologie aber diversen Funktionen (Chaves et al. 2011). Photolyasen (PLs) katalysieren die Reparatur UV-Licht-induzierter DNA-Schäden, während Cryptochrome (CRYs) als Photorezeptoren mit Signalfunktion ohne oder mit eingeschränkter DNA-Reparaturaktivität definiert werden (Sancar 2003;

Einleitung

Chaves et al. 2011). Evolutionsgeschichtlich wird angenommen, dass alle heutigen PLs und CRYs aus einem Photolyasevorläufer in Folge mehrerer, unabhängiger Genduplikationen hervorgegangen sind, wobei die CRY-Diversifizierung vor der Spaltung von Pro- und Eukaryoten eingetreten ist (Kanai et al. 1997; Cashmore et al. 1999; Essen et al. 2017). Auf Basis von Sequenzhomologien werden CPF-Vertreter in fünf Gruppen unterteilt (Abb. 1.5):

- 1) Proteobakterielle CPF
- 2) CPDI- und CPDIII- Photolyasen, pflanzliche und pflanzenähnliche Cryptochrome
- 3) (6-4)-Photolyasen, tierische und tierähnliche Cryptochrome
- 4) CPDII-Photolyasen
- 5) CRY-DASH

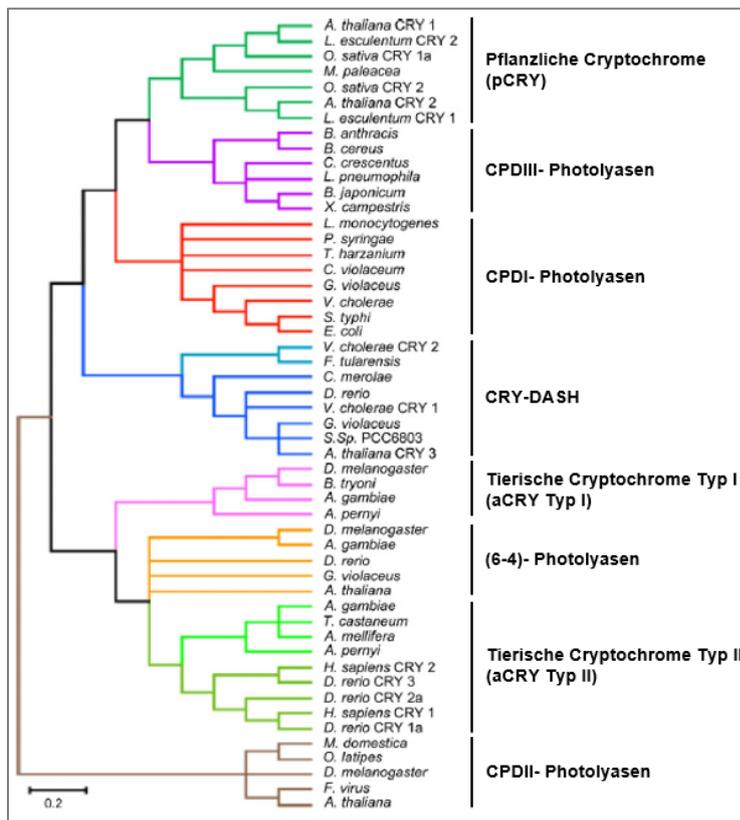


Abb. 1.5: Phylogenetischer Stammbaum der Cryptochrom-Photolyase-Familie. Verändert nach Kavakli et al. (2017).

Gemeinsames Strukturmerkmal aller CPF-Vertreter ist die Sensordomäne (*Photolyase homologous region*, PHR), die sich aus einer N-terminalen α/β - und einer C-terminalen α -helikalen Subdomäne zusammensetzt (Abb. 1.6; Sancar 2003). Die α -helikale Subdomäne bildet in Form einer tiefen Grube die FAD-Bindetasche, die sich teils aus konservierten, teils aus nicht-konservierten AS zusammensetzt

Einleitung

(Park et al. 1995; Sancar 2003; Brautigam et al. 2004). Die FAD-Bindung wird über ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken stabilisiert, wobei FAD eine U-förmige Konformation einnimmt, in der die Isoalloxazin- und Adenin-Ringsysteme parallel gestapelt sind (Abb. 1.7 A).

Darüber hinaus können die einzelnen CPF-Gruppen unterschiedliche Antennenchromophore in Form eines Folat- oder Flavin-Derivats in einer exponierten, weniger konservierten Tasche zwischen den beiden Subdomänen nicht-kovalent binden. Am häufigsten werden 5,10-Methenyltetrahydropteracylpolyglutamat (Methenyltetrahydrofolat, MTHF) oder 8-Hydroxy-5-Desazariboflavin (8-HDF) gebunden (Abb. 1.7 B).

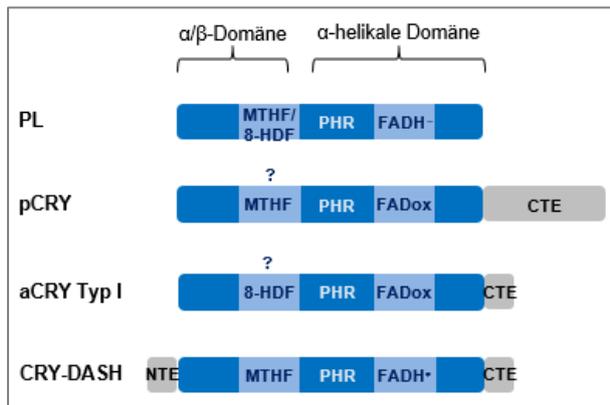


Abb. 1.6: Strukturvergleich von Photolyasen und Cryptochromen. Dargestellt sind je die PHR-Domänen (*Photolyase homologous region*, blau) mit den daran gebundenen Chromophoren und mögliche C- bzw. N-terminale-Erweiterungen (CTE, NTE, grau). Die jeweiligen FAD-Redoxformen bezeichnen die angenommenen Ruheformen. *MTHF* Methenyltetrahydrofolat; *8-HDF* 8-Hydroxy-5-Desazariboflavin; *PL* Photolyasen; *pCRY* pflanzliche CRYs, *aCRY* tierische CRYs.

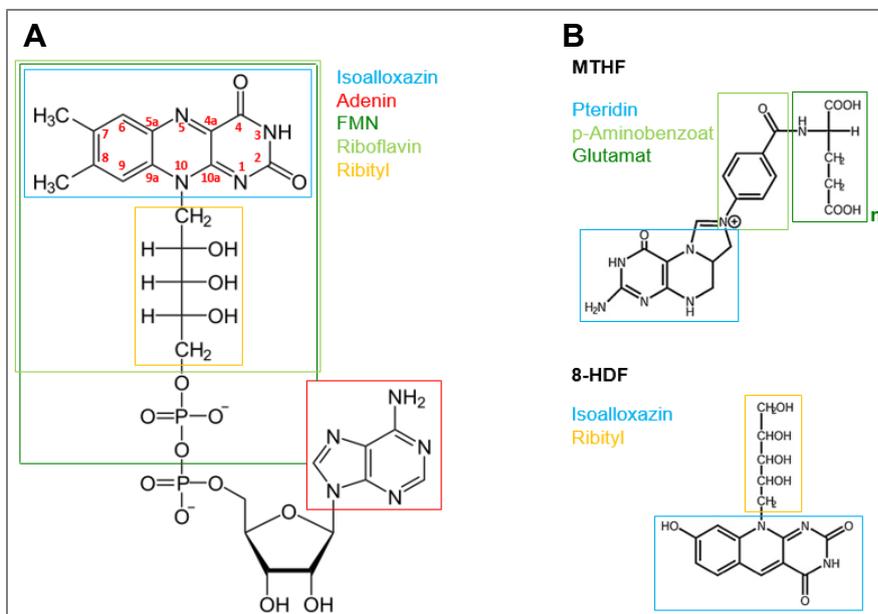


Abb. 1.7: Chemische Struktur von FAD, MTHF und 8-HDF. (A) FAD setzt sich aus Riboflavin und Adenosindiphosphat zusammen. Es weist eine U-Konformation auf, in der die Isoalloxazin- und Adenin-Ringsysteme parallel gestapelt sind. (B) Viele CPF-Mitglieder binden ein Antennenchromophor, i.d.R. in Form von MTHF oder 8-HDF. Verändert nach Brazard et al. (2012).

1.3.1 Die FAD-Photochemie

FAD setzt sich aus Riboflavin und Adenosindiphosphat zusammen (Abb. 1.7). Maßgebend für das Absorptionsverhalten ist der aromatische, heterozyklische Isoalloxazinring (Losi 2007; Kritsky et al. 2010; Losi und Gärtner 2011). Dieser kann an den Positionen N1 und N5 in zwei Schritten reduziert werden, sodass FAD in den Redoxstufen oxidiert, semireduziert oder vollreduziert vorliegen kann. Zudem kann jede Redoxstufe abhängig vom Protonierungsgrad kationisch, anionisch oder neutral geladen sein (Abb. 1.8 A). In der CPF nachweisbar sind das oxidierte FADox, das semireduzierte Anionradikal FAD^{•-} bzw. Neutralradikal FADH[•] oder das zweielektronenreduzierte FADH⁻, die anhand ihres Absorptionsverhaltens unterschieden werden können (Abb. 1.8 B; Liu et al. 2010).

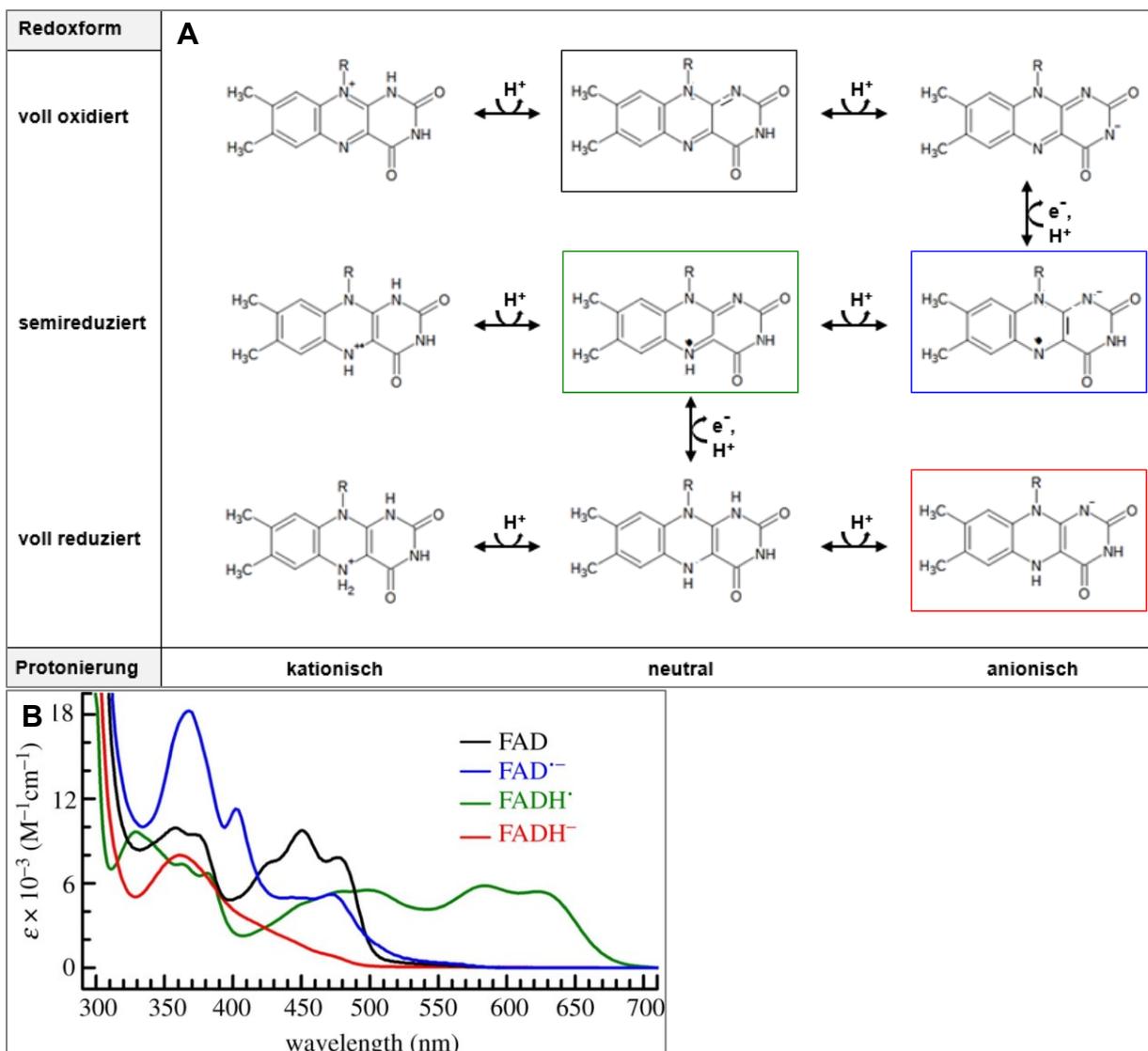


Abb. 1.8: FAD-Redox- und Protonierungsformen. (A) FAD kann in den Redoxstufen oxidiert, semireduziert und vollreduziert vorliegen. Jede Redoxstufe kann abhängig vom Protonierungsgrad kationisch, neutral oder anionisch geladen sein. **(B)** Die vier in Photolyasen und Cryptochromen nachweisbaren FAD-Redoxformen können anhand ihres Absorptionsverhaltens unterschieden werden (Liu et al. 2010). *Schwarz* FADox, *blau* semireduziertes Anionradikal FAD^{•-}, *grün* semireduziertes Neutralradikal FADH[•], *rot* zweielektronenreduziertes FADH⁻.

Einleitung

Unter *in vitro*- Bedingungen, ausgehend vom oxidierten FADox, ist die FAD-Exzitation entweder direkt durch die FAD-Absorption oder indirekt durch Resonanzenergietransfer des Antennenchromophors (Abb. 1.10, 1). Im angeregten Zustand sind oxidierte Flavine aufgrund eines erhöhten Reduktionspotentials starke Oxidationsmittel (Losi und Gärtner 2011). Unter *in vitro*- Bedingungen wirkt dabei eine konservierte Tryptophan-Triade, die das Protein vom FAD bis zur Oberfläche durchspannt, als proteinintrinsische Elektronendonorkette (Abb.1.10, 2). Bei (6-4)-PLs und tierischen CRYs ist die Triade zu einer aromatischen Tetrade erweitert (Müller et al. 2015; Nohr et al. 2016; Kutta et al. 2018). Um das FAD^{•-}/ W_{3/4}H^{•+}-Radikal, bestehend aus dem photoreduzierten FAD^{•-} und dem terminalen oberflächenexponierten W₃H^{•+} bzw. W₄H^{•+}, gegen interne Elektronenrekombination zu stabilisieren, wird W₃H^{•+} bzw. W₄H^{•+} vom Lösemittel oder umgebenden AS deprotoniert (Abb. 1.10, 3; Kavakli und Sancar 2004; Immeln et al. 2012). Abhängig von der CPF-Gruppe erfolgen verschiedene weitere FAD-Reduktions- und Protonierungsschritte. Entscheidend dafür ist die AS, die in direktem Kontakt zur FAD-N5-Position liegt. In pflanzlichen CRYs liegt ein Aspartat gegenüber zu FAD-N5. Dieses wirkt als direkter Protonendonator bzw. -akzeptor, sodass das semireduzierte Neutralradikal FADH[•] das primäre FAD-Photoprodukt darstellt (Abb. 1.10, 4a; Giovani et al. 2003). In PLs, tierähnlichen CRYs und CRY-DASHs liegt ein Asparagin an äquivalenter Position; die Protonen zur Bildung von FADH[•] stammen aus dem Lösemittel (Abb. 1.10, 4a; Kavakli und Sancar 2004; Brazard et al. 2010; Biskup et al. 2011). Tierische CRYs Typ I weisen ein Cystein gegenüber FAD-N5 auf, was eine weitere Protonierung und Reduktion des Anionradikals FAD^{•-} verhindert (Abb. 1.10, 4b; Song et al. 2007; Öztürk et al. 2008). In allen CPF-Mitgliedern, mit Ausnahme der tierischen CRYs Typ I, kann ein weiterer FAD-Reduktionsschritt folgen, bei dem ein externes Reduktionsmittel als Elektronendonator wirkt (Abb. 1.10, 5; Kavakli und Sancar 2004; Banerjee et al. 2007).

Unter *in vivo*- Bedingungen werden in den einzelnen CPF-Gruppen verschiedene dunkeladaptierte Ruheformen in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der FAD-Bindetasche, insbesondere der FAD-N5 proximalen Position, und des zellulären Redoxpotentials stabilisiert (Abb. 1.9). Daher durchlaufen die einzelnen CPF-Mitglieder nicht immer die komplette beschriebene FAD-Reduktionskette.

Die FAD-Reduktion wird für CRYs als primäres photochemisches Ereignis betrachtet, die Mechanismen der folgenden Proteinkonformationsänderungen und Signalwege sind vielfältig oder nicht bekannt.

Einleitung

Redoxform	oxidiert	semireduziert		vollreduziert
	FADox	FAD ^{•-}	FADH [•]	FADH ⁻
Photolyasen				Ruhe- und Katalyseform
pCRY	Dunkelform		Signalform	inaktiv
aCRY Typ I	Dunkelform	Signalform		
CRY-DASH			Dunkelform	Signal- und Katalyseform

Abb. 1.9: Übersicht über die FAD-Redoxzustände in den angenommenen Ruhe- und Signalformen der verschiedenen CPF-Gruppen.

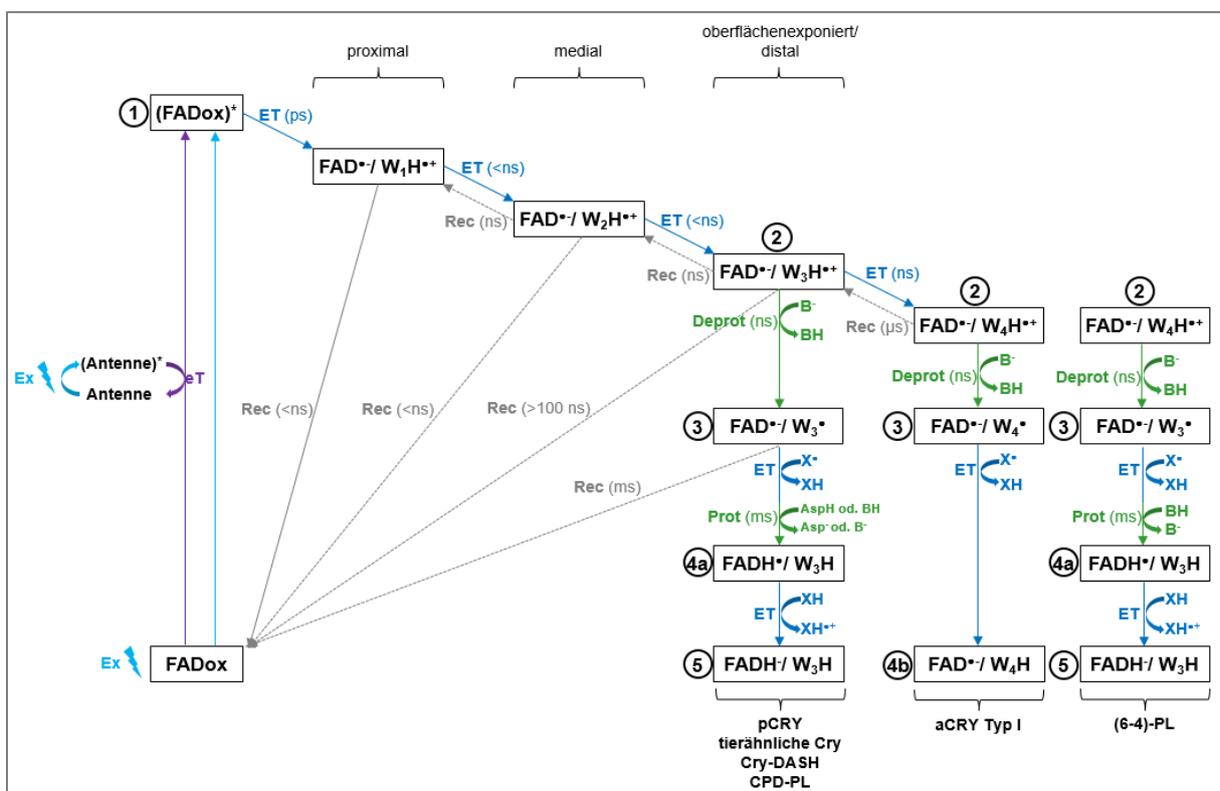


Abb. 1.10: Die FAD-Reduktion in den einzelnen CPF-Gruppen. Unter *in vitro*-Bedingungen können die Proteine einzelner CPF-Gruppen verschiedene photoinduzierte FAD-Redoxformen annehmen. Ausgehend von FADox können PLs, pCRYs, tierähnliche CRYs und Cry-DASHs in zwei Schritten über FADH[•] zu FADH⁻ reduziert werden, während aCRYs Typ I zu FAD^{•-} reduziert werden. *Blaue Pfeile/ ET* Elektronentransfer, *grüne Pfeile/ (De)Prot* (De)Protonierung, *graue Pfeile/ Rec* Elektronenrekombination, *B* externer Protonendonator/ -akzeptor, *X* externer Elektronendonator/ -akzeptor, *eT* Energietransfer, *Ex* Photoexzitation, *W₃* und *W₄* distale, terminale Elektronendonoren der kanonischen Trp-Triade.

1.3.2 Photolyasen

Eine Bestrahlung mit hochenergetischem UV-A/B-Licht (280-380 nm) kann DNA-Schäden in Form von Pyrimidindimeren induzieren. Dabei entstehen Pyrimidin-Cyclobutan (Pyr<>Pyr)- oder Pyrimidin-Pyrimidon(6-4) (Pyr[6-4]Pyr)- Photoprodukte (Abb. 1.11 A). Während der Photoreaktivierung

Einleitung

katalysieren Photolyasen (PLs) BL-abhängig in einem zyklischen, nicht-reduktiven Elektronentransfer die Reparatur dieser Schäden. Abhängig vom Substrat werden sie in CPD- und (6-4)-PLs unterteilt und weisen einen ähnlichen Katalysemechanismus auf (Abb. 1.11 B und C; Zhao et al. 1997; Thompson und Sancar 2002; Sancar 2003). Das DNA-Substrat wird strukturspezifisch und lichtunabhängig in einer Grube der α -helikalen Domäne gebunden, an deren Ende die FAD-Bindetasche liegt. Der Enzym-Substrat-Komplex wird dabei durch ionische Wechselwirkungen zwischen dem Phosphatrückgrat und der positiven Oberflächenladung der Grube stabilisiert, sodass das dimere Photoprodukt aus der Doppelhelix ausdreht und in direkten Kontakt zum FAD tritt. FAD liegt stabil als vollreduziertes FADH^- vor und wird infolge von BL-Bestrahlung (350-450 nm) entweder direkt oder durch einen Resonanzenergietransfer vom Antennenchromophor angeregt. $(\text{FADH}^-)^*$ als potenter Elektronendonator überträgt ein Elektron auf das Photoprodukt, woraufhin die Dimerbindung bricht und das Elektron zurück auf FAD übertragen wird. Der Elektronentransfer ist demnach zyklisch, sodass für die Wiederherstellung des katalytisch aktiven FADH^- keine externen oder proteinintrinsischen Elektronendonoren nötig sind (Li et al. 1991; Kavakli und Sancar 2004).

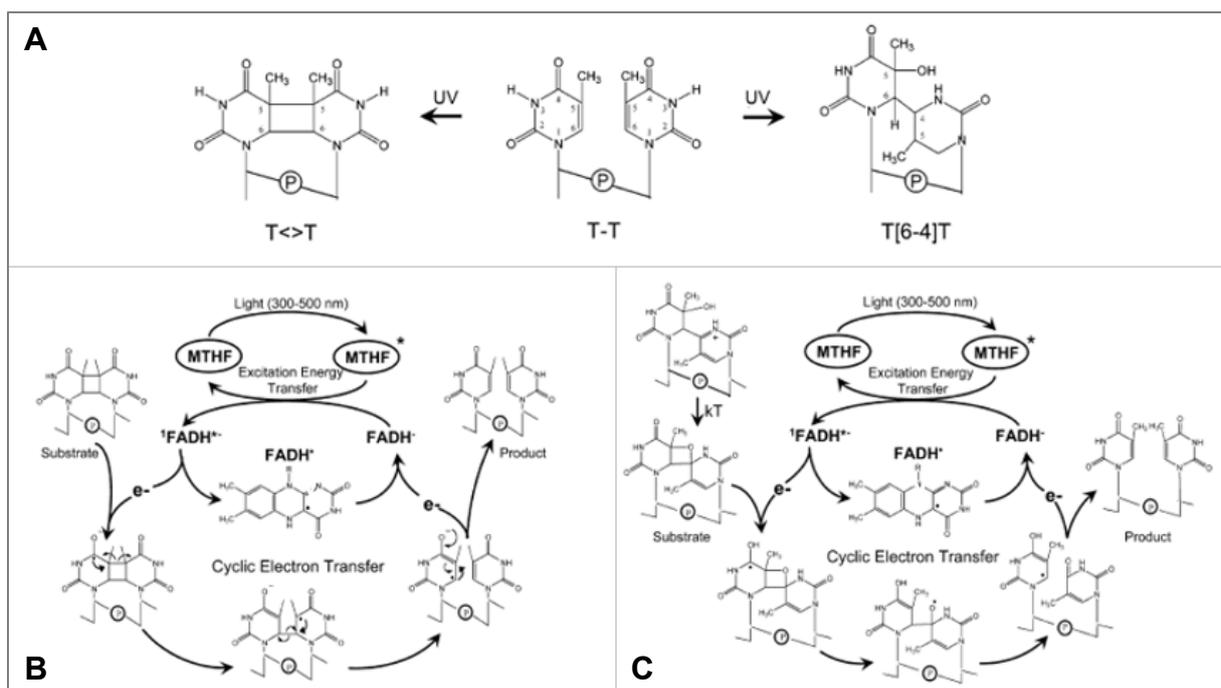


Abb. 1.11: UV-induzierte DNA-Photoprodukte und Photolyase-Reaktionsmechanismus. (A) Eine UV-Bestrahlung (200-300 nm) kann zwischen benachbarten Pyrimidinen die Bildung von Pyrimidin-Cyclobutan-Dimeren (B) oder Pyrimidin-Pyrimidon (6-4)-Photoprodukten (C) induzieren. Die Reparatur wird BL-abhängig von CPD-Photolyasen (B) oder (6-4)-Photolyasen (C) katalysiert. Verändert nach Sancar (2003).

1.3.3 Cryptochrome

Cryptochrome (CRYs) sind ubiquitär in allen Domänen, jedoch nicht obligatorisch in allen Organismen verbreitet (Sancar 2003; Chaves et al. 2011). Strukturell unterscheiden sich CRYs von PLs in einer intrinsisch unstrukturierten C-terminalen Erweiterung (CTE), die in Länge und Sequenz variiert, und in der FAD-Bindetasche, die eine Stabilisierung des Kofaktors in unterschiedlichen Redoxformen ermöglicht. Im Gegensatz zu sonstigen Photorezeptoren können für CRYs keine deutlich trennbaren Sensor- und Effektordomänen eingegrenzt werden. Die Mechanismen der Photosignaltransduktion innerhalb von CRYs und in nachgeschalteten Signalwegen sind so vielfältig wie ihre Verbreitung und müssen empirisch analysiert werden.

CRYs wurden erstmals als **pflanzliche Cryptochrome (pCRYs)** in *A. thaliana* identifiziert (Ahmad und Cashmore 1993). pCrys sind aus CPD-PLs hervorgegangen und weisen eine verhältnismäßig lange CTE von über 100 bis 500 AS auf. Zu den bestcharakterisierten pCrys gehören heute *A. thaliana* CRY1 und CRY2 (AtCRY1 und AtCRY2) sowie *C. reinhardtii* CPH1 (CrCPH1). Nach heterologer Aufreinigung binden pCRYs FADox, das auch als Ruheform unter *in vivo*- Bedingungen betrachtet wird (Reisdorph und Small 2004; Zeugner et al. 2005; Banerjee et al. 2007; Bouly et al. 2007; Immeln et al. 2007; Langenbacher et al. 2009; Herbel et al. 2013; Müller et al. 2014; Hense et al. 2015; Thöing et al. 2015; Schroeder et al. 2018). Sekundäre Chromophore wurden bisher nicht koisoliert, *in vivo*- Aktionsspektren lassen die Bindung von MTHF vermuten (Malhotra et al. 1995; Hoang et al. 2008a; Goett-Zink und Kottke 2021). AtCRY1 und AtCRY2 sind nukleocytoplasmatische Proteine (Wu und Spalding 2007; Yu et al. 2007a). Infolge von BL-Belichtung wird das semireduzierte Neutralradikal FADH[•], das durch die Bindung von ATP stabilisiert wird, als Signalform gebildet (Immeln et al. 2007; Burney et al. 2009; Müller et al. 2014). Über nicht geklärte Mechanismen führt die FAD-Reduktion zu einer proteinintrinsischen Konformationsänderung, bei der die CTE ihre Bindung an die PHR löst, und zur Homooligomerisierung (Partch et al. 2005; Sang et al. 2005; Kottke et al. 2006; Thöing et al. 2015). Unterstützt wird die Strukturänderung durch eine BL-induzierte PHR-(Auto-) Phosphorylierung sowie Phosphorylierungen an der CTE (Shalitin et al. 2003; Bouly et al. 2003; Immeln et al. 2007; Yu et al. 2007a; Yu et al. 2007b). Die Konformationsänderungen legen Interaktionsflächen in der PHR und CTE für nachgeschaltete Transkriptionsfaktoren und -modulatoren frei, sodass pCrys indirekt BL-induzierte Änderungen der Transkription und damit Wachstums- und Entwicklungsprozesse regulieren (Abb. 1.12; Chaves et al. 2011). In *A. thaliana* wirken AtCRY1 und AtCRY2 u.a. als Inhibitoren für die COP1-SPA-vermittelte Degradation der Transkriptionsfaktoren HY5 und CONSTANS, was BL-abhängig zur Inhibition des Hypokotyl-Wachstums bzw. zur Förderung der Blütenbildung und Stomataöffnung führt (Wang et al. 2001; Yang et al. 2001; Mao et al. 2005; Kang et al. 2009; Liu et al. 2011a; Zuo et al. 2011).

PCRYs sind demnach keine integralen Photorezeptoren der circadianen Uhr, weder im *Input*-Signalweg noch als Kernkomponenten (Chaves et al. 2011).

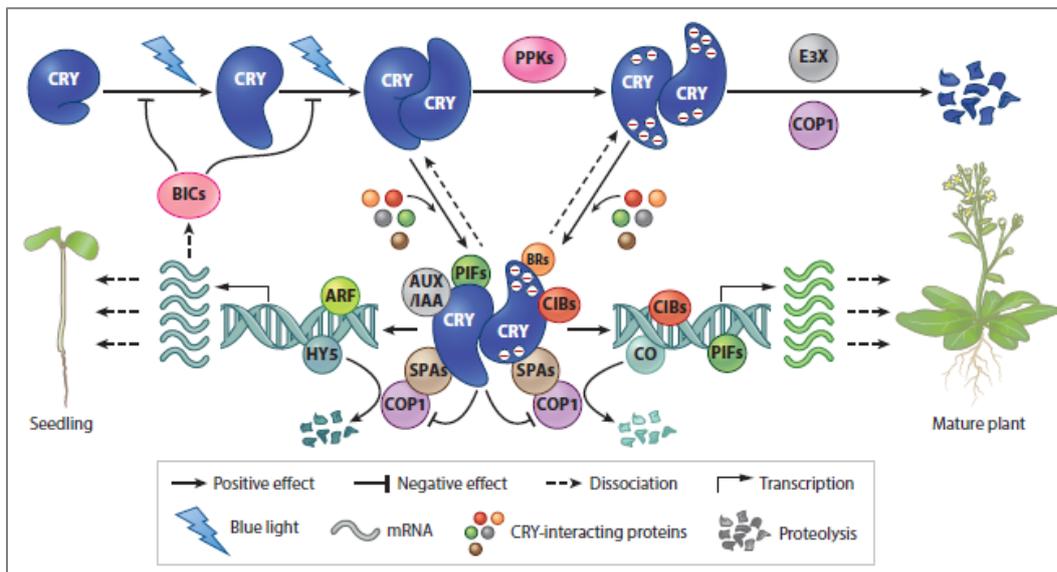


Abb. 1.12: Photoaktivierung, Signalwege und Inaktivierung pflanzlicher Cryptochrome in *A. thaliana*. Infolge von BL-Belichtung werden AtCRY1 und AtCRY2 durch eine Konformationsänderung und Homooligomerisierung aktiviert (Photoaktivierung), was die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren ermöglicht. Die CRY-COP1-SPA-Interaktion führt zur Inhibition der COP1-SPA-vermittelten Degradation der Transkriptionsfaktoren CO und HY5. Die CRY-CIB-Interaktion aktiviert die Transkription des *flowering locus T*-Gens. Die PIF und AUX-IAA-vermittelte Transkriptionsaktivierung wird durch AtCRY1 und AtCRY2 inhibiert. In miteinander vernetzten Transkriptionsaktivierungs- und Inhibierungswegen stimulieren AtCRY1 und AtCRY2 BL-abhängig Blütenbildung, Stomataöffnung, Kotyledonenentwicklung und inhibieren das Hypokotylwachstum. PPK-vermittelte Phosphorylierungen unterstützen die BL-induzierte AtCRY2- Ubiquitinierung und Degradation über das 26S-Proteasom. Beide CRYs werden durch eine BIC-vermittelte Inhibition der Homooligomerisierung inaktiviert. *AUX/IAA* auxin/indole-3-acetic acid, *ARFs* auxin response factors, *BIC* blue-light inhibitor of cryptochromes, *BR* brassinosteroid regulator, *CIB* cryptochrome-interacting basic helix-loop-helix, *CO* CONSTANS, *COP1* CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1, *CRY* cryptochrome, *E3X* unknown E3 ubiquitin ligases, *HY5* LONG HYPOCOTYL 5, *PIF* phytochrome-interacting factor, *PPK* photoregulatory protein kinase, *SPA* suppressor of phytochrome A (Wang und Lin 2020).

Tierische Cryptochrome (aCRYs) sind aus (6-4)-PLs hervorgegangen und weisen im Vergleich zu pCrys eine kürzere CTE von unter 100 AS auf. Abhängig von ihrer Funktionsweise werden aCrys in Typ I und Typ II unterteilt.

ACrys Typ I sind die primären BL-abhängigen Photorezeptoren zur Synchronisation der circadianen Uhr (Abb. 1.13; Emery et al. 1998; Stanewsky et al. 1998). Das bestuntersuchte Modellprotein ist DmCRY aus *Drosophila melanogaster* (Emery et al. 1998). Im dunkeladaptierten Ruhezustand liegt DmCRY in einer inaktiven geschlossenen Konformation vor, in der die CTE um die FAD-Bindetasche in der PHR anliegt und FAD oxidiert ist (Zoltowski et al. 2011; Czarna et al. 2013; Vaidya et al. 2013; Lin et al. 2018). Eine BL-Belichtung führt zur Reduktion von FADox zum semireduzierten Anionradikal FAD•⁻ (Berndt et al. 2007; Öztürk et al. 2008). Dies induziert eine Neuordnung von Wasserstoffbrücken rund um den

anionischen FAD-Kofaktor, wodurch sich die CTE von der PHR löst und Interaktionsflächen an der PHR für nachgeschaltete Signalkomponenten der circadianen Uhr freigibt (Özturk et al. 2009; Ganguly et al. 2016; Lin et al. 2018).

Der circadiane Mechanismus von *D. melanogaster* basiert auf einer lichtunabhängigen negativen Transkriptions-Translations-Rückkopplungsschleife, in der die CYCLE-CLOCK aktivierte Transkription E-Box kontrollierter Gene durch das TIM-PER-Heterodimer reprimiert wird. DmCRY bindet BL-abhängig an TIM und unterbindet damit dessen Repressorfunktion. Somit synchronisiert DmCRY die negative Rückkopplung mit dem äußeren Tag-Nacht-Rhythmus (Ceriani et al. 1999; Stanewsky 2002; Koh et al. 2006; Peschel et al. 2009; Lin et al. 2001; Özturk et al. 2013). Gleichzeitig werden sowohl DmCRY als auch TIM BL-abhängig über das Proteasom abgebaut (Busza et al. 2004; Koh et al. 2006; VanVickle-Chavez und van Gelder 2007; Peschel et al. 2009; Özturk et al. 2013).

Eine weitere Funktion, die aCrys Typ I zugeschrieben wird, ist die Orientierung am Erdmagnetfeld durch lichtabhängige Magnetoperzeption. CRYs könnten geeignete Magnetorezeptoren aufgrund der Bildung paramagnetischer Triplet-Anregungszustände darstellen (Gegear et al. 2008).

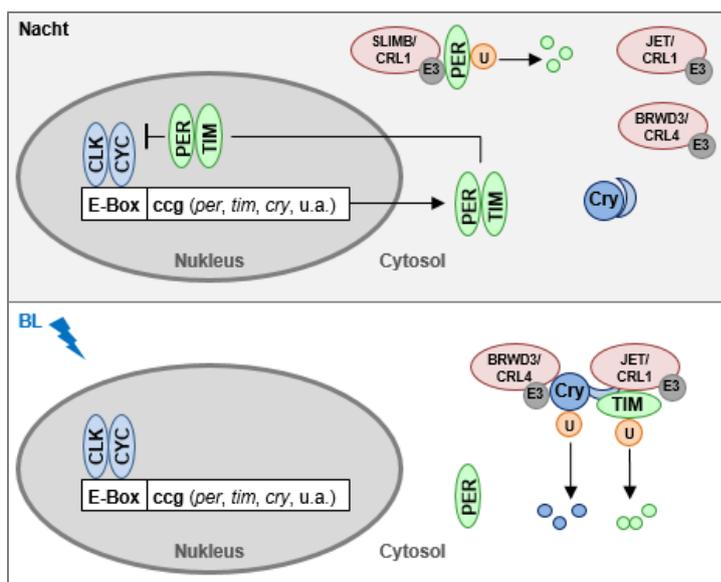


Abb. 1.13: Tierische Cryptochrome Typ I als BL-abhängige Photorezeptoren zur Synchronisation der circadianen Uhr in *D. melanogaster*. Abends bindet das CLOCK-CYCLE-Heterodimer im Nucleus an E-Box-Erkennungssequenzen im Promotor von circadian regulierten Genen und aktiviert damit deren Transkription, darunter *period* (*per*), *timeless* (*tim*) und *cry*. In der späten Nacht reprimieren die Genprodukte PER und TIM als Heterodimer im Nucleus die CLK-CYC-induzierte Transkription und damit ihre eigene Expression. Die negative Rückkopplung wird zudem durch den Proteasom-vermittelten PER-Abbau verstärkt. Eine BL-Belichtung aktiviert DmCRY, das nun an TIM bindet und damit dessen Repressorfunktion unterbindet. Sowohl DmCRY als auch TIM werden BL-induziert über das Proteasom abgebaut. CLK circadian locomotor output cycles kaput, CYC CYCLE, PER PERIOD, TIM TIMELESS, *ccg* clock-controlled genes, SLIMB/CRL1 E3-Ligase-Substrat-Rezeptor, JET/CRL4 E3-Ligase-Substrat-Rezeptor, BRWD3/CRL4 E3-Ligase-Substrat-Rezeptor, E3 Protein-Ubiquitin-Ligase, U Ubiquitinierung.

Im Gegensatz zu aCry^s Typ I werden **aCry^s Typ II** als lichtunabhängige Transkriptionsrepressoren innerhalb des Kern-Oszillators der circadianen Maschinerie betrachtet (Abb. 1.14; Okamura et al. 1999; van der Horst et al. 1999; Vitaterna et al. 1999; Shearman et al. 2000; Hirayama et al. 2003). ACry^s Typ II sind vor allem in Säugern vertreten, wobei MmCRY1 und MmCRY2 aus *Mus musculus* und HsCRY1 und HsCRY2 aus *Homo sapiens* am besten untersucht sind. In einer lichtunabhängigen negativen Transkriptions-Translations-Rückkopplung wirkt CRY im Dimer mit PER als Repressor für die CLOCK-BMAL1-aktivierte Transkription E-Box-kontrollierter Gene (Gekakis et al. 1998; Hogenesch et al. 1998). Da die CRYs hier als lichtunabhängige Kern-Oszillator-Komponenten wirken, wird angenommen, dass sie sich bereits im Grundzustand in einer aktiven Konformation befinden. Dabei bieten sowohl die PHR als auch die CTE Interaktionsflächen für die weiteren Oszillator-Faktoren (Chaves et al. 2006; van der Schalie et al. 2007; Langmesser et al. 2008; Ozber et al. 2010; Xing et al. 2013).

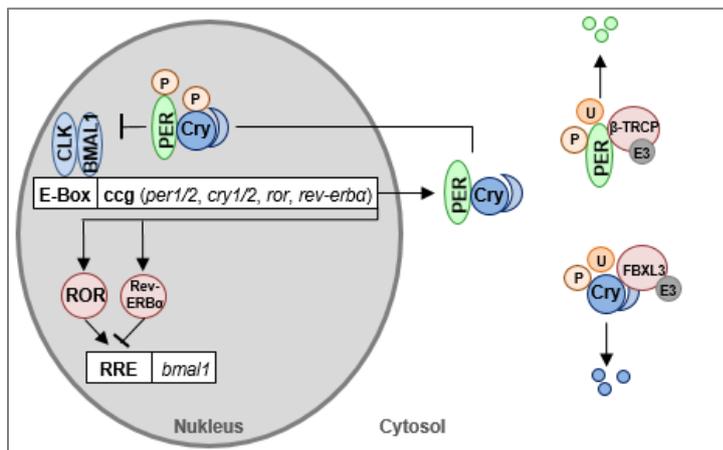


Abb. 1.14: Tierische Cryptochrome Typ II als lichtunabhängige Transkriptionsrepressoren des circadianen Kern-Oszillators in Säugern. Im Kern-Oszillator von Säugern aktiviert das CLOCK-CYCLE-Heterodimer die Transkription von E-Box- regulierten Genen, darunter *period* (*per*), *cry*, *ror* und *Rev-erba*. Durch Kasein-Kinase-vermittelte Phosphorylierungen wird das PER-CRY-Heterodimer in den Nucleus überführt, wo es die CLK-BMAL1-induzierte Transkription und damit die eigene Expression reprimiert. Die negative Rückkopplung wird zudem durch den Proteasom-vermittelten PER- und CRY-Abbau verstärkt. In einer zweiten Rückkopplungsschleife konkurrieren ROR bzw. Rev-ERBa um die Bindung an den *bmal1*- Promoter, wobei ROR aktivierend und Rev-ERBa reprimierend auf die BMAL1-Expression wirkt. Dies führt zu einer zeitlichen Verzögerung der CLK-BMAL1-induzierten Transkription, um den circadianen Rhythmus zu takten. CLK circadian locomotor output cycles kaput, BMAL1 brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)-like protein 1, PER PERIOD, ROR und Rev-ERBa retinoid- related orphan receptors, RRE retinoid-related orphan receptor response elements, ccg clock-controlled genes, beta-TRCP E3-Ligase-Substrat-Rezeptor, FBXL3 E3-Ligase-Substrat-Rezeptor, E3 Protein-Ubiquitin-Ligase, U Ubiquitinierung, P Phosphorylierung.

CRY-DASHs wurden erstmals 2003 mit AtCRY3 in *A. thaliana* und SynCRY-DASH in *Synechocystis sp.* identifiziert (Brudler et al. 2003). Die Benennung basiert auf der nahen Verwandtschaft mit aCRYs und (6-4)-PLs (*Drosophila-Arabidopsis-Synechocystis-Homo*). CRY-DASHs können in Bakterien, Cyanobakterien und Pilzen bis hin zu Pflanzen und aquatischen Vertebraten nachgewiesen werden

Einleitung

(Daiyasu et al. 2004). CRY-DASHs ähneln strukturell am meisten CPDI-PLs in Bezug auf die positive Oberflächenladung rund um die FAD-Bindetasche, die die Substrat-Bindung in PLs ermöglicht (Kleine et al. 2003). In diesem Zusammenhang wurde in *in vitro*-Ansätzen eine Bindung an und Reparatur von CPD-Dimeren in einzelsträngiger ssDNA nachgewiesen, weshalb CRY-DASHs als CPD-PLs für ssDNA angesehen werden (Selby und Sancar 2006; Pokorny et al. 2008).

Neben einer CTE können CRY-DASHs eine N-terminale Erweiterung (NTE) von 40 bis 50 AS aufweisen, die in AtCRY3 den Import in Chloroplasten und Mitochondrien vermittelt (Kleine et al. 2003; Huang et al. 2006; Klar et al. 2007). Auch für CRY-DASH-Proteine aus *Karenia brevis* und *C. reinhardtii* (CrCRY-DASH1) wurde eine Chloroplasten-Lokalisation gezeigt, während in *Trypanosoma* die Lokalisation im Mitochondrium nachgewiesen wurde (Brunelle et al. 2007; Agalarov et al. 2011; Carolaing Gabaldón et al. 2010; Rredhi et al. 2021).

CRY-DASHs wird zusätzlich eine Photorezeptorfunktion zugeschrieben. Diese Funktion wird auf (post-) translationaler Ebene ausgeübt, da Unterschiede zum Wildtyp in Mutanten nicht in veränderten Transkriptlevels, sondern in veränderten Proteinkompositionen gefunden werden (Castrillo et al. 2013; Castrillo et al. 2015; Vass et al. 2014; Wang et al. 2017; Rredhi et al. 2021). So beeinflusst CrCRY-DASH1 die Synthese von Thylakoidmembranen, Photosyntheseproteinen und -pigmenten in Übereinstimmung mit seiner plastidiären Lokalisation (Rredhi et al. 2021). Eine Repression von CLK-BMAL1-aktivierten Transkriptionen konnte nicht nachgewiesen werden (Daiyasu et al. 2004).

CRY-DASH-Proteine werden i.d.R. mit MTHF isoliert, das einzige Antennenchromophor, das bisher in dieser Gruppe gefunden wurde (Daiyasu et al. 2004; Huang et al. 2006; Song et al. 2006; Klar et al. 2007; Rredhi et al. 2021). Die FAD-Redoxformen in isolierten Proteinen sind vielfältig. Während CrCRY-DASH1 mit FADH⁻ aufgereinigt wird, liegt in den CRY-DASHs aus *Danio rerio* und *Xenopus laevis* eine Mischung aus FADox und FADH[•] und in AtCRY3 aus FADox und FADH⁻ vor (Daiyasu et al. 2004; Song et al. 2006; Rredhi et al. 2021). Aufgrund der Photolyase-Aktivität wird für *in vivo*- Bedingungen der vollreduzierte Zustand FADH⁻ als Ruhe- und Katalyseform betrachtet. Für die Ausübung der Photorezeptorfunktion wird auch die oxidierte und semireduzierte Form als Ruheform erwogen, sodass CRY-DASH-Proteine in Abhängigkeit von den jeweiligen externen Lichtbedingungen und der zellulären Redoxumgebung eine duale Funktion als Photolyase oder Photorezeptor ausüben können (Kiontke et al. 2020).

Eine weitere CRY-Gruppe mit dualer Funktion sind **tierähnliche CRYs**. Diese sind am nächsten zu (6-4)-PLs und aCRYs verwandt. Wie aCRYs weisen tierähnliche CRYs eine kurze CTE auf und werden mit FADox isoliert, können jedoch lichtabhängig bis zum vollreduzierten FADH⁻ überführt werden (Beel et al. 2012; Franz et al. 2018). Die drei bestcharakterisierten tierähnlichen CRYs aus *P. tricornutum* (PtCPF1), *Ostreococcus tauri* (OtCPF1) und *C. reinhardtii* (CrCRY) wirken als (6-4)-PLs unter *in vitro*-

und *in vivo*- Ansätzen (Coesel et al. 2009; Heijde et al. 2010; Franz et al. 2018). Darüber hinaus wirken alle der genannten CRYs als Photorezeptoren. PtCPF1 reguliert BL-abhängig, CraCRY BL- und RL-abhängig die Transkription (Coesel et al. 2009; Beel et al. 2012; Franz et al. 2018). OtCPF1 wirkt beim *Input*-Signalweg der circadianen Maschinerie (Heijde et al. 2010).

1.4 Photorezeptoren in *P. tricornutum*

Aufgrund der besonderen Lichtverhältnisse in aquatischen Habitaten weisen die Mikroalgen des marinen Phytoplanktons spezialisierte Photorezeptoren auf (Hegemann 2008; Jaubert et al. 2017). Dazu gehören die Stramenopilen-spezifischen Aureochrome sowie die Vielzahl an CRYs, darunter CRYs mit dualer Funktion wie CRY-DASHs und tierähnliche CRYs, sowie pflanzenähnliche CRYs.

Die Genomanalyse von *P. tricornutum* gibt Hinweis auf ein PHY, ein Heliorhodopsin, drei AUREOs Typ I-Isoformen, ein AUREO Typ II sowie vier CRYs (vgl. Anhang Abb. A1; Bowler et al. 2008). Gleichzeitig können für *P. tricornutum*, wie für Diatomeen allgemein, keine homologen Komponenten zu bekannten Signaltransduktionskaskaden gefunden werden. Unter den annotierten CRYs sind zwei CRY-DASHs, ein tierähnliches CRY mit dualer Funktion sowie ein pflanzenähnliches CRY. Von diesen annotierten Photorezeptoren wurden das PHY PtDPH1, die AUREOs PtAUREO1a, -1b, 1c und PtAUREO2 sowie PtCPF1 mit dualer Funktion charakterisiert (Abb. 1.15; Coesel et al. 2009; Huysman et al. 2013; Fortunato et al. 2016).

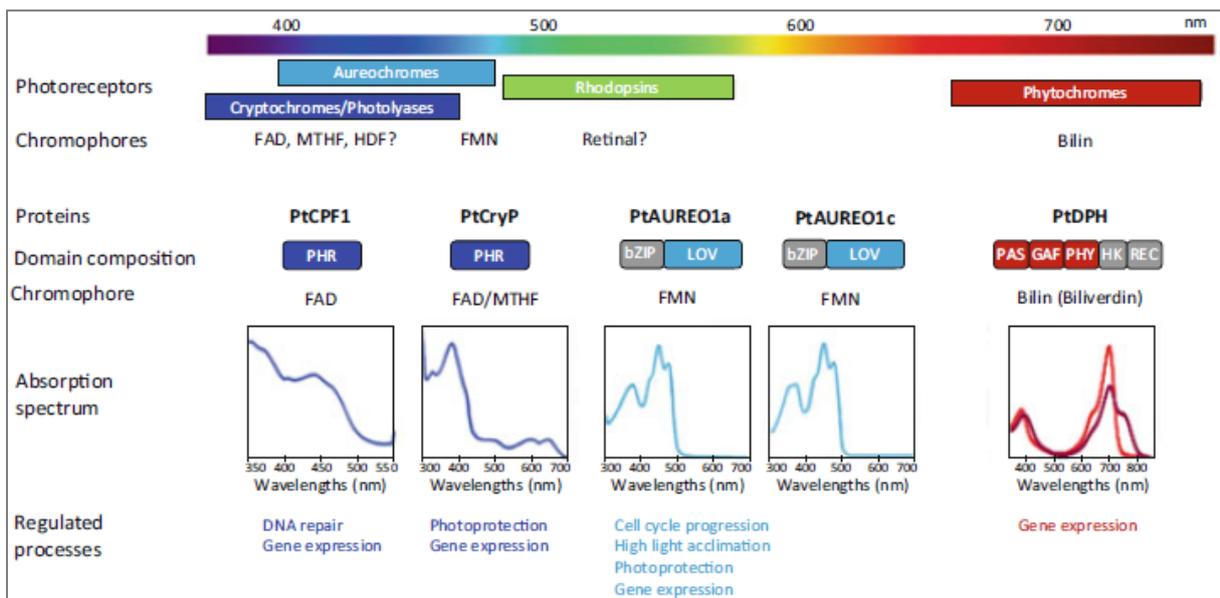


Abb. 1.15: Photorezeptoren in *P. tricornutum*. Entsprechend der Genomanalyse enthält *P. tricornutum* ein Phytochrom, ein Heliorhodopsin, vier Aureochrome und vier Cryptochrome. Von diesen wurde das Phytochrom PtDPH1, die Aureochrome PtAUREO1a, -1b und -1c sowie das tierähnliche Cryptochrom PtCPF1 bereits charakterisiert. PtCryP gehört zur vergleichsweise neu definierten Gruppe pflanzenähnlicher Cryptochrome. Verändert nach Jaubert et al. in Falciatore und Mock 2022.

Einleitung

PtDPH1 weist eine Bakteriophytochrom-ähnliche Struktur auf mit dem Chromophor Biliverdin IX α und einer Histidin-Kinase-Effektordomäne, die eine fRL-abhängige Autophosphorylierung induziert (Fortunato et al. 2016). *Knockout*-Untersuchungen zeigten eine von PtDPH1 im fRL kontrollierte Expression von Genen mit meist unbekannter Funktion. Bisher konnten keine Homologe zu bekannten PHY-Interaktionspartnern gefunden werden.

Die AUREOs PtAUREO1a, -1b und 1c sind nuklear lokalisierte, BL-aktivierte Transkriptionsfaktoren mit einer N-terminalen bZIP-Domäne, die als Dimere die Bindung an Promotoren mit AUREO-Erkennungssequenzen vermitteln (Schellenberger Costa et al. 2013a). Sie aktivieren BL-abhängig die Expression von Zellzykluskontrollproteinen sowie des Thylakoidmembran-lokalisierten Lichtschutzkomplexes Lhcx1 und sind damit an der Regulation des Zellzyklus und der Starklichtakklamation beteiligt (Huysman et al. 2013; Schellenberger Costa et al. 2013b; Banerjee et al. 2016; Heintz und Schlichting 2016; Mann et al. 2017).

Dem zu den tierähnlichen Cryptochromen gehörigen PtCPF1 wurde eine duale Funktion als BL-aktivierte (6-4)-PL und als Photorezeptor nachgewiesen (Coesel et al. 2009). Als Transkriptionsregulator kann PtCPF1 in COS7-Zellen wie aCRYs Typ II die CLOCK-BMAL1-aktivierte Genexpression reprimieren und in *P. tricornutum* sowohl aktivierend als auch hemmend auf die Expression von photosynthetischen Lichtsammelproteinen und Pigmentbiosyntheseenzymen wirken.

Erstaunlicherweise können in Organismen, die aus der sekundären Endosymbiose zwischen einem heterotrophen Eukaryot und einer Rotalge hervorgegangen sind, keine klassischen pCRYs gefunden werden. Stattdessen weisen Diatomeen Vertreter der neu definierten CPF-Untergruppe **pflanzenähnlicher CRYs** auf (Abb. 1.16; Oliveri et al. 2014). Pflanzenähnliche CRYs besitzen etwa 30 % Sequenzidentität mit pCRYs, unterscheiden sich von diesen jedoch deutlich in Bezug auf die FAD-Bindung, den CTE-Aufbau sowie in weiteren pCRY-Schlüsselpositionen. Phylogenetisch betrachtet gruppieren sich pflanzenähnliche CRYs am nächsten zu pCRYs und damit zu CPDIII-PLs (vgl. Abb. 1.5). Ihre Verteilung ist breit gestreut. Vertreter finden sich in eukaryotischen Einzellern aus dem Bereich Excavata, Heterokontophyta (darunter zentrische und pennate Diatomeen), Haptophyta, Cryptophyta, Rhodophyta und Chlorophyta sowie in aquatischen Metazoen der Klasse Actinopterygii (Strahlenflosser) (Abb. 1.16; Oliveri et al. 2014; Fortunato et al. 2015; Mei und Dvornyk 2015; Vechtomova et al. 2020; Petersen et al. 2021). Ihre Verbreitung bezieht sich demnach sowohl auf Vertreter der roten (von Rhodophyta abstammenden) als auch der grünen (von Chloroplastida abstammenden) Linie und nicht-photosynthetischer Organismen, ist jedoch auf aquatische Lebensformen beschränkt. So finden sich keine Vertreter in multizellularen Organismen der braunen, roten oder grünen Linie wie Landpflanzen. Diese phylogenetisch breite Verstreung lässt vermuten, dass der Vorläufer pflanzenähnlicher CRYs bereits im letzten gemeinsamen Vorfahr der verschiedenen,

Einleitung

heute existierenden, eukaryotischen Lebensformen enthalten gewesen sein muss. Evolutionsgeschichtlich müssen die zugehörigen Gene mehrfach verloren gegangen sein, was zur heutigen Verbreitung dieser CRY-Untergruppe geführt hat (Oliveri et al. 2014; Fortunato et al. 2015).

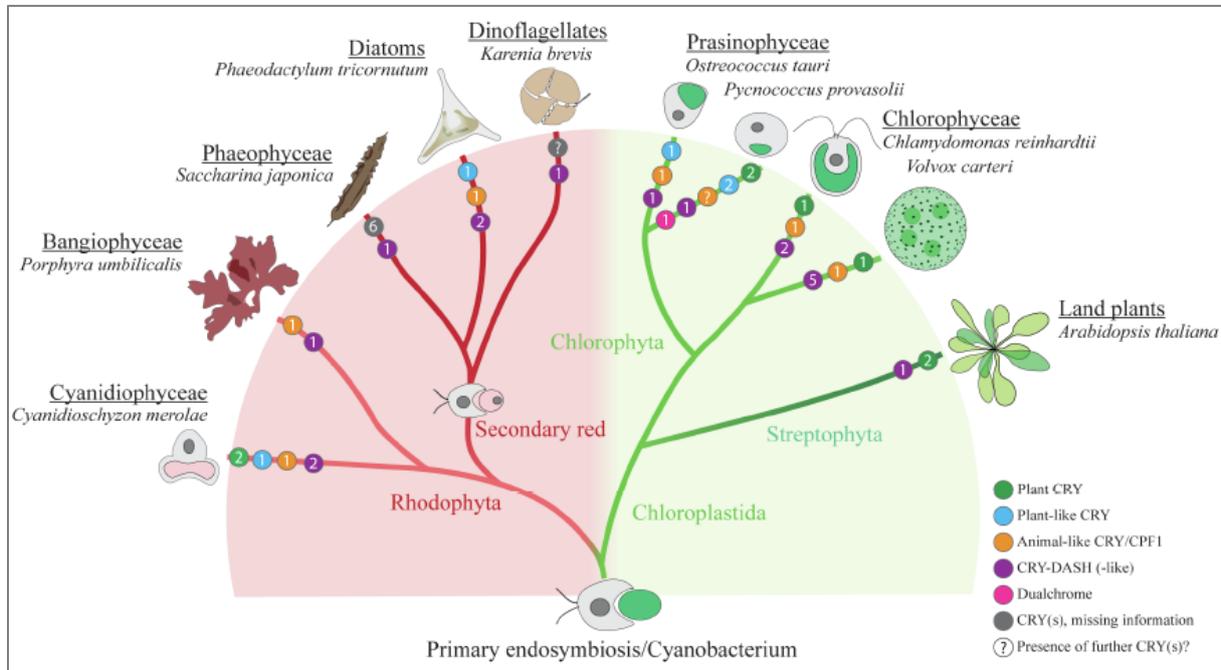


Abb. 1.16: Cryptochrom-Verteilung in ausgewählten Algenspezies im Vergleich zu Landpflanzen. Die verschiedenen Cryptochrom-Gruppen sind farblich kodiert, Nummern geben die Cryptochrom-Anzahl im jeweiligen Genom wider (Petersen et al. 2021).

Für das pflanzenähnliche Cryptochrom aus *P. tricornutum* PtCryP (CryP) konnten in vorhergehenden Untersuchungen bereits grundlegende Informationen zur Chromophorbinding, Lokalisation und Protein-Interaktionen gewonnen werden (Juhas 2015; König 2016). CryP ist ein wasserlösliches Protein mit einer Masse von 67 kDa. Es wird nach heterologer Expression mit dem Neutralradikal FADH[•] und dem Antennenchromophor MTHF isoliert (Juhas et al. 2014). Fluoreszenzmikroskopische Bilder zeigten eine nukleare Lokalisation des CryP-GFP-Fusionskonstrukts. Mittels eines *Pulldown-Assays* wurden 18 potentielle CryP-Interaktionspartner identifiziert. Von diesen stehen 10 Proteine mit Ribosomen und Translation, 6 Proteine mit dem Bereich DNA und Regulation sowie ein Protein mit dem Vitamin-Metabolismus in Verbindung, wobei einem Protein keine Funktion zugeordnet werden konnte (König 2016). In CryP-*Knockdown*-Mutanten, die mittels RNA-*Antisense*-Konstrukten gewonnen wurden, konnte ein regulativer Einfluss von CryP auf die Expression verschiedener Gene aufgezeigt werden. Einerseits wiesen die Mutanten im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Proteinlevel der photosynthetischen Lichtsammelkomplexe Lhcf1-11 und gleichzeitig reduzierte Level an den mit Lichtschutz verbundenen Lhcx-Proteinen auf (Juhas et al. 2014). Darüber hinaus wurden BL-abhängige

Einleitung

Transkriptomanalysen durchgeführt (König et al. 2017). Diese deckten sowohl eine aktivierende als auch eine reprimierende Wirkung von CryP auf Gene unterschiedlichster Funktionen auf. Diese Gene wurden in Abhängigkeit von der jeweiligen CryP-Wirkung in BL-regulierte, dunkel-regulierte oder BL- und dunkel-regulierte Gene eingruppiert.

Letztlich konnten bislang keine konkreten Daten zur CryP-Wirkweise *in vivo* gewonnen werden. Dies basiert auf der Tatsache, dass im Genom von *P. tricornutum* und anderen Diatomeen keine homologen Komponenten zu bekannten pflanzlichen oder tierischen CRY-Signalwegen, wie z.B. der circadianen Uhr, gefunden wurden.

1.5 Zielsetzung

Basierend auf bekannten Mechanismen über die Photoreduktion und Proteininteraktionen von Photolyasen und Cryptochromen unterschiedlicher Klassen sollte in vorliegender Arbeit die Bedeutung des FAD-Redoxzustands und der C-terminalen Proteindomäne für die Wirkweise von CryP aus *P. tricornutum* untersucht werden.

Der Fokus lag auf der Untersuchung folgender Fragestellungen:

- 1) Wie bestimmt die Komposition der FAD-Bindetasche die hohe Stabilität des semireduzierten FADH• gegen aerobe Oxidation?
- 2) Welche Änderungen in Abhängigkeit des FAD-Redoxzustands und der C-terminalen Proteindomäne können beobachtet werden in Bezug auf
 - CryP-Strukturänderungen hinsichtlich des Oligomerisierungszustands und der Konformation?
 - die CryP-Bindefähigkeit mit bereits identifizierten Interaktionspartnern?
 - die CryP-Stabilität im zellulären Umfeld?

Die Analyse dieser Fragestellungen ermöglicht einen Vergleich der CryP-Wirkweise mit der pflanzlicher bzw. tierischer Cryptochrome einerseits und Photolyasen andererseits. Ein mit pflanzlichen und tierischen Cryptochromen vergleichbarer Mechanismus ist mit Strukturänderungen zwischen einer inaktiven Dunkelform und einer lichtaktivierten Signalform verbunden, die zu differentiellen Interaktionen mit Faktoren der Proteinexpressionsmaschinerie führen, während der Photolyase-Mechanismus auf einem Elektronentransfer auf einen redoxsensitiven Bindepartner nach Photoexzitation des FAD-Kofaktors beruht.

Hierzu wurden rekombinante CryP-Varianten heterolog exprimiert und isoliert, die Mutationen in für die FAD-Reduzierbarkeit entscheidenden Aminosäuren oder eine Deletion der C-terminalen Proteindomäne tragen. Durch die Wahl unterschiedlicher Belichtungsparameter wurde der FAD-Redoxzustand zwischen den drei Reduzierungsstufen oxidiert, semireduziert oder vollreduziert variiert.

Mit vorliegender Arbeit werden Erkenntnisse über grundlegende Wirkmechanismen der vergleichsweise unerforschten Klasse pflanzenähnlicher Cryptochrome gewonnen.

2 Material und Methoden

2.1 Mikrobiologische und molekulargenetische Methoden

2.1.1 Zellkultivierung von *P. tricornutum*

Zellen des *P. tricornutum*-Wildtypstamms UTEX 646 (Heterokontophyta, Bacillariophyceae) sowie alle daraus mittels ballistischer Transformation hergestellten Stämme wurden in einem täglichen 16 h Licht/ 8 h Dunkel-Rhythmus bei $60 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ und $18 \text{ }^\circ\text{C}$ in ASP-Medium kultiviert. Die Anzucht aller gentechnisch modifizierten Stämme erfolgte unter Zugabe von $100 \mu\text{M}$ Zeocin.

Die Wildtypstämme von *Cyclotella meneghiniana*, *Thalassiosira pseudonana* und *Chlamydomonas reinhardtii* wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von N. Herrmann, K. Pieper und Dr. M. Angstenberger (Goethe-Universität Frankfurt).

ASP-Medium (nach Provasoli et al. 1957):

Zugabe vor dem Autoklavieren:	<u>Eisen(III)-Lösung:</u>
86 mM NaCl	12,5 mM EDTA
21 mM KCl	12,2 mM FeCl ₃
11,8 mM NaNO ₃	<u>Spurenelementlösung A:</u>
8,1 mM MgSO ₄ x 7H ₂ O	80,6 mM EDTA
4 mM Tris	20,5 mM MnCl ₂ x 4H ₂ O
0,58 mM K ₂ HPO ₄	8,3 mM ZnCl ₂
0,16 mM H ₃ BO ₃	5 % (v/v) Spurenelement-Lösung B
pH 7,8 mit H ₂ SO ₄	<u>Spurenelement-Lösung B:</u>
Zugabe nach dem Autoklavieren:	1 mM CaCl ₂ x 6H ₂ O
2,72 mM CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,5 mM Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O
0,1 % (v/v) Eisen(III)-Lösung	0,35 mM CuCl ₂ x 2 H ₂ O
0,1 % (v/v) Spurenelement-Lösung A	

Tab. 2.1: Verwendete *P. tricornutum*- Stämme.

Stamm (Abkürzung)	Herkunft	Merkmale und Verwendung
UTEX 646 (WT)	Isolation aus Segelskär (Finnland; 1951); erhältlich von <i>Culture Collection of Algae at the University of Texas</i>	Wildtyp; CryP-Abbau, lichtabhängige Expressionsrhythmen
Pt-pPHAT_eGFP-CryP mature-5 (Pt_CryP-eGFP)	Goethe-Universität Frankfurt (Jäger 2013)	Expression CryP-EGFP-Fusion, CryP-Abbau
PteGFP1 (Pt_eGFP)	Goethe-Universität Frankfurt, M. Fauth, S. Jäger	Expression cytosolisches EGFP, Kontrolle für CryP-Abbau

2.1.2 Zellkultivierung von *E. coli*

Zellen der *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme XL1 blue und BL21DE3+ wurden, wenn nicht anders beschrieben, bei 37 °C in *lysogeny broth* (LB)-Medium bzw. 2xYT-Medium kultiviert. Die Anzucht erfolgte unter Zugabe von 100 µM Ampicillin (pET303-haltige Zellen), 50 µM Kanamycin (pET24a/b-haltige Zellen) bzw. 34 µM Chloramphenicol (Stamm BL21DE3+).

LB-Medium: 10 g/l Trypton, 5 g/l, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7,0

2xYT-Medium: 16 g/l Trypton, 10 g/l, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7,0

Tab. 2.2: Verwendete *E. coli*-Stämme.

Stamm	Herkunft	Merkmale und Verwendung
XL1 blue	Stratagene	Amplifizierung klonierter Vektoren
BL21 DE3 codon+	Stratagene	Heterologe Proteinexpression

2.1.3 Isolation von Plasmiden

Die Isolation von Plasmiden erfolgte entsprechend den Angaben zum *Gene-Jet Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific). Die Plasmide wurden in Tris-Puffer gelöst und bei -20 °C gelagert.

Tris-Puffer: 10 mM Tris, pH 8,0

2.1.4 Isolation von genomischer DNA (gDNA) aus *P. tricornutum*

Das Zellsediment aus 50 ml dicht bewachsener Kultur wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und durch Homogenisieren mit einem Mörser aufgeschlossen. Das Lysat wurde mit 700 µl 2x CTAB-Puffer (Kira et al. 2016) versetzt, anschließend 1:1 (v/v) mit Chloroform/ Isoamylalkohol (CI, 24:1 (v/v)) vermischt und zentrifugiert (16060 g, 5 min). Die obere wässrige, DNA-haltige Phase wurde von der organischen Phase getrennt, auf 1 ml mit 1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC)- H₂O aufgefüllt, 1:1 (v/v) mit Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (PCI für DNA-Extraktion, Roth) versetzt und zentrifugiert (16060 g, 3 min). Die wässrige Phase wurde durch Zugabe von 1 ml Chloroform von Phenolresten befreit und die enthaltene DNA nach Zentrifugation (16060 g, 3 min) mit 0,1 Vol 3 M Natriumacetat und 1 Vol Isopropanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Nach Zentrifugation (16060 g, 20 min, 4 °C) wurde das DNA-haltige Sediment zweimal in 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und nach Trocknen in 100 µl Tris-Puffer gelöst. Es folgte ein einstündiger RNA-Verdau bei 37 °C nach Zugabe von 10 µl RNase A (10 mg/ml, Thermo Scientific). Anschließend folgte eine PCI-Fällung mit Chloroform-Aufreinigung und Präzipitation wie beschrieben. Das DNA-Sediment wurde in 50 µl Tris-Puffer gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt (vgl. 2.1.6).

2.1.5 Isolation von RNA aus *P. tricornutum*

Das Zellsediment aus 50 ml Kultur wurde nach Zugabe von ca. 0,25 ml Glasperlen (0,1:0,3 mm (1:1)) sowie 0,5 ml Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (PCI für RNA-Extraktion, Roth) aufgeschlossen (10 min, 60 Hz, TissueLyser, Qiagen). Das Lysat wurde mit 1 ml 1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC)-H₂O versetzt und zentrifugiert (16060 g, 3 min). Die obere wässrige, RNA-haltige Phase wurde von der organischen Phase getrennt, auf 1 ml mit DEPC- H₂O aufgefüllt, mit 1 ml PCI versetzt und zentrifugiert (16060 g, 3 min). Die wässrige Phase wurde durch Zugabe von 1 ml Chloroform von Phenolresten befreit und nach Zentrifugation (16060 g, 3 min) mit 5 M LiCl₂ im Verhältnis 1:1 (v/v) über Nacht bei -20 °C gefällt. Nach Zentrifugation (16060 g, 20 min, 4 °C) wurde das RNA-haltige Sediment zweimal in 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und nach Trocknen in 42 µl DEPC-H₂O gelöst. Es folgte ein dreistündiger DNA-Verdau bei 37 °C nach Zugabe von 5 µl 10x DNase I-Puffer und 3 µl DNase I (RNase-free, Thermo Scientific). Anschließend folgte eine PCI-Fällung sowie Chloroform-Aufreinigung mit LiCl₂-Fällung wie beschrieben. Das RNA-Sediment wurde in 15 µl DEPC-H₂O gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt (vgl. 2.1.6).

2.1.6 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration isolierter Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt (Formel 1).

Formel 1: $c [\mu\text{g}/\text{ml}] = \text{OD}_{260} \times V \times F$

(c = Konzentration der Probe; OD_{260} = Absorption bei 260 nm; V = Verdünnungsfaktor;

F = Multiplikationsfaktor (40 für RNA, 50 für dsDNA)

(Gallagher und Desjardins 2006)

2.1.7 Reverse Transkription und Quantitative Real-time-PCR (qRT-PCR)

Zur Analyse von Rhythmus und Lichtabhängigkeit der *cryp*-, *ID42612*- und *bola*-Genexpression wurden *P. tricornutum*-Zellen des Wildtyps UTEX 646 auf eine anfängliche Zelldichte von 10^6 -Zellen/ml gebracht und 7 Tage kultiviert. Vor Beginn der Probenentnahme wurden die Kulturen 16 h an Dunkelheit adaptiert. Anschließend wurden die Zellen weiterhin in Dunkelheit oder bei $15 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ Blaulicht (BL, λ_{max} 466 nm), Rotlicht (RL, λ_{max} 591 nm) bzw. Dunkelrotlicht (fRL, λ_{max} 731 nm) inkubiert. Es folgte die Ernte von je 50 ml Kultur in einem Zweistunden-Rhythmus (3466 g, 10 min) mit anschließender RNA-Isolation (vgl. 2.1.5). Die Synthese von cDNA aus isolierter Gesamt-RNA erfolgte entsprechend den Herstellerangaben (M-MuLV Reverse Transcriptase, NEB).

Zur Analyse relativer Transkriptmengen wurden quantitative RT-PCRs gemäß den Herstellerangaben durchgeführt (2x Blue S'Green qPCR-Mix versetzt mit 200 nM ROX, Biozym). Zunächst wurden die Effizienzen der verwendeten Starteroligonukleotide (Primer) durch Messung der Linearität der Standardkurven in einer cDNA-Verdünnungsreihe bestimmt (Tab. 2.3). Die Reinheit der Amplifikate wurde mit Hilfe von Schmelzkurven überprüft. Unter Verwendung des Programms MxPro (Agilent Technologies) zur Ergebnisauswertung wurden die relativen Transkriptmengen anschließend nach Schmittgen und Livak (2008) berechnet. Als endogenes Referenzgen diente *histon h4* (Siaut et al. 2007; Sachse et al. 2013). Folgende Parameter definierten den PCR-Ablauf:

Initiale Denaturierung (10 min/ 95 °C), **Amplifizierung** in 40 Zyklen (Primerannealing bei 60 °C), **Schmelzkurvenmessung** (1 min/ 95 °C, 30 sec/ 55 °C, 30 sec/ 95 °C).

Tab. 2.3: Für die Analyse der lichtabhängigen Genexpression von *cryp*, *ID42612* und *bola* mittels qRT-PCR verwendete Primer (5'→3') und deren Effizienzen gemessen an der Linearität einer cDNA-Verdünnungsreihe (R²).

Endogenes Referenzgen <i>h4</i> (PHATRDRAFT_26896)		
h4 fw	GGTCCTTCGCGACAATATCC	R ² = 0,969
h4 rv	CGCAGGTCTGCTGTGATTC	
<i>cryp</i> (PHATRDRAFT_54342)		
cryp S4b fw	CGAGAGCGTTCTTGCAATGA	R ² = 0,900
cryp S2 rv	TTATGCGAGACTTGATGGCAGC	
<i>ID42612</i> (PHATRDRAFT_42612)		
exp aaa fw	GGCCAAGATTCTCTCCAGG	R ² = 0,991
exp aaa rv	CGCCATAGCCTTATCGGTGA	
<i>bola</i> (PHATRDRAFT_14849)		
exp bola fw	TCGCCGACGCCATTGTCC	R ² = 0,990
exp bola rv	CCACTGGGCCGGTGTTTTG	

2.1.8 Restriktion von Plasmid-DNA

Die Restriktion von Plasmid-DNA erfolgte gemäß den Herstellerangaben der verwendeten Restriktionsendonukleasen (Thermo Scientific).

2.1.9 Auftrennung von DNA-Fragmenten per Agarose-Gelelektrophorese

Der Erfolg von PCR und Restriktion wurde elektrophoretisch auf Agarosegelen überprüft. Dazu wurden Gele einer Konzentration von 1 oder 2 % Agarose in 1xTAE-Puffer eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte bei 75-100 V für 60-120 min.

1xTAE (Tris-Acetat-EDTA): 40 mM Tris, pH 7.5, 20 mM Natriumacetat, 1 mM Na₂EDTA

2.1.10 Klonierung von Expressionsvektoren für die heterologe Proteinexpression in *E. coli*

Zur biochemischen und spektroskopischen Analyse von CryP wurden Expressionsvektoren für verschiedene CryP-Varianten und Kontrollproteine kloniert. Dies erfolgte auf Basis des pET303/CT-His bzw. pET302/NT-His-Vektorsystems (Invitrogen). Hierfür wurden in einer Pfu-Polymerase-katalysierten Polymerasekettenreaktion (PCR) nach Herstellerangaben (Thermo Scientific) unter

Tab. 2.5: Für die Klonierung von Expressionsvektoren mittels Fusions-PCR verwendete Primer (5'→3') und Vektormerkmale. Fortführung auf folgender Seite.

pET303/<i>cryp</i>-his_W342F (pET303/CT-His geschnitten XbaI, Matrize pET303/<i>cryp</i>-his)	
HF_pET303- <i>cryp</i> fw	TAACTTTAAGAAGGAGGTCTAGAATGTCTGAATAGCGACCATGG
HF1_W342F rv	TTCGTCACCCGTGACGAATCCGATGCTTCATAG
HF2_W342F fw	CTA GTGCTCGAGATGCATTCTAGATGCGAGACTTGATGGCAGCC
HF_pET303- <i>cce</i> rv	TGAAGCATCGGAATTCGTCACGGGTGACGAA
pET303/<i>cryp</i>-his_N417C (pET303/CT-His geschnitten XbaI, Matrize pET303/<i>cryp</i>-his)	
HF_pET303- <i>cryp</i> fw	TAACTTTAAGAAGGAGGTCTAGAATGTCTGAATAGCGACCATGG
HF1_N417C rv	CCACATCATCGAATGGATCGCGC
HF2_N417C fw	GCGCGATCCATTCGATGATGTGG
HF_pET303- <i>cce</i> rv	GTGCTCGAGATGCATTCTAGATGCGAGACTTGATGGCAGCC
pET303/<i>cryp</i>-his_W231A (pET303/CT-His geschnitten XbaI, Matrize pET303/<i>cryp</i>-his)	
HF_pET303- <i>cryp</i> fw	TAACTTTAAGAAGGAGGTCTAGAATGTCTGAATAGCGACCATGG
HF1_W231A rv	GGCTCATCCGCCTTTGTGGAAGG
HF2_W231A fw	CCTCCACAAAGGCGGATGAGCC
HF_pET303- <i>cce</i> rv	GTGCTCGAGATGCATTCTAGATGCGAGACTTGATGGCAGCC
pET303/<i>cryp</i>-his_Y373A (pET303/CT-His geschnitten XbaI, Matrize pET303/<i>cryp</i>-his)	
HF_pET303- <i>cryp</i> fw	AACCTTTAAGAAGGAGGTCTAGAATGTCTGAATAGCGACCATGG
HF1_Y373A rv	AACCAGTTGTAGCGAGTTCACGCATCCC
HF2_Y373A fw	GGGATGCGTGAACCTCGCTACAACCTGGTT
HF_pET303- <i>cce</i> rv	GTGCTCGAGATGCATTCTAGATGCGAGACTTGATGGCAGCC
pET303/<i>cryp</i>-his_Y373A/W231A (pET303/CT-His geschnitten XbaI, Matrize pET303/<i>cryp</i>-his)	
HF_pET303- <i>cryp</i> fw	TAACTTTAAGAAGGAGGTCTAGAATGTCTGAATAGCGACCATGG
HF1_W231A rv	GGCTCATCCGCCTTTGTGGAAGG
HF2_W231A fw	CCTCCACAAAGGCGGATGAGCC
HF1_Y373A rv	AACCAGTTGTAGCGAGTTCACGCATCCC
HF2_Y373A fw	GGGATGCGTGAACCTCGCTACAACCTGGTT
HF_pET303- <i>cce</i> rv	GTGCTCGAGATGCATTCTAGATGCGAGACTTGATGGCAGCC
pET303/<i>cryp</i>-his_E128A (pET303/CT-His geschnitten XbaI, Matrize pET303/<i>cryp</i>-his)	
HF_pET303- <i>cryp</i> fw	TAACTTTAAGAAGGAGGTCTAGAATGTCTGAATAGCGACCATGG
HF1_E128A rv	CCCTGCTTGCAGGTGTCATCTC
HF2_E128A fw	GAGATGACACCTGCAAGCAGGG
HF_pET303- <i>cce</i> rv	GTGCTCGAGATGCATTCTAGATGCGAGACTTGATGGCAGCC
pET303/<i>cpf1</i>-his (pET303/CT-His geschnitten XbaI, Matrize <i>P. tricornutum</i> gDNA)	
HF_CPF1_E1 fw	GTTTAACTTTAAGAAGGAGGTCTAGAATGGCTAAATCGGAAGAGAAAAAAC
CPF1_E1 rv	TATACAGCCGTGCTTGACGTAAGGACTCAAAGCAGTAGTGCTTGG
CPF1_E2 fw	CCAAGCACTACTGCTTTGAGTCCTTACGTCAAGCACGGCTGTATA
CPF1_E2 rv	ATCATTGTTGTCAAAAGTTTGGAGTGCTGTATCCGACCAGATAAATTGAAGT
CPF1_E3 fw	ACTTCAATTATCTGGTCGGATACAGCACTCCAAACTTTGACAAAATGAT
CPF1_E3 rv	GGCGAATAGCATCGAAAATACTGATAGAAATGGGCAGTGCAAGAA
CPF1_E4 fw	TGGCTTTCTTGCACTGCCATTCTATCAGTATTTTCGATGCTATTCGCC
CPF1_E4 rv	TTGAACTGAGGCAACCATTTGCGAATGTAATCGCCATTTGGGTCCGTCTTTTTACC
CPF1_E5 fw	TTCGGTAAAAAGACGGACCCAAATGGCGATTACATTCGCA
HF_CPF1_E5 rv	GTGGTGGTGCTCGAGATGCATTCTAGAGTTGCGACGTTGTCGCTTTG

Tab. 2.5: Fortführung.

pET303/ <i>cpf1-cte</i> -his (pET303/CT-His geschnitten XbaI, Matrizen pET303/ <i>cpf1</i> -his u. pET303/ <i>cryp</i> -his)	
HF_CPF1_E1 fw	GTTTAACTTTAAGAAGGAGGTCTAGAATGGCTAAATCGGAAGAGAAAAAAC
HF_cpf1-crypCT rv	TTCTTGCGATCGCCTTCTGTTGCGACGTTGTCGCTTTG
HF_cpf1-crypCT fw	CAAAGCGACAACGTCGCAACAGAAGGCGATCGCAAGAA
HF_pET303-crypCT rv	GTGGTGGTGGTGCTCGAGTGCAGACTTGATGGCAG
XhoI	

Die Assemblierung von PCR-Produkt und Vektor erfolgte stets in einer ligase-unabhängigen Hot-Fusion-Reaktion nach Fu et al. (2014).

Die Verifizierung der klonierten Vektoren erfolgte per Sequenzierung (Eurofins Genomics).

2.1.11 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von *E. coli* wurden chemisch kompetente Zellen eingesetzt (Cohen et al. 1972). Diese wurden 1:1 (v/v) mit Transformationspuffer versetzt und nach Zugabe von maximal einem Zehntel des Zellvolumens an Plasmid-DNA bzw. Hot-Fusion-Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 90 sec wurde der Ansatz kurz auf Eis abgekühlt und 1:5 (v/v) mit LB-Medium (*E. coli* XL1 blue) bzw. 1:1 (v/v) mit SOC-Medium (*E. coli* BL21 DE3 Codon+) verdünnt. Der Transformationsansatz wurde nach 30 min Inkubation bei 37 °C auf LB-Agar-Platten (1,3 % (w/v) Agar) unter Antibiotikadruck ausgestrichen.

Transformationspuffer: 100 mM CaCl₂, 50 mM MgCl₂

LB-Medium: 1 % Pepton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl

SOC-Medium: 20 mM Glukose, 2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄

2.1.12 Verwendete Plasmide

Tab. 2.6: Für die heterologe Proteinexpression verwendete Vektoren. Fortführung auf folgender Seite.

Plasmid	Herkunft	Merkmale und Verwendung
pET303/CT-His	Invitrogen	Klonierung von Expressionsvektoren
pET302/NT-His	Invitrogen	Klonierung von Expressionsvektoren
pET303/ <i>cryp</i> -his	Juhas et al. 2014	CryP-His

Tab. 2.6: Fortführung.

Plasmid	Herkunft	Merkmale und Verwendung
pET303/ <i>cryp</i> -ha	Neißner 2017	CryP-HA
pET303/ <i>cryp</i> - <i>phr</i> -his	Diese Arbeit	CryP-PHR-His (AS 1-512)
pET303/ <i>cryp</i> - <i>phr</i> -his_korr	Diese Arbeit	CryP-PHR-His (AS 1-512) ohne klonierungsbedingtes R zwischen PHR und His-Tag
pET303/ <i>cryp</i> -his_W342F	Diese Arbeit	CryP-His mit W→F-Austausch des distalen W342 der W-Triade
pET303/ <i>cryp</i> -his_N417C	Diese Arbeit	CryP-His mit N→C-Austausch des FAD-N5-proximalen N417
pET303/ <i>cryp</i> -his_W231A	Diese Arbeit	CryP-His mit W→A-Austausch des potentiellen MTHF-komplexierenden W231
pET303/ <i>cryp</i> -his_Y373A	Diese Arbeit	CryP-His mit Y→A-Austausch des potentiellen MTHF-komplexierenden Y373
pET303/ <i>cryp</i> -his_W231A/ Y373A	Diese Arbeit	CryP-His mit W→A- und Y→A-Austausch der potentiellen MTHF-komplexierenden W231 und Y373
pET303/ <i>cryp</i> -his_E128A	Diese Arbeit	CryP-His mit E→A-Austausch des potentiellen MTHF-komplexierenden E128
pET303/ <i>cte</i> -his	Diese Arbeit	C-terminale Domäne CTE von CryP (AS 510-585)
pET303/ <i>cte</i> -his_korr	Diese Arbeit	C-terminale Domäne CTE von CryP (AS 510-585) ohne klonierungsbedingtes R zwischen CTE und His-Tag
pET303/ <i>ptcpf1</i> -his	Diese Arbeit	PtCPF1-His, vgl. Coesel et al. (2009)
pET303/ <i>ptcpf1</i> - <i>phr</i> -his	Diese Arbeit	PtCPF1-PHR-His (AS 1-520)
pET303/ <i>ptcpf1</i> - <i>cte</i> -his	Diese Arbeit	Fusion PtCPF1 und CTE von CryP
pET28a/ <i>cracry</i> -his	Beel et al. 2012	CraCRY-His aus <i>C. reinhardtii</i>
pET303/ <i>cracry</i> - <i>phr</i> -his	Diese Arbeit	CraCRY-PHR-His (AS 1-510)
pET303/ <i>aaa</i> -his	König 2016	CryP-Interaktionspartner ID42612
pET303/ <i>bola</i> -his		CryP-Interaktionspartner Bola
pET302/8x-his- <i>egfp</i>	Diese Arbeit	8xHis-EGFP
pET24b/ <i>lv-wscp</i> -his	Takahashi et al. 2013	Wasserlösliches Chlorophyll-Protein (WSCP-His aus <i>Lepidium virginicum</i>)

2.2 Proteinbiochemische und spektroskopische Methoden

2.2.1 Heterologe Proteinexpression und -isolation

Die Expression der in dieser Arbeit verwendeten Proteine erfolgte im heterologen T7-Expressionssystem in *E. coli* BL21 DE3 Codon+ (Invitrogen) durch Induktion der Proteinexpression mittels Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG). Zur Proteinisolation per Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) diente je eine rekombinante Polyhistidinmarkierung (His-Tag) variabler Länge und Position. Expression und Isolation erfolgten in Anlehnung an Juhas et al. (2014) (Tab. 2.7).

Für sämtliche Proteine erfolgte die Isolation und Handhabung bei 4 °C, überdies wurden für die CRY-Varianten alle Arbeitsschritte nach IPTG-Zugabe in Dunkelheit durchgeführt. Die Zellen wurden mittels Ultraschall (3x 15 s Puls/ 45 s Pause, Amplitude 45 %, 1/8 Aufsatz, Ultrasonnic Processor FB-505, Fisher Scientific, auf Eis) aufgeschlossen, das entstandene Lysat bei 22 000 g für 15 min zentrifugiert. Die Proteine wurden mit 150 mM Imidazol eluiert und anschließend mithilfe von Größenausschlussfiltern (Millipore Amicon Ultra, 10 bzw. 30 kDa Ausschluss) durch aufeinander folgende Verdünnungs- und Konzentrationsschritte in den Lagerpuffer überführt, um eine Präzipitation der Proteine während des stundenlangen Pufferwechsels in einem Dialyseschlauch zu vermeiden. Die Proteine wurden nach Bradford (vgl. 2.2.2) quantifiziert und bei -20 °C gelagert. Wenn nicht anders beschrieben wurden alle experimentellen Ansätze in Lagerpuffer durchgeführt.

Tab. 2.7: Expressionsparameter für die heterologe Proteinexpression in *E. coli*. Fortführung auf folgender Seite.

Protein	IPTG-Konzentration [μ M]	Expressions-temperatur [°C]	Expressionsdauer [h]
CryP-His, CryP-HA CryP-PHR-His CryP-His_W342 CryP-His_N417C CryP-His_W231A CryP-His_Y373A CryP-His_W231A/Y373A CraCRY-His CraCRY-PHR-His PtCPF1-His PtCPF1-PHR-His PtCPF1-PHR-CTE-His	10	18	20

Tab. 2.7: Fortführung.

Protein	IPTG-Konzentration [μM]	Expressions-temperatur [°C]	Expressionsdauer [h]
CTE-His	100	37	6
ID42612-His	100	37	6
BolA-His	100	37	4-5
8xHis-EGFP	100	37	6
WSCP-His	1000	37	20

Lysepuffer: 50 mM NaPi pH7.8, 300 mM NaCl, 20 % Glycerin

Waschpuffer: 50 mM NaPi pH7.8, 100 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 20 % Glycerin

Elutionspuffer: 50 mM NaPi pH7.8, 100 mM NaCl, 150 mM Imidazol, 20 % Glycerin

Lagerpuffer: 50 mM NaPi pH7.8, 100 mM NaCl, 20 % Glycerin

2.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Quantifizierung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach Bradford entsprechend den Herstellerangaben (Roti®Quant, Roth). Hierfür wurde eine Referenzgerade mit Bovinem Serumalbumin (BSA) zwischen 0 und 20 μg erstellt.

2.2.3 Wechsel zwischen den Flavin-Redoxzuständen in CryP

Der Wechsel zwischen den FAD-Redoxzuständen in CryP für die biochemischen Analysen wurde wie folgt erreicht:

Unmittelbar nach heterologer Isolation ist der Flavin-Kofaktor größtenteils als semireduziertes FADH[□] mit einem kleinen Anteil an oxidiertem FADox in CryP-His gebunden. Dieser Anteil wurde durch Belichtung für 15 min bei 15 μE*m⁻²*s⁻¹ Blaulicht (BL, λ_{max} 466 nm) in den stabilen, semireduzierten Zustand überführt. CryP mit gebundenem semireduzierten FADH[•] wird fortan als CryPsemired bezeichnet.

Die Oxidation des Flavin-Kofaktors wurde durch Zugabe von 20 mM K₃[Fe(CN)]₆ im Eluat chemisch beschleunigt. Dieses wurde in den folgenden Filterschritten vor der Lagerung wieder ausgewaschen (vgl. 2.2.1). CryP mit gebundenem oxidierten FADox wird fortan als CryPox bezeichnet.

Der vollreduzierte FADH⁻-Zustand wurde durch Zugabe von 20 mM Dithiothreitol (DTT) und BL-Belichtung des Proteins nach 15 min bei 15 μE*m²*s⁻¹ erreicht. Um diese, im Dunkeln instabile,

Redoxform zu erhalten, wurden alle folgenden Arbeitsschritte unter BL durchgeführt. CryP mit gebundenem vollreduziertem FADH⁻ wird fortan als CryPfullyred bezeichnet.

2.2.4 Cryptochrom-Belichtung

Die Belichtung der untersuchten Cryptochrom-Varianten erfolgte mit Blaulicht (BL, λ_{max} 466 nm), Rotlicht (RL, λ_{max} 591 nm) bzw. Dunkelrotlicht (fRL, λ_{max} 731 nm) bei Lichtintensitäten zwischen 15 und 30 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Die Überschneidung der jeweiligen Lichtqualitäten mit den Absorptionsbereichen von CryP mit gebundenem FADH[•] bzw. FADox ist in Abb. 2.1 dargestellt.

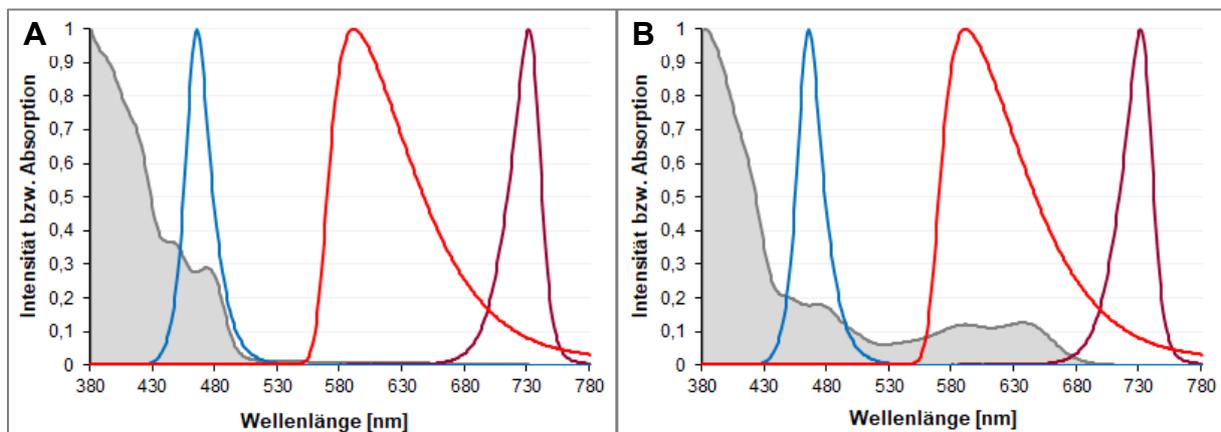


Abb. 2.1: Für die Cryptochrom-Belichtung verwendete Lichtfelder. Die Belichtung erfolgte unter BL (λ_{max} 466 nm), RL (λ_{max} 591 nm) bzw. fRL (λ_{max} 731 nm). **(A)** Überlagerung der Lichtfelder mit der Absorption von CryPox. **(B)** Überlagerung der Lichtfelder mit der Absorption von CryPsemired.

2.2.5 Blue Native PAGE

Die native Auftrennung von Proteinen per Blue Native-Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE) erfolgte in 4-10%igen Polyacrylamid (PAA)-Gradientengelen. Als Längenstandard wurde HMW Native Marker (Scientific Laboratory Supplies) eingesetzt. Der Gellauf erfolgte bei 4 °C mit gefärbtem Kathodenpuffer bis zur halben Laufstrecke, die zweite Laufhälfte mit einem ungefärbten Kathodenpuffer. Nach dem Gellauf waren die Proteine aufgrund des Coomassie-haltigen Laufpuffers direkt sichtbar. Es folgte eine denaturierende SDS-PAGE in zweiter Dimension (vgl. 2.2.6) oder Western Blotting und Immunodetektion (vgl. 2.2.8).

Tab. 2.8: Zusammensetzung der BN-PAA-Gele.

	4 % Sammelgel	4 % Trenngel	10 % Trenngel
H ₂ O	1,574 ml	1,372 ml	0,152 ml
ROTIPHORESE®Gel 40 (29:1)	0,4 ml	0,4 ml	1 ml
3x Gelpuffer	1 ml	1 ml	1 ml
75 % Glycerin	-	0,2 ml	0,62 ml
10 % APS	10 µl	10 µl	10 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

10x Probenpuffer: 0.5 Vol 2x Bis-Tris ACA, 0,4 Vol Glycerin, 0.01 % (w/v) Coomassie Brillantblau G250

2x BisTris-ACA: 1 M 6-Aminocapronsäure, 200 mM Bis-Tris, pH 7.0

3x Gelpuffer: 1,5 M 6-Aminocapronsäure, 150 mM BisTris, pH 7.0

Kathodenpuffer: 15 mM Bis-Tris, 50 mM Tricin, (0.01 % (w/v) Coomassie Brillantblau G250), pH 7.0

Anodenpuffer: 50 mM BisTris, pH 7.0

2.2.6 Diskontinuierliche SDS-PAGE

Die denaturierende Auftrennung von Proteinen per diskontinuierlicher Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) erfolgte in 10 oder 12 %igen Polyacrylamid (PAA)-Trenngelen mit einem Tris-Glycin-Laufpuffer. Als Probenpuffer wurde Roti®-Load 1 (Roth), als Längenstandard BlueStar PLUS Prestained Protein Marker (NIPPON Genetics) oder Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas) eingesetzt. Nach dem Gellauf wurden die Proteine wahlweise mit Coomassie (1 h Färbung, 16 h Entfärbung) oder mittels Western Blotting und Immunodetektion (vgl. 2.2.8) visualisiert.

Tab. 2.9: Zusammensetzung der SDS-PAA-Gele nach Laemmli.

	4 % Sammelgel	10 % Trenngel	12 % Trenngel
H ₂ O	2,46 ml	4,93 ml	4,43 ml
ROTIPHORESE®Gel 40 (37,5:1)	0,6 ml	2,5 ml	3 ml
Sammelgelpuffer	1 ml	-	-
Trenngelpuffer	-	2,5 ml	2,5 ml
25 % SDS	16 µl	40 µl	40 µl
10 % APS	20 µl	40 µl	40 µl
TEMED	20 µl	40 µl	40 µl

- Sammelgelpuffer:** 0,5 M Tris, pH 6.8
Trenngelpuffer: 1,5 M Tris, pH 8.8
Laufpuffer: 0.038 M Glycin, 0.05 M Tris, 0.1 % SDS
Färbelösung: 0.25 % Coomassie Brilliantblau G250 in 10 % Acetat
Entfärber: 10 % Acetat

2.2.7 Zweidimensionale PAGE

Die Auflösung von Proteinkomplexen wurde in zweidimensionaler PAGE mit einer nativen BN-PAGE (vgl. 2.2.5) in erster und einer denaturierenden SDS-PAGE (vgl. 2.2.6) in zweiter Dimension durchgeführt. Nach erfolgtem BN-Gellauf wurde der proteinhaltige Gelabschnitt ausgeschnitten, 2 min in Äquilibrierungspuffer inkubiert und auf das Sammelgel eines SDS-PAA-Gels aufgelegt. Dieses wurde mit 1 % Agarose (in Laufpuffer) überschichtet, worauf ein Gellauf nach Laemmli folgte. Anschließend wurden die Proteine mittels Western Blotting mit Immunodetektion (vgl. 2.2.8) untersucht.

Äquilibrierungspuffer: 500 µl Glycerin, 750 µl β-Mercaptoethanol, 2.5 ml 25 % SDS, 3.75 ml Laemmli-Sammelgelpuffer, aufgefüllt auf 25 ml mit H₂O

2.2.8 Western Blotting und Immunodetektion

Nach erfolgter BN- oder SDS-PAGE wurden die Proteine mittels Western Blotting im semi-dry-Verfahren (modifiziert nach (Burnette 1981) auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Amersham™) übertragen (1,5 h/ 1,5 mA/cm²). Die Membran wurde blockiert (1 h in 5 % Milchpulver in PBS) und mit einem Peroxidase-gekoppelten Antikörper (Tab. 2.10; 1 h, 4 °C) inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch Waschen mit PBS entfernt. Die Antikörper-Epitop-markierten Proteine wurden mittels Chemolumineszenzreaktion auf einem Röntgenfilm (Roth®) visualisiert. Dabei wird nach einminütiger Inkubation der Membran in ECL-Lösung die frei werdende Lumineszenz aus der Umsetzung von Luminol detektiert. Diese Reaktion wird durch das an den Antikörper gekoppelte Reporterenzym HRP (Meerrettichperoxidase) katalysiert.

- Transferpuffer:** 25 mM Tris, 150 mM Glycin, 20 % Methanol
PBS-Puffer: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.4
ECL-Lösung: 100 mM Tris/ HCl pH 8.5, 2.5 mM Luminol (in DMSO), 0.4 mM p-Cumarsäure

Tab. 2.10: Für die Immunodetektion Epitop-markierter Proteine verwendete Antikörper.

Antikörper	Hersteller	Verdünnung in 3 % Milchpulver in PBS
Monoklonal Anti-polyHistidine Peroxidase Antibody	Sigma-Aldrich	1:3000
Anti-HA Antibody produced in rabbit	Sigma-Aldrich	1:2000
RbcL, Rubisco large subunit, form I and form II	Agrisera	1:3000
Goat Anti-Rabbit IgG, H&L Chain Specific Peroxidase Conjugate	Calbiochem	1:10000
Anti-GFP (Goat) Antibody Peroxidase Conjugated	Rockland	1:5000

2.2.9 Analyse des CryP-Oligomerisierungsverhaltens

Die CryP-Oligomerisierung wurde in zwei Versuchsaufbauten untersucht. Einerseits wurde die CryP-Oligomerisierung in Abhängigkeit von FAD-Redoxzustand, der C-terminalen Domäne (CTE), Ionenstärke, Detergenzien und Kofaktoren mittels BN-PAGE (vgl. 2.2.5) untersucht. Dazu wurden heterolog exprimiertes und isoliertes CryP-His (vgl. 2.2.1) in den Redoxzuständen FADox und FADH² sowie das um die CTE verkürzte CryP-PHR-His eingesetzt. Die einzelnen CryP-Redoxformen wurden durch chemische Oxidation bzw. reduzierende BL-Belichtung gewonnen (vgl. 2.2.3 und 2.2.4). 125-1000 ng der einzelnen CryP-Varianten wurden ohne weitere Zusätze oder nach Zugabe von 50 mM DTT, 300 mM NaCl, 0.02 % Triton X-100, 0.016 % β -Dodecylmaltosid (β -DDM), 5 mM ATP, 50 mM MgCl₂, 5 mM Riboflavin oder einem Gradienten von 200 bis 500 mM NaCl bzw. 0.008 bis 0.032 % β -DDM 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Zudem wurde ein Ansatz mit DNase I und RNase A (Thermo Scientific) 20 h bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Das Ansatzvolumen war nicht größer als 15 μ l. Alle Ansätze wurden mit 10x BN-Ladepuffer versetzt, die Proteine in einer BN-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blotting und Immunodetektion (vgl. 2.2.8) visualisiert.

In einem zweiten Versuchsaufbau wurde die CryP-Oligomerisierung über eine Ko-Elution von immobilisiertem CryP-His mit CryP-HA untersucht. Dazu wurden 500 μ g heterolog isoliertes CryP-His im semireduzierten Zustand und gelöst in 2 ml Lysepuffer (vgl. 2.2.1, mit 500 mM NaCl) 1 h bei 4 °C im Dunkeln an eine IMAC-Säule gebunden. Nach einem Waschschrift mit 10 ml Waschpuffer (vgl. 2.2.1, mit 500 mM NaCl) wurde die Säule 1 h bei 4 °C im Dunkeln mit einem CryP-HA-haltigen *E. coli*-Lysat aus der Expression in 1 l Kultur wie beschrieben (vgl. 2.2.1) inkubiert. Es folgte ein Waschschrift mit 120 ml Waschpuffer (mit 500 mM NaCl), um ungebundenes CryP-HA zu entfernen. Anschließend wurden die Proteine mit 300 mM Imidazol von der Säule eluiert. Die Ko-Elution von CryP-His und CryP-HA wurde anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blotting mit Immunodetektion untersucht (vgl.

2.2.6 und 2.2.8). Als Kontrolle für eine spezifische CryP-CryP-Interaktion wurde gleicher Ansatz mit 500 µg WSCP-His durchgeführt.

2.2.10 Analyse des CryP- Interaktionsverhaltens mittels zweidimensionaler PAGE

Die Interaktion von CryP mit den Proteinen ID42612 und Bola in Abhängigkeit vom FAD-Redoxzustand und der C-terminalen Domäne (CTE) wurde mittels zweidimensionaler PAGE (vgl. 2.2.7) durchgeführt. Dazu wurden heterolog isoliertes CryP-His in seinen drei bekannten FAD-Redoxzuständen, FADox, FADH[•] und FADH⁻, sowie das um die CTE verkürzte CryP-PHR-His einerseits, die Interaktionspartner ID42612-His und Bola-His andererseits, eingesetzt. Die einzelnen CryP-Redoxformen wurden durch chemische Oxidation bzw. reduzierende BL-Belichtung gewonnen (vgl. 2.2.3 und 2.2.4). Die einzelnen vier CryP-Varianten wurden je mit ID42612-His bzw. Bola-His in einem äquimolaren Verhältnis 30 min im Dunkeln auf Eis für gebundenes FADox und FADH[•] bzw. unter BL für das im Dunkeln instabile FADH⁻ inkubiert. Dazu wurden 200 ng der CryP-Variante in einem Reaktionsvolumen von nicht mehr als 15 µl eingesetzt. Anschließend wurde der Proteinkomplex mit 10x BN-Ladepuffer versetzt (vgl. 2.2.5) und in zweidimensionaler PAGE analysiert (vgl. 2.2.7). Als Kontrolle dienten Ansätze mit PtCPF1-His, CraCRY-His bzw. EGFP-His.

2.2.11 Analyse der Interaktion von CryP-PHR mit der CTE mittels zweidimensionaler PAGE

Die Interaktion von CryP-PHR mit der CTE wurde wie unter 2.2.10 beschrieben durchgeführt. Als Kontrolle dienten Ansätze mit PtCPF1-PHR-His, CraCRY-PHR-His bzw. EGFP-His.

2.2.12 Analyse der CryP-Proteinstruktur mittels partieller Proteolyse

CryP-Strukturänderungen in Abhängigkeit vom FAD-Redoxzustand und der C-terminalen Domäne (CTE) wurden mittels limitierter Proteolyse mit Trypsin (Promega) durchgeführt. Dazu wurde heterolog isoliertes CryP-His in seinen drei bekannten FAD-Redoxzuständen, FADox, FADH[•] und FADH⁻, das um die CTE verkürzte CryP-PHR-His sowie CTE-His eingesetzt. Die einzelnen CryP-Redoxformen wurden durch chemische Oxidation bzw. reduzierende BL-Belichtung gewonnen (vgl. 2.2.3 und 2.2.4). Da CryP-PHR-His und CTE-His klonierungsbedingt ein tryptisch sensibles Arginin zwischen PHR-Domäne und His-Epitop aufweisen, wurden für beide Proteine um dieses Arginin korrigierte Varianten kloniert. Die Inkubation der einzelnen vier CryP-Varianten mit Trypsin erfolgte in einem Verhältnis von 1:200 (mol/mol) Trypsin : CryP bei 18 °C im Dunkeln für gebundenes FADox und FADH[•] bzw. unter BL für das

im Dunkeln instabile FADH[·]. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Roti[®]-Load 1 (Roth) nach definierten Inkubationszeiten gestoppt. Das Schnittmuster wurde anschließend mittels SDS-PAGE (vgl. 2.2.6) und Western Blotting mit Immunodetektion (vgl. 2.2.8) untersucht.

2.2.13 Analyse des lichtabhängigen CryP-Abbaus

Der licht- und proteasevermittelte CryP-Abbau in Abhängigkeit vom FAD-Redoxzustand, der FAD-Reduzierbarkeit und der C-terminalen Domäne (CTE) wurde in zwei Versuchsaufbauten untersucht.

In einem ersten Aufbau wurden *P. tricornutum*-Zellen der Stämme Pt-pPHAT_eGFP-CryP mature-5 (Expression CryP-EGFP-Fusionskonstrukt) und PteGFP1 (Expression cytosolisches EGFP) eingesetzt. Der Stamm Pt-pPHAT_eGFP-CryP mature-5, der CryP über eine C-terminale Fusion mit EGFP unter Kontrolle des *fcpb*-Promotors exprimiert, wurde zur Analyse des CryP-Abbaus mit anschließendem immunologischem Nachweis mittels eines GFP-Antikörpers genutzt. Der Stamm PteGFP1, der cytosolisches EGFP exprimiert, diente als Kontrolle für die Spezifität des Abbaus. Kulturen beider Stämme wurden auf eine anfängliche Zelldichte von 10⁶-Zellen/ ml gebracht und 7 Tage in einem Volumen von 350 ml kultiviert (vgl. 2.1.1). Vor Versuchsstart wurden die Kulturen 16 h an Dunkelheit adaptiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet (3466 g, 10 min), in 1 ml ASP-Medium resuspendiert und nach Zugabe von 0,5 ml Glasperlen (0,1:0,3 mm (1:1)) mechanisch aufgeschlossen (15 min, 60 Hz, auf Eis, TissueLyser, Qiagen). Nach Zentrifugation des Lysats (16060 g, 5 min/ 4 °C) wurde der lösliche Proteinanteil mit ASP-Medium auf 3,5 ml aufgefüllt (Konzentrierung der Proteine relativ zur Ausgangskultur um den Faktor 100). Es folgte eine Inkubation bei 18 °C in Dunkelheit oder unter 30 μE*m⁻²*s⁻¹ Blaulicht (BL, λ_{max} 466 nm), Rotlicht (RL, λ_{max} 591 nm) bzw. Dunkelrotlicht (fRL, λ_{max} 731 nm). Der Abbau wurde durch Zugabe von Roti[®]-Load 1 (Roth) nach stündlicher Probenentnahme gestoppt. Das Abbauverhalten wurde anschließend mittels SDS-PAGE (vgl. 2.2.6) und Western Blotting mit Immunodetektion (vgl. 2.2.8) untersucht.

In einem zweiten Aufbau wurden *P. tricornutum*-Zellen des Wildtyps UTEX 646 wie für den ersten Aufbau beschrieben kultiviert und geerntet. Die Zellen wurden mittels Ultraschall (6x 10 s Puls/ 50 s Pause, Amplitude 45 %, 1/8 Aufsatz, Ultrasonnic Processor FB-505, Fisher Scientific, auf Eis) in 50 Mm NaPi pH 7,8) aufgeschlossen. Das entstandene Lysat wurde zentrifugiert (16060 g, 5 min/ 4 °C). 100 μg/ml des löslichen Proteinextrakts wurden mit 50 μg/ml heterolog isolierten CryPox-His bzw. CryPsemired-His, CryP-PHR-His, CryP_W342Fox-His bzw. CryP_W342Fsemired-His oder CTE-His wie für den ersten Aufbau beschrieben inkubiert und analysiert. Zudem wurde je ein Ansatz CryPsemired-His mit einem Proteinextrakt aus *T. pseudonana*, *C. meineghiniana* bzw. *C. reinhardtii* untersucht. Als Kontrolle dienten Ansätze mit EGFP-His.

2.2.14 Absorptionsspektroskopie

Die Messung von UV-Vis-Absorptionsspektren sämtlicher CRY-Varianten wurde mit einem UV-Vis-Spektralphotometer (V-650, Jasco) zwischen 370 und 750 nm in einem Messintervall von 1 nm durchgeführt. Die proteinhaltigen Proben wurden vor und zwischen den Messungen auf Eis gekühlt.

2.2.15 Fluoreszenzspektroskopie

Die Messung von Fluoreszenzspektren erfolgte bei Raumtemperatur mit auf Eis gekühlten Proben (FP-6500, Jasco).

Fluoreszenzemissionsspektren wurden zwischen 410 und 700 nm nach Exzitation bei 380 bzw. 450 nm in einem Messintervall von 1 nm gemessen. Die *Response Sensitivity* wurde auf 500 V festgelegt.

Fluoreszenzexzitationsspektren wurden zwischen 350 und 550 nm bei einer Emissionswellenlänge von 530 nm gemessen. Die *Response Sensitivity* wurde auf 500 V festgelegt. Ein Rhodamin-Standardpektrum diente zur Korrektur der Spektren.

2.2.16 Bioinformatische Anwendungen

Der Vergleich multipler Proteinsequenzen wurde mithilfe von Clustal Omega (EMBL-EBI) durchgeführt. Die *in silico* Analyse verschiedener CRYs im Hinblick auf die intrinsische Proteinunordnung erfolgte mittels IUPRED3 (*Prediction of Intrinsically Unstructured Proteins*) unter Verwendung des *Short disorder*-Algorithmus.

Die Berechnung der potentiellen CryP-Tertiärstruktur erfolgte mithilfe des Strukturvorhersage-Programms Phyre2 (*Protein Homology/AnalogY Recognition Engine*) auf Basis von Homologievergleichen mit bekannten Strukturen von CPF-Proteinen (Kelley et al. 2015).

Die Tertiärstrukturen von Proteinen wurden mithilfe von UCSF Chimera (*Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics (RBVI), University of California, San Francisco*) visualisiert.

3 Ergebnisse

3.1 Sequenz- und Strukturvergleich von CryP mit bekannten CPF-Vertretern

Als Mitglied der bisher nicht charakterisierten Gruppe der pflanzenähnlichen CRYs liegen für CryP aus *P. tricornutum* nur wenige Informationen über die FAD-Redoxchemie, das Bindevverhalten, Konformation und Struktur oder *in vivo* Funktionen vor. Um mögliche Ähnlichkeiten zu bereits charakterisierten CRYs und PLs untersuchen zu können, wurden die Primärsequenzen der konservierten PHR von CryP und ausgewählten CPF-Vertretern aller Untergruppen miteinander verglichen (Abb. 3.1). Die hohe Zahl konservierter und chemisch verwandter Aminosäuren (AS) im positionsgenauen Vergleich spiegelt den homologen Ursprung der CPF-Mitglieder wider. Dabei besitzt CryP mit den Positionen W342, W398 und W421 wie alle betrachteten CRYs und PLs die konservierte kanonische Trp-Triade, die als Voraussetzung für eine Photoreduktion des FAD-Kofaktors unter *in vitro*-Bedingungen betrachtet wird (Kavakli und Sancar 2004; Öztürk et al. 2008; Li et al. 2011). Darüber hinaus sind in CryP auch die konservierten FAD-Bindestellen erhalten, die zusammen mit weiteren, nicht-konservierten Resten eine FAD-Bindung hauptsächlich über elektrostatische Wechselwirkungen ermöglichen. Die Bildung und die Stabilität unterschiedlicher FAD-Redoxzustände werden maßgeblich von der AS gegenüber der N5-Position des FAD-Isoalloxazinrings beeinflusst (Balland et al. 2009). CryP trägt an dieser Stelle ein Asparagin (N417) und weist damit größere Homologie zu PLs, CRY-DASHs, aCRYs Typ II und tierähnlichen CRYs auf als zu pCRYs und Insekten-CRYs, die hier ein Aspartat bzw. Cystein tragen. Im Gegensatz zur FAD-Bindetasche sind die AS, die eine Bindung des Antennenchromophors vermitteln, weniger stark bis gar nicht konserviert. Die Zuordnung der beteiligten Positionen wird zudem dadurch erschwert, dass CRYs und PLs mit verschiedenen oder auch ganz ohne Antennenchromophore isoliert werden. Die Strukturanalyse der CPDIII-PL aus *Agrobacterium tumefaciens* (AgtCPDIII) deckte in diesem Bezug zwei Tryptophane auf, die eine MTHF-Bindung über π - π -Wechselwirkungen beidseits des Pterin-Ringsystems ermöglichen (Scheerer et al. 2015). Diese beiden Tryptophane sind in allen bekannten CPDIII-PLs konserviert. Auch CryP weist mit W231 und Y373 zwei aromatische AS an diesen Positionen auf, die eine MTHF-Bindung über ähnliche Wechselwirkungen vermitteln könnten.

Ergebnisse

DmCRY1-PHR	LEDATF---V---ELDPEFCRSLKLFQQLPTPEHFNV--YGDNM--GFLAKINWRGGETQ	229
CraCRY-PHR	AA-MP-PPAE---DMPSAAPA----ATGVPTWQEVGFKE-----PPL--TVFKGGETE	217
Dm (6-4) PL	LKNMPTPPKD---EVEQKDSA----AYDCPTMKQLVKRP-----EELGPNKFPGGETE	249
MmCRY1-PHR	SDVIGK-CMT---PLSDDHDE----KYGVPSLEELGFDT-----DGLSSAVWPGGETE	216
CryP-PHR	SLACLYSVAPPPQDCKSV---PIEELGFETV-----PPSTKWD--EPIRERFPMIHYL	245
SynCRY-DASH	----PCFFAP--SQLLPS--PNIKLELTAPPPEFFP--QINFDHR--SVL--AFQGGETA	218
EcCPDI	CVAAPKVRSS--GSIEPS--PSITLNYP---RQ----SFD---T--AHF----PVEEKA	227
AgtCPDIII	SLTAP-----KVWPK--SEKLSNWKLLPTKPDWAKDFSDI	210
AtCRY1-PHR	-----KKIIS--GDVSK---CVADPLVFEDDSEKGSNALLARA	219
DmCRY1-PHR	ALLLLDERLKVQHAFAFERGFYLPNQALPNIH-DSPKSMSAHLRFGCLSVRRFYWSVHDLF	288
CraCRY-PHR	ALARLEAAFQDP--KVVAGFQKPDTPSAWEKPA TTVLS PYLKFGCLSARLFHARLLEVY	275
Dm (6-4) PL	ALRRMEESLKDE--IWVARFEKPNAPNSLE-PS TTVLS PYLKFGCLSARLFNQKLKEII	306
MmCRY1-PHR	ALTRLERHLERK--AWVANFERPRMNANSLL-AS PTGLS PYLRFGCLSCLFYFKLTDLY	273
CryP-PHR	AQRRLDHF L--I-- KGLPLYESDRSRA-DM-EYATSQ LSVYLRIIGIISPRELYWRIEDSS	299
SynCRY-DASH	GLARLQDYFWHG--DRLKDYKETRNGM-VG-ADY SSKFS PWLALGCLSPRFIYQEVKRYE	274
EcCPDI	AIAQLRQFC--Q--NGAGEYEQQRDFP-AV--EG TSRLS ASLATGGLSPRQCLHRLLAEQ	280
AgtCPDIII	ALDKLDDFI--D--GALKGYEEGRDFP-AK--PA TSLLS PHLAAGEISPAAVWHATKGLS	263
AtCRY1-PHR	GDKALTTFI--N--G PLLEY SKNRRKA-DS--AT TSFLS PHLHFGEVSVRKVFLVRIKQ	272
	. : : . :* : * .:	
DmCRY1-PHR	KNVQLRACVRGVQMTGGAHITG QLI WREYFYTMSVNNPNY-DRMEGNDICLSIP WAK ---	344
CraCRY-PHR	RRH--PAH-----S QPPVSL RGQLLWREFFYTVGSTTPNF-HRMAGNPVCKQID DD ---	324
Dm (6-4) PL	KRQ--PKH-----S QPPVSL IGQLMWREFFYTVAAAEPNF-DRMLGNVYCMQIP WQE ---	355
MmCRY1-PHR	KKV--KKN-----S SPPLSL YGQLLWREFFYTAATNNPRF-DKMEGNPICVQIP WDK ---	322
CryP-PHR	----- LSPEAKKT FARRLIWRELAY YQLFC FPKM-RDRSIRKHYEASE WVTGDE	347
SynCRY-DASH	QER-----V SNDSTH WLI FELL WRDFFRFVAQKYGNKLFN RG G-LLNKN FPWQE ---	322
EcCPDI	PQA-----L DGGAGS VWLNELI WRE FYRHLITYHPSLCKHRPFIAWTDRV QWQS ---	329
AgtCPDIII	RH-----I ASNDI S RFER KEI WRE FCYHLLFHFPEL-GEKNW NS FD AFS WRD---	310
AtCRY1-PHR	VAWANEGN--EAGEESVN LE FLKS IGL REYSRYISFNHPYS-HERPLL GLK FF WAV ---	326
	: *:	*
DmCRY1-PHR	PNENLL QSW RLGQTGFPLIDGAMRQLLAEG WLH HTLRNTVATFLTRG GLWQS WEHGLQHF	404
CraCRY-PHR	NP-EFLAA WRE ARTGFPWIDA IMT QLVTW GMH HLARHSVACFLTRGD LYV S W ERGMEVF	383
Dm (6-4) PL	HP-DHLEA WTH GRTGYPFIDAIMRQLRQEG WI HNLARHAVACFLTRGD LWIS WEEGQRVF	414
MmCRY1-PHR	NP-EALAK WAE GRTGFPWIDA IMT QLRQEG WI HHLARHAVACFLTRGD LWIS WEEGMKVF	381
CryP-PHR	EK-GRFNA WKR GLTGYPLVDAGMREL YTTG Y LQ S VRM VVAS FLVE -YLRVD WTK GA EW	405
SynCRY-DASH	DQ-VRFEL WRS GQTGYPLVDANMREL NLT G FMS NRGR QNV ASFLCK-NL GID WR WGA EW	380
EcCPDI	NP-AHL QAW QEGKTGYPIVD AMR LN STG W MHN RL MIT ASFLVK-DLLID WRE GER YF	387
AgtCPDIII	DE-KSF KA W TR GMTGYPIVDAGMR QLW Q HGT M HN RV RM IVASFLIK-HLLID WR KGE KW	368
AtCRY1-PHR	DE-NYF KA W RQ GRTGYPLVDAGMREL WAT G WLH DRI RVV SS FFV K-VL Q LP WR W G M KY F	384
	: * . ** * : . * : * . * . . * . : * * :	
DmCRY1-PHR	LKY LLD AD WSV CAG N W MV SSSAFERLLDSS LV TC P VALAKRLDPDGTYIKQYVPELMNV	464
CraCRY-PHR	EEHLID QD H YL NAAN W WLSASAFFSQY--FRVYSPV V FGK YD PEGRFIRKFL PV LKDM	441
Dm (6-4) PL	EQL LD Q D WALNAG N W W LSASAFFHQY--FRVYSPV A FGK TD PQGHYIRKYVPELSKY	472
MmCRY1-PHR	EEL LD AD WS INAG S W W LS CS FF Q QF--FHCYCPV G FR RTD PNGDYIRRYLPVLRGF	439
CryP-PHR	HYTLADAD SAIN SMM W Q AGRS GD Q WN -F----VL S PENAS Q DPYGE YTR K W VPELS S	460
SynCRY-DASH	ESCLID YD VCSN W GN NY TAGIGNDARD-F-RYFNIP K Q S Q YD PQGT Y LRH W LPEL KN L	438
EcCPDI	MSQLID GD LAAN NG W Q AA ST GT DA AP-YFRIFN P TT Q GE K FD H EGEFIR Q W L PEL RD V	446
AgtCPDIII	RDT LV DAD PAS NAAN W Q W VAGSGADASP-FFRIFN P IL Q GE K FD G D G D Y VR R FVPE L E K L	427
AtCRY1-PHR	WDT LL DAD LES DAL G Q Y IT GT L P DSRE-FDRID N P Q FE G Y K FD P NG E Y V RR W LPEL S R L	443
	* * * *	* . :

Abb. 3.1: PHR-Sequenzvergleich von CryP und ausgewählten CPF-Vertretern. Der Vergleich wurde mithilfe von Clustal Omega (EMBL-EBI) durchgeführt. Die Farben der hinterlegten Positionen sind wie folgt codiert: *rot* kanonische Trp-Triade, *gelb* FAD-Bindestellen, *türkis* FAD-N5-proximale Position, *blau* MTHF-Bindestellen, *rote Buchstaben* mögliche alternative aromatische Elektronendonoren. Punkte und Sterne markieren den Konservierungsgrad der jeweiligen Position. Agt *Agrobacterium tumefaciens*, At *Arabidopsis thaliana*, Cra *Chlamydomonas reinhardtii*, Dm *Drosophila melanogaster*, Ec *Escherichia coli*, Mm *Mus musculus*, Syn *Synechocystis* sp. Vollständiger Sequenzvergleich mit noch weiteren CPF-Vertretern vgl. Anhang Abb. A2.

Ergebnisse

Um die aus dem Sequenzvergleich ermittelten Positionen mit Einfluss auf das FAD-Redoxverhalten und die Chromophorbindung auf die CryP-Struktur zu übertragen, wurde eine mögliche Tertiärstruktur der CryP-PHR auf Basis der Homologie zu AgtCPDIII modelliert (Abb. 3.2). Aufgrund fehlender Homologien und damit verbundenen fehlenden Strukturdaten ist die CTE von der Strukturberechnung ausgenommen.

Die CryP-PHR weist den typischen Aufbau bereits charakterisierter CRY-Strukturen auf (Abb. 3.2 A, Park et al. 1995; Brautigam et al. 2004). Dabei besteht die N-terminale Proteinhälfte aus einer $\alpha\beta$ -Subdomäne, wobei die C-terminale Subdomäne α -helikale Strukturen enthält. Beide Subdomänen werden durch einen variablen Linker, der um die α -Subdomäne liegt, miteinander verbunden. Die FAD-Bindestelle, die sich in den bereits bekannten CPF-Strukturen als besonders konserviert erwiesen hat, befindet sich in einer Tasche, die von der α -helikalen Subdomäne gebildet wird. FAD wird hier in einer U-Konformation nicht-kovalent gebunden, in der sich die Adenin- und Isoalloxazinringsysteme parallel gegenüberliegen. Dagegen wird das Antennenchromophor MTHF vermutlich an einer exponierten Stelle an der Grenzfläche beider Subdomänen gebunden. Mit einem Abstand von 18 Å zwischen N10 des MTHF-Pterinrings und N5 des FAD-Isoalloxazinrings würden sich beide Chromophore in geeigneter Distanz für einen Resonanzenergietransfer befinden.

Die vergrößerte Darstellung der FAD-Umgebung zeigt, dass die Positionen der kanonischen Trp-Triade W342, W398 und W421 sowie FAD in einer Reihe und mit 15 Å, 8 Å und 6 Å in für einen Elektronentransfer geeigneter Nähe liegen (Abb. 3.2. C). Gleichzeitig liegt die Amidgruppe von N417 in direktem Kontakt zu N5-FAD, an dem die photoinduzierten Redoxreaktionen stattfinden. Dies würde die Bedeutung dieser Position für die Bildung und die Stabilität verschiedener FAD-Redoxformen bestärken.

Die Analyse der vermuteten MTHF-Binderegion bestärkt die Annahmen aus dem Sequenzvergleich (Abb. 3.2 D). Die aromatischen Ringsysteme von W231 und Y373 liegen in paralleler Anordnung und mit 3,5 Å bzw. 4,7 Å in optimalem Abstand zum Pterin-Ring, um eine Bindung über π -Stapelkräfte zu ermöglichen.

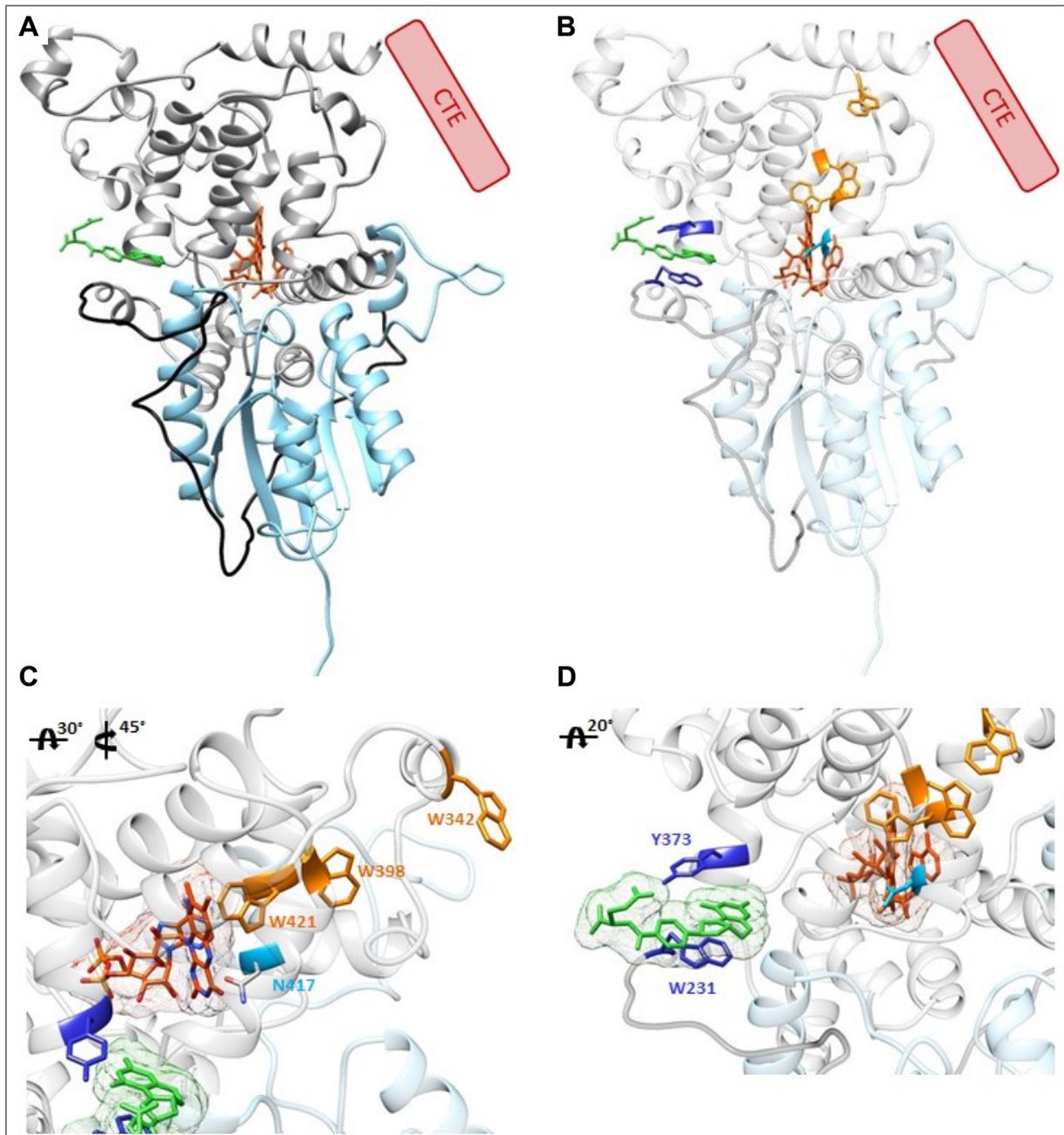
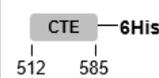


Abb. 3.2: Struktureller CryP-Aufbau. Die potentielle CryP-Tertiärstruktur wurde auf Basis der Strukturdaten der *Agrobacterium tumefaciens* CPDIII-Photolyase (4U63; Scheerer et al. 2015) mittels des PHYRE2 *Protein Homology/ analogy Recognition Engine* Servers errechnet und mithilfe von UCSF Chimera visualisiert. **(A)** Intraprotein-Aufbau. CryP weist eine N-terminale $\alpha\beta$ -Subdomäne (hellblau) auf, die von einem Interdomänen-Linker (schwarz) mit der C-terminalen α -helikalen Subdomäne (grau) verbunden wird. FAD (rot) wird in einer Tasche in der α -helikalen Subdomäne gebunden, während MTHF (grün) an der Grenzfläche beider Domänen liegt. Aufgrund fehlender Strukturdaten ist die C-terminale Erweiterung (CTE) strukturell nicht dargestellt. **(B)** Übersicht über die in dieser Arbeit betrachteten Aminosäuren. Zur Analyse der FAD-Reduzierbarkeit wurden Punktmutationen an den Positionen N417, W342, W398 und W421 eingefügt. Die MTHF-Bindung wurde durch Punktmutationen der Positionen W231 und Y373 analysiert. **(C)** Vergrößerte Darstellung der FAD-Umgebung. **(D)** Vergrößerte Darstellung der MTHF-Bindestelle.

Zur Analyse der Chromophorbindung und der FAD-Redoxchemie wurden in vorliegender Arbeit mittels gentechnischer Methoden einzelne Aminosäureaustausche oder Deletionen in die CryP-Sequenz

eingeführt. Dabei wurde das oberflächenexponierte Tryptophan der kanonischen Trp-Triade gegen redox-inertes Phenylalanin ersetzt (W342F). Die Position in nächstem Kontakt zu N5 des FAD-Isoalloxazinrings wurde gegen Cystein ausgetauscht, um eine zu Insekten-CRYs vergleichbare Redoxumgebung zu schaffen (N417C). Die MTHF-Bindung wurde durch einen Austausch der aromatischen Aminosäuren in nächstem Kontakt zum MTHF-Pterinring gegen Alanin analysiert (W231A, Y373A). Zudem wurde eine verkürzte CryP-Variante mit Deletion der CTE erzeugt, um die grundsätzliche Bedeutung dieser Domäne für die CryP-Wirkweise zu untersuchen (CryP-PHR). Tab. 3.1 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit erstellten und untersuchten CryP-Varianten. Diese tragen eine C-terminale Hexahistidinmarkierung, die in der Nomenklatur der folgenden Arbeit, falls nicht erforderlich, jedoch nicht weiter erwähnt wird.

Tab. 3.1: Übersicht über die in dieser Arbeit charakterisierten CryP-Varianten.

CryP-Variante	Merkmale	Struktur
CryP	Wildtyp-Protein	
CryP-PHR	Deletion der CTE (AS 513-585)	
CryP_W342F	W→F-Austausch des distalen W342 der Trp-Triade	
CryP_N417C	N→C-Austausch des FAD-N5 proximalen N417	
CryP_W231A	W→A-Austausch des potentiellen MTHF-komplexierenden W231	
CryP_Y373A	Y→A-Austausch des potentiellen MTHF-komplexierenden Y373	
CTE	C-terminale Erweiterung von CryP (AS 513-585)	

3.2 Spektroskopische Charakterisierung von CryP-Mutanten mit Einfluss auf die FAD-Redoxchemie und das MTHF-Bindungsverhalten

CryP kann als wasserlösliches Protein mit einer molekularen Masse von 68 kDa nach heterologer Expression in *E. coli* mithilfe einer rekombinanten C-terminalen Hexahistidinmarkierung per IMAC isoliert werden (Juhas et al. 2014). Anhand von Absorptionsspektren des frisch isolierten CryP können

Ergebnisse

die Chromophore FAD und MTHF nachgewiesen werden (Abb. 3.3 A). FAD liegt dabei hauptsächlich als semireduziertes Neutralradikal FADH^\bullet mit Absorptionsmaxima bei 590 und 636 nm vor. Zudem ist ein kleiner Teil als volloxidiertes FADox mit Absorptionsschultern bei 450 und 473 nm sichtbar. Die Absorption von FADox wird dabei stellenweise von der Absorption des Antennenchromophors MTHF überdeckt, das mit einem Absorptionsmaximum bei 380 nm eine höhere molare Extinktion im UV-A-Bereich als FADox aufweist. Infolge von aerober Inkubation im Dunkeln wird das Neutralradikal über mehrere Tage schrittweise zu FADox oxidiert. Dies wird sichtbar an einer Abnahme der relativen Absorptionen bei 590 und 636 nm mit einem gleichzeitigen Anstieg der Absorptionen bei 450 und 473 nm. Die FAD-Oxidation kann durch chemische Oxidation mit $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ beschleunigt werden. Die FAD-Redoxzustände können durch unterschiedliche Färbungen voneinander unterschieden werden. CryPsemired weist eine grünliche Färbung auf, CryPox ist gelb gefärbt (Abb. 3.3 C). Eine Belichtung von CryP mit BL unter Zugabe eines externen Reduktionsmittels führt zur Bildung des vollreduzierten FADH^- , was an einer gleichzeitigen Abnahme der Absorption bei 450, 473, 590 und 636 nm gemessen werden kann.

Um die Redoxchemie des CryP-gebundenen FAD in Bezug auf die Bildung und Stabilität der einzelnen FAD-Redoxstufen zu untersuchen, wurden vergleichende Belichtungs- und Oxidationsmessungen am wildtypspezifischen CryP sowie verschiedenen CryP-Punkt- und Deletionsmutanten durchgeführt.

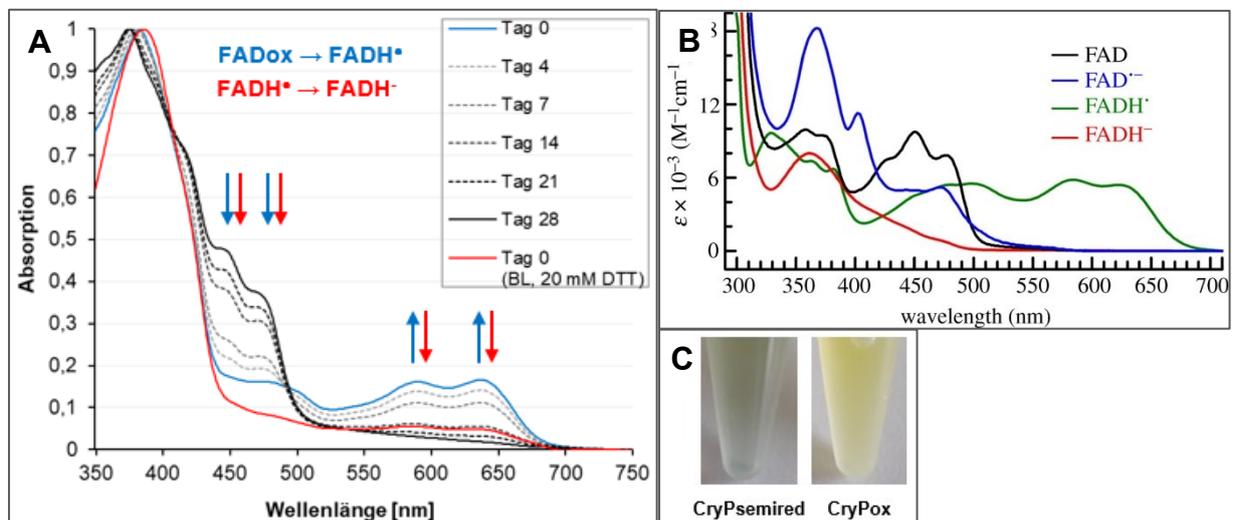


Abb. 3.3: FAD-Oxidation und -Reduktion in CryP. (A) Frisch isoliertes CryPsemired wurde über 28 Tage im Dunkeln auf Eis inkubiert, um die Stabilität von FADH^\bullet gegen aerobe Oxidation zu untersuchen. Die Inkubation erfolgte in Lagerpuffer (50 mM NaPi pH7.8, 100 mM NaCl, 20 % Glycerin). Zudem wurde CryPsemired 5 min mit Blaulicht (BL, λ_{max} 465 nm, $15 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) nach Zugabe von 10 mM DTT belichtet. Die UV-Vis-Absorptionsspektren (350-750 nm) wurden relativ zur maximalen MTHF-Absorption bei 380 nm normiert. (B) Absorptionsspektren verschiedener FAD-Redoxformen verändert nach Liu et al. (2010). (C) Frisch isoliertes CryP enthält das semireduzierte Neutralradikal FADH^\bullet mit einer blaugrünen Färbung (links), während es nach Oxidation die gelbliche Färbung von FADox aufweist (rechts).

3.2.1 FAD-Photoreduktion und -Oxidation im CryP-Wildtypprotein und CryP-PHR

Um die biochemischen Eigenschaften der PHR-Domäne und CTE zu untersuchen, wurde eine verkürzte CryP-Variante hergestellt. Diese setzt sich aus der 512 AS umfassenden PHR-Domäne mit einer C-terminalen Hexahistidin-Markierung zusammen und wird fortan als CryP-PHR bezeichnet (vgl. Tab. 3.1). CryP-PHR enthält wie das Vollängenprotein CryP alle relevanten Sequenzmerkmale zur Bindung von FAD und MTHF, weshalb von einer unveränderten Chromophorbinding ausgegangen wurde. Die heterologe Expression und Isolation von CryP-PHR bestätigte dies jedoch nur zum Teil (Abb. 3.4). Während beide Varianten mit dem Antennenchromophor MTHF isoliert werden, sind Unterschiede im FAD-Redoxzustand zu finden. Frisch isoliertes CryP enthält typischerweise zu einem Großteil das semireduzierte Neutralradikal FADH^\bullet , nur eine kleine Menge oxidiert während des aeroben Isolationsprozesses zu FADox (vgl. Abb. 3.3). Im Gegensatz dazu bindet CryP-PHR ausschließlich FADox nach der Aufreinigung.

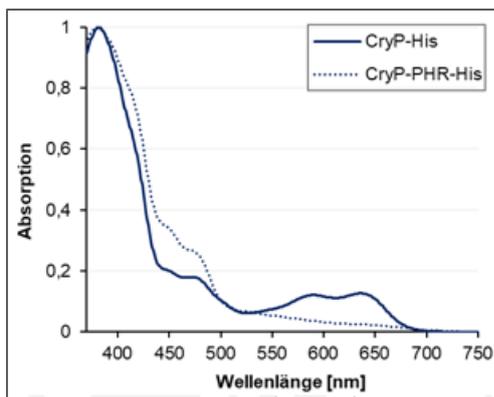


Abb. 3.4: Vergleich von CryP und CryP-PHR. UV-Vis-Absorptionsspektren (370-750 nm) von frisch isoliertem CryP und CryP-PHR. Die Spektren wurden relativ zur maximalen MTHF-Absorption bei 380 nm normiert.

Ob dieser FAD-Redoxunterschied in einer verminderten Resistenz von FADH^\bullet gegen aerobe Oxidation oder in einer beeinträchtigten FAD-Reduzierbarkeit in CryP-PHR begründet ist, sollte anschließend in vergleichenden Belichtungs- und Reoxidationskinetiken absorptionspektroskopisch untersucht werden. Dazu wurde CryP entweder direkt nach Isolation, d. h. hauptsächlich mit semireduziertem FADH^\bullet (CryPsemired), oder nach chemischer Oxidation, d. h. mit FADox (CryPox), mit CryP-PHR verglichen. CryPox, CryPsemired und CryP-PHR wurden zunächst für definierte Zeitlängen mit BL belichtet und anschließend im Dunkeln inkubiert, um den Grad von FAD-Reduktion und -Reoxidation zu vergleichen. Es wurden jeweils Ansätze ohne Reduktionsmittel bzw. mit 10 mM DTT vermessen. Die Messergebnisse wurden von Krischer et al. (2022) veröffentlicht.

Ergebnisse

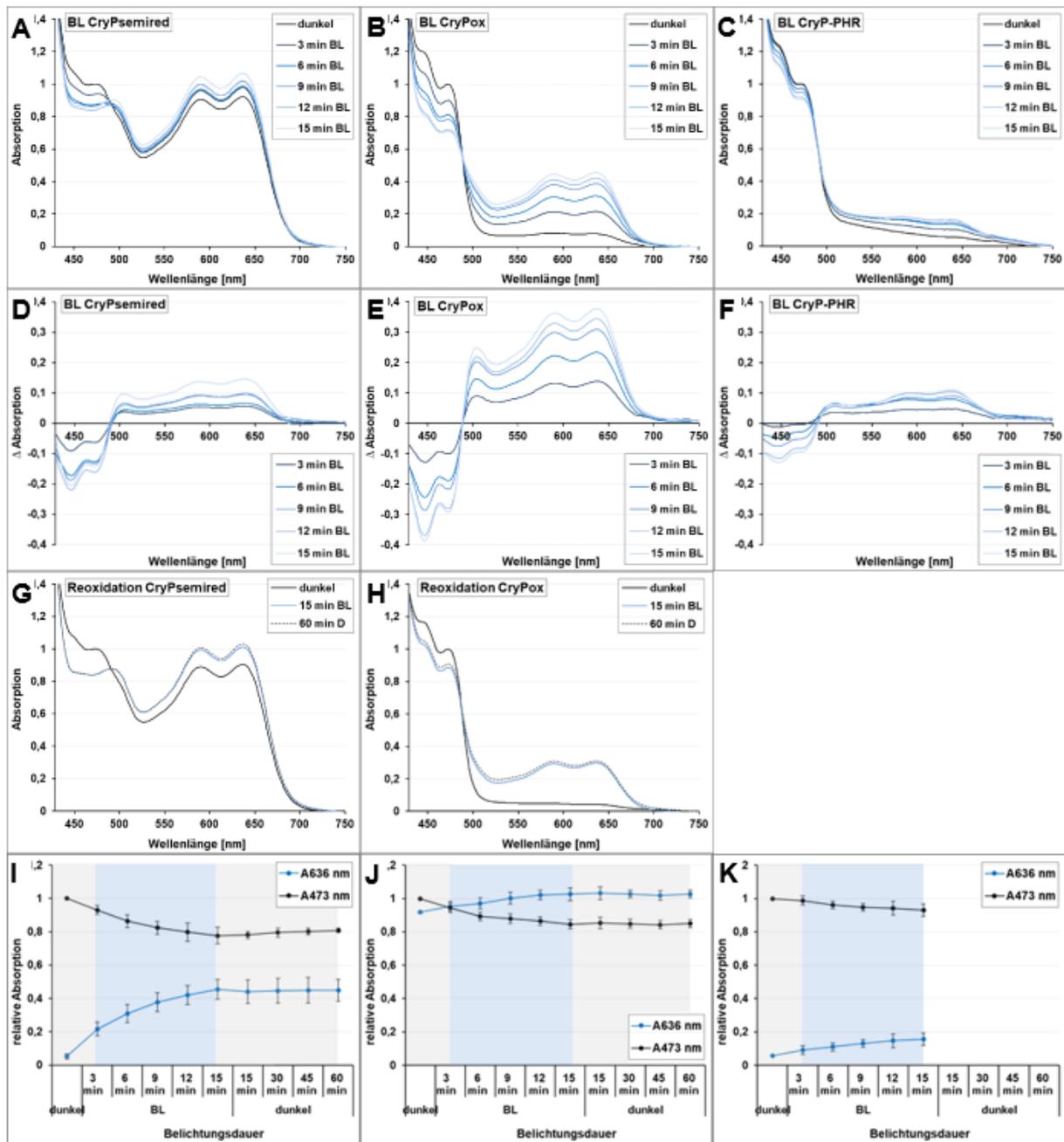


Abb. 3.5: Vergleich der blaulichtabhängigen FAD-Reduktion und -Reoxidation in CryPsemired, CryPox und CryP-PHR ohne DTT: UV-Vis-Absorptionsspektren (430-750 nm) von frisch isoliertem CryPsemired (A) bzw. nach chemischer Oxidation mit $K_3[Fe(CN)_6]$ (CryPox) (B) und CryP-PHR (C) nach jeweils 3 bis 15 min BL (λ_{max} 465 nm, $10 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) ohne Zugabe eines Reduktionsmittels. Die Spektren wurden relativ zur Absorption bei 473 nm normiert. Differentialspektren der Kurven nach Belichtung abzüglich der Kurve vor Belichtung für CryPsemired (D), CryPox (E) und CryP-PHR (F). UV-Vis-Absorptionsspektren (430-750 nm) von CryPsemired (G) und CryPox (H) nach 15 min BL und 60 min Dunkel-Reoxidation. Vergleich der Absorptionswerte A473 und A636 als Maß für die relativen Mengen von FADox bzw. FADH* in CryPsemired (I), CryPox (J) und CryP-PHR (K). Die Messwerte stellen Mittelwerte und daraus abgeleitete Standardabweichungen aus jeweils neun technischen Replikaten dar. Verändert nach Krischer et al. (2022).

Eine BL-Belichtung von frisch isoliertem CryPsemired ohne Zugabe eines externen Reduktionsmittels führt zur Reduktion des kleinen Anteils an gebundenem FADox zum semireduzierten Zustand (Abb. 3.5

Ergebnisse

A und I). Dies ist erkennbar an einem Anstieg der relativen Absorption bei 636 nm als Maß für FADH^\bullet mit einer gleichzeitigen Abnahme der Absorption bei 473 nm als Maß für FADox . Dieser Effekt ist nach 15 min Belichtung gesättigt. Aufgrund des geringen Anteils von FADox an der FAD -Gesamtmenge erscheinen die errechneten Absorptionsdifferenzen der Kurven nach Belichtung gemessen an der Kurve vor Belichtung als gering (Abb. 3.5 D). Der vollreduzierte Zustand FADH^- wird nicht erreicht. Gleiches ist für die BL-Belichtung von per chemischer Oxidation gewonnenem CryPox zu beobachten. FADox wird sehr effizient zu FADH^\bullet reduziert, erkennbar an großen Absorptionsdifferenzen (Abb. 3.5 B, E, J). Nach 15 min kann keine weitere Reduktion beobachtet werden. Gemessen daran wird für CryP-PHR kaum eine FAD -Reduktion beobachtet. Die Reduktion von FADox zu FADH^\bullet beträgt nur circa ein Viertel der Effizienz von CryPox (Abb. 3.5 C, F, K).

An CryP gebundenes semireduziertes FADH^\bullet ist sehr stabil, innerhalb einer Messzeit von 60 min kann keine Reoxidation im Dunkeln unter aeroben Bedingungen gemessen werden (Abb. 3.5 G und H). Für eine vollständige Oxidation von FADH^\bullet zu FADox muss CryP länger als 20 Tage in Dunkelheit unter aeroben Verhältnissen inkubiert werden (vgl. Abb. 3.3).

Für CryP-PHR wurden aufgrund der schwachen Reduzierbarkeit ohne Reduktionsmittel keine Reoxidationskinetiken vermessen.

Nach Zugabe von 10 mM DTT als externes Reduktionsmittel wird FADH^\bullet in CryPsemired durch BL-Belichtung in den zweielektronen-reduzierten Zustand FADH^- überführt. Dies ist erkennbar an einer gleichzeitigen Abnahme der relativen Absorptionen bei 473 und 636 nm (Abb. 3.6 A, D und J). Gleiches ist für die Blaubelichtung von CryPox zu beobachten. FADox wird über die Zwischenstufe FADH^\bullet für Belichtungszeiten länger als 3 min zu FADH^- reduziert (Abb. 3.6 B, E und K). Im Gegensatz dazu führt die Zugabe von DTT zu CryP-PHR lediglich zu einer erhöhten Reduzierbarkeit von FADox zu FADH^\bullet (Abb. 3.6 C, F und L). Das Ausmaß der FADH^\bullet -Bildung ist hier vergleichbar mit der BL-Reduktion von CryPox ohne Reduktionsmittel (Abb. 3.5 B, E und J).

Anders als FADH^\bullet ist an CryP gebundenes vollreduziertes FADH^- weniger stabil gegen aerobe Oxidation. Innerhalb einer einstündigen Dunkelinkubation nach BL-Belichtung mit DTT wird FADH^- wieder vollständig zu FADH^\bullet reoxidiert (Abb. 3.6 G und H). Dabei findet jedoch keine Rückoxidation zu FADox statt, erkennbar an einem höheren Wiederanstieg der Absorption bei 636 nm im Vergleich zu 473 nm. Der Wiederanstieg an beiden Messpunkten ist dabei auf die Reoxidation von FADH^- zu FADH^\bullet zu erklären. Anders verhält sich die Stabilität von FADH^\bullet in CryP-PHR. Im Gegensatz zu CryP, für das über eine Stunde keine Reoxidation von FADH^\bullet zu FADox gemessen wird, ist das Neutralradikal in CryP-PHR im gleichen Zeitraum sensibler gegenüber aerober Oxidation (Abb. 3.6 I und L).

Ergebnisse

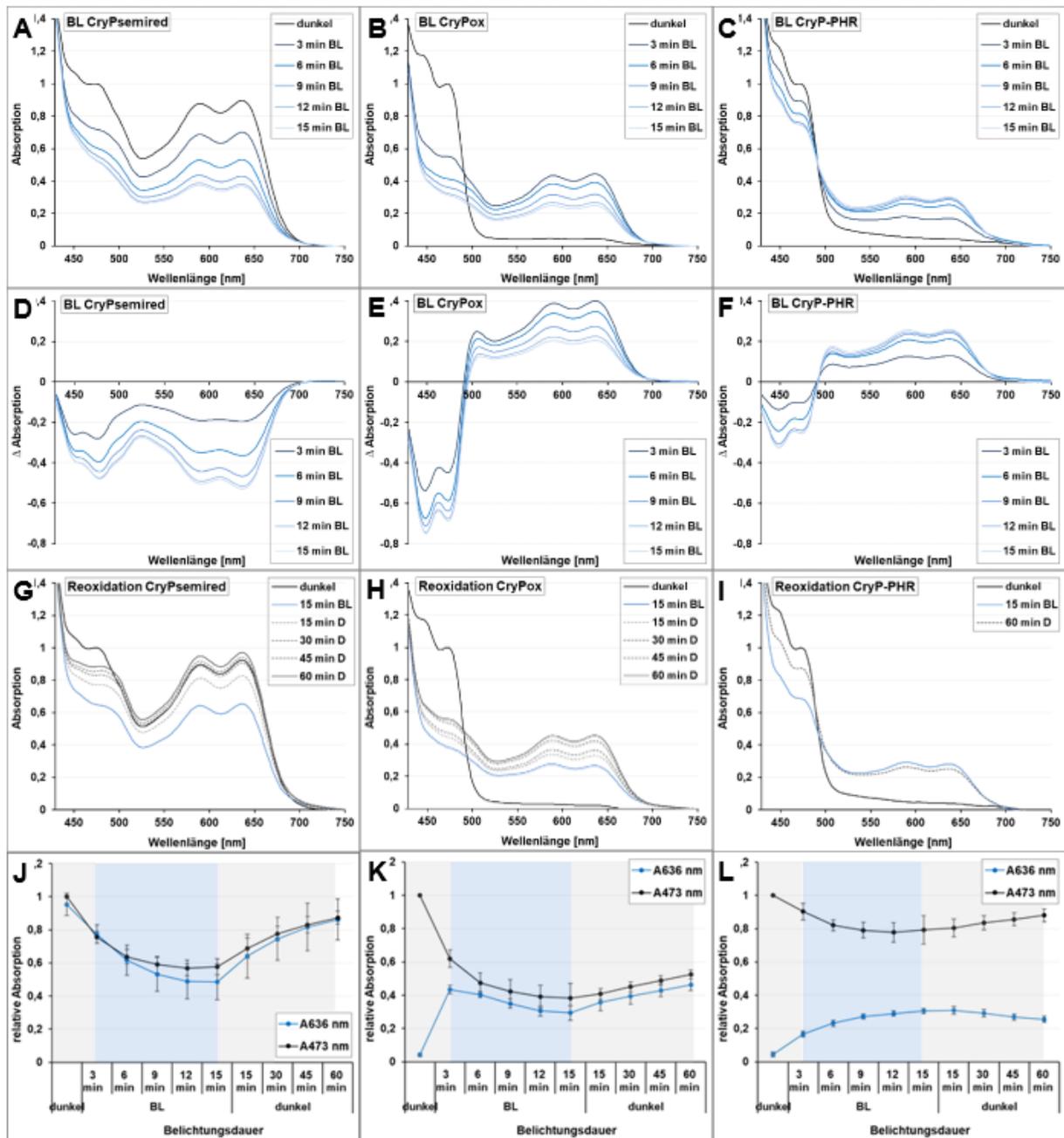


Abb. 3.6: Vergleich der blaulichtabhängigen FAD-Reduktion und -Reoxidation in CryPsemired, CryPox und CryP-PHR mit 10 mM DTT: UV-Vis-Absorptionsspektren (430-750 nm) von frisch isoliertem CryPsemired (A) bzw. nach chemischer Oxidation mit $K_3[Fe(CN)_6]$ (CryPox) (B) und CryP-PHR (C) nach jeweils 3 bis 15 min BL (λ_{max} 465 nm, $10 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) und Zugabe von 10 mM DTT. Die Spektren wurden relativ zur Absorption bei 473 nm normiert. Differentialspektren der Kurven nach Belichtung abzüglich der Kurve vor Belichtung für CryPsemired (D), CryPox (E) und CryP-PHR (F). UV-Vis-Absorptionsspektren (430-750 nm) von CryPsemired (G), CryPox (H) und CryP-PHR (I) nach 15 min BL und 15 bis 60 min Dunkel-Reoxidation. Vergleich der Absorptionswerte A473 und A636 als Maß für die relativen Mengen von FADox, FADH[•] bzw. FADH⁻ in CryPsemired (J), CryPox (K) und CryP-PHR (L). Die Messwerte stellen Mittelwerte und daraus abgeleitete Standardabweichungen aus jeweils neun technischen Replikaten dar. Verändert nach Krischer et al. (2022).

Ergebnisse

Zusammenfassend unterscheiden sich CryP und CryP-PHR sowohl in der lichtabhängigen Reduzierbarkeit als auch der Stabilität gegenüber aerober Oxidation des Kofaktors. Das Volllängenprotein CryP, das frisch isoliert bereits größtenteils FADH[•] enthält, kann ohne externes Reduktionsmittel lichtabhängig den einelektronen-reduzierten Neutralradikalzustand FADH[•] erreichen, während eine Belichtung mit Reduktionsmittel bis zum zweielektronen-, vollreduzierten Zustand FADH⁻ führt. Das um die CTE verkürzte CryP-PHR bindet frisch isoliert FADox und kann nur nach Zugabe eines Reduktionsmittels und Belichtung effizient zu FADH[•] reduziert werden, der vollreduzierte Zustand wird nicht erreicht. Während das Neutralradikal in CryP über Tage sehr stabil gegen Oxidation ist, startet die Reoxidation in CryP-PHR bereits innerhalb von 60 min. Der nur in CryP induzierbare vollreduzierte Zustand reoxidiert innerhalb von einer Stunde zu FADH[•].

Zur Untersuchung, ob dieser Einfluss der CTE auf das FAD-Reduktions- und Oxidationsverhalten CryP-spezifisch ist oder auch in anderen CRYs beobachtet werden kann, wurden vergleichbare Absorptionsmessungen an PtCPF1 und CraCRY sowie deren um die CTE-verkürzten Varianten PtCPF1-PHR und CraCRY-PHR durchgeführt. PtCPF1 und CraCRY sind tierähnliche CRYs aus *P. tricornutum* bzw. *C. reinhardtii* und üben *in vivo* eine duale Funktion aus, indem sie sowohl als Photorezeptoren als auch (6-4)-PLs aktiv sind (Coesel et al. 2009; Franz et al. 2018). Mit 55 und 76 AS weisen ihre CTEs vergleichbare Längen mit der CTE von CryP mit 73 AS auf. Im Gegensatz zu CryP werden PtCPF1 und CraCRY sowie deren um die CTE verkürzten Varianten nach heterologer Expression gleichermaßen mit FADox aber ohne Antennenchromophor isoliert (vgl. Anhang Abb. A3 und Abb. A4). Es folgten BL-Belichtungen und Dunkelinkubationen ohne und mit Zugabe eines externen Reduktionsmittels ähnlich wie für CryP und CryP-PHR. Dabei zeigte sich ein ähnliches Reduktionsverhalten von PtCPF1 und CraCRY wie für CryP. Ein großer Unterschied bildet jedoch die Stabilität von FADH[•], die in PtCPF1 und CraCRY deutlich geringer ist als in CryP. Im Gegensatz zu CryP und CryP-PHR zeigt der Vergleich von PtCPF1 und CraCRY mit ihren C-terminal verkürzten Varianten keine Unterschiede im FAD-Reduktions- und Oxidationsverhalten.

Demnach sind sowohl die hohe Resistenz des semireduzierten FADH[•] gegen aerobe Oxidation als auch die Wichtigkeit der CTE für eine effiziente lichtinduzierte FAD-Reduktion und Verlängerung der FADH[•]-Lebensdauer als CryP-spezifische Charakteristika zu betrachten.

Neben dem Einfluss der CTE auf die FAD-Reduzierbarkeit und -Oxidationsresistenz wird ihre Bedeutung im Hinblick auf Proteinkonformation, Interaktionsverhalten und Stabilität von CryP in den Abschnitten 3.5, 3.6 und 3.8 erläutert.

3.2.2 FAD-Photoreduktion und -Oxidation in CryP_W342F

Alle bisher analysierten CPF-Vertreter mit Ausnahme der CPDII-PLs weisen eine konservierte Tryptophan-Triade auf, die als Voraussetzung für eine effiziente FAD-Photoreduktion unter *in vitro*-Bedingungen betrachtet wird (Okafuji et al. 2010). In diesem Prozess werden in einer Kette aus einem distalen, oberflächen-exponierten Trp, einem medialen Trp und einem zu FAD proximalen Trp bis zu zwei Elektronen auf N1 bzw. N5 des FAD-Isoalloxazinrings übertragen (vgl. Abb. 1.10). Diese kanonische Trp-Triade ist mit W342, W398 und W421 auch in CryP konserviert. Um die Bedeutung dieser Triade für die FAD-Photoreduktion in CryP zu untersuchen, wurden einzelne Aminosäureaustausche der drei Positionen gegen redox-inertes Phenylalanin eingefügt. Von diesen drei Punktaustauschen konnte nur CryP_W342F mit einem W→F-Austausch des oberflächen-exponierten Trp erfolgreich in *E. coli* exprimiert und isoliert werden. CryP_W398F und CryP_W421F, in denen das mediale bzw. proximale Trp ersetzt wurden, konnten nicht exprimiert werden.

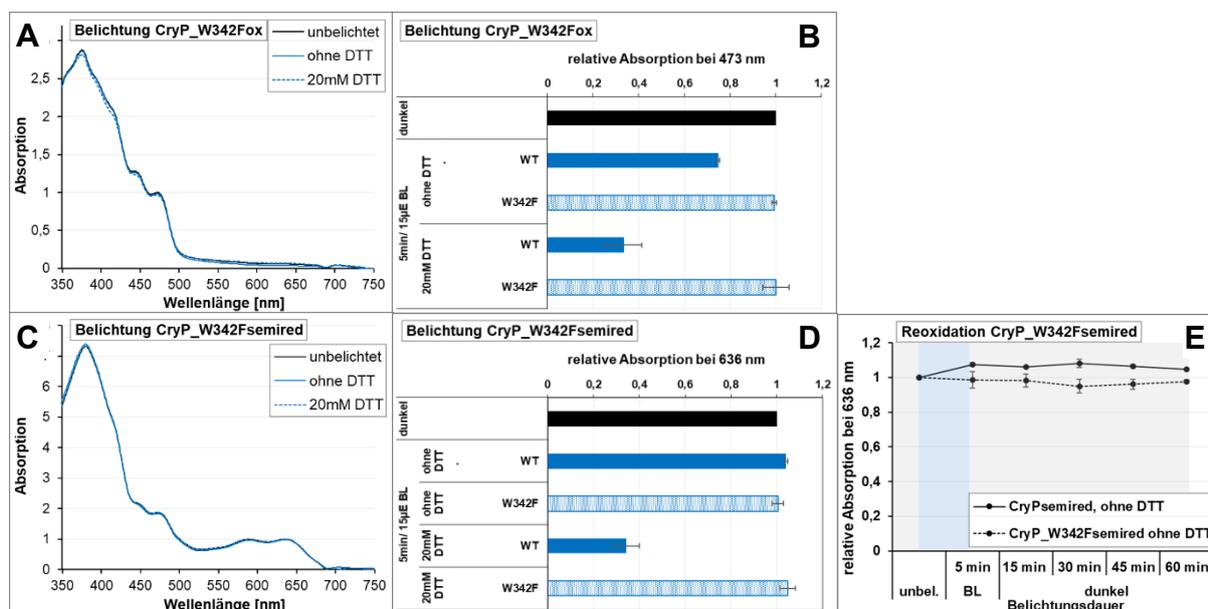


Abb. 3.7: Vergleich der lichtabhängigen FAD-Reduktion und -Reoxidation in CryP_W342Fox und CryP_W342Fsemired. (A) und (C) UV-Vis-Absorptionsspektren (350-750 nm) von frisch isoliertem CryP_W342Fsemired bzw. nach chemischer Oxidation mit $K_3[Fe(CN)_6]$ (CryP_W342Fox). Die Messung erfolgte nach 5 min Belichtung mit BL (λ_{max} 465 nm, $15 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) ohne oder nach Zugabe von 20 mM DTT. Die Spektren von CryPox wurden relativ zur Absorption bei 473 nm, die Spektren von CryPsemired zur Absorption bei 636 nm normiert. (B) und (D) Zum Vergleich der Stärke der Photoreduktion unter den einzelnen Belichtungsbedingungen wurden die relativen Absorptionswerte bei 473 nm und 636 nm als Maß für FADox bzw. FADH• dargestellt. (E) Die Reoxidation von FADH• wurde über 60 min beobachtet und anhand der relativen Absorption bei 636 nm visualisiert. Die Messwerte stellen Mittelwerte und daraus abgeleitete Standardabweichungen aus jeweils drei technischen Replikaten dar.

Das Absorptionsspektrum von frisch isoliertem CryP_W342F weist dieselben Charakteristika wie CryP auf, das heißt die Bindung von semireduziertem FADH• und des Antennenchromophors MTHF

(Abb. 3.7). Wie CryPsemired kann CryP_W342F mittels $K_3[Fe(CN)]_6$ chemisch oxidiert werden. Eine folgende Belichtung von CryP_W342Fox und CryP_W342Fsemired kann jedoch keine FAD-Reduktion induzieren (Abb. 3.7 A und C). Dies wurde an einem Vergleich der relativen Absorptionen bei 473 nm bzw. 636 nm als Maß für FADox bzw. FADH[•] messbar, die über den Belichtungsprozess unverändert blieben (Abb. 3.7 B und D). Die Absorption bei 473 nm sinkt im Fall einer FADox-Reduktion, die Absorption bei 636 nm sinkt im Fall ein FADH[•]-Reduktion oder Oxidation. Auch die Zugabe von DTT als externes Reduktionsmittel änderte den aktuellen FAD-Redoxzustand in CryP_W342F nicht. Der Punktaustausch beeinträchtigt jedoch nicht die Stabilität des semireduzierten FADH[•]. Wie für CryPsemired wird innerhalb von 60 min Messzeit keine Oxidation zu FADox in CryP_W342Fsemired gemessen (Abb. 3.7 E).

Demnach ist CryP_W342F unter *in vitro*-Bedingungen nicht reduzierbar.

3.2.3 FAD-Photoreduktion und -Oxidation in CryP_N417C

Die Bildung und Stabilität einzelner FAD-Redoxformen wird besonders von der AS gegenüberliegend zu N5 des FAD-Isoalloxazinrings beeinflusst. Die meisten CRYs und PLs, einschließlich CryP, tragen an dieser Position ein Asparagin. Eine Ausnahme stellen pflanzliche CRYs mit Aspartat und Insekten-CRYs mit Cystein dar. Um die Bedeutung dieser Position für das FAD-Redoxverhalten in CryP zu untersuchen, wurde die Position N417 gegen Aspartat bzw. Cystein ersetzt. Dabei konnte jedoch nur die Variante CryP_N417C in ausreichenden Mengen in *E. coli* exprimiert werden, die Variante CryP_N417D wurde nur schwach exprimiert und war nach dem Isolationsprozess nicht nachweisbar.

Das Absorptionsspektrum von CryP_N417C nach Isolation ist vergleichbar mit CryP-PHR (Abb. 3.8 A). Neben MTHF ist FAD als oxidiertes FADox gebunden. Analog zu CryP-PHR sollte untersucht werden, ob dieser FAD-Redoxunterschied zwischen frisch isoliertem CryP und CryP_N417C mit einer verminderten Resistenz von FADH[•] gegen aerobe Oxidation oder einer beeinträchtigten FAD-Reduzierbarkeit in CryP_N417C erklärbar ist. Eine Belichtung von CryP_N417C führt jedoch zu keiner FAD-Reduktion. Wie für CryP_W342F kann das gebundene FADox weder durch Erhöhung der reduktiven Kraft mittels DTT noch durch eine verlängerte Belichtungsdauer reduziert werden. Dies wird durch eine unveränderte Absorption bei 473 nm in Relation zum dunkeladaptierten Protein messbar (Abb. 3.8. B). Demnach hat der N417C-Austausch direkten Einfluss auf die FAD-Reduzierbarkeit aufgrund einer Veränderung der proteinvermittelten Redoxumgebung. Über die Stabilität lichtinduzierter Redoxformen kann keine Aussage getroffen werden. Die Beobachtung, dass CryP_N417C mit FADox isoliert wird, lässt jedoch eine verminderte Stabilität von FAD[•] gegen aerobe Oxidation wie für CryP-PHR vermuten.

Ergebnisse

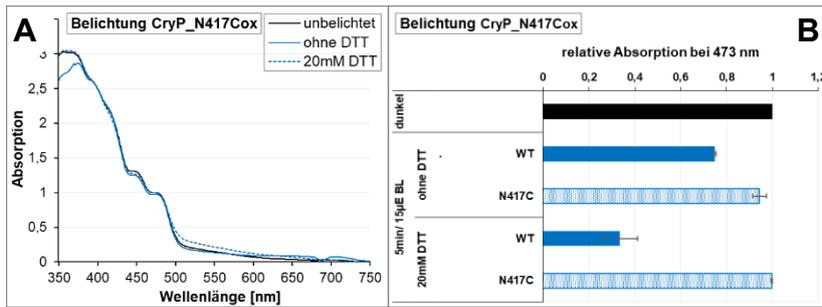


Abb. 3.8: Vergleich der lichtabhängigen FAD-Reduktion in CryP_N417Cox. (A) UV-Vis-Absorptionsspektren (350-750 nm) von frisch isoliertem CryP_N417Cox nach 5 min Belichtung mit BL (λ_{max} 465 nm, $15 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) ohne oder nach Zugabe von 20 mM DTT. Die Spektren wurden relativ zur Absorption bei 473 nm normiert. (B) Zum Vergleich der Stärke der Photoreduktion unter den einzelnen Belichtungsbedingungen wurden die relativen Absorptionswerte bei 473 nm als Maß für FADox bzw. FADH \bullet dargestellt. Die Messwerte stellen Mittelwerte und daraus abgeleitete Standardabweichungen aus jeweils drei technischen Replikaten dar.

3.2.4 FAD-Photoreduktion und -Oxidation in CryP_W231A

Die Isolation von CryP mit MTHF ist ein deutlicher Unterschied zu den bisher charakterisierten pCRYs und aCRYs, die ohne Antennenchromophor isoliert werden (Todo et al. 1997; Immeln et al. 2007; Öztürk et al. 2008). Eine Aufreinigung mit Antennenchromophor wird in der Regel für CRY-DASHs und PLs beobachtet (Park et al. 1995; Song et al. 2006). Im Gegensatz zur FAD-Bindetasche ist die Bindestelle der Antennenchromophore nur schwach konserviert. Der Sequenzvergleich von CryP mit AgtCPDIII lieferte mit W231 und Y373 zwei konservierte aromatische AS, die eine MTHF-Bindung in CryP über π -Stapelkräfte ermöglichen könnten (Scheerer et al. 2015). Eine alternative, zur *E. coli* CPDI-PL homologe Bindestelle könnte durch E128 vermittelt werden (Schleicher et al. 2005). Zur Identifizierung der MTHF-Bindepotion in CryP wurden daher einzelne Aminosäureaustausche der Positionen W231, Y373 und E128 gegen Alanin in CryP eingeführt. Alle der erzielten CryP-Varianten konnten erfolgreich exprimiert und isoliert werden.

Wie im wildtypspezifischen CryP ist in allen Varianten das semireduzierte Neutralradikal FADH \bullet gebunden, das mit $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ chemisch oxidiert werden kann (Abb. 3.9 A). Deutliche Unterschiede sind jedoch in der MTHF-Bindung zu erkennen. Während CryP_E128A eine mit CryP vergleichbare Chromophorbinding aufweist, ist MTHF in CryP_Y373A deutlich reduziert und in CryP_W231A überhaupt nicht gebunden. Dies ist erkennbar an einer im Vergleich zu CryP gesenkten Absorption bei 380 nm. Diese Unterschiede treten nach chemischer Oxidation, wenn FAD nur noch als FADox gebunden ist, deutlicher hervor (Abb. 3.9 B). Somit ist für CryP eine mit AgtCPDIII vergleichbare MTHF-Bindestelle anzunehmen.

Ergebnisse

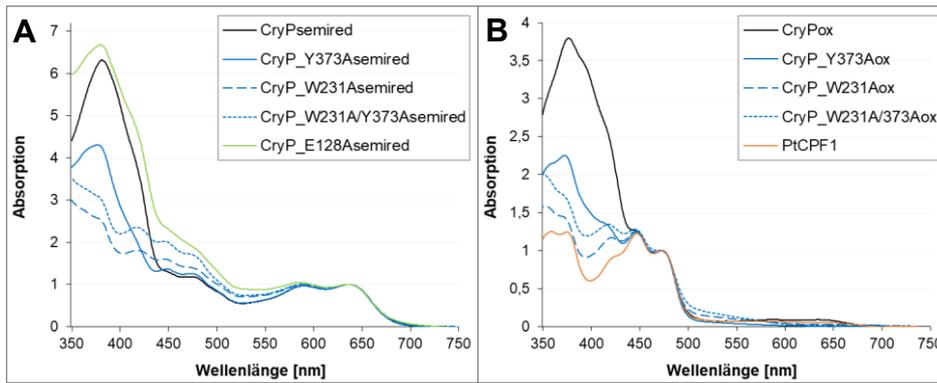


Abb. 3.9: Absorptionsspektroskopischer Vergleich von CryP und potentiellen MTHF-freien CryP-Punktmutanten. (A) UV-Vis-Spektren (370-750 nm) von frisch isoliertem CryPsemired, CryP_Y373Asemired, CryP_W231Asemired, CryP_W231A/Y373Asemired und CryP_E128Asemired. Die Spektren wurden relativ zur Absorption bei 636 nm normiert. **(B)** UV-Vis-Spektren (370-750 nm) von frisch isoliertem PtCPF1 sowie CryPox, CryP_Y373Aox, CryP_W231Aox und CryP_W231A/Y373Aox nach chemischer Oxidation mit $K_3[Fe(CN)_6]$. Die Spektren wurden relativ zur Absorption bei 473 nm normiert.

Da die Antennenchromophore zum Transfer ihrer Resonanzenergie auf FAD befähigt sind, wurden Unterschiede der FAD-Reduzierbarkeit zwischen CryP und CryP_W231A nach Belichtung der oxidierten bzw. semireduzierten Proteinvarianten erwartet (Abb. 3.10). Die Absorptionsspektren zeigen für CryP und CryP_W231A unter den gewählten Belichtungsbedingungen jedoch das gleiche Maß an FAD-Reduktion gemessen an den relativen Absorptionen bei 473 nm und 636 nm (Abb. 3.10 B und D). Auch eine Belichtung unter geringerer Lichtstärke, um eine gesättigte FAD-Reduktion am Ende der Belichtungszeit zu vermeiden, deckte keine Unterschiede zwischen CryP und CryP_W231A auf (Daten nicht gezeigt). Dies wurde durch eine vergleichbare Abnahme der Absorption bei 473 nm als Maß für die FADox-Reduktion bzw. Abnahme der Absorption bei 636 nm als Maß für die FADH[•]-Reduktion gemessen.

Die 60minütige Dunkelinkubation in Folge der Belichtung zeigt auch ähnliche Stabilitäten von FADH[•] bzw. FADH⁻ in CryP und CryP_W231A (Abb. 3.10 E).

Ergebnisse

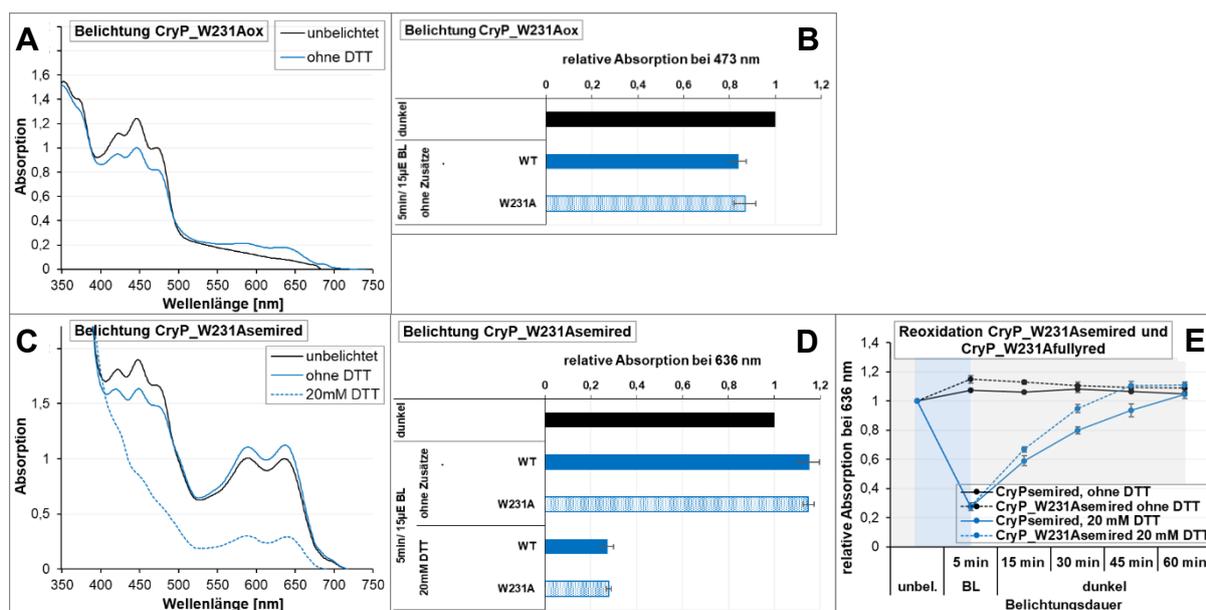


Abb. 3.10: Vergleich der lichtabhängigen FAD-Reduktion und -Reoxidation in CryP_W231Aox und CryP_W231Asemired. (A) und (C) UV-Vis-Absorptionsspektren (350-750 nm) von frisch isoliertem CryP_W231Asemired bzw. nach chemischer Oxidation mit $K_3[Fe(CN)_6]$ (CryP_W231Aox). Die Messung erfolgte nach 5 min BL (λ_{max} 465 nm, $15 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) mit oder ohne Zugabe von 20 mM DTT. Die Spektren von CryP_W231Aox wurden relativ zur Absorption bei 473 nm, die Spektren von CryP_W231Asemired zur Absorption bei 636 nm normiert. (B) und (D) Zum Vergleich der Stärke der Photoreduktion unter den einzelnen Belichtungsbedingungen wurden die relativen Absorptionswerte bei 473 nm und 636 nm als Maß für FADox, FADH• bzw. FADH⁻ dargestellt. (E) Die Reoxidation von photoinduziertem FADH• bzw. FADH⁻ wurde über 60 min beobachtet und anhand der relativen Absorption bei 636 nm visualisiert. Die Messwerte stellen Mittelwerte und daraus abgeleitete Standardabweichungen aus jeweils drei technischen Replikaten dar.

Da im Vergleich der Absorptionsspektren von CryP und CryP_W231A nach Belichtung demnach kein Energietransfer von MTHF auf FAD messbar ist, wurden zusätzlich fluoreszenzspektroskopische Messungen durchgeführt. Dabei wurden einerseits CryPox und CryP_W231Aox im nativen Zustand, sowie andererseits die Chromophorüberstände nach Hitzedenaturierung der Proteine verglichen. Als Referenz diente freies FAD.

Die Messung von Fluoreszenzemissionsspektren erfolgte jeweils nach Exzitation am MTHF-Absorptionsmaximum bei 380 nm bzw. am FADox-Absorptionsmaximum bei 450 nm (Abb. 3.11 B, C, D, G, H und I).

Für freies FAD ist nach Anregung bei beiden Wellenlängen eine typische Fluoreszenz bei 529 nm messbar (Abb. 3.11 B). Dabei ist die Fluoreszenz nach Anregung bei 450 nm höher als nach Anregung bei 380 nm, das Verhältnis der Emissionen $E_{m 380 nm} / E_{m 450 nm}$ beträgt 0,6. Das Emissionsverhalten ist nach Hitzebehandlung (Abb. 3.11 G) unverändert.

CryPox zeigt nach Anregung mit 450 nm eine erwartete FAD-Fluoreszenz bei 529 nm, während die Anregung bei 380 nm zu einer Emission bei 480 nm mit einer Schulter bei 455 nm führt (Abb. 3.11 C).

Die Fluoreszenzschulter bei 455 nm basiert auf der MTHF-Emission, wohingegen die Verschiebung des

Ergebnisse

Emissionsmaximums von 529 nm für freies FAD hin zu 480 nm für CryPox mit dem Energietransfer von MTHF auf FAD zu erklären ist. Da der Transfer nicht vollständig ist, überlagern sich die Emissionen von MTHF und FAD, was zu genannter Verschiebung des Fluoreszenzmaximums führt. Der hohe MTHF-Beitrag an der Fluoreszenz nach Anregung mit 380 nm spiegelt sich auch in dem im Vergleich zu freiem FAD sieben Mal höheren $E_{m\ 380\text{ nm}}/E_{m\ 450\text{ nm}}$ -Verhältnis von 4,1 wider. Zu beachten ist die deutlich niedrigere Fluoreszenz nach Anregung mit 450 nm von CryPox verglichen mit freiem FAD. Dies ist auf die Fluoreszenzlöschung des proteingebundenen FAD aufgrund des Elektronentransfers zwischen FAD und der Trp-Triade innerhalb von CryP zurückzuführen, wodurch die Lebensdauer des angeregten (FADox)* reduziert wird.

Die Emission der freien Chromophore nach Hitzedenaturierung des CryPox-Apoproteins ist in ihrer Intensität und dem $E_{m\ 380\text{ nm}}/E_{m\ 450\text{ nm}}$ -Verhältnis mit der Fluoreszenz von freiem FAD vergleichbar (Abb. 3.11 H). Der Beitrag von MTHF ist an einer Schulter bei 455 nm messbar.

Die Anregung von CryP_W231Aox mit 450 nm führt wie erwartet zu einer FAD-Fluoreszenz bei 529 nm mit einer vergleichsweise zu CryPox ähnlichen bzw. zu freiem FAD niedrigen Intensität basierend auf der proteinintrinsischen Fluoreszenzlöschung (Abb. 3.11 D). Aufgrund der fehlenden MTHF-Bindung ist die Emission nach Anregung mit 380 nm ebenfalls auf FAD zurückzuführen, wobei die Intensität wegen der niedrigen molaren Extinktion von FAD bei 380 nm und der proteinbedingten Fluoreszenzlöschung ähnlich niedrig ist wie nach Anregung mit 450 nm.

Einen zusätzlichen Nachweis für den Energietransfer zwischen MTHF und FAD zeigen die Fluoreszenzexcitationsspektren gemessen an der relativen FAD-Emission bei 530 nm (Abb. 3.11 E). Während für CryPox der Energietransfer von MTHF auf FAD anhand der hohen Emission nach Anregung bei 380 nm messbar wird, fehlt dieser Beitrag in CryP_W231Aox, was zu einem gleichen Exzitationsspektrum wie für freies FAD führt. Nach Hitzedenaturierung der Apoproteine verläuft die Exzitationskurve der Chromophore aus CryPox aufgrund des fehlenden Energietransfers wie die Kurven der Chromophore aus CryP_W231Aox bzw. für freies FAD (Abb. 3.11 J).

Mittels fluoreszenzspektroskopischer Methoden konnte demnach erfolgreich der Energietransfer von MTHF auf FAD in CryPox nachgewiesen werden, der in CryP_W231Aox aufgrund der fehlenden MTHF-Bindung fehlt.

Ergebnisse

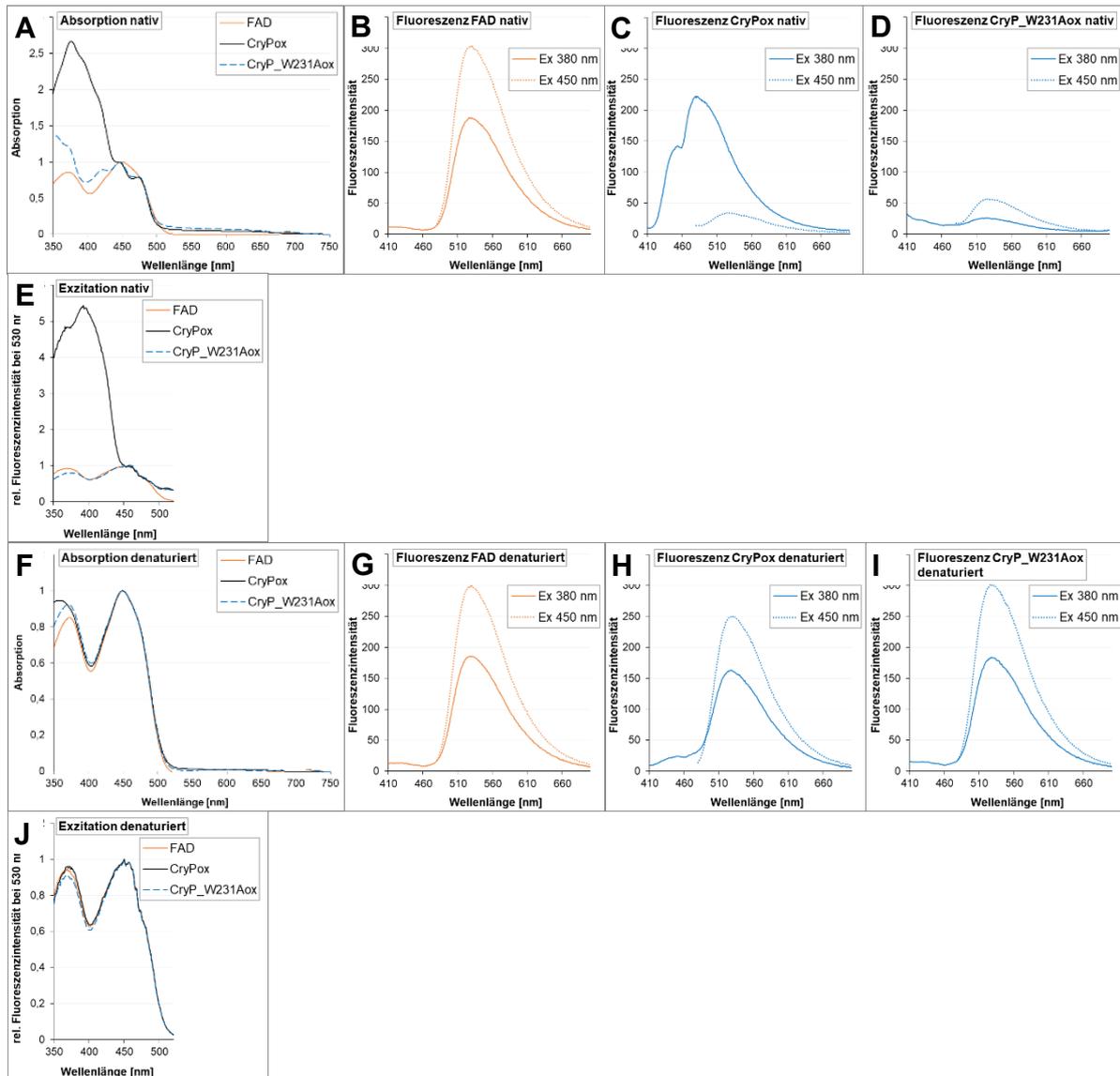


Abb. 3.11: Fluoreszenzspektroskopischer Vergleich von CryPox und CryP_W231Aox. (A) Nach chemischer Oxidation mit $K_3[Fe(CN)_6]$ wurden UV-Vis-Spektren (370-750 nm) von CryPox und CryP_W231Aox gemessen. Die Spektren wurden relativ zur Absorption bei 450 nm normiert. Es folgte die Messung von Fluoreszenzemissionsspektren zwischen 410-520 nm nach Exzitation bei 380 nm bzw. zwischen 480-520 nm nach Exzitation bei 450 nm (B, C und D) sowie Fluoreszenzexzitationspektren bei 530 nm nach Exzitation zwischen 350-530 nm (E). Sämtliche Messungen wurden am Chromophor-haltigen Überstand nach Hitzedenaturierung der Proteine (10 min, 95 °C) wiederholt (F, G, H, I und J). Als Referenz diente freies FAD in Lagerpuffer (50 mM NaPi pH7.8, 100 mM NaCl, 20 % Glycerin).

Tabelle 3.2 gibt eine Übersicht über das FAD-Photoreduktions- und Oxidationsverhalten in den einzelnen betrachteten CryP-Varianten.

Tab. 3.2: Vergleich der FAD-Redoxeigenschaften von CryP, CryP-PHR, CryP_W342F, CryP_N417C und CryP_W231A.

CryP-Variante	FAD-Redoxform nach Isolation	FAD-Photoreduzierbarkeit		Stabilität FADH [•] gegen aerobe Oxidation
		ohne Reduktionsmittel	mit Reduktionsmittel	
CryP	FADH [•] , wenig FADox	FADox → FADH [•]	FADox → FADH [•] → FADH ⁻	hoch (> 60 min)
CryP-PHR	FADox	-	FADox → FADH [•]	gering (< 60 min)
CryP_W342F	FADH [•] , wenig FADox	-	-	hoch (> 60 min)
CryP_N417C	FADox	-	-	nicht untersucht
CryP_W231A	FADH [•] , wenig FADox	FADox → FADH [•]	FADox → FADH [•] → FADH ⁻	hoch (> 60 min)

3.3 Das CryP-Oligomerisierungsverhalten

Basierend auf bekannten Mechanismen zur Dimerisierung bzw. Oligomerisierung von CRYs wurde das CryP-Oligomerisierungsverhalten in zwei Versuchsaufbauten untersucht.

In einem ersten Ansatz wurde die Fähigkeit von CryP zur Selbstinteraktion mittels Ko-Elution von immobilisiertem CryP-His mit CryP-HA untersucht. Dazu wurde heterolog isoliertes CryP-His im semireduzierten Zustand an eine IMAC-Säule gebunden und mit einem CryP-HA-haltigen *E.coli*-Lysat inkubiert. Durch anschließende Elution von CryP-His konnte eine Selbstinteraktion durch Ko-Elution mit CryP-HA aufgedeckt werden (Abb. 3.12 A). Während die Waschfraktionen des Reinigungsvorgangs frei von Epitop-markiertem CryP waren, lösten sich in den Elutionsfraktionen gleichzeitig CryP-His und CryP-HA. Eine unspezifische Wechselwirkung von CryP-HA mit rekombinantem CryP-His oder dem IMAC-Säulenmaterial konnte durch einen Parallelversuch mit immobilisiertem WSCP-His als Negativkontrolle ausgeschlossen werden (vgl. Abb. 3.12 B). Hier wurde sämtliches CryP-HA im Waschvorgang von der Säule entfernt.

Daher ist CryP grundsätzlich zur Selbstinteraktion befähigt.

Ergebnisse

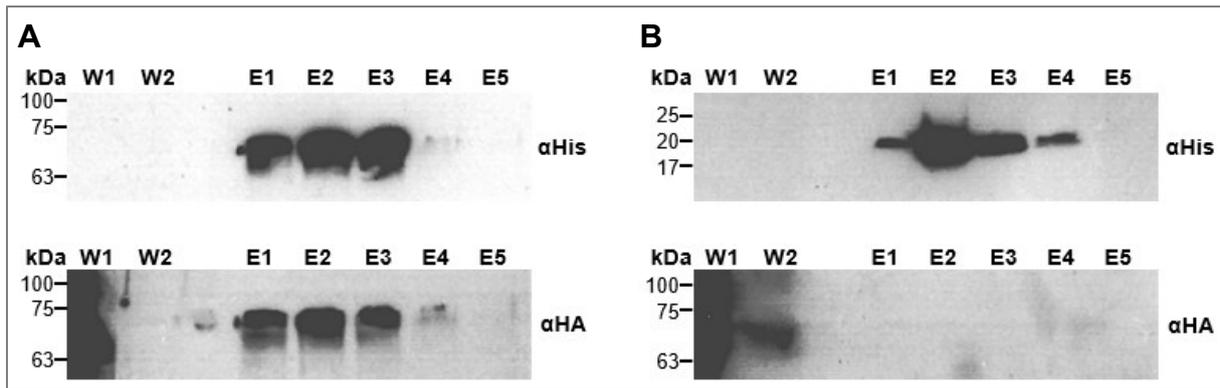


Abb. 3.12: Ko-Aufreinigung von CryP-His mit CryP-HA: (A) 500 µg rekombinant aufgereinigtes CryP-His wurde an eine IMAC-Säule gebunden. Diese wurde mit einem CryP-HA-haltigen *E.coli*-Proteinlysats 1 h im Dunkeln inkubiert. Nach dem Waschen der Säule (W1-2) erfolgte die gemeinsame Elution von CryP-His mit daran gebundenem CryP-HA (E1-5). (B) Als Negativkontrolle wurde rekombinant aufgereinigtes WSCP-His unter gleichen Bedingungen eingesetzt. Die einzelnen Fraktionen wurden in einer 10 %igen SDS-PAGE nach Lämmli aufgetrennt. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran folgte der immunologische Nachweis von CryP-His und WSCP-His mit einem His-Antikörper bzw. von CryP-HA mit einem HA-Antikörper. Verändert nach Krischer et al. (2022).

In einem zweiten Versuchsansatz wurden zur Analyse der CryP-Oligomerisierungsstufe BN-PAGES mit isoliertem Protein durchgeführt. Dabei sollte die Frage nach der Abhängigkeit der Oligomerisierung von Proteinkonzentration, Ionenstärke, Detergenzien, verschiedenen Kofaktoren, FAD-Redoxzustand und C-terminaler Domäne (CTE) beantwortet werden.

Der immunologische Nachweis zeigte, dass CryP in einer BN-PAGE hauptsächlich in Form eines Monomers und eines Dimers erscheint (Abb. 3.13). Durch Auftragen einer steigenden CryP-Konzentration konnte ein Anstieg des Dimer-Monomer-Verhältnisses nachgewiesen werden (Abb. 3.13 A). Gleichzeitig traten bei erhöhten CryP-Konzentrationen auch höhere Oligomerisierungsformen wie Tetramere auf. Die Zugabe verschiedener Kofaktoren wie ATP, MgCl₂, Riboflavin oder des CryP-Interaktionspartners Bola löste keine Veränderung des Dimer-Monomer-Verhältnisses aus (Abb. 3.13 B). Im Gegensatz dazu konnte eine Dimer- und Oligomer-Stabilisierung gegenüber dem Monomer durch Zugabe der Detergenzien β-DDM bzw. TX-100 beobachtet werden. Gleichzeitig führte eine erhöhte NaCl-Konzentration im Vergleich zu den Standardbedingungen zu einer Destabilisierung von CryP-Dimeren und -Oligomeren. Diese Beobachtung wurde durch die Anwendung eines β-DDM- und NaCl-Konzentrationsgradienten bei gleichbleibender CryP-Konzentration bestärkt (Abb. 3.14).

Die Fähigkeit zur Oligomerisierung wurde weder durch den FAD-Redoxzustand noch durch die CTE beeinflusst (für eine genaue Charakterisierung der CTE-loosen Variante CryP-PHR vgl. Abschnitt 3.4). Die CryP-CryP-Interaktion erfolgt über direkte Protein-Wechselwirkungen. Die Möglichkeit der Interaktion

Ergebnisse

über koaufgereinigte Nukleinsäuren konnte durch Behandlung von CryP mit DNase I und RNase A ausgeschlossen werden (vgl. Anhang Abb. A5).

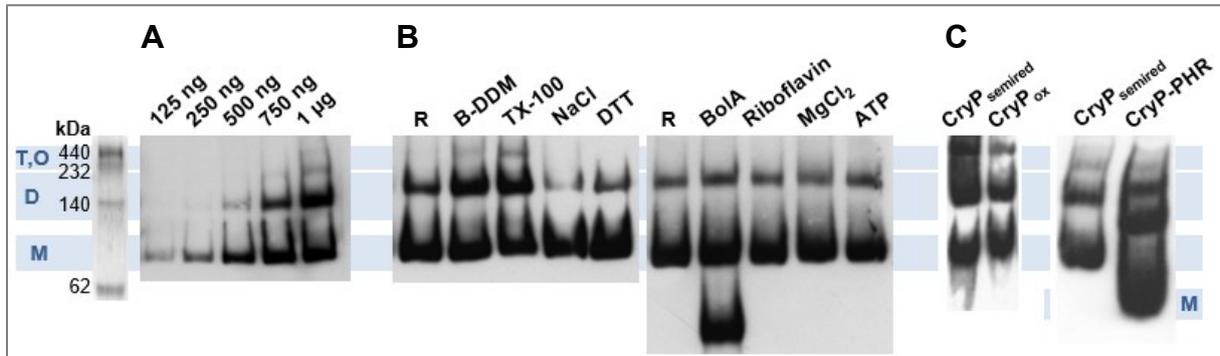


Abb. 3.13: Abhängigkeit der CryP-Dimerisierung von Proteinkonzentration, Ionenstärke, Detergenzien, Kofaktoren, FAD-Redoxzustand und CTE: (A) 125-1000 ng rekombinant aufgereinigtes CryPsemired wurden 30 min dunkel auf Eis inkubiert. (B) 200 ng rekombinant aufgereinigtes CryPsemired wurde unter Zugabe von 0.016 % β -DDM, 0.02 % TX-100, 300 mM NaCl bzw. 50 mM DTT sowie der Kofaktoren 200 ng BoIA-His, 5 mM Riboflavin, 50 mM $MgCl_2$ bzw. 5 mM ATP 30 min dunkel auf Eis inkubiert. Als Referenzwert (R) für das Dimer-Monomer-Verhältnis diente isoliertes CryP ohne weitere Additive (50 mM NaPi pH 7.8, 100 mM NaCl, 20 % Glycerol). (C) 200 ng rekombinant aufgereinigtes CryPsemired, CryPox bzw. CryP-PHR wurden 30 min dunkel auf Eis inkubiert. Die einzelnen Ansätze wurden in einer 4-10 %igen BN-PAGE aufgetrennt. Der immunologische Nachweis von CryP-His erfolgte mit einem His-Antikörper nach Transfer auf eine PVDF-Membran. Blau hervorgehoben sind die elektrophoretischen Laufweiten von CryP-Monomer (M), -Dimer (D) und -Tetrameren bzw. -Oligomeren (T, O). Verändert nach Krischer et al. (2022).

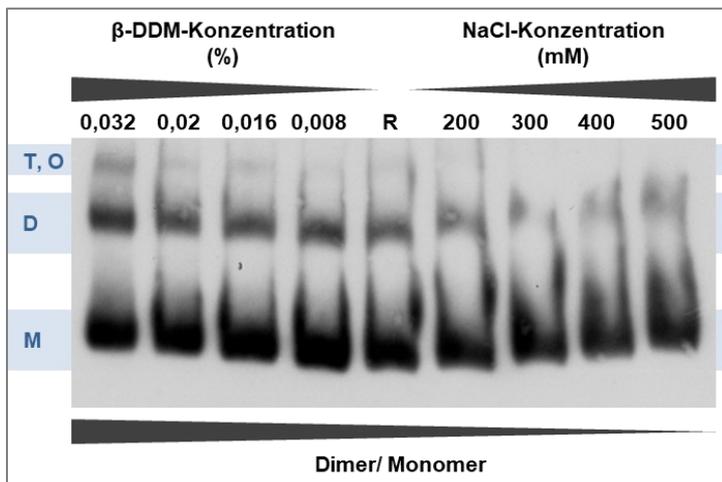


Abb. 3.14: Abhängigkeit der CryP-Dimerisierung von Detergenzien und Ionenstärke: 200 ng rekombinant aufgereinigtes CryPsemired wurde unter steigender β -DDM- (0-0.032 %) bzw. steigender NaCl- (100-500 mM) Konzentration 30 min dunkel auf Eis inkubiert. Als Referenzwert (R) für das Dimer-Monomer-Verhältnis diente isoliertes CryP ohne weitere Additive (50 mM NaPi pH 7.8, 100 mM NaCl, 20 % Glycerol). Die einzelnen Ansätze wurden in einer 4-10 %igen BN-PAGE aufgetrennt. Der immunologische Nachweis von CryP-His erfolgte mit einem His-Antikörper nach Transfer auf eine PVDF-Membran. Blau hervorgehoben sind die elektrophoretischen Laufweiten von CryP-Monomer (M), -Dimer (D) und -Tetrameren bzw. -Oligomeren (T, O).

Zusammenfassend zeigten die BN-PAGES eine CryP-Oligomerisierung mit einem Dimer und einem Monomer als hauptsächliche Migrationsformen. Die Oligomerisierung erfolgt PHR-vermittelt und konzentrationsabhängig aber unabhängig vom FAD-Redoxzustand. Die Oligomer-Stabilisierung durch Detergenzien mit gleichzeitiger Destabilisierung bei erhöhter Ionenstärke lässt eine Oligomerisierung über elektrostatische Wechselwirkungen der Untereinheiten vermuten.

Der Einfluss von nativen zellulären Bedingungen wie die natürliche Proteinumgebung, die Anwesenheit bestimmter Kofaktoren oder Interaktionspartner und posttranslationale Modifikationen auf das Oligomerisierungsverhalten wurden in diesem Versuchsaufbau nicht untersucht.

3.4 Sequenzcharakterisierung der PHR-Domäne und der C-terminalen Erweiterung von CryP

CRYs weisen im Gegensatz zu den verwandten PLs neben der konservierten PHR-Domäne, die die nicht-kovalente Chromophorbindung vermittelt, eine C-terminale Proteinerweiterung (CTE) auf. Länge und Struktur dieser Erweiterung variieren stark zwischen den verschiedenen CRY-Klassen. Daher wird der CTE eine zentrale Rolle bei der Ausübung der spezifischen Rezeptorfunktion zugeschrieben.

Der Sequenzvergleich von CryP mit strukturell bereits charakterisierten CRYs zeigt neben der 512 AS umfassenden PHR-Domäne eine CTE aus 73 AS. Damit ist die CryP-CTE länger als die der meisten aCRYs (z.B. 21 AS für DmCRY, Zoltowski et al. 2011), jedoch deutlich kürzer als die von pCRYs (z.B. 172 AS für AtCRY1, Brautigam et al. 2004). Aufgrund der intrinsischen Unordnung der CTEs konnten für diese bis heute keine positionsbezogenen Strukturdaten gewonnen werden. Eine Ausnahme bildet DmCRY aus *D. melanogaster*, für das eine Crykristallstruktur des Holo-Proteins dargestellt wurde (Zoltowski et al. 2011).

Als ungeordnet werden Proteinbereiche beschrieben, die keine definierte Tertiärstruktur aufweisen (Iakoucheva et al. 2004). Intrinsisch ungeordnete Regionen sind charakteristisch für Proteine mit Regulations- und Signalfunktion und durchlaufen oftmals eine *disorder-to-order*-Konformationsänderung in Folge von Proteininteraktionen. Somit enthalten ungeordnete Domänen oft Bindedomänen für Interaktionspartner sowie potentielle Phosphorylierungsstellen.

Mittels bioinformatischer Auswertung wurde analysiert, ob die CryP-CTE eine ähnliche intrinsische Unstrukturiertheit aufweist. Hierzu wurde die CryP-Primärstruktur mit der Sequenz weiterer CRYs verglichen. Die *in silico* Analyse mithilfe von IUPRED3 zeigt die generellen Strukturgleichheiten zwischen PLs und den verschiedenen CRY-Gruppen (Abb. 3.15). Die konservierte N-terminale PHR-Domäne einer Länge von circa 500 AS weist für alle untersuchten Vertreter eine geordnete Struktur auf. Für einige CRY-DASHs und PLs werden kurze Bereiche intrinsischer Unordnung in der PHR

Ergebnisse

vorhergesagt (Abb. 3.15 C und D). Dies ist typisch für Interaktionsbereiche, z.B. DNA-Bindestellen (Iakoucheva et al. 2004). Alle analysierten CTEs weisen eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit intrinsischer Unordnung auf. Kurze geordnete Bereiche verweisen auf Positionen, die wahrscheinlich *disorder-to-order* Änderungen in Folge von Proteininteraktionen durchlaufen (Trudeau et al. 2013).

Die Vorhersage der CryP-Struktureigenschaften ist dabei vergleichbar mit denen für pCRYs und aCRYs. Die PHR-Domäne lässt auf eine geordnete Tertiärstruktur schließen, während die CTE unstrukturiert erscheint. Dieses Bild kann durch Sequenzanalyse der CTE erklärt werden (Abb. 3.16). Die Hälfte der CTE (39 von 73 AS) setzt sich aus AS zusammen, die Unordnung fördern, von der zweiten Hälfte sind nur 20 % (14 von 73 AS) charakteristisch für geordnete Strukturen (Iakoucheva et al. 2004). Zwei Drittel der Sequenz (49 von 73 AS) umfassen polare AS, darunter 38 % (28 von 73 AS), die bei physiologischen pH geladen sind. Zudem sind 15 phosphorylierbare Positionen enthalten. Auffällig sind drei Bereiche, in denen sich basische Arginine bzw. Lysine mit phosphorylierbaren Serinen, Threoninen und Tyrosinen bündeln. Es ist denkbar, dass diese Bereiche an der Vermittlung von Konformationsänderungen und Proteininteraktionen beteiligt sind, indem lichtabhängige Phosphorylierungen zu Änderungen der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der PHR und CTE führen.

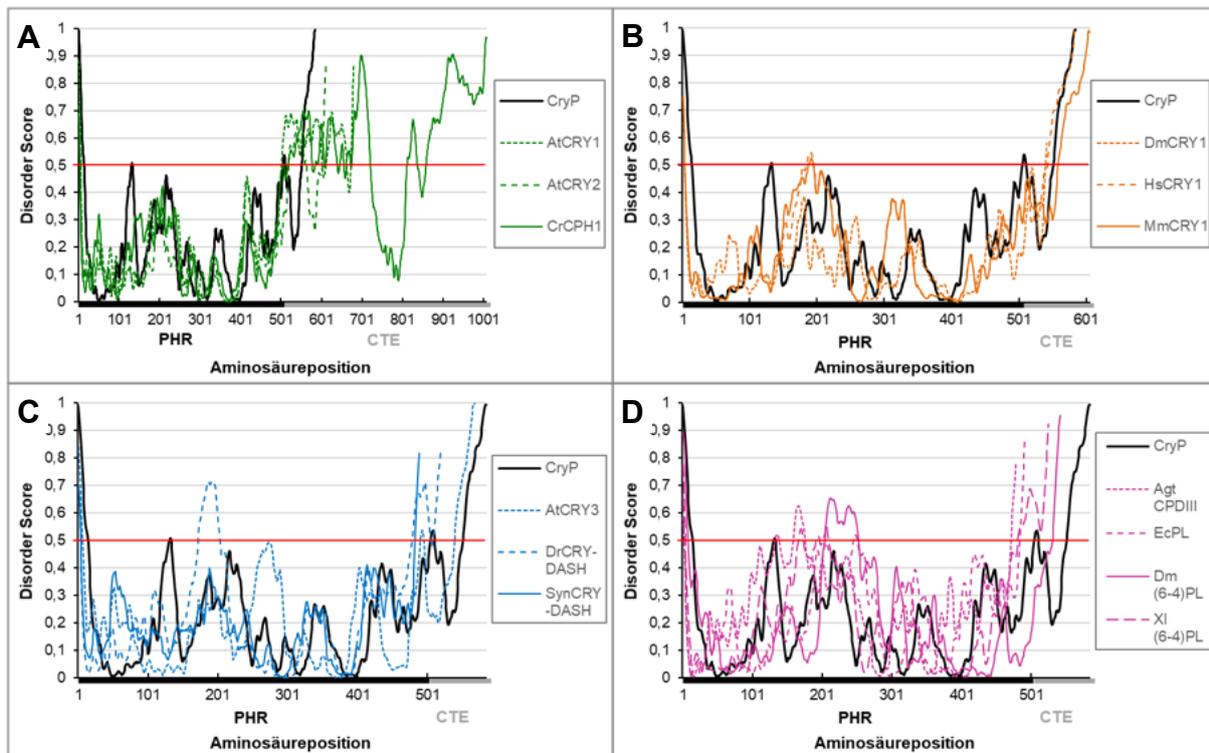


Abb. 3.15: Vorhersage der intrinsischen Unordnung (*Disorder Prediction*) von CryP und repräsentativen CPF-Vertretern mittels IUPRED3. Die *Disorder Prediction* von CryP wurde mit pCrys (A), aCrys (B), CRY-DASHs (C) und PLs (D) verglichen. Ein *Disorder Score* von $\geq 0,5$ definiert eine Sequenz als ungeordnet (rote Linie). Der CryP-Datensatz ist jeweils schwarz hervorgehoben. Agt *Agrobacterium tumefaciens*, At *Arabidopsis thaliana*, Cr *Chlamydomonas reinhardtii*, Dm *Drosophila melanogaster*, Ec *Escherichia coli*, Hs *Homo sapiens*, Dr *Danio rerio*, Syn *Synechocystis* sp., XI *Xenopus laevis*.

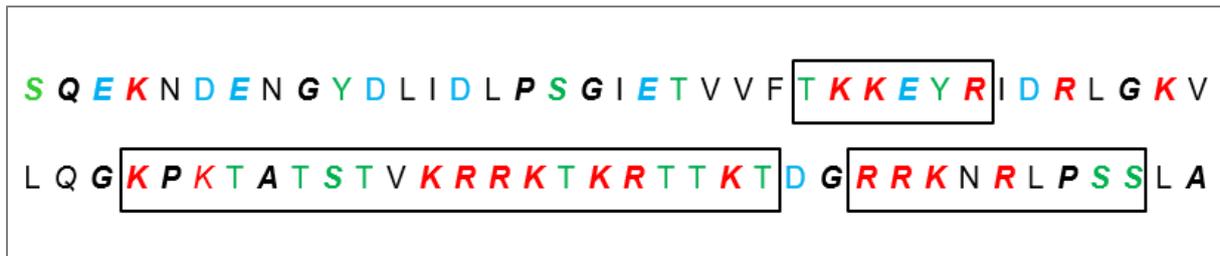


Abb. 3.16: Analyse der Aminosäuresequenz der CryP-CTE. Dargestellt ist die 73 Aminosäuren umfassende CTE von CryP. *Rot* positiv geladene Positionen, *blau* negativ geladene Positionen, *grün* phosphorylierbare Positionen, *kursiv* Unordnung vermittelnde Positionen. Die Umrahmungen markieren Bereiche, in denen eine hohe Dichte basischer und phosphorylierbarer Aminosäuren zu finden ist.

3.5 Untersuchungen zur Konformation von PHR und CTE

Wie der absorptionsspektroskopische Vergleich von CryP und CryP-PHR zeigt unterscheiden sich beide Varianten bezüglich der FAD-Redoxform nach heterologer Expression und Isolation. Während CryP hauptsächlich FADH[•] bindet, ist in CryP-PHR ausschließlich FADox gebunden (vgl. Abb. 3.4). Dies legt die Vermutung nahe, dass im Volllängenprotein ein Kontakt zwischen PHR und CTE im Bereich der FAD-Bindetasche besteht, der die Redoxumgebung des Kofaktors beeinflusst.

Um die Fähigkeit von PHR und CTE zu einer spezifischen Interaktion miteinander zu untersuchen, wurden Interaktionstests mittels zweidimensionaler PAGES durchgeführt (Abb. 3.17). Dazu wurden die CryP-Untereinheiten CryP-PHR und CTE einzeln isoliert. Nach separater bzw. gemeinsamer Inkubation der Untereinheiten erfolgte eine BN-PAGE in erster Dimension zur Auftrennung der Interaktionskomplexe. Es folgte eine SDS-PAGE in zweiter Dimension zur Dissoziation der Komplexbestandteile. Wie erwartet zeigte die separate Auftrennung von CryP-PHR eine Dimer-Monomer-Gliederung. Dies zeigte sich anhand zwei unterschiedlich weit migrierender Proteinansammlungen in der BN-PAGE, die in der folgenden SDS-PAGE die gleiche, für CryP-PHR typische Laufhöhe bei 60 kDa aufwiesen (Abb. 3.17 CryP-PHR). Die Einzelauftrennung der CTE führte zu einer Proteinansammlung am oberen Gelrand der BN-PAGE, die in der SDS-PAGE bei einer für die CTE zu erwartenden Laufhöhe von 10 kDa detektiert wurde (Abb. 3.17 CTE). Aufgrund der intrinsischen Unordnung der CTE (vgl. Abb. 3.15) bildet diese unter nativen Bedingungen Aggregate, die sich am oberen Gelrand der BN-PAGE absetzen und erst unter der denaturierenden Wirkung der SDS-PAGE dissoziieren. CryP-PHR und CTE weisen in ihrer jeweiligen Einzelauftrennung unterschiedliche, sich nicht überlagernde Laufstrecken in beiden Dimensionen auf. Dies ist Voraussetzung für die Analyse möglicher Interaktionen mittels zweidimensionaler PAGE.

Die gemeinsame Inkubation und folgende Auftrennung von CryP-PHR und CTE lieferte ein anderes Bild (Abb. 3.17 CryP-PHR + CTE). Während CryP-PHR wie in der Einzelauftrennung eine Monomer-Dimer-Gliederung aufwies, wurde für die CTE ein breites, horizontales Signal in der SDS-PAGE detektiert.

Ergebnisse

Dieses verlief auf paralleler Höhe zum CryP-PHR-Monomer und -Dimer. Aufgrund einer Wechselwirkung der CTE mit dem PHR-Monomer und -Dimer konnten sich demnach ein Großteil der CTE-Aggregate lösen und simultan mit der PHR in das BN-Gel einlaufen. Dies belegt die grundsätzliche Fähigkeit zur Interaktion von PHR und CTE und zur Bildung einer geschlossenen Konformation beider Untereinheiten in CryP.

Um die Spezifität dieser Wechselwirkung zu belegen, wurden 2D-PAGES unter gleichen Bedingungen mit der PHR von PtCPF1 aus *P. tricornutum* (PtCPF1-PHR) sowie der PHR von CraCRY aus *C. reinhardtii* (CraCRY-PHR) durchgeführt. Wie für CryP-PHR wurde für die Einzelauftrennungen von PtCPF1-PHR und CraCRY-PHR eine Monomer-Dimer-Gliederung beobachtet (Abb. 3.17 PtCPF1-PHR und CraCRY-PHR). Das Dimer-Monomer-Verhältnis für PtCPF1 war dabei genauso ausgewogen wie für CryP-PHR, während für CraCRY-PHR das Dimer die stabilere Form darstellte. Wie für CryP-PHR überlagerten sich die Laufstrecken beider Kontrollproteine nicht mit derjenigen der CTE in den betrachteten Einzelauftrennungen. Daran änderte auch die gemeinsame Inkubation und folgende zweidimensionale Auftrennung der Kontrollproteine in Kombination mit der CTE nichts (Abb. 3.17 PtCPF1-PHR + CTE und CraCRY-PHR + CTE). In beiden Fällen blieben die CTE-Aggregate, die sich am oberen Rand des BN-Gels absetzen, erhalten. Das bedeutet, dass die CTE von CryP im vorliegenden Versuch nicht mit PtCPF1-PHR oder CraCRY-PHR wechselwirkt, was die Spezifität der Interaktion zwischen CryP-PHR mit der eigenen CTE belegt.

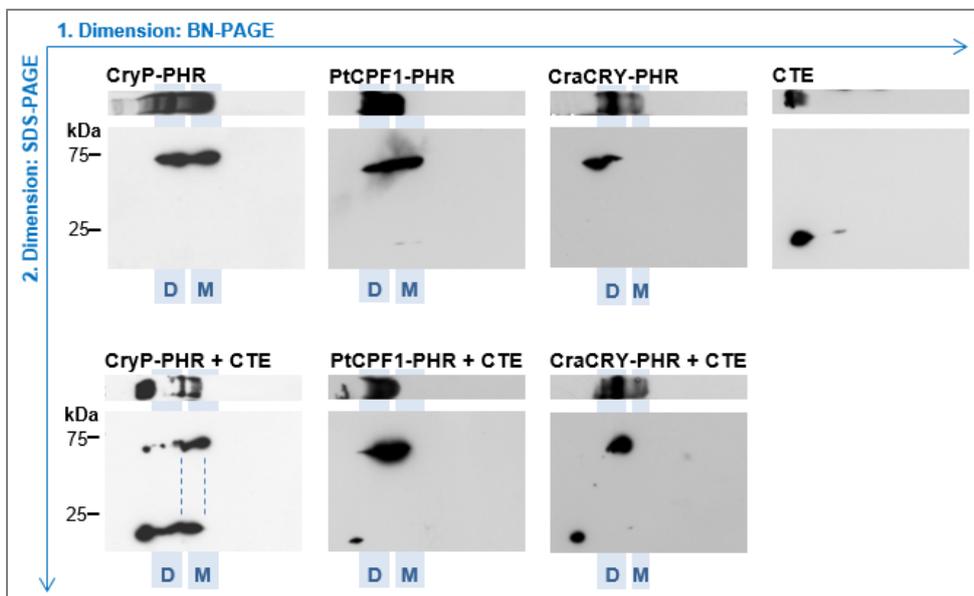


Abb. 3.17: 2D-PAGE zur Interaktion von CryP-PHR und CryP-CTE. Je 200 ng rekombinant aufgereinigtes CryP-PHR, PtCPF1-PHR bzw. CraCRY-PHR wurden separat oder mit einer äquimolaren Menge CTE 30 min dunkel auf Eis inkubiert und anschließend in einer 4-10 %igen BN-PAGE aufgetrennt. Es folgte eine 10 %ige SDS-PAGE in zweiter Dimension zur Auftrennung der Interaktionskomplexe. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte der immunologische Nachweis mit einem Histidin-Antikörper. Blau hervorgehoben sind die elektrophoretischen Laufweiten von CRY-Monomer (M) bzw. -Dimer (D). Gestrichelte Linien markieren die Signalüberlagerung von CryP-PHR-Monomer und -Dimer mit der CryP-CTE in der BN-PAGE.

Ergebnisse

In einem zweiten Versuchsaufbau wurde mittels partieller Proteolyse untersucht, ob Änderungen des FAD-Redoxzustands in Folge von Belichtung oder Dunkeloxidation mit einer Änderung der Konformation der CTE relativ zur PHR einhergehen. Zudem sollten in diesem Ansatz genauere Informationen über den Bindebereich der CTE an der PHR gewonnen werden.

In einer partiellen Proteolyse wird das Zielprotein unter limitierten Bedingungen bezüglich Reaktionszeit und -temperatur sowie Proteasekonzentration unvollständig abgebaut. Dabei werden Schnittstellen an exponierten und flexiblen Regionen bevorzugt angegriffen, wohingegen im Gesamtprotein verdeckte und in geordneten Sekundärstrukturen befindliche Schnittstellen resistent gegen den proteolytischen Angriff bei limitierter Reaktionszeit sind (Fontana et al. 2004). Das Ergebnis ist eine sequenzspezifische Fragmentierung des Zielproteins, die elektrophoretisch analysiert werden kann. Anhand der Größe der entstandenen Fragmente und der Verteilung aller bekannten Proteaseschnittstellen im Zielprotein können zudem die angegriffenen Schnittstellen eingegrenzt werden.

Bezogen auf CryP können mit dieser Methode Konformationsänderungen als Folge von lichtinduzierten Verschiebungen des FAD-Redoxzustands oder der Deletion der CTE durch differentielle Fragmentierungsmuster visualisiert werden. Daher wurden in diesem Versuchsaufbau CryPox, CryPsemired, CryPfullyred und CryP-PHR miteinander verglichen.

Einerseits wurde frisch isoliertes CryP, das bereits größtenteils FADH[•] bindet, 15 min mit BL belichtet, um sämtliches gebundenes FAD in den semireduzierten Zustand zu überführen. Andererseits wurde isoliertes CryP mit K₃[Fe(CN)]₆ inkubiert, um die Oxidation chemisch zu beschleunigen. CryPfullyred wurde durch 15 min BL-Belichtung von CryPsemired nach Zugabe von DTT gewonnen. CryP-PHR wurde direkt nach Isolation mit gebundenem FADox eingesetzt. Es folgte ein proteolytischer Verdau, der für CryPsemired, CryPox sowie CryP-PHR im Dunkeln und für CryPfullyred im BL durchgeführt wurde, um die jeweiligen FAD-Redoxformen stabil zu halten. Die entstandenen Fragmentmuster nach 2 min Inkubationszeit wurden nach elektrophoretischer Auftrennung und immunologischem Nachweis miteinander verglichen (Abb. 3.18).

Für alle drei CryP-Redoxvarianten ist eine identische Fragmentierung mit fünf Hauptfragmenten und 13 weniger intensiven Fragmenten erkennbar. Der Vergleich von CryP mit CryP-PHR zeigt jedoch unterschiedliche Fragmentierungen. Unter Berücksichtigung des Größenunterschieds zwischen den Varianten von 8,3 kDa, den die Deletion der CTE hervorruft, sind die betroffenen Schnittstellen von CryP und CryP-PHR grundsätzlich gleich. In der genauen Analyse der relativen Empfindlichkeiten einzelner Schnittstellen für den tryptischen Verdau unterscheiden sich die Varianten jedoch voneinander. Die Fragmente 4, 4a und 4b, die für CryP eine Größe zwischen ca. 22 und 30 kDa aufweisen, entstehen auch in CryP-PHR, die Empfindlichkeit der zugehörigen Schnittstellen für den proteolytischen Angriff ist jedoch unterschiedlich. Während in CryP Fragment 4 gegenüber 4a und 4b

Ergebnisse

deutlich intensiver ist, erscheinen in CryP-PHR umgekehrt die Fragmente 4a und 4b stärker als Fragment 4. Die zugehörigen Schnittstellen um diese Fragmente schließen die Binderegion der CTE an der PHR ein.

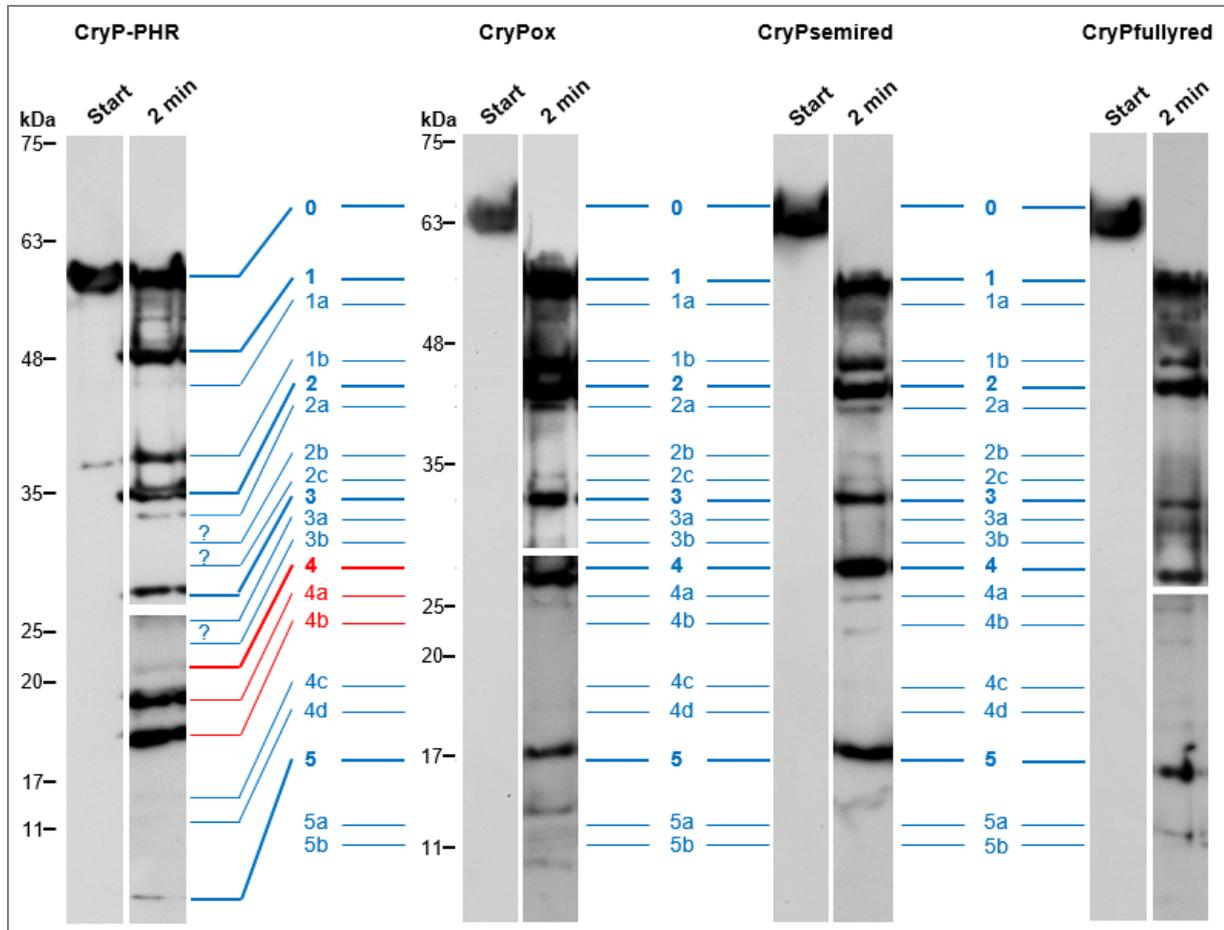


Abb. 3.18: Partielle Proteolyse von CryPox, CryPsemired, CryPfullyred und CryP-PHR. Rekombinant isoliertes CryPox, CryPsemired, CryPfullyred und CryP-PHR wurden für 2 min bei 18 °C mit Trypsin in einem Verhältnis von 1:200 (mol/mol) CryP/ Trypsin inkubiert. Die Inkubation erfolgte für CryPfullyred bei $10 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, für die übrigen Varianten im Dunkeln. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Roti®Laod gestoppt. Es folgte eine 10 %ige SDS-PAGE zur Auftrennung der tryptisch gebildeten Fragmente. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte der immunologische Nachweis mit einem Histidin-Antikörper. Die signalstärksten Hauptfragmente sind von 1 bis 5 nummeriert, die zugehörigen signalschwächeren Fragmente mit Buchstaben von a bis d. Die unterbrochene Darstellung der einzelnen Fragmentmuster ist auf unterschiedliche Belichtungszeiten einzelner Membranbereiche zurückzuführen.

Um den Interaktionsbereich von PHR und CTE in der CryP-Gesamtstruktur zu lokalisieren, wurden die betroffenen Schnittstellen mithilfe der Trypsinschnittstellenverteilung in der CryP-Primärsequenz auf die errechnete CryP-PHR-Tertiärstruktur übertragen (vgl. Anhang Tab. A1; vgl. Abb. 3.2). Die Berechnung der CryP-Struktur deckt dabei aufgrund fehlender Strukturvorlagen für die CTE nur die PHR ab. Die Genauigkeit der elektrophoretischen Auftrennung lässt jedoch nur eine Eingrenzung der

Ergebnisse

Schnittstellen, keine aminosäuregenaue Lokalisation, zu. Durch Abschätzung der Größen von Fragment 4 (~ 32 kDa), Fragment 4a (~ 28 kDa) und Fragment 4b (~ 23 kDa) und Abgleich mit einem ungefärbten Proteingrößenstandard wurde die Lage der drei Schnittstellen auf einen Bereich zwischen R294 und K349 eingegrenzt. Dieser Bereich wurde auf der errechneten Struktur von CryP-PHR dargestellt (Abb. 3.19). Die dreidimensionale Darstellung zeigt, dass die CTE an einer Region rund um die FAD-Bindetasche anliegen muss. Diese Annahme wird durch die unterschiedlichen FAD-Reduktions- und Oxidationseigenschaften von CryP und CryP-PHR bestärkt (vgl. Abschnitt 3.2.1).

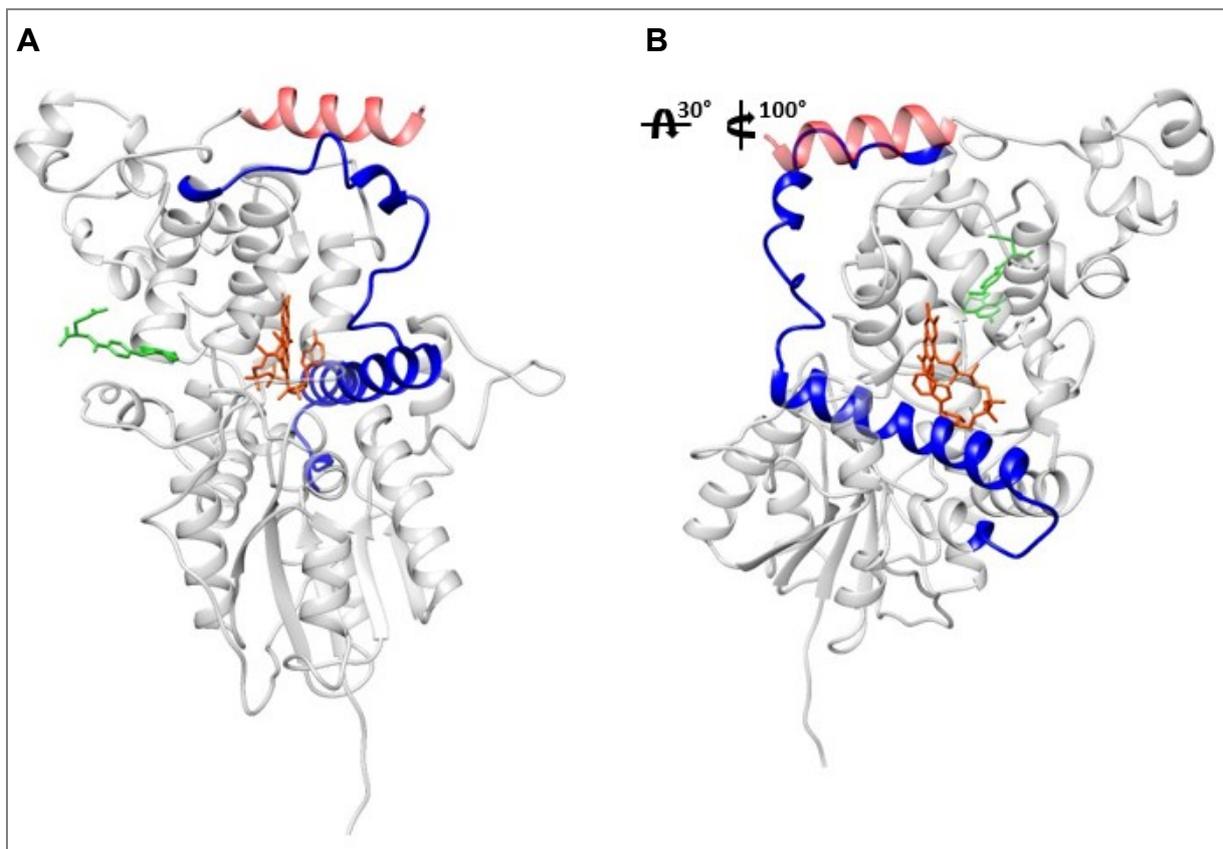


Abb. 3.19: Aus partieller Proteolyse bestimmter Interaktionsbereich von PHR und CTE in CryP: Der Vergleich der partiellen Proteolyse von CryP und CryP-PHR grenzt einen Proteinbereich differenzieller Fragmentierung ein, der mithilfe der Trypsinschnittstellenverteilung in der CryP-Primärsequenz lokalisiert werden kann. Dieser Bereich schließt den Interaktionsbereich von PHR und CTE ein. Dargestellt ist die errechnete Struktur der CryP-PHR auf Basis der Strukturdaten der *Agrobacterium tumefaciens* CPDIII-Photolyase (4U63; Scheerer et al. 2015). Grün MTHF, orange FAD, rot C-terminales Ende ohne CTE, blau Bereich differentieller Fragmentierung in CryP und CryP-PHR zwischen R294 und K349.

Zusammenfassend können im direkten Vergleich der partiellen Proteolyse von CryPox, CryPsemired, CryPfullyred und CryP-PHR keine redoxabhängigen Konformationsunterschiede nachgewiesen, der Kontaktbereich von PHR und CTE aber auf eine Region um die FAD-Bindetasche eingegrenzt werden. Da auch die für CryP beobachtete Oligomerisierung keine Abhängigkeit zum FAD-Redoxzustand oder

der CTE zeigt, können Auswirkungen auf das differentielle Fragmentmuster der partiellen Proteolyse infolge unterschiedlicher Oligomerisierung ausgeschlossen werden.

Redoxabhängige Änderungen der konformationellen Ausrichtung von PHR und CTE können dennoch nicht ausgeschlossen werden, falls diese mit dieser Methode nicht erfassbar sind. Unterschiedliche Gründe können dafür genannt werden. Einerseits könnten nur kleine redoxgetriebene Umstrukturierungen infolge einer CryP-Belichtung eintreten, für die sensitivere Nachweismethoden erforderlich sind. Andererseits könnten außer einer Änderung des FAD-Redoxzustands weitere lichtinduzierte Mechanismen wie posttranslationale Modifikationen in Form von Phosphorylierungen oder die Interaktion mit spezifischen Interaktionspartnern nötig für Proteinumstrukturierungen sein, die in diesem *in vitro*-Ansatz nicht nachgestellt wurden.

3.6 Das CryP-Interaktionsverhalten

In vorhergehenden Untersuchungen zur CryP-Wirkweise wurden mittels *Pulldown*- und massenspektrometrischen Analysen 18 potentielle CryP-Interaktionspartner identifiziert (König 2016). Davon stehen 10 Proteine in Verbindung mit Ribosomen und Translation, 6 Proteine mit dem Bereich DNA und Regulation, ein Protein mit dem Vitamin-Metabolismus sowie ein Protein mit unbekannter Funktion. Auf Basis der Qualität der massenspektrometrischen Auswertung wurden drei ausgewählte Proteine in einem reversen *Pulldown*-Experiment als CryP-Interaktionspartner verifiziert. Die *in silico*-Analyse des Interaktionspartners ID14849 zeigte eine Zugehörigkeit zur in Pro- und Eukaryoten verbreiteten BOLA-Familie und in Verbindung damit eine mögliche Rolle als redox-regulierter Transkriptionsfaktor mit nucleocytoplasmatischer Lokalisation. Der Interaktionspartner ID15211, der ebenfalls in Pro- und Eukaryoten nachgewiesen werden kann, ist ein potentielles *Cold-Shock-Domain*-Protein (CSDP) mit DNA- und RNA-Bindeeigenschaften, was eine regulative Wirkung auf posttranskriptionaler Ebene durch veränderliche mRNA-Stabilitäten vermuten lässt. Der dritte bestätigte Interaktionspartner ID42612, dem keine bekannte Funktion zugewiesen werden kann, ist ein Heterokonten-spezifisches Protein, für das eine ER-Assoziation aufgrund eines N-terminalen Signalpeptids vermutet wird. Dieser Partner zeigte in den *Pulldown*- und massenspektrometrischen Analysen die stärkste CryP-Bindung im Vergleich aller betrachteten potentiellen Interaktionspartner. Auf Basis des Isolationserfolgs nach heterologer Expression in *E. coli* wurden in dieser Arbeit die Interaktionspartner ID42612 und ID14849 (BOLA) für CryP-Interaktionsstudien in Abhängigkeit von der CTE und des FAD-Redoxzustands eingesetzt. Dies erfolgte in zweidimensionalen PAGEs. Dabei wurden nach Inkubation von CryP-PHR, CryPox, CryPsemired bzw. CryPfullyred mit dem jeweiligen Interaktionspartner die Interaktionskomplexe in einer BN-PAGE in erster Dimension vereinzelt. Es folgte eine SDS-PAGE in zweiter Dimension, um die Komplexe zu dissoziieren. Voraussetzung für die

Ergebnisse

Analyse möglicher Interaktionen mittels zweidimensionaler PAGE sind unterschiedliche, sich nicht überlagernde Laufstrecken der betrachteten Proteine in ihrer Einzelauftrennung. Genaue Bindungsaffinitäten können mit dieser Methode nicht definiert werden. Die Ergebnisse der Interaktionsstudien wurden von Krischer et al. (2022) veröffentlicht.

Die zweidimensionale Einzelauftrennung der verschiedenen CryP-Varianten zeigte die erwartete Dimer-Monomer-Gliederung, die bereits für den PHR-CTE-Interaktionstest beschrieben wurde (Abb. 3.20; vgl. Abb. 3.17). Diese zeigt sich in zwei Proteinsignalen auf unterschiedlicher Laufhöhe in der BN-PAGE, die sich in der folgenden SDS-PAGE auf der gleichen, CryP-spezifischen Laufhöhe bei 68 kDa befinden. Dagegen bildet der Interaktionspartner ID42612 Aggregate, die sich in der BN-PAGE am oberen Gelrand anlagern. Diese dissoziieren in der folgenden SDS-PAGE nicht vollständig, sodass ID42612 als gestrecktes Signal bei 25 kDa detektiert werden kann. Für die CTE von CryP wurde eine ähnliche Aggregation in der BN-PAGE beobachtet (vgl. Abb. 3.17). Diese Aggregation konnte auf die intrinsische Unordnung der CTE zurückgeführt werden. Im Gegensatz dazu erklärt sich dieses Verhalten bei ID42612 durch seine lipophilen Eigenschaften. Durch die Zugabe der Detergenzien TX-100 bzw. α -DDM in steigenden Konzentrationen können die Aggregate schrittweise gelöst werden (vgl. Anhang Abb. A6). Die Detergenz-Protein-Wechselwirkung führt jedoch gleichzeitig zu einer Erhöhung des apparenten Molekulargewichts von ID42612 in der BN-PAGE mit der Folge, dass das CryP-Monomer und ID42612 auf derselben Laufhöhe migrieren. Diese Beobachtung macht eine Auswertung potentieller Interaktionen mittels zweidimensionaler PAGE unmöglich, weshalb auf eine Detergenzbehandlung von ID42621 verzichtet wurde. Gleichzeitig bestärkt die Beobachtung des lipophilen Charakters von ID42612 Vermutungen über eine ER-Assoziation.

Die 2D-PAGE von ID42612 mit CryPox bzw. CryPsemired zeigt in der ersten Dimension ein fehlendes CryP-Dimer-Signal (Abb. 2.20 CryPox + ID42612 und CryPsemired + ID42612). Die Auflösung in der zweiten Dimension bestätigt dies, nur das Monomer bleibt erhalten. Dagegen ist das ID42612-Laufverhalten nahezu unverändert. In der zweiten Dimension der Inkubation mit CryPsemired sind Proteinansammlungen unterhalb der sonst gewohnten Dimer-Position sichtbar, die der Form von ID42612 ähneln. Dies lässt den Schluss einer Interaktion von ID42612 mit dem Dimer von CryPox bzw. CryPsemired zu. Die Ursache des fehlenden Dimer-Signals liegt dabei am wahrscheinlichsten in einer Aggregation des CryP-Dimers mit ID42612, die das Einlaufen in das BN-Gel und damit einen Nachweis des ID42612-CryP-Dimer-Komplexes verhindert. Eine mögliche Degradation des CryP-Dimers in Folge der Inkubation mit ID42612 kann ausgeschlossen werden, da eine direkte Auftrennung des Interaktionskomplexes in einer SDS-PAGE ohne vorherige BN-PAGE eine gleichbleibende CryP-Menge zeigt (vgl. Anhang Abb. A7). Auch ein Zerfall des Dimers zum Monomer ist nicht ursächlich, da die Monomermenge relativ zur CryP-Einzelauftrennung unverändert ist.

Ergebnisse

In der Inkubation von ID42612 mit CryP-PHR bleibt das Dimer erhalten (Abb. 3.20 CryP-PHR + ID42612). Ähnlich wie bei CryPox sind unterhalb des CryP-PHR-Dimers in der SDS-PAGE aber Proteinansammlungen vergleichbar mit der ID42612-Laufform sichtbar. Daher interagiert ID42612 auch mit dem CryP-PHR-Dimer, jedoch mit deutlich geringerer Affinität als mit dem CryP-Dimer.

Die Analyse des Interaktionsverhaltens von CryPfullyred muss unter Zugabe des Reduktionsmittels DTT erfolgen, um den vollreduzierten Zustand FADH^- nach Belichtung zu erreichen. Daher mussten auch mögliche Einflüsse des Reduktionsmittels auf das Laufverhalten der Einzelproteine untersucht werden. Während CryPsemired (DTT-Zugabe ohne folgende Belichtung) und CryPfullyred (DTT-Zugabe mit folgender Belichtung) weiterhin eine Monomer-Dimer-Gliederung aufweisen, führt die Zugabe von DTT zu ID42612 zu einer Lösung der Aggregate ähnlich wie nach Detergenzbehandlung mit der Folge, dass der Interaktionspartner parallel zum CryP-Monomer und -Dimer migriert. Die gemeinsame Inkubation von CryPfullyred mit ID42612 führt wie für CryPox und CryPsemired zu einem fehlenden Dimer-Signal (Abb. 3.20 CryPfullyred + ID42612). Somit interagiert ID42612 auch mit dem CryPfullyred-Dimer. Eine Interaktion mit dem CryPfullyred-Monomer ist möglich, kann aufgrund der DTT-bedingten Dissoziation der ID42612-Aggregate und parallelen Laufhöhe zum CryP-Monomer jedoch nicht mit Bestimmtheit nachgewiesen werden.

Der Interaktionspartner Bola bildet in der BN-PAGE ein Signal unterhalb des CryP-Monomers, das in der folgenden SDS-PAGE auf der erwarteten Bola-Laufhöhe von 10 kDa nachgewiesen werden kann. Somit überlagern sich die Laufformen von CryP und Bola in ihren Einzelauftrennungen nicht.

Die Inkubation von CryPox bzw. CryPsemired mit Bola führt zu einer parallelen Migration von Bola mit dem Monomer und Dimer, erkennbar auf der SDS-PAGE in zweiter Dimension (Abb. 3.20 CryPox + Bola und CryPsemired + Bola). Folglich interagiert Bola sowohl mit dem CryP-Monomer als auch dem -Dimer. Im Gegensatz dazu verhält sich Bola in der Inkubation mit CryP-PHR wie in seiner Einzelauftrennung (Abb. 3.20 CryP-PHR + Bola). Bola migriert in der BN-PAGE unterhalb des CryP-PHR-Monomers ohne erkennbare Signale parallel zu Monomer oder Dimer in der SDS-PAGE. Eine Interaktion von Bola mit CryP-PHR kann in der 2D-PAGE demnach nicht nachgewiesen werden.

Das Bola-Laufverhalten ändert sich auch durch die Zugabe von DTT nicht. Wie für CryPox und CryPsemired ist für die Inkubation von CryPfullyred mit Bola eine Interaktion mit dem Monomer und dem Dimer nachweisbar, wobei die Wechselwirkung mit dem Dimer hier stärker scheint.

Um die Bildung eines möglichen Interaktionskomplexes zu untersuchen, erfolgte ein Interaktionstest in Kombination von CryPsemired, ID42612 und Bola. Die Auswertung der 2D-PAGE wies dabei eine Interaktion von ID42612 mit dem CryP-Dimer nach, während Bola einen Komplex mit dem CryP-Monomer bildete. In diesem direkten Vergleich kann demnach eine höhere Bindungsaffinität zwischen ID42612 und dem CryP-Dimer verglichen mit Bola und dem Dimer gezeigt werden.

Ergebnisse

Eine mögliche Interaktion von ID42612 und BolA konnte mittels zweidimensionaler PAGE nicht nachgewiesen werden.

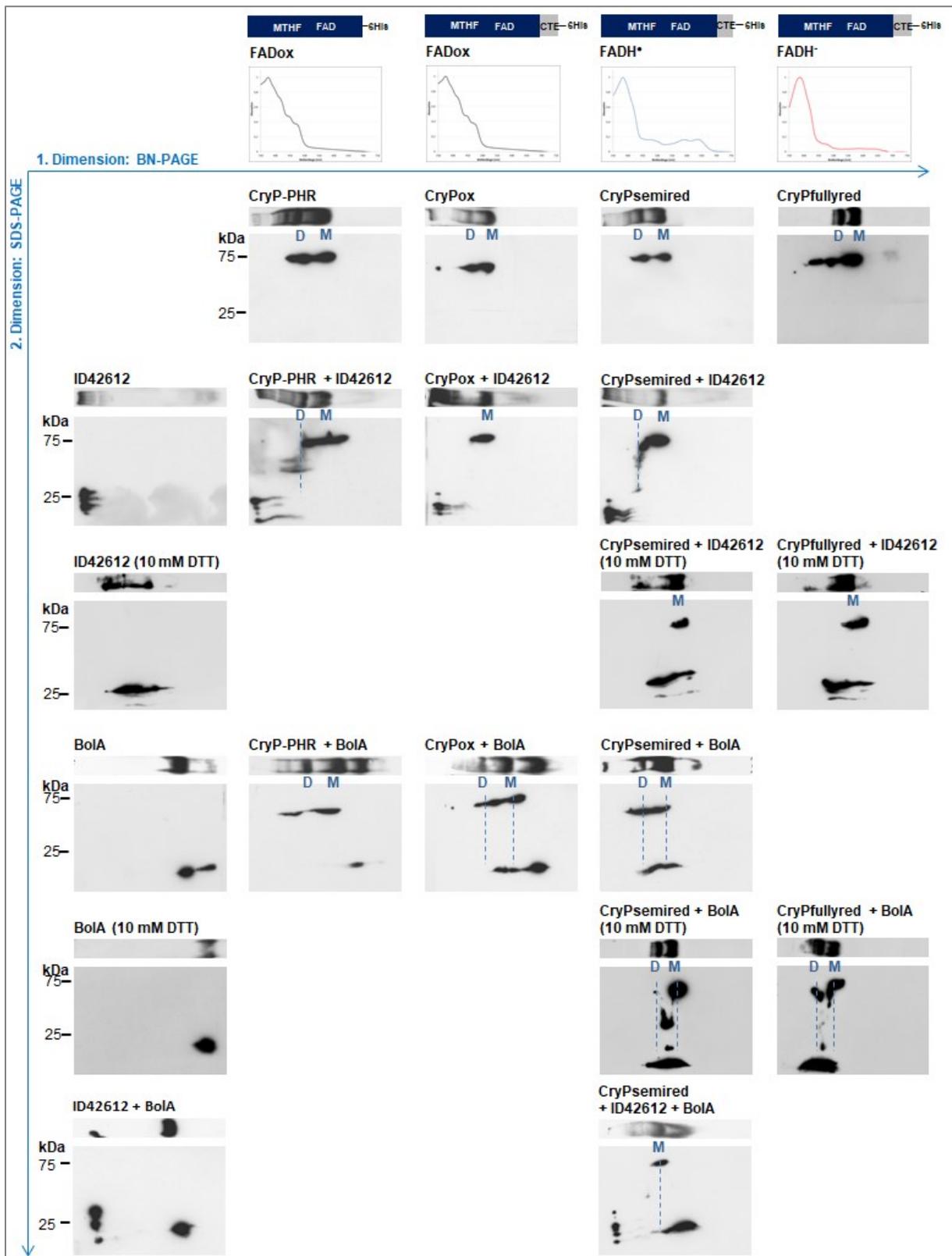


Abb. 3.20: 2D-PAGE zur Interaktion von CryP-PHR, CryPox, CryPsemired bzw. CryPfullyred mit ID42612 und BolA. Fortführung auf folgender Seite.

Ergebnisse

Abb. 3.20: Fortführung. Je 200 ng rekombinant aufgereinigtes CryP-PHR, CryPox bzw. CryPsemired wurden separat oder mit einer äquimolaren Menge ID42612 bzw. BolA 30 min dunkel auf Eis inkubiert und anschließend in einer 4-10 %igen BN-PAGE aufgetrennt. Es folgte eine 10 %ige SDS-PAGE in zweiter Dimension zur Auftrennung der Interaktionskomplexe. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte der immunologische Nachweis mit einem Histidin-Antikörper. Zur Analyse der Interaktion mit CryPfullyred erfolgte eine 15 minütige Dunkel- bzw. BL-Inkubation mit 10 mM DTT vor Zugabe von ID42612 bzw. BolA, um die Interaktion mit CryPsemired + DTT bzw. CryPfullyred + DTT zu vergleichen. Nach anschließender 30 minütiger Dunkel- bzw. BL-Inkubation folgte eine BN-PAGE in Dunkelheit bzw. konstantem BL, um CryPsemired bzw. CryPfullyred stabil zu halten. Es folgte eine 10 %ige SDS-PAGE und ein immunologischer Nachweis per Histidin-Antikörper. Gestrichelte Linien markieren die Interaktion des Monomers (M) bzw. Dimers (D) mit den Interaktionspartnern. Verändert nach Krischer et al. (2022).

Um die Spezifität der Interaktionen zu belegen, wurden 2D-PAGES unter gleichen Bedingungen mit PtCPF1 durchgeführt. Wie für CryP wurde für die Einzelauftrennung von PtCPF1 eine Monomer-Dimer-Gliederung beobachtet, wobei das Monomer den größeren Anteil darstellt (Abb. 3.21). Während für BolA und PtCPF1 keine Wechselwirkungen nachgewiesen werden können, interagiert ID42612 mit dem PtCPF1-Dimer wie im Fall von CryP (Abb. 3.21 A). Da ID42612 damit offenbar nicht nur spezifisch mit CryP sondern auch mit PtCPF1 und möglicherweise weiteren CRYs interagiert, wurde die Interaktion in Bezug auf ihre Spezifität untersucht. ID42612 ist ein Heterokonten-spezifisches Protein, weshalb als zweites, artfremdes Kontroll-CRY CraCRY aus der Grünalge *C. reinhardtii* eingesetzt wurde. Für die Interaktionstests mit CraCRY musste der Versuchsaufbau jedoch abgeändert werden. Der Grund hierfür liegt darin, dass CraCRY trotz der rekombinanten Hexahistidin-Markierung nach heterologer Expression zwar mittels IMAC isoliert, jedoch nicht mit einem Histidin-Antikörper detektiert werden kann. Daher wurde nur eine BN-PAGE gefolgt von einer Coomassie-Brillantblau-Färbung der Gesamtproteine nach Inkubation von CraCRY mit ID42612 durchgeführt. Eine mögliche Interaktion von ID42612 mit CraCRY kann dann wie für CryP an einem fehlenden Dimersignal relativ zur CraCRY-Einzelauftrennung nachgewiesen werden. Dies wurde für die CraCRY-ID42612-Inkubation jedoch nicht beobachtet (Abb. 3.21 B). Im Gegensatz zu CryP blieb das coomassie-brillantblau-gefärbte CraCRY-Dimer auch in Kombination mit ID42612 erhalten, was eine mit CryP-vergleichbare Interaktion ausschließt.

In Kontrolltests mit isoliertem EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) wurde keine Interaktion zwischen EGFP und ID42612 bzw. BolA festgestellt (vgl. Anhang Abb. A8).

Ergebnisse

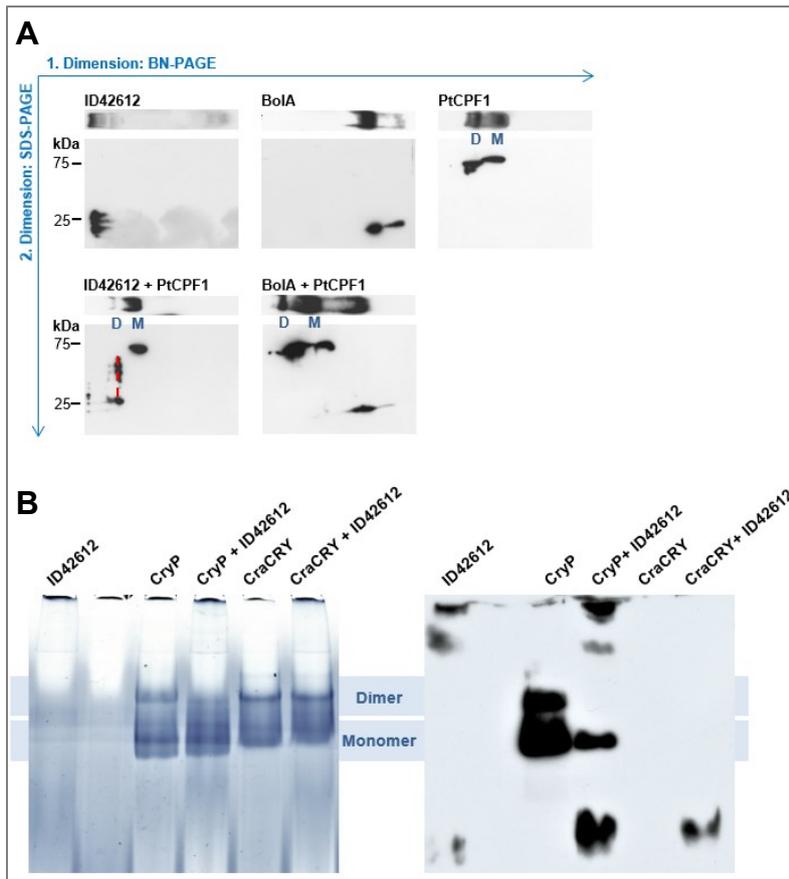


Abb. 3.21: BN- und 2D-PAGE zur Interaktion von PtCPF1 bzw. CraCRY mit ID42612 und BoIA. (A) Je 200 ng rekombinant aufgereinigtes PtCPF1 wurden separat oder mit einer äquimolaren Menge ID42612 bzw. BoIA 30 min dunkel auf Eis inkubiert. Es folgte eine 4-10 %ige BN-PAGE in erster sowie 10 %ige SDS-PAGE in zweiter Dimension zur Auftrennung der PtCPF1-Interaktionskomplexe mit anschließendem immunologischen Nachweis mit einem Histidin-Antikörper. **(B)** Je 200 ng rekombinant aufgereinigtes CraCRY wurden separat oder mit einer äquimolaren Menge ID42612 30 min dunkel auf Eis inkubiert. Die CraCRY-Interaktionskomplexe wurden in einer 4-10 %igen BN-PAGE aufgetrennt, gefolgt von einer Coomassie-Proteinfärbung (links) bzw. einem immunologischen Nachweis mit einem Histidin-Antikörper (rechts). Rote gestrichelte Linien markieren die Interaktion des Monomers (M) bzw. Dimers (D) mit den Interaktionspartnern.

Zusammenfassend geben die Interaktionsstudien mittels zweidimensionaler PAGE Aufschluss über unterschiedliche Bindeverhalten der beiden betrachteten Interaktionspartner an CryP. Während ID42612 einen Komplex mit dem CryP-Dimer bildet, bindet BoIA sowohl an das Monomer als auch an das Dimer. Die Interaktion von CryP mit BoIA erfolgt über die CTE. Im Vergleich dazu erhöht die CTE zwar die CryP-Bindeaffinität zu ID42612, eine Interaktion wird durch die Deletion der CTE jedoch nicht verhindert. Für beide Interaktionspartner wurde eine Interaktion mit CryP unabhängig vom FAD-Redoxzustand nachgewiesen.

3.7 Diurnaler Transkriptionsrhythmus von *cryp* und den CryP-Interaktionspartnern *ID42612* und *bola*

Die Analyse des CryP-Interaktionsverhaltens mittels zweidimensionaler PAGE zeigte keine Unterschiede in Abhängigkeit vom FAD-Redoxzustand. Daher ist eine mögliche Regulation der CryP-Interaktion auf Basis unterschiedlicher, alternierender Expressionsrhythmen von CryP und seinen Interaktionspartnern möglich. Zu diesem Zweck wurden Zellen des *P. tricornutum* Wildtyps an einen 16 h Weißlicht/ 8 h Dunkel-Zyklus adaptiert. Für das Experiment wurden die Zellen im Anschluss an die gewohnte Dunkelphase 10 h in Dunkelheit inkubiert oder mit konstantem Blaulicht (BL), Rotlicht (RL) bzw. Dunkelrotlicht (fRL) bestrahlt. Der Vergleich relativer Transkriptmengen von *cryp*, *ID42612* und *bola* unter den einzelnen Belichtungsbedingungen erfolgte mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qRT-PCR) relativ zum Histon-Gen *h4* (Abb. 3.22).

Die *cryp*-Transkription wies unabhängig von der folgenden Belichtungsart eine Abnahme gemittelt um den Faktor 2 innerhalb der ersten 2 Messstunden auf, in denen sich die Zellen gleichermaßen am Ende der Dunkelphase befanden. Dies zeigt eine Regulation der *cryp*-Transkription auf circadianer Ebene in Zellen, die an einen regelmäßigen Licht-Dunkel-Zyklus gewöhnt sind. Abhängig von der folgenden Lichtqualität differenzierte sich das *cryp*-Transkriptlevel. Innerhalb der ersten 2 h nach BL- oder RL-Aktivierung konnte eine Abnahme der *cryp*-Transkription um den Faktor 5 beobachtet werden. Das Transkriptlevel blieb bis zum Ende der Messzeit konstant niedrig mit Werten zwischen 0,05 und 0,17 relativ zum Ausgangswert von 1. Im Gegensatz dazu konnte bei konstanter Dunkelinkubation oder fRL-Belichtung keine weitere Abnahme der *cryp*-Transkription wie im BL oder RL beobachtet werden. Gegenteilig erholten sich die Werte bis 4 h nach weiterer Dunkelinkubation bzw. fRL-Aktivierung mit Werten von 0,84 bzw. 0,62 relativ zum Ausgangswert von 1. Bis zum Ende der Messzeit sanken die Werte wieder.

Wie für *cryp* zeigte die *ID42612*-Transkription eine Regulierung nach BL- und RL-Aktivierung, wobei die Erhöhung der Transkription um den Faktor 270 im BL und 414 im RL 2 h nach Lichtaktivierung gegenteilig und deutlich stärker ausfiel als für *cryp*. Die Belichtung mit fRL wies mit Schwankungen um den Ausgangswert 1 über den gesamten Messzeitraum keine Änderung zum dunkeladaptierten Zustand auf. Eine Behandlung in konstanter Dunkelheit führte im Schnitt zu einer Halbierung der *ID42612*-Transkription.

Die Transkription des Interaktionspartners Bola zeigt eine regelmäßige Alternation unabhängig von den äußeren Lichtbedingungen. Während ein Minimum bis zum Ende der Dunkelphase erreicht wird, steigt die Transkription innerhalb von 4 h nach Lichtaktivierung bzw. weiterer Dunkelbehandlung auf ein Maximum, sodass sich die Transkription relativ zum Messstart wieder erholt. Im weiteren Messverlauf schwanken die Werte um den Ausgangswert 1.

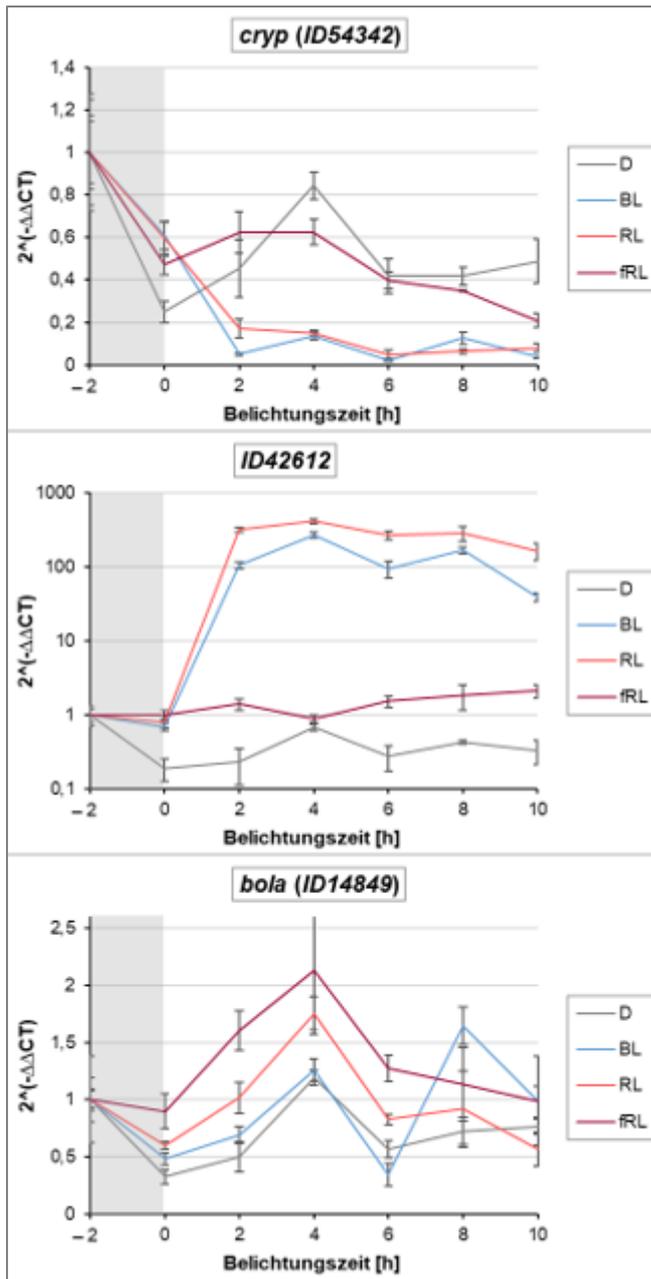


Abb. 3.22: Diurnaler, lichtabhängiger Transkriptionsrhythmus von *cryp*, *ID42612* und *bola*: Zellen des *P. tricornutum* WT wurden an einen 16 h Weißlicht/ 8 h Dunkel-Zyklus adaptiert. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde die diurnale Expression der Gene *cryp*, *ID42612* und *bola* mittels qRT-PCR unter verschiedenen Lichtbedingungen analysiert. Dazu wurden die Zellen unter konstanter Dunkelheit (D) oder je $15 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Blaulicht (BL, λ_{max} 465 nm), Rotlicht (RL, λ_{max} 591 nm) bzw. Dunkelrotlicht (fRL, λ_{max} 731 nm) inkubiert. Die Probenahme erfolgte anfangend bei 2 h vor Belichtung (-2) über 12 h in einem 2 h-Takt. Die Expression der betrachteten Gene wurde relativ zum Referenzgen *Histon h4* (ID26896) normiert und zum Messstart auf einen Wert von 1 festgelegt. Die Messwerte und daraus berechnete Standardabweichungen stellen Mittelwerte aus drei technischen Replikaten dar (n=3). Grau hinterlegte Bereiche stellen die späte Dunkelphase dar, in denen sich alle Zellen gleichermaßen in Dunkelheit befanden.

Zusammenfassend können für die diurnale Transkription von *cryp* und seinen Interaktionspartnern *ID42612* und *bola* verschiedene Regulationsmechanismen in getakteten *P. tricornutum*-Zellen nachgewiesen werden. Relativ zu einem 16 h Tag/ 8 h Nacht-Zyklus erreicht die *cryp*- Transkription zu einem Zeitpunkt in der Dunkelphase, der hier nicht genau erfasst wurde, ihr Maximum. Es folgt eine Herunterregulation der *cryp*- Transkription zu Tagesbeginn, die sowohl circadian als auch BL- und RL-abhängig ist. Die Transkription von *ID42612* erfolgt rein lichtabhängig, wobei Belichtungen mit BL und RL zu einer starken Hochregulierung gegenteilig zur *cryp*-Transkription führen. *BolA* folgt einem circadianen Transkriptionsrhythmus mit maximalen Werten am Tagesbeginn.

3.8 Lichtinduzierte CryP-Degradation

In vorhergehenden Untersuchungen zur CryP-Wirkweise wurde für CryP eine lichtinduzierte, proteasevermittelte Degradation beobachtet (Radev 2016). Auch in anderen aCRYs und pCRYs, wie DmCRY aus *D. melanogaster* und AtCRY2 aus *A. thaliana*, konnte ein lichtinduzierter Abbau über den Proteasomweg nachgewiesen werden (Guo et al. 1999; Busza et al. 2004). In diesem Zusammenhang sollte die für CryP beobachtete Proteolyse in Anhängigkeit zum FAD-Redoxzustand und der CTE spezifiziert werden.

In einem ersten Versuchsansatz wurden Zellen des *P. tricornutum*-Stamms Pt_CryP-eGFP eingesetzt, die CryP mit einer C-terminalen EGFP-Fusion exprimieren (Jäger 2013). Der gleiche Stamm war bereits zuvor erfolgreich zum Nachweis der nuklearen Lokalisation von CryP eingesetzt worden (König 2016). Das wasserlösliche Proteinlysate dieser Zellen wurde über 5 h in Dunkelheit oder BL, RL bzw. fRL derselben Intensität inkubiert. Die CryP-Stabilität unter den verschiedenen Belichtungsbedingungen wurde nach elektrophoretischer Auftrennung mittels immunologischer Detektion verglichen (Abb. 3.23). Die CryP-EGFP-Menge blieb während der Beobachtungszeit in Dunkelheit und fRL konstant, wohingegen nach 2 h Inkubation in BL oder RL nahezu kein CryP-EGFP mehr detektierbar war. Um die Spezifität des CryP-Abbaus nachzuweisen, wurde das EGFP-haltige Proteinlysate aus Pt_eGFP unter gleichen Inkubationsbedingungen untersucht. Im Gegensatz zu CryP-EGFP blieb die Menge an EGFP sowohl in Dunkelheit als auch nach BL-Inkubation konstant.

In diesem *in vivo*-nahen Versuchsaufbau konnte demnach eine lichtvermittelte CryP-Degradation beobachtet werden. Unbeantwortet bleibt jedoch, ob dieser Abbau autokatalytisch oder proteasevermittelt ist und welche Abhängigkeiten zum FAD-Redoxzustand und der CTE bestehen. Zu diesem Zweck wurden heterolog isoliertes CryPsemired bzw. CryPox, CryP-PHR, CryP_W342F und die CTE ohne oder mit dem wasserlöslichen Proteinlysate aus Zellen des *P. tricornutum*-Wildtyps inkubiert und unter sonst gleichen Belichtungsbedingungen untersucht (Abb. 3.24).

Ergebnisse

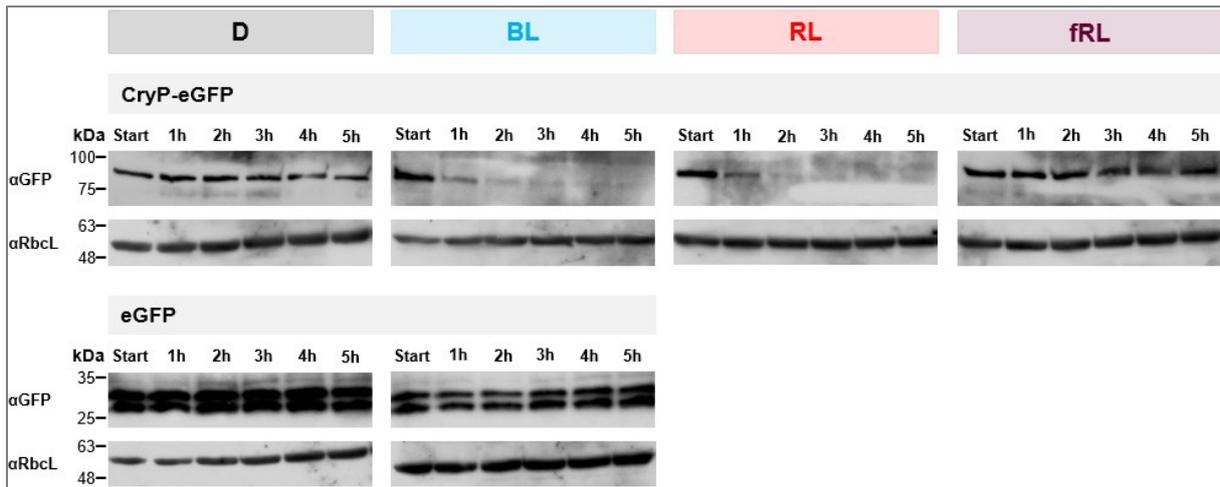


Abb. 3.23: Lichtabhängiger CryP-Abbau *in vivo*. Nach Zellyse des *P. tricornutum*-Stamms Pt_CryP-eGFP wurde das wasserlösliche Proteinlysate im Dunkeln (**D**), unter Blaulicht (**BL**, λ_{\max} 465 nm), unter Rotlicht (**RL**, λ_{\max} 591 nm) bzw. unter Dunkelrotlicht (**fRL**, λ_{\max} 731 nm) je 0-5 h bei $20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ und 18°C inkubiert, um den lichtabhängigen CryP-Abbau zu induzieren. Der CryP-Nachweis erfolgte mit einem GFP-Antikörper nach Auftrennung in einer 10 %igen SDS-PAGE nach Lämmli und Transfer auf eine PVDF-Membran. Als Ladekontrolle diente der Proteinnachweis mit einem RuBisCO(Rbcl)-Antikörper. Als Abbaukontrolle wurde EGFP aus Pt_eGFP unter sonst gleichen Bedingungen untersucht.

Die Inkubationsansätze der isolierten Proteine in Lagerpuffer ohne das Proteinlysate zeigten für alle getesteten Varianten eine gleichbleibende Proteinmenge während der Beobachtungszeit unabhängig von der gewählten Belichtungsart, weshalb eine autokatalytische Degradation ausgeschlossen werden kann (vgl. Anhang Abb. A9). Demnach muss der beobachtete CryP-Abbau durch einen proteolytischen Mechanismus ausgelöst von Bestandteilen des Proteinlysats vermittelt werden. Diese Vermutung wird durch die Inkubation der isolierten Proteine mit dem *P. tricornutum*-Proteinlysate bestätigt (Abb. 3.24). Wie für CryP-EGFP aus Pt_CryP-eGFP zeigte der Inkubationsansatz von CryPsemired mit dem Proteinlysate eine BL- und RL-vermittelte schrittweise Abnahme der Proteinmenge, sodass nach 5 h Belichtung kein CryPsemired mehr nachweisbar war. Im Gegensatz dazu blieb die Proteinmenge nach Dunkel- bzw. fRL-Behandlung konstant. Die gleiche BL- und RL-abhängige Degradation war für CryPox nachweisbar. Dies stellt eine direkte Abhängigkeit zwischen FAD-Redoxzustand bzw. FAD-Reduzierbarkeit und CryP-Abbau in Frage, da das in CryPox gebundene FADox RL nicht absorbieren und folglich weder angeregt noch reduziert werden kann. Die gleiche Frage gilt für den Inkubationsansatz von CryP_W342Fox, dessen Proteinmenge ebenfalls BL- und RL-induziert abnimmt, obwohl sich dieses Protein unter *in vitro*-Bedingungen als nicht reduzierbar erwiesen hat (vgl. Abb. 3.7). Demnach besteht keine direkte Abhängigkeit zwischen CryP-Reduzierbarkeit und CryP-Degradation.

Wie für CryP konnte auch für CryP-PHR ein BL- und RL-abhängiger Abbau gezeigt werden, wobei dieser bereits nach 2 h und damit schneller als für CryP abgeschlossen war. Dies ist mit der grundsätzlichen Instabilität von CryP-PHR verglichen mit CryP unter den gewählten Versuchsparametern zu erklären,

Ergebnisse

da auch die proteinlysatfreien Inkubationsansätze einen schrittweisen CryP-PHR-Zerfall über 5 h aufzeigen (vgl. Anhang Abb. A9). Die Degradation ist jedoch nicht nur PHR-vermittelt, da die CTE unter den gewählten Testbedingungen das gleiche lichtabhängige Abbauverhalten zeigt.

In einem Kontrollansatz wurde für isoliertes EGFP keine Degradation festgestellt.

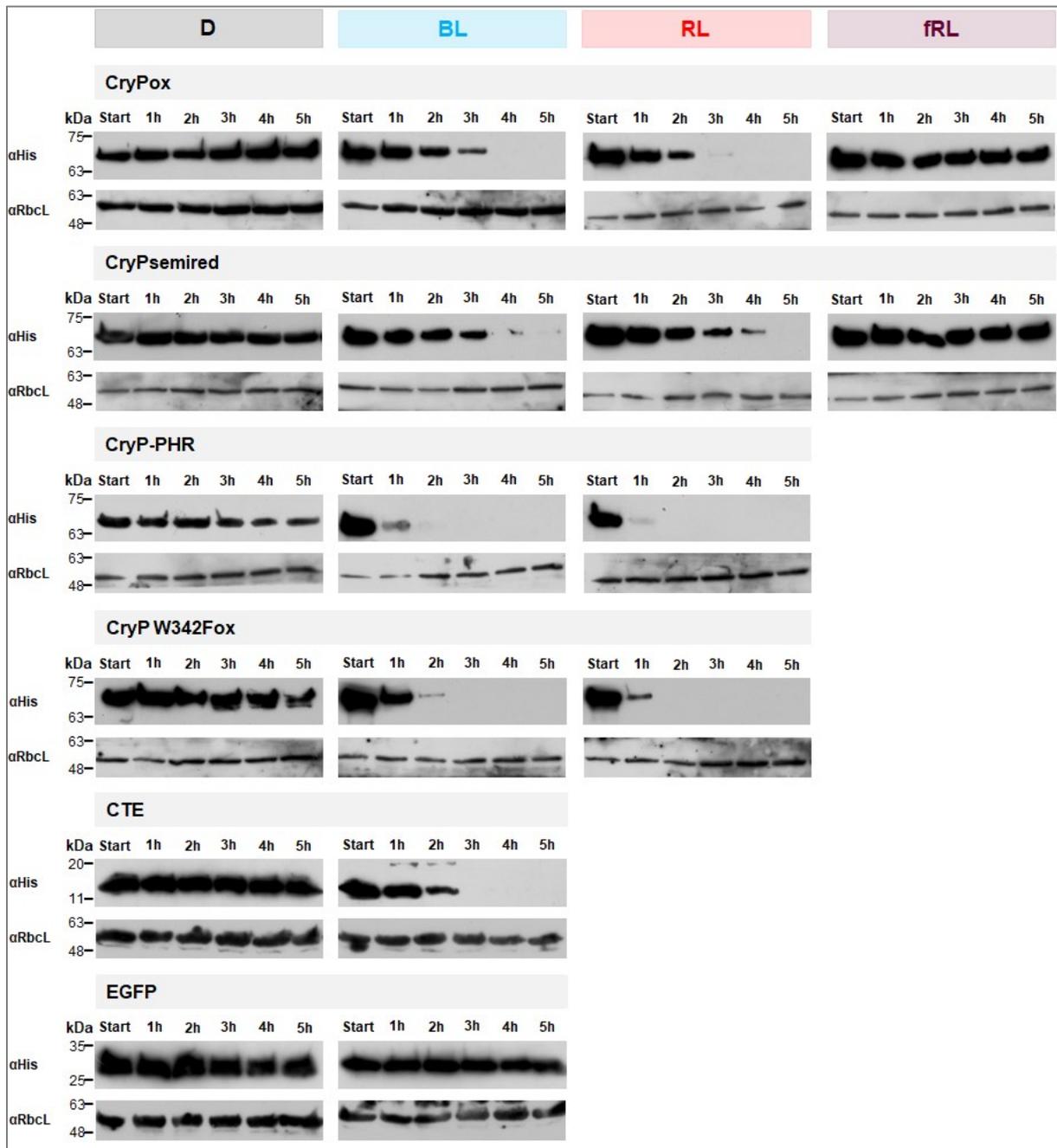


Abb. 3.24: Lichtinduzierter, proteasevermittelter CryP-Abbau. Rekombinant aufgereinigtes CryPox, CryPsemired, CryP-PHR, CryP W342F bzw. CTE wurden mit einem Proteinlysat aus *P. tricornutum* im Dunkeln (D) oder unter $20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ Blaulicht (BL, $\lambda_{\text{max}} 466 \text{ nm}$), Rotlicht (RL, $\lambda_{\text{max}} 591 \text{ nm}$) bzw. Dunkelrotlicht (fRL, $\lambda_{\text{max}} 731 \text{ nm}$) inkubiert, um den lichtabhängigen proteasevermittelten Abbau zu induzieren. Die Proben nach 0-5 h Inkubation wurden in einer 10 %igen SDS-PAGE nach Lämmli aufgetrennt. Der CryP-Nachweis erfolgte mit einem Histidin-Antikörper nach Transfer auf eine PVDF-Membran. Als Ladekontrolle diente der Proteinnachweis mit einem RuBisCO(RbcL)-Antikörper. Als Kontrolle wurde EGFP mit einem Proteinlysat aus *P. tricornutum* unter sonst gleichen Bedingungen untersucht.

Ergebnisse

Um die Spezifität des CryP-Abbaus einzugrenzen, wurde isoliertes CryPsemired mit dem Proteinlysate aus *T. pseudonana* bzw. *C. meneghiniana* unter sonst gleichen Bedingungen inkubiert (vgl. Anhang Abb. A10). Im Vergleich zur Inkubation im *P. tricornutum*-Proteinlysate war der CryP-Abbau im *T. pseudonana*-Lysate deutlich verlangsamt und im *C. meneghiniana*-Lysate überhaupt nicht zu beobachten. Demnach wird der CryP-Abbau spezifisch von Komponenten des *P. tricornutum*-Lysates vermittelt, die teilweise auch in *T. pseudonana* erhalten sind, jedoch nicht in *C. meneghiniana*.

In einem parallelen Kontrollansatz, in dem isoliertes CraCRY-PHR mit dem Proteinlysate aus *C. reinhardtii* inkubiert wurde, war in Übereinstimmung mit bekannten Untersuchungen kein CraCRY-PHR-Abbau nachweisbar. Diese Beobachtung bestärkt die Spezifität des Versuchsaufbaus.

Zusammenfassend ist für CryP eine proteasekatalysierte, BL- und RL-induzierte Degradation ohne direkte Abhängigkeit von der FAD-Reduzierbarkeit zu beobachten, die sowohl von der PHR als auch der CTE vermittelt wird.

4 Diskussion

4.1 Cryptochrom-Signaltransduktions-Modelle

Die CRY-Forschung ist von einer grundlegenden Kontroverse über die Art der primären FAD-Photochemie als Auslöser der Photorezeptoraktivierung geprägt. Dies basiert darauf, dass bislang außer für DmCRY keine Kristallstrukturen der CRY-Volllängenproteine gewonnen werden konnten, die die Bindungskräfte zwischen PHR und CTE abbilden (Zoltowski et al. 2011). Die intrinsische Unordnung der CTE erschwert solche Strukturanalysen. Die FAD-Redoxchemie wird von der spezifischen Aminosäurezusammensetzung der FAD-Bindetasche und zellulären Komponenten, wie der Anwesenheit bestimmter Interaktionspartner, Metabolite und Reduktionsmittel sowie dem zellulären Redoxpotential und der Sauerstoffkonzentration beeinflusst (Spexard et al. 2014). Daraus resultiert eine CRY-spezifische und veränderliche Redoxumgebung im nativen Umfeld, die mit spektroskopischen Methoden *in vitro* nicht erfasst wird. Die FAD-Redoxformen in isolierten CPF-Proteinen sind demnach nicht mit dem realen Dunkel- bzw. Ruhezustand des Photorezeptors *in vivo* gleichzusetzen. Zudem ist die Aktivität von CRYs, wie die aller Photorezeptoren, abhängig von Regulationen auf posttranslationaler Ebene (Mehra et al. 2009). Vor diesem Hintergrund werden grundsätzlich zwei Modelle zur CRY-Signaltransduktion diskutiert (Abb. 4.1).

Aufgrund der gemeinsamen evolutionären Abstammung entspricht das erste Modell einer universellen CRY-Photoaktivierung in einem Photolyase-ähnlichen Mechanismus (Kao et al. 2008b). Dieser basiert auf einem Elektronentransfer zwischen FAD und einem Akzeptormolekül, wie einem Bindepartner, der CTE oder ATP, der keine Änderung des FAD-Redoxzustands infolge einer Photoreduktion voraussetzt (Song et al. 2007; Öztürk et al. 2008; Liu et al. 2010; Liu et al. 2011b; Liu et al. 2013; Karki et al. 2021). Das Photolyase-Modell beinhaltet die Fähigkeit zur Bildung eines langlebigen FAD-Anregungszustands mit hohem Redoxpotential als Elektronendonator, der aufgrund der schnellen Fluoreszenzlöschung von $(FADox)^*$ und $(FADH^*)^*$ nur in $(FAD^{\bullet})^*$ und $(FADH^{\bullet})^*$ gegeben ist (Kao et al. 2008a).

In einem zweiten Modell wird der gleiche Aktivierungsmechanismus für alle photosensorischen CRYs in einem Phototropin-Modell angenommen (Öztürk et al. 2008). Dieser beinhaltet eine Übertragung lokaler lichtinduzierter elektrostatischer Effekte um FAD in globale Proteinkonformationsänderungen, die eine Änderung der relativen Ausrichtung von PHR und CTE einschließt (Müller und Bouly 2015). Dabei besteht jedoch keine Einigkeit über die Notwendigkeit einer FAD-Photoreduktion. Einerseits wird eine Photoreduktion als Voraussetzung für elektrostatische Abstoßungen in der FAD-Bindetasche infolge der Bildung von $FAD^{\bullet-}$ - bzw. Asp^- -Anionen betrachtet, andererseits wird die FAD-Exzitation mit folgendem intramolekularem Elektronenaustausch zwischen dem Isoalloxazin- und Adeninring als primäre Photochemie angesehen (Zeugner et al. 2005; Kondoh et al. 2011; Öztürk et al. 2011; Vaidya

et al. 2013; Özturk et al. 2013; Ma et al. 2020; Lin et al. 2022). Ein weiterer Diskussionspunkt ist die Wichtigkeit der Identität von FAD-Ruhe- und Signalform. Diesbezüglich sei die Definition bestimmter Ruhe- und Signalformen bedeutsam, da nur der Wechsel zwischen zwei definierten Redoxformen bestimmte Protonentransfers, Neubildungen von Wasserstoffbrücken oder elektrostatische und hydrophobe Effekte sowie Konformationsänderungen zulasse (Procopio et al. 2016; Franz-Badur et al. 2019). Andererseits könnte die CRY-Aktivierung zwischen zwei beliebigen FAD-Redoxformen wechseln, da die primäre Photochemie grundsätzlich auf einer plötzlichen Änderung der elektrostatischen Umgebung des FAD in der Bindetasche beruhe (Özturk et al. 2014; Wang et al. 2021).

Die CRY-Funktionsweise sollte grundsätzlich vor dem Hintergrund der evolutionären Diversifizierung gesehen werden. So sind pCRYs und aCRYs aus verschiedenen Photolyase-Vorläufern hervorgegangen und auch die dualen CRY-DASHs und tierähnlichen CRYs sind jeweils zu verschiedenen Photolyasegruppen näher verwandt (vgl. Abb. 1.5). Trotz des hohen Konservierungsgrades der PHR zwischen den verschiedenen CPF-Gruppen folgt der evolutionären Substitution einzelner, entscheidender Positionen der FAD-Bindetasche eine Variation der FAD-Photochemie in Bezug auf die Bildung und Stabilisierung verschiedener Redoxformen.

Im Folgenden werden strukturelle Einflussfaktoren in Bezug auf die FAD-Redoxchemie, die Konformation und das Interaktionsverhalten von CryP analysiert, um daraus die möglichen FAD-Ruhe- und Signalzustände abzuleiten und Rückschluss auf die spezifische CryP-Photorezeptorfunktion zu gewinnen.

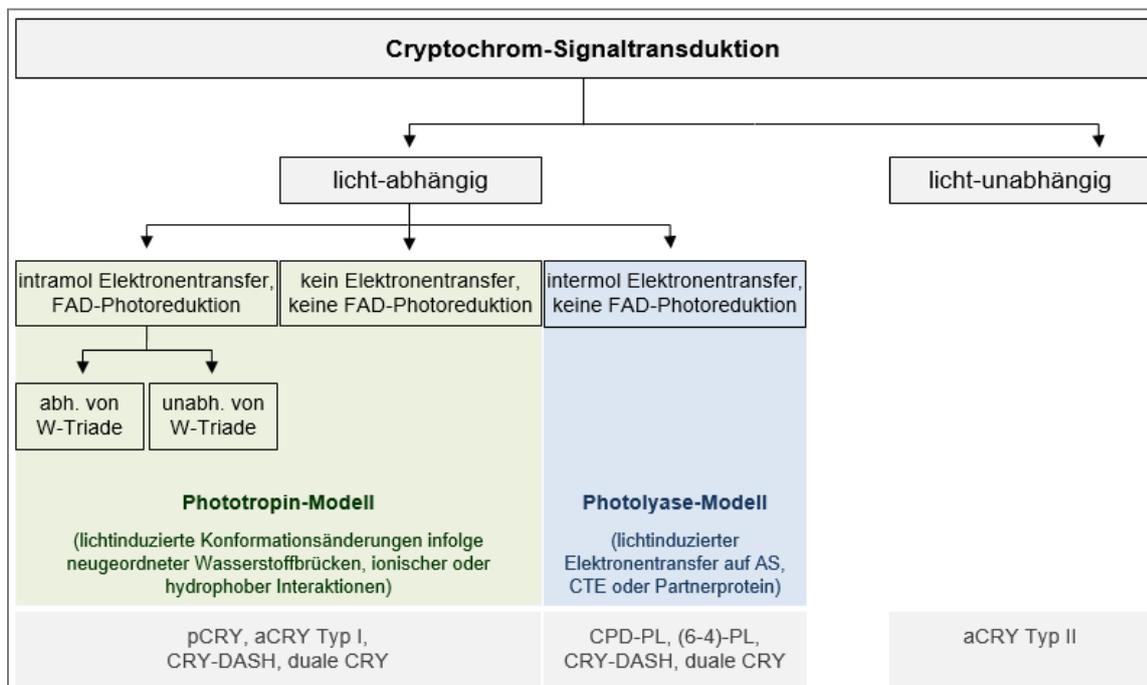


Abb.4.1: Cryptochrom-Signaltransduktions-Modelle. Während aCRYs Typ II aufgrund der fehlenden FAD-Bindung lichtunabhängig wirken, ist die primäre Photochemie in CRYs zur Photorezeptoraktivierung nicht letztlich geklärt. Diskutiert wird ein Photolyase- sowie ein Phototropin-Modell.

4.2 Die CryP-Struktur

4.2.1 Die oligomere CryP-Struktur ist ähnlich zu pCRYs und unabhängig vom FAD-Redoxzustand

Für das pflanzenähnliche CryP wurde nach heterologer Expression und Isolation mittels Ko-Elution von CryP-HA mit immobilisierten CryP-His, zweidimensionalen PAGEs und partieller Proteolyse die Fähigkeit zur Bildung PHR-vermittelter Dimere und Tetramere sowie die Bindung der CTE an die PHR unabhängig vom FAD-Redoxzustand nachgewiesen (vgl. Abb. 3.12, Abb. 3.13, Abb. 3.17, Abb. 3.18). Dabei bildeten das Monomer und Dimer die hauptsächlichen Migrationsformen in der nativen PAGE (vgl. Abb. 3.13). Der Bindebereich der CTE konnte auf einen Bereich um die FAD-Bindetasche eingegrenzt werden. Ebenfalls unabhängig von der FAD-Redoxform bindet der Interaktionspartner BolA an die CTE des CryP-Monomers und Dimers, während ID42612 mit dem CryP-Dimer interagiert. Auch für pCRYs wurde die Bildung von Dimeren und Tetrameren beobachtet, die in direkter Abhängigkeit zur BL-induzierten Photorezeptoraktivierung steht (Sang et al. 2005; Shao et al. 2020). AtCRY1 bildet lichtunabhängig Dimere, wie *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen mittels Yeast-two-Hybrid-Assays, *Size-Exclusion-Chromatographie* (SEC) und Koimmunopräzipitationen (CoIP) gezeigt haben (Sang et al. 2005; Liu et al. 2020). Dagegen ist die Di- und Tetramerisierung von AtCRY2 lichtabhängig (Wang et al. 2016; Liu et al. 2020). Die Nachweisbarkeit der Oligomere wird von der gewählten Methode beeinflusst. Für AtCRY2 konnten mittels SEC, Dichtegradientenzentrifugation oder nativen Gelen keine Oligomere nachgewiesen werden (Yu et al. 2007b). Darüber hinaus wurde für AtCRY2 eine BL-induzierte Formierung von *Photobodies* im Nukleus beobachtet (Rosenfeldt et al. 2008; Yu et al. 2009; Zuo et al. 2012; Ma et al. 2020). Im Gegensatz dazu sind PLs und die lichtunabhängigen aCRYs Typ II als Monomere aktiv, während Dimere in aCRYs Typ I wie DmCRY entweder nicht oder nur mit schwacher Interaktion auftreten (Rosato et al. 2001; Czarna et al. 2013; Zoltowski et al. 2011; Liu et al. 2020).

Einflussfaktoren auf die CryP-Oligomerisierung aus dem nativen zellulären Umfeld, wie die natürliche Proteinumgebung, die Anwesenheit bestimmter Kofaktoren oder posttranslationale Modifikationen, wurden nicht berücksichtigt. Für AtCRY2 wird die BL-induzierte FAD-Reduktion unabhängig von biochemischen Proteinmodifikationen als Auslöser für die Tetramerisierung betrachtet. Dies wird mit der Geschwindigkeit der Photobodybildung und der Unfähigkeit einer in der FAD-Bindung beeinträchtigten Substitutionsmutanten zur Tetramerisierung begründet (Zuo et al. 2012; Shao et al. 2020).

Für CryP ist daher eine Oligomerisierung unabhängig von einer lichtinduzierten FAD-Reduktion oder Phosphorylierungen vergleichbar mit AtCRY1 anzunehmen, sodass der CryP-Aktivierungsmechanismus

keine Änderung der Oligomerisierungsstufe beinhaltet. Dabei kann die dominierende *in vivo* CryP-Oligomerisierungsstufe jedoch nicht mit Bestimmtheit definiert werden, da die Verteilung von Monomer, Dimer und Tetramer durch die native Gelaufentrennung beeinflusst wird. Es ist anzunehmen, dass das CryP-Tetramer oder -Dimer im natürlichen Umfeld die dominierenden CryP-Formen darstellen, die sich während des nativen Gellaufs zum Großteil in das stabile Dimer und Monomer auftrennen. Auch für AtCRY2 ist die Dimer-Interaktionsfläche im Vergleich zur Tetramergrenzfläche stabiler (Shao et al. 2020; Palayam et al. 2021). In diesen kürzlich veröffentlichten Kristallstrukturen wurde die Stabilisierung der Monomer-Untereinheiten im AtCRY2-Tetramer über ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken an der konservierten Dimerrenzfläche dargestellt. Da die Beobachtungen aus der nativen PAGE auch für CryP eine Wechselwirkung der Untereinheiten über elektrostatische Wechselwirkungen aufzeigen, ist eine CryP-Dimerstruktur vergleichbar zu AtCRY2 denkbar (vgl. Abb. 3.14).

Durch Kombination der Beobachtungen zur Konformation von PHR und CTE sowie dem CryP-Interaktionsverhalten und unter Verwendung der kalkulierten CryP-Tertiärstruktur kann die mögliche CryP-Dimerstruktur abgeleitet werden (Abb. 4.2).

Für die CTE konnte eine Bindung an die PHR in einem Bereich um die FAD-Bindetasche mittels partieller Proteolyse nachgewiesen werden (Abb. 3.18). Dabei bindet die CTE sowohl an die monomere als auch die dimere PHR (Abb. 3.17). Dies bedeutet, dass die CTE dem Lösemittel zugewandt ist, nicht im CryP-Dimer verdeckt wird und damit kein Teil der CryP-Dimerisierungsfläche darstellt. Bestärkt wird dies durch die Bindung des Interaktionspartners BOLA an die CTE des Monomers als auch des Dimers (Abb. 3.20). Somit ist für CryP eine Dimerisierung über die gleiche Kontaktfläche wie für AtCRY2 wahrscheinlich, obwohl die beteiligten AS aus AtCYR2 in CryP nicht konserviert sind (Abb. 4.2 A; Palayam et al. 2021). In diesem zugewiesenen Kontaktbereich weist CryP sowohl negative als auch positive Oberflächenpolaritäten auf, was eine Dimerisierung über elektrostatische Wechselwirkungen ermöglicht. Die Beobachtung, dass der Interaktionspartner ID42612 ausschließlich an das CryP-Dimer bindet, verleiht der dimeren Struktur eine funktionale Relevanz.

Die frei an der PHR anliegende CTE ermöglicht Änderungen der Konformation oder des Interaktionsverhaltens infolge einer FAD-Reduktion wie es für pCRYs und aCRYs Typ I beobachtet wurde (Partch et al. 2005; Kottke et al. 2006; Vaidya et al. 2013; Berntsson et al. 2019; Chandrasekaran et al. 2021; Goett-Zink et al. 2021). Dabei weist die Oberflächenpolarität um die zugewiesene CTE-Bindestelle auf der CryP-PHR größere Ähnlichkeiten zu PLs als zu pCRYs oder aCRYs auf (Abb. 4.2 B). In PLs und CRY-DASHs hat die Oberfläche um die FAD-Bindetasche aufgrund eines Clusters basischer AS eine positive Polarität, was die Bindung des DNA-Substrates stabilisiert, während pCRYs und aCRYs in

diesem Bereich eine negative bis neutrale Polarität aufweisen (vgl. Anhang Abb. A11; Park et al. 1995; Brautigam et al. 2004; Huang et al. 2006; Klar et al. 2007; Pokorny et al. 2008; Czarna et al. 2013).

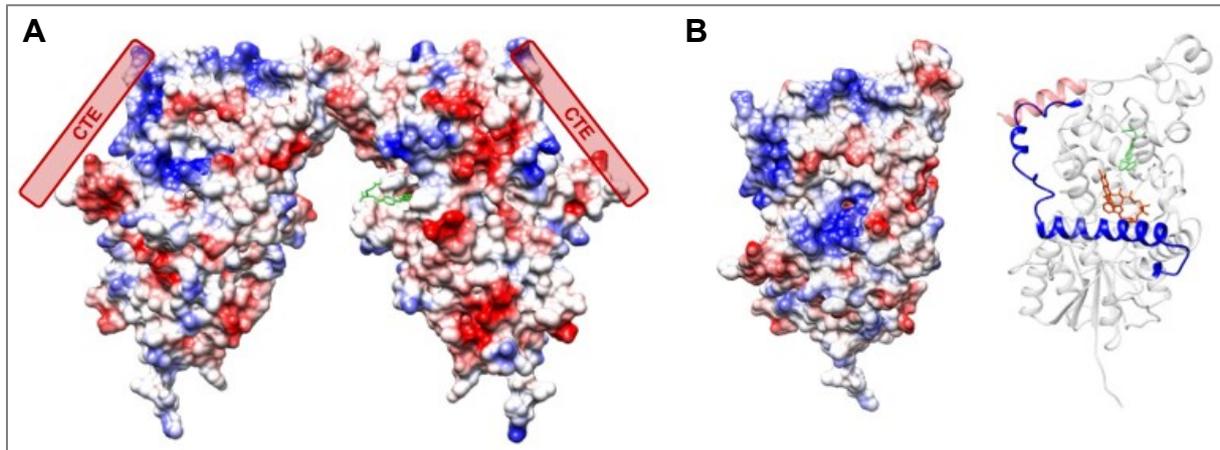


Abb. 4.2: Das CryP-Dimer. Die potentielle CryP-PHR-Tertiärstruktur wurde auf Basis der Strukturdaten der *A. tumefaciens* CPDIII-Photolyase (4U63; Scheerer et al. 2015) mittels des PHYRE2 *Protein Homology/ analogy Recognition Engine* Servers errechnet und mithilfe von UCSF Chimera visualisiert. Oberflächenpotentiale wurden mit dem *Electrostatic Surface Coloring* Tool kalkuliert. **(A)** In der potentiellen CryP-Dimerstruktur sind die Untereinheiten Kopf an Kopf mit einer frei an der PHR anliegenden CTE ausgerichtet. **(B)** Der mittels partieller Proteolyse ermittelte CTE-Bindebereich an der PHR weist eine positive Oberflächenpolarität auf. Zur besseren Übersicht ist die schematische CTE in der Darstellung (B) nicht enthalten. *Blau* positives Oberflächenpotential, *rot* negatives Oberflächenpotential.

4.2.2 Die C-terminale Erweiterung von CryP bindet unabhängig vom FAD-Redoxzustand an die PHR

Für die CTE von CryP wurde mittels *in silico* Analyse eine intrinsische Unordnung vorhergesagt und anhand der Bildung von Aggregaten in nativer PAGE bestätigt (vgl. Abb. 3.15, Abb. 3.17). Das Fehlen einer geordneten Sekundärstruktur ist charakteristisch für die CTEs aller CPF-Gruppen und für Proteine, die an Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind, da ein flexibles Proteinrückgrat variable Proteininteraktionen ermöglicht (Fontana et al. 2004; Iakoucheva et al. 2004; Partch et al. 2005; Trudeau et al. 2013). Mittels CD-, NMR- und FTIR-spektroskopischer Messungen konnte gezeigt werden, dass in den CTEs von pCRYs und aCRYs Typ I, wie AtCRY1, AtCRY2 und DmCRY1, sowie den lichtunabhängigen HsCRY1 und MmCRY1 eine α -helikale Faltung infolge der spezifischen Interaktion mit der jeweiligen PHR induziert wird (Partch et al. 2005; Kottke et al. 2006; Kondoh et al. 2011; Czarna et al. 2013; Parico et al. 2020). Mit DmCRY ist bislang nur eine Kristallstruktur eines CPF-Proteins in voller Länge bekannt, in der die Wechselwirkung der PHR und der vergleichsweise kurzen CTE von 21 AS erfasst wurde (Zoltowski et al. 2011). In dieser bindet die CTE in einer Grube zum Zugang der FAD-Bindetasche analog zum DNA-Substrat in CPD-PLs. Auch für die CryP-CTE ist die Bindung an die eigene PHR spezifisch (vgl. Abb. 3.17). Aufgrund des Einflusses der CTE auf die FAD-Redoxchemie liegt für CryP

eine ähnliche Bindung der CTE im Kontakt zur FAD-Bindetasche und eine damit verbundene CTE-Strukturierung vor (vgl. Abb. 3.5, Abb. 3.6).

Sowohl pCRYs als auch aCRYs Typ I ändern lichtabhängig und großräumig ihre Konformation, was als Mechanismus zur Photorezeptoraktivierung betrachtet wird (Partch et al. 2005; Kottke et al. 2006; Kondoh et al. 2011; Vaidya et al. 2013; Thöing et al. 2015; Berntsson et al. 2019; Goett-Zink et al. 2021). Dies beinhaltet einen dunkeladaptierten, geschlossenen Ruhezustand, in dem die CTE durch Bindung an die PHR stabilisiert wird, gefolgt von einer lichtinduzierten sequentiellen Dissoziation und *order-to-disorder*-Transition der CTE. Für das lichtunabhängige HsCRYI wurde eine vergleichbare Dissoziation der CTE von der PHR infolge der Bindung des PER-Interaktionspartners beobachtet (Parico et al. 2020). Die Konformationsänderungen in allen CPF-Gruppen werden durch Phosphorylierungen, hauptsächlich im Bereich der CTE, unterstützt (Shalitin et al. 2003; Yu et al. 2007b).

Die Änderung der relativen Ausrichtung von PHR und CTE kontrolliert die Photorezeptoraktivität, wobei die CTEs aus pCRYs und aCRYs verschiedene regulative Wirkungen besitzen. In aCRYs Typ I und Typ II kommt der CTE eine autoinhibitorische, cis-regulative Funktion zu, die die Zugänglichkeit von Interaktionsflächen auf der PHR für nachgeschaltete Signaltransduktionskomponenten reguliert (Trudeau et al. 2013; Parico et al. 2020). Dies verdeutlichen die konstitutiv aktiven DmCRY Δ CTE und HsCRY1 Δ 11, in denen die CTE ganz oder teilweise deletiert ist (Ceriani et al. 1999; Rosato et al. 2001; Busza et al. 2004; Dissel et al. 2004; Peschel et al. 2009; Öztürk et al. 2013; Parico et al. 2020). Im Gegensatz dazu vermittelt in pCRYs nicht die PHR, sondern die CTE eine konstitutive Rezeptorantwort, sodass die CTE von pCRYs als Effektordomäne betrachtet wird (Yang et al. 2000; Yu et al. 2007b).

Im Gegensatz zu DmCRY oder AtCRY1 und AtCRY2 konnten für CryP mittels partieller Proteolyse jedoch keine großräumigen Konformationsänderungen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.18). Die CTE ist unabhängig vom FAD-Redoxzustand mit der CryP-PHR assoziiert. Dabei stellen mit den Bindepartnern ID42612 und BoLA sowohl die PHR als auch die CTE Interaktionsflächen bereit, sodass für die CryP-Domänenstruktur keine klare Sensor- und Effektor-bezogene Einteilung getroffen werden kann. Falls CryP lichtinduzierte Konformationsänderungen eingeht, sind diese entweder nicht ausschließlich redoxabhängig oder umfassen kleinere Rearrangements von Struktureinheiten.

Der beobachteten lichtabhängigen Dissoziation der CTE von der PHR in pCRYs und aCRYs Typ I gehen stets intermediäre Umstrukturierungen innerhalb der PHR, wie die Auflösung von β -Faltblättern oder Neuordnung von α -Helices und *Random Coils*, voraus (Vaidya et al. 2013; Thöing et al. 2015; Sommer et al. 2017; Berntsson et al. 2019; Goett-Zink et al. 2021). In CPD- und (6-4)-PLs treten licht- und redoxunabhängige, substratinduzierte Rearrangements von α -Helices in der PHR infolge der DNA-Bindung auf (Wijaya et al. 2013; Yamada et al. 2016). Für das tierähnliche CraCRY mit dualer Funktion wurden mittels Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR)- und Wasserstoff-Deuterium-Austausch-Massenspektrometrie (HDX-MS)- Messungen auf die PHR limitierte

Konformationsänderungen mit einer Umpositionierung der CTE ohne Dissoziation infolge einer BL- oder RL-Belichtung festgestellt (Spexard et al. 2014; Oldemeyer et al. 2016; Oldemeyer et al. 2019; Franz-Badur et al. 2019). Ähnliche Umstrukturierungen innerhalb der PHR sind auch für CryP wahrscheinlich, die mittels partieller Proteolyse nicht erfasst werden konnten. Zudem könnte eine redoxunabhängige Loslösung der CTE von der PHR aufgrund fehlender biochemischer Modifikationen oder Bindepartner in der Versuchsanordnung verhindert worden sein. Wie die Sequenzanalyse der PHR gezeigt hat, bündeln sich in der CTE basische und phosphorylierbare AS, die die Bindung zwischen PHR und CTE über elektrostatische Wechselwirkungen oder Abstoßungen beeinflussen. Die CTE von AtCRY1 weist eine ähnliche AS-Komposition auf, die die elektrostatische Anziehung sowie Abstoßung nach lichtinduzierter Phosphorylierung unterstützt (Müller und Bouly 2015).

Die für CryP möglichen Wege der primären FAD-Redoxchemie als Auslöser der Konformationsänderungen werden in Abschnitt 4.3.2 erläutert.

4.2.3 CryP bindet MTHF in einer Bindetasche vergleichbar zur CPDIII-Photolyase aus *Agrobacterium tumefaciens*

CryP weist nach heterologer Expression und Isolation eine spezifische Chromophorzusammensetzung auf. Neben dem katalytischen FAD, das zum Großteil als semireduziertes Neutralradikal FADH[•] vorliegt, wird das Antennenchromophor MTHF gebunden (vgl. Abb. 3.3; Juhas et al. 2014; Krischer et al. 2022). Das an CryP gebundene MTHF zeigt eine maximale Absorption im UVA-Bereich bei 382 nm basierend auf der 5,10-Methenylbrücke, die das Pteridin mit p-Aminobenzoat verbindet (Moldt et al. 2009). Die Wechselwirkungen zwischen dem Apoprotein mit der positiven Ladung der Methenylgruppe und die hydrophoben Interaktionen mit dem Pterinring bewirken eine Rotverschiebung der Absorption im Vergleich zu freiem MTHF in wässriger Lösung (Sancar 2003). Dabei weist das Folat einen deutlich höheren molaren Extinktionskoeffizienten an seinem Absorptionsmaximum im UVA bei 380 nm als FADox bei 450 nm auf (Liu et al. 2010; Vechtomova et al. 2020).

Die Antennenchromophore von CPF-Proteinen werden in einer exponierten, wenig konservierten Tasche zwischen der α -helikalen und $\alpha\beta$ -Subdomäne nicht-kovalent gebunden und wurden bislang hauptsächlich in CPD-PLs und CRY-DASHs nachgewiesen (Park et al. 1995; Klar et al. 2007). Aufgrund dieser wenig affinen Bindetasche und häufig fehlenden Synthesewegen in heterologen Wirten spiegeln die *in vitro* Daten zur Antennenbindung nicht immer die *in vivo* Chromophorbindung wider (Damiani et al. 2009; Franz et al. 2018).

Die meisten CRY-DASHs und CPD-PLs von Eukaryoten und einigen Prokaryoten binden, so wie CryP, MTHF. Dazu zählen die CRY-DASHs aus *A. thaliana* (AtCRY3), *C. reinhardtii* (CrCRY-DASH1), *X. laevis* (Xl-CRY-DASH), *D. rerio* (DrCRY-DASH) und *O. tauri* (OtCPF2), sowie die CPD-PLs aus *E. coli* (EcCPDI) und

A. tumefaciens (AgtCPDIII) (Jorns et al. 1987; Johnson et al. 1988; Park et al. 1995; Daiyasu et al. 2004; Huang et al. 2006; Song et al. 2006; Klar et al. 2007; Biskup et al. 2009; Brazard et al. 2010; Biskup et al. 2013; Wijaya et al. 2013; Scheerer et al. 2015; Göbel et al. 2017; Rredhi et al. 2021). Neben MTHF ist das Flavin-Derivat 8-HDF ein häufig gebundenes Antennenchromophor in Prokaryoten und niederen Eukaryoten wie der PL aus *Anacystis nidulans* (AnCPDI) oder dem tierähnlichen CraCRY aus *C. reinhardtii* (Tamada et al. 1997; Franz et al. 2018). Darüber hinaus bindet die PL aus *Sulfolobus tokodaii* FAD und aus *Thermus thermophilus* FMN (Ueda et al. 2005; Fujihashi et al. 2007). Zudem wurde 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (DMRL) in den prokaryotischen (6-4)-PLs aus *Agrobacterium fabrum* und *Rhodobacter sphaeroides* nachgewiesen (Geisselbrecht et al. 2012; Zhang et al. 2013). Im Gegensatz zu CRY-DASHs und CPD-PLs wurden die bisher charakterisierten pCRYs, aCRYs Typ I, tierähnlichen CRYs und die meisten (6-4)-PLs ohne Antennenpigment isoliert. So konnten in DpCRY1 aus *Danaus plexippus* und CrCPHI aus *C. reinhardtii* nur substöchiometrische Mengen MTHF gefunden werden, während DmCRY, CraCRY, PtCPF1 und die (6-4)-PLs aus *A. thaliana*, *D. melanogaster*, *O. tauri* und *X. laevis* keine Antenne aufweisen (Todo et al. 1997; Zhao et al. 1997; Li et al. 2006; Immeln et al. 2007; Song et al. 2007; Hitomi et al. 2009; Usman et al. 2009; Kiontke et al. 2011; Öztürk et al. 2011). AtCRY1 und AtCRY2 werden ebenfalls ohne zusätzliche Chromophore isoliert, obwohl Strukturanalysen eine mögliche MTHF-Bindetasche aufzeigen (Brautigam et al. 2004; Ma et al. 2020). Die Messung von *in vivo* Aktions- und Exzitationsspektren lassen eine Bindung von MTHF vermuten (Ahmad et al. 2002; Hoang et al. 2008b).

Die CPF-Antennenchromophore erfüllen alle nötigen Voraussetzungen für einen effizienten Resonanzenergietransfer auf das katalytische FAD. Dies beinhaltet eine geeignete räumliche Nähe und Ausrichtung der Transitionsdipolmomente sowie eine spektrale Überlappung von Fluoreszenz und Absorption des Donor- bzw. Akzeptor-Pigments (Jorns et al. 1990).

Auf Basis der berechneten Tertiärstruktur und des Absorptionsverhaltens erfüllen die Chromophore in CryP diese Anforderungen. Der Abstand von 18 Å zwischen dem MTHF-Pteridin und der N5-Position des FAD-Isoalloxazinrings von CryP ist vergleichbar mit Distanzen von 15-18 Å in bekannten CPF-Strukturen (Park et al. 1995; Brautigam et al. 2004; Zoltowski et al. 2011). Der FAD-Isoalloxazinring und der MTHF-Pteridinring liegen in einem nahezu rechten Winkel zueinander. Dies ist charakteristisch für MTHF-bindende CPF-Proteine und schränkt die Effizienz des Energietransfers ein. Für EcCPDI liegt die Transfereffizienz bei 70 % (Payne und Sancar 1990). Im Gegensatz dazu beträgt die Effizienz in AnCPDI 100 % bedingt durch die eher parallele Anordnung der Isoalloxazinringe von FAD und 8-HDF (Kim et al. 1992).

Der Abgleich der Fluoreszenz und Absorption von MTHF und FAD in CryP belegt die spektrale Überlagerung von Donor und Akzeptor (vgl. Abb. 3.11). Die MTHF-Fluoreszenz zwischen 450 und

480 nm ermöglicht einen Resonanzenergietransfer auf FADox mit Absorptionsmaxima bei 450 und 473 nm, was zur Exzitation vom Grundzustand S_0 in den ersten Anregungszustand S_1 führt. Auch ein Energietransfer auf semireduziertes FAD^\bullet oder $FADH^\bullet$ ist möglich, die in diesem Bereich Absorptionsnebenbanden aufweisen. Ein direkter Energietransfer von MTHF auf FAD konnte mittels Fluoreszenzexcitations- und Fluoreszenzemissionsspektren nachgewiesen werden. Dabei wurde das intakte CryP-Holoprotein mit dem Chromophorüberstand nach Hitzedenaturierung des Apoproteins sowie der MTHF-freien Variante CryP_W231A verglichen (vgl. Abb. 3.11). Die MTHF-Bindung und der Energietransfer haben jedoch keinen Einfluss auf die CryP-Redoxeigenschaften und die Stabilität des semireduzierten $FADH^\bullet$. Dies zeigt der Vergleich des CryP-Wildtypproteins mit CryP_W231A (vgl. Abb. 3.10). Beide Varianten werden mit $FADH^\bullet$ isoliert und zeigen eine gleich effiziente Photoreduktion und gleiche Oxidationskinetiken. Möglich wäre eine beeinträchtigte Photoreduktionseffizienz in CryP-W231A im Vergleich zum Wildtypprotein aufgrund des fehlenden Energietransfers von MTHF auf FAD gewesen. Auch für AnCPDI und SynCRY-DASH konnte kein Einfluss der Antenne auf die FAD-Redoxeigenschaften festgestellt werden (Damiani et al. 2009).

Daher stellt sich die Frage, ob die Bindung eines Antennenpigments Einfluss auf die Photorezeptor-Funktion nimmt. Für die *E. coli*-PL EcCPDI wurde gezeigt, dass das Fehlen von MTHF weder die Bindung von CPD-Photoprodukten noch deren katalytische Reparatur beeinträchtigt (Schleicher et al. 2005; Liu et al. 2013). Mit pCRYs und aCRYs Typ I durchgeführte *in vitro* Funktionstests zum lichtabhängigen Bindeverhalten von Interaktionspartnern oder proteasom-gesteuerten Abbau, in denen heterolog isolierte Proteine ohne Antennenpigment eingesetzt wurden, zeigten keine Unterschiede zu vergleichbaren *in vivo* Untersuchungen (Rosato et al. 2001; Busza et al. 2004; Öztürk et al. 2011; Vaidya et al. 2013; Öztürk et al. 2014; Wang et al. 2016; Ma et al. 2020; Shao et al. 2020). Daher muss die Funktion des Antennenchromophors im Kontext von natürlicher zellulärer Umgebung und Habitat betrachtet werden. In freilebenden *P. tricornutum*-Zellen sind die Photoreduktionsbedingungen für Photorezeptoren aufgrund der aquatischen Lebensweise sowie der zellulären Pigmentzusammensetzung nicht optimal (vgl. Abschnitt 1.1). Als Sensorpigmente liegen CRYs im Gegensatz zu den photosynthetischen Lichtsammelpigmenten nur in geringer Konzentration vor. Damit fangen Chlorophylle und Fucoxanthine einen Großteil des blauen Lichts, bei dem FADox maximal absorbiert, ab (Abb. 4.3). MTHF weist im Vergleich zu FAD eine blauverschobene Absorption sowie einen höheren molaren Extinktionskoeffizienten im UVA-Bereich auf. Daher kommt MTHF unter natürlichen Bedingungen eine größere Bedeutung für die CryP-Exzitation als unter *in vitro*-Bedingungen zu.

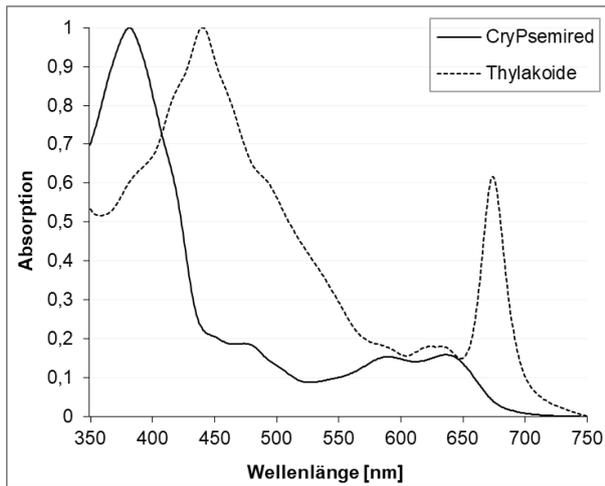


Abb.4.3: Vergleich der Absorption von CryP mit isolierten Thylakoiden aus *P. tricornutum*. UV-Vis-Spektren (350-750 nm) von CryPsemired (in Lagerpuffer) und isolierten Thylakoiden (in 25 mM Tris, 2 mM KCl, 0.03 % β -DDM, pH 7.4) aus *P. tricornutum* UTEX646. Die Spektren wurden auf das MTHF-Maximum bei 382 nm bzw. das Chl c-Maximum bei 441 nm normiert. Das Spektrum isolierter Thylakoide wurde freundlicherweise von T. Bulatovic (AK Büchel, Uni Frankfurt) zur Verfügung gestellt.

Neben dem Nachweis des Energietransfers auf FAD gibt die MTHF-freie Variante CryP_W231A zudem strukturelle Informationen über die Antennenbindung. Die Kristallstruktur von AgtCPDIII, auf deren Basis die potentielle CryP-Struktur berechnet wurde, stellt die oberflächen-exponierte MTHF-Bindetasche zwischen der α -helikalen und $\alpha\beta$ -Subdomäne dar (Abb. 4.4 A und C; Scheerer et al. 2015). Dabei erfolgt die MTHF-Bindung hauptsächlich über π - π -Wechselwirkungen zwischen dem Pteridinring und zwei Tryptophanen (W196, W336), die parallel zueinander angeordnet sind. Zudem wird das Pteridin über Wasserstoffbrücken mit Carbonylgruppen des Proteinerückgrats (L335, D370, T371) sowie hydrophoben Interaktionen (A50, F200, G339) stabilisiert. Diese Positionen sind in den bekannten CPDIII-PLs sowie CryP konserviert (Abb. 4.4 E). In CryP binden die Positionen W231 und Y373 das Pteridin über π - π -Wechselwirkungen. Dies belegt der Aminosäureaustausch dieser Positionen in CryP_W231A und Y373A, wobei die MTHF-Bindung in W231A komplett unterdrückt und in Y373 eingeschränkt ist (vgl. Abb. 3.9). Dies wurde bereits von Scheerer et al. (2015) im Vergleich von CryP mit AgtCPDIII vermutet.

In EcCPDI und AtCRY3 führt der Aminosäureaustausch E109A bzw. E149A zum Verlust der MTHF-Bindung (Klar et al. 2007; Zirak et al. 2009; Liu et al. 2013). Der zu diesen Positionen homologe Austausch E128A in CryP hat dagegen keinen Einfluss auf die MTHF-Bindung (vgl. Abb. 3.9). Der CryP-Sequenz- und Strukturvergleich zeigt, dass die Positionen E128 und W231 bzw. Y373 an zwei gegenüberliegenden Bereichen liegen. Dies verdeutlicht, dass die Antennenbindung in EcCPDI und CRY-DASHs einerseits und CPDIII-PLs andererseits über verschieden gelegene Bindetaschen vermittelt wird. Die Berechnung der CryP-Struktur auf Basis von AtCRY3 zeigt, warum die MTHF-Bindung in CryP in dieser Tasche nicht möglich ist (Abb. 4.4 E und F). Die in AtCRY3 an der Bindung beteiligten AS, die

ein Wasserstoffbrücken-Netzwerk zu MTHF ausbilden, sind in CryP nicht konserviert. Einerseits besetzt die Seitenkette von K327 (AtCRY3 N341) die potentielle Bindetasche, andererseits bilden die Positionen P127 und A412 keine Wasserstoffbrücken mit dem Pteridin (AtCRY3 S147, Y423).

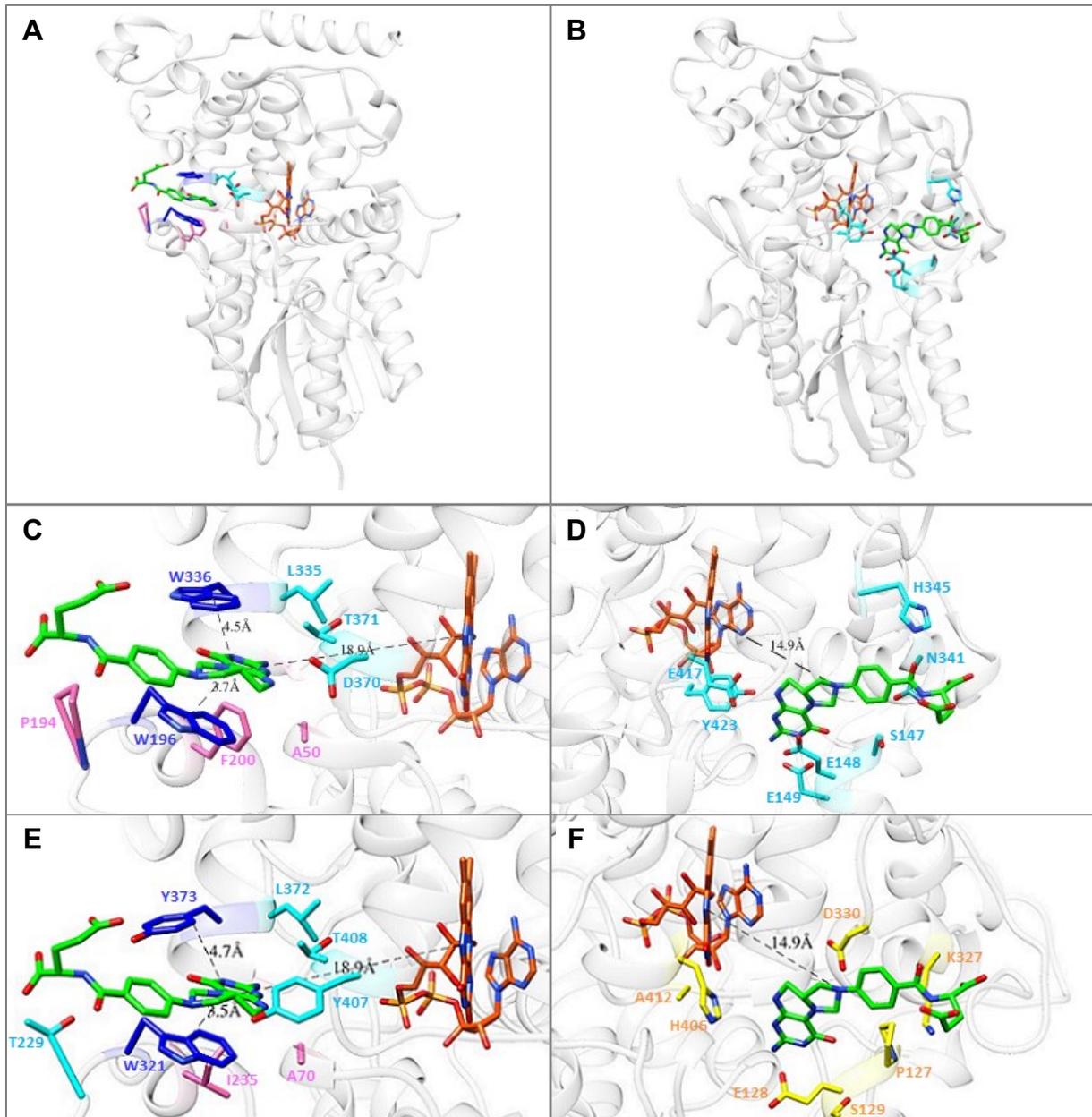


Abb. 4.4: Vergleich der MTHF-Bindung in AgtCPDIII, AtCRY3 und CryP. (A) *A. tumefaciens* CPDIII-Photolyase (AgtCPDIII, 4U63, Scheerer et al. 2015). (B) *A. thaliana* CRY3 (AtCRY3, 2J4D, Klar et al. 2007). (C) MTHF-Bindetasche in AgtCPDIII. (D) MTHF-Bindetasche in AtCRY3. (E) Potentielle MTHF-Bindetasche in CryP auf Basis von AgtCPDIII berechnet mit PHYRE2. (F) Potentielle MTHF-Bindetasche in CryP auf Basis von AtCRY3 berechnet mit PHYRE2. Grün MTHF, orange FAD, blau π - π -Wechselwirkungen vermittelnde AS, türkis H-Brücken vermittelnde AS, pink hydrophobe Interaktionen vermittelnde AS, gelb nicht konservierte AS in CryP im Vgl. zu AtCRY3.

Die CryP-Struktureigenschaften spiegeln demnach dessen phylogenetische Einordnung zwischen pCRYs, CRY-DASHs und CPDIII-PLs wider (vgl. Abschnitt 1.4; Juhas et al. 2014). Während die CryP-Oligomerisierung vergleichbar zu pCRYs ist, verhält sich CryP in Bezug auf die CTE-Konformation wie CRYs mit dualer Funktion und mit der positiven Oberflächenpolarität und MTHF-Bindung wie CPDIII-PLs.

4.3 Die CryP-Redoxchemie

4.3.1 Die FAD-Redoxchemie in CryP ist ähnlich zu CPD-Photolyasen und wird von der FAD-N5-proximalen Position sowie der CTE reguliert

Nach heterologer Expression und Isolation bindet CryP den katalytischen Kofaktor zum Großteil als semireduziertes Neutralradikal FADH^\bullet , ein kleiner Anteil ist im Zuge des aeroben Isolationsprozesses zu FADox oxidiert (vgl. Abb. 3.3; Juhas et al. 2014; Krischer et al. 2022). Bei BL-Belichtung ohne externem Reduktionsmittel kann FADox zu FADH^\bullet reduziert werden, nach Zugabe eines Reduktionsmittels bis zum vollreduzierten FADH^- . CryP zeichnet sich durch die hohe Resistenz von FADH^\bullet gegen aerobe Oxidation aus. Eine vollständige FADH^\bullet -Oxidation wird erst nach 28 Tagen Dunkelinkubation oder Behandlung mit einem chemischen Oxidationsmittel erreicht (vgl. Abb. 3.3, Abb. 3.5). Dagegen ist das vollreduzierte FADH^- deutlich instabiler, indem es innerhalb von 60 min zu FADH^\bullet unter aeroben Bedingungen reoxidiert (vgl. Abb.3.6). Eine CryP-spezifische Eigenschaft ist die Wichtigkeit der CTE für eine effiziente FAD-Reduktion und die FADH^\bullet -Stabilität gegen aerobe Oxidation (vgl. Abb. 3.4, Abb. 3.5, Abb. 3.6).

Die beschriebene FAD-Redoxchemie von CryP weist große Ähnlichkeiten zu CPD-PLs und CRY-DASHs auf. Nach Expression in einem heterologen System werden EcCPDI aus *E. coli* und AnCPDI aus *A. nidulans* sowie die CRY-DASHs aus *X. laevis* (XICRY-DASH) und *D. rerio* (DrCRY-DASH) wie CryP mit einer Mischung aus FADH^\bullet und FADox isoliert (Jorns et al. 1987; Li et al. 1991; Tamada et al. 1997; Schleicher et al. 2005; Daiyasu et al. 2004; Biskup et al. 2013). Die CRY-DASHs aus *A. thaliana* (AtCRY3), *O. tauri* (OtCPF2) und *Vibrio cholerae* (VcCRY-DASH) enthalten darüber hinaus anteilig auch das vollreduzierte FADH^- , während CrCRY-DASH aus *C. reinhardtii* den FAD-Kofaktor ausschließlich als FADH^- bindet (Song et al. 2006; Brazard et al. 2010; Sokolowsky et al. 2010; Gindt et al. 2021; Rredhi et al. 2021). Ausnahmen dazu bilden das CRY-DASH aus *Synechocystis sp. PCC 6803* (SynCRY-DASH) und die CPDIII-PL aus *A. tumefaciens* (AgtCPDIII), die FADox nach der Aufreinigung binden (Brudler et al. 2003; Damiani et al. 2009; Scheerer et al. 2015).

Auch die *in vitro* CryP-Redoxkinetiken sind vergleichbar zu EcCPDI und AnCPDI. Wie für CryP wird das vollreduzierte FADH⁻ in EcCPDI und AnCPDI effizient in Folge von BL-Belichtung und Zugabe eines Reduktionsmittels unter aeroben Bedingungen gebildet, eine Reoxidation zu FADH[•] ist innerhalb weniger Stunden zu beobachten (Jorns et al. 1987; Malhotra et al. 1992; Damiani et al. 2009). Dagegen ist das Neutralradikal für Wochen unter aeroben Bedingungen stabil. Auch in CRY-DASHs erweist sich das Neutralradikal als verhältnismäßig stabil, eine vollständige Oxidation ist innerhalb von Stunden für SynCRY-DASH, VcCRY1 und AtCRY3 messbar (Brudler et al. 2003; Worthington et al. 2003; Daiyasu et al. 2004; Zikihara et al. 2008; Damiani et al. 2009; Gindt et al. 2021).

Die FAD-Redoxchemie von CPD-PLs und CRY-DASHs steht im Kontrast zu pCRYs (AtCRY1, AtCRY2, CrCPH1), aCRYs Typ I (DmCRY, DpCRY) und tierähnlichen CRYs mit dualer Funktion (PtCPF1, OtCPF1, CraCRY), die ausschließlich mit FADox isoliert werden (Banerjee et al. 2007; Berndt et al. 2007; Immeln et al. 2007; Song et al. 2007; Öztürk et al. 2008; Burney et al. 2009; Coesel et al. 2009; Langenbacher et al. 2009; Heijde et al. 2010; Beel et al. 2012). In *in vitro* Reduktions- und Oxidationsmessungen sind die semireduzierten FAD-Redoxformen in pCRYs und aCRYs Typ I weitaus weniger stabil als für CPD-PLs, CRY-DASHs und CryP. In CrCPH1 oxidiert FADH[•] innerhalb von 5 min, in AtCRY1 und AtCRY2 innerhalb von 2 bis 4 min (Banerjee et al. 2007; Berndt et al. 2007; Immeln et al. 2007; Song et al. 2007; Öztürk et al. 2008; Burney et al. 2009; Coesel et al. 2009; Langenbacher et al. 2009; Heijde et al. 2010; Beel et al. 2012). Für die aCRYs Typ I DmCRY, DpCRY1 aus *D. plexippus*, AgCRY1 aus *Anopheles gambiae* und ApCRY1 aus *Antheraea pernyi* wurde eine FAD[•]-Rückoxidation in 1 bis 12 min nachgewiesen (Berndt et al. 2007; Song et al. 2007; Öztürk et al. 2008; Öztürk et al. 2011; Öztürk et al. 2014; Vaidya et al. 2013). Durch den Ausschluss von Sauerstoff, die Zugabe von ATP oder Messungen in einem zellulären *in vivo* Umfeld wird die Redoxumgebung verändert und damit die Stabilität des semireduzierten FAD[•]- bzw. FADH[•] sowohl in pCRYs als auch aCRYs Typ I auf über 1 h erhöht (Berndt et al. 2007; Bouly et al. 2007; Hoang et al. 2008a; Herbel et al. 2013; Vaidya et al. 2013; Müller et al. 2014; El-Esawi et al. 2015; Hense et al. 2015; Xu et al. 2019; Goett-Zink und Kottke 2021). Dagegen ist die FADH[•]-Stabilität in CryP unabhängig von ATP und der Sauerstoffkonzentration und wird einzig von der CryP-spezifischen Struktur bestimmt.

ACRYs Typ II wie HsCRY1 und HsCRY2 aus *Homo sapiens* oder MmCRY1 und MmCRY2 aus *Mus musculus*, die als lichtunabhängige Transkriptionsrepressoren innerhalb des Kern-Oszillators der circadianen Uhr wirken, werden komplett ohne Chromophore als Apoprotein isoliert (van der Horst et al. 1999; Vitaterna et al. 1999). Gründe dafür liegen in der Struktur der FAD-Bindetasche, die die FAD-Bindeaffinität im Vergleich zu aCRYs Typ I herabsetzt, weshalb aCRYs Typ II unter Berücksichtigung der zellulären Konzentration an freiem FAD als kofaktorlos angesehen werden (Czarna et al. 2013; Xing et al. 2013; Kutta et al. 2017).

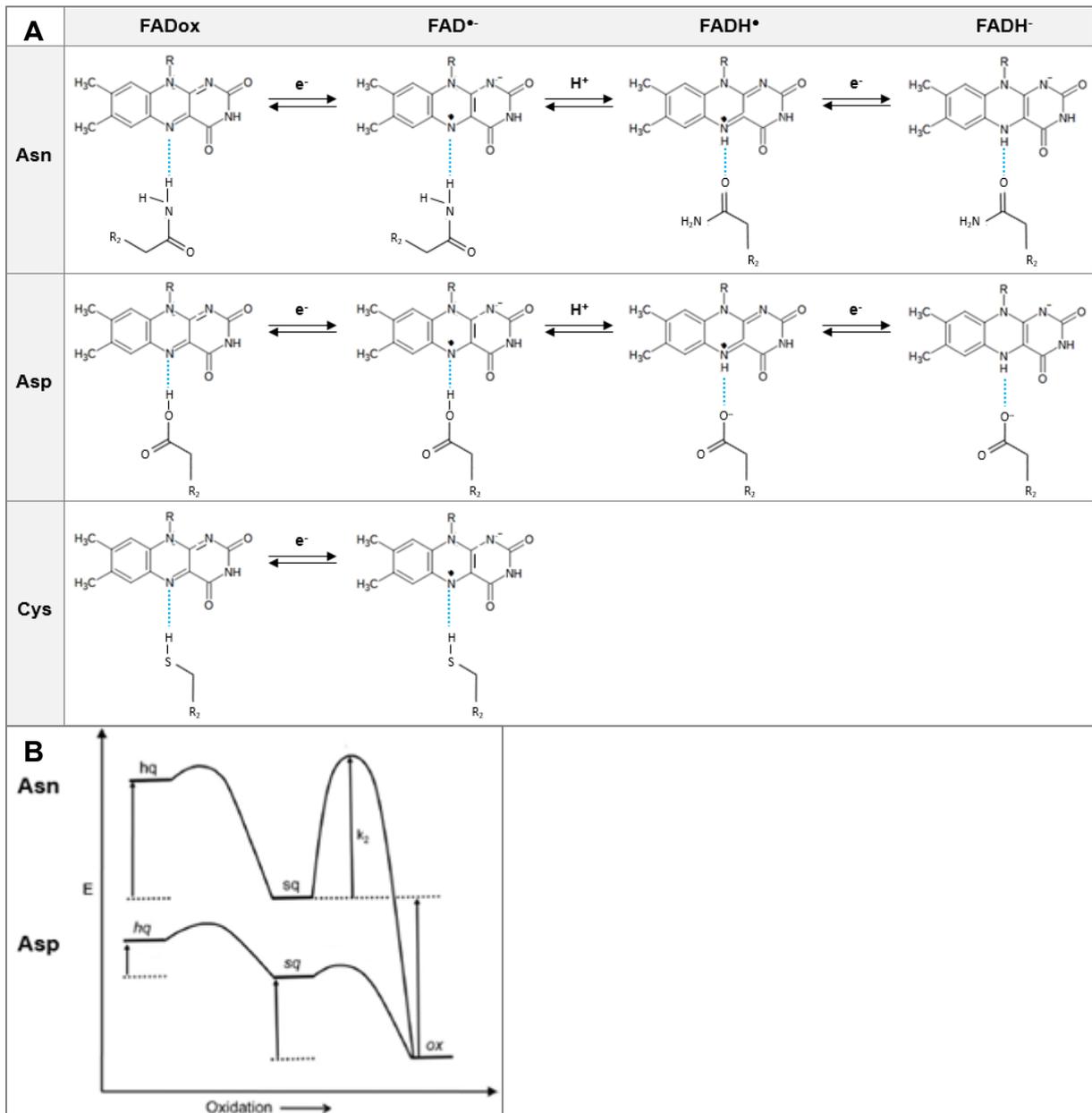


Abb. 4.5: Stabilisierung der FAD-Redoxformen in Abhängigkeit von der N5-proximalen Aminosäure. (A) In den meisten CPF, einschließlich Photolyasen und CRY-DASHs, wirkt die Aminogruppe eines konservierten Asn als H-Brückendonator für N5 in FADox, während die Carbonylgruppe als H-Brückenakzeptor für N5H in FADH[•] und FADH⁻ dient. Die Notwendigkeit eines externen Protonendonors bzw. -akzeptors zur N5(H)-(De)Protonierung und einer konformationellen Rotation der Amin- und Carbonylgruppen in Asn bewirkt eine kinetische Stabilisierung von FADH[•] im Vgl. zu pCRYs. In pCRYs wirkt die Carboxylatgruppe eines Asp als H-Brückendonator bzw. akzeptor für N5 bzw. N5H und gleichzeitig als Protonendonator für die N5-Protonierung beim Übergang von FADox zu FADH[•], was im Vgl. zu Photolyasen zu einem niedrigeren Redoxpotential von (FADH[•]/ FADH⁻) und einer beschleunigten N5(H)-(De)Protonierung führt. Das vollreduzierte FADH⁻ wird durch die negative Ladung des Asp destabilisiert. In aCRYs Typ I wird FAD[•] durch die Thiolgruppe eines Cys stabilisiert, was eine weitere Protonierung von N5 aufgrund des hohen pKs(Cys) verhindert. **(B)** Asn als N5-proximale AS erhöht das FAD-Redoxpotential im Vgl. zu Asp. Zudem wird FADH[•] aufgrund der Notwendigkeit einer Asn-Rotation und eines externen Protonenakzeptors bei der Oxidation kinetisch stabilisiert. *hq* vollreduzierter Zustand, *sq* semireduzierter Zustand, *ox* oxidiertes Zustand. Verändert nach Damiani et al. (2011).

Maßgebend für die Ausbildung verschiedener FAD-Redoxformen ist die CPF-spezifische FAD-Bindetasche. Diese reguliert die kinetische und thermodynamische Stabilität der FAD-Redoxformen durch den Zugang zu Protonendonoren bzw. -akzeptoren, die Variation der relativen pKs-Werte von FAD und den umliegenden AS sowie der Redoxpotentiale der (FADox/ FAD[•] bzw. FADH[•])- und (FADH[•]/ FADH⁻)-Redoxpaare mittels veränderlichen Polaritäten, elektrostatischen Effekten, Wasserstoffbrücken und $\pi\pi$ -Wechselwirkungen (Gindt et al. 2005; Damiani et al. 2009; Sokolowsky et al. 2010). Der größte Strukturfaktor zur FADH[•]-Stabilisierung ist die zu FAD-N5 proximal gelegene AS, in der sich die verschiedenen CPF-Gruppen unterscheiden (Abb. 4.5, vgl. Abschnitt 1.3.1).

Der Vergleich der AS, die die strukturell konservierte FAD-Bindetasche bilden, zeigt für CryP die gleiche Konservierung an fünf Positionen wie für die übrigen betrachteten CPF-Proteine (Abb. 4.6). Darunter sind R383 und D411, die unter Ausbildung einer Salzbrücke essentiell für die FAD-Bindung sind, sowie S278, R315 und D413. In Bezug auf die nicht-konservierten Positionen weist CryP die größte Ähnlichkeit zu CPD-PLs auf. Die Ribityl- und Phosphatgruppen von FAD werden durch ein Wasserstoffbrückennetz mit Y261, T274, S275, Q276, S278, R315, Y377 und Q380 stabilisiert. Der Isoalloxazinring wird sowohl durch hydrophobe Interaktionen mit M384, A387, L409, M420 und A412 als auch elektrostatische Wechselwirkungen mit R383, D411 und D413 gebunden. Wasserstoffbrücken zwischen der 3'OH-Gruppe des Adenosins und dem Diphosphat sowie zwischen N1 des Isoalloxazinrings und der 3'OH-Gruppe des Ribityls stabilisieren die U-Konformation des FAD.

Homolog zu PLs, CRY-DASHs und tierähnlichen CRYs ist in CryP N417 die zu FAD-N5 proximal gelegene AS. Asn stabilisiert das semireduzierte FADH[•] thermodynamisch durch eine Erhöhung des (FADH[•]/ FADH⁻)-Redoxpotentials verglichen mit (O₂/ O₂^{•-}) sowie kinetisch durch die Notwendigkeit eines externen Protonenakzeptors und einer konformationellen Rotation der Amin- und Carbonylgruppe des Asparagin während der FADH[•]-Oxidation (Abb. 4.5; Balland et al. 2009; Damiani et al. 2009; Sokolowsky et al. 2010; Damiani et al. 2011). In pCRYs ist FADH[•] weniger stabil, da das konservierte Aspartat proximal zu FAD-N5 als proteinintrinsischer Protonenüberträger wirkt und damit einen schnellen Wechsel zwischen N5H und N5 ermöglicht. Die Senkung des (FADH[•]/ FADH⁻)-Redoxpotentials stellt ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal bei der Evolution von CRYs aus PLs dar und ist entscheidend für die unterschiedlichen Funktionen von CRYs als Photorezeptoren und PLs. In PLs ist ein hohes (FADH[•]/ FADH⁻)-Redoxpotential zum Schutz vor aerober Oxidation und eine kinetische Barriere gegen die FADH[•]-Deprotonierung essentiell für die Stabilisierung des (FADH[•]/ CPD^{•-})-Intermediats und effiziente CPD-Reparatur. Dies zeigte die unterdrückte *in vitro* und *in vivo* Katalyseaktivität von EcCPDI_N378S (Xu et al. 2008).

Diskussion

DmCRY	F249	P263	K264	S265	M266	S267	L270	I308	Q311	R315	W375	H378
PtCPF1	F262	T277	T278	A279	L280	S281	V284	L317	Q320	R324	W383	H386
CraCRY	F235	T250	T251	V252	L253	S254	L257	L288	Q291	R395	W354	H357
Dm (6-4) -PL	F267	T281	T282	V283	L284	S285	L288	L319	Q322	R326	W385	N388
Xl (6-4) -PL	F234	T248	T249	V250	L251	S252	V255	L285	Q288	R292	W351	H354
DpCRY1	F260	Q274	T275	G276	L277	S278	L281	L311	Q314	R318	W377	H380
HsCRY2	Y274	P288	T289	G290	L291	S292	L295	L326	Q329	R333	W392	H395
HsCRY1	F234	P248	T249	G250	L251	S252	L255	L286	Q289	R293	W352	H355
MmCRY1	F234	P248	T249	G250	L251	S252	L255	L286	Q289	R293	W352	H355
CryP	Y261	T274	S275	Q276	L277	S278	L281	F308	R311	R315	Y377	Q380
AtCRY3	Y316	S329	T330	K331	F332	S333	L336	V366	E369	R373	F432	N435
DrCRY-DASH	Y239	S252	T253	K254	F255	S256	L259	V289	E292	R296	F355	N358
SynCRY-DASH	Y236	S249	S250	K251	F252	S253	L256	L286	E289	R293	F352	N355
EcCPDI	Y243	T255	S256	R257	L258	S259	L262	W292	E295	R299	W339	N342
AnCPDI	Y228	T240	S241	G242	L243	S244	L247	W280	E283	R287	W346	N349
AgtCPDIII	Y226	T238	S239	L240	L241	S242	L245	F274	E277	R281	T340	N343
CrCPH1	F233	T245	S246	R247	L248	S249	I252	F287	Q290	R294	W353	N356
AtCRY1	Y235	T247	S248	F249	L250	S251	L254	F290	S293	R297	W356	D359
AtCRY2	Y232	T244	S245	L246	L247	S248	L251	F287	G290	R294	W353	N356
:	:	.	:	*	:	*	:	*	:	*	:	.
	C, D, P	6, AL, C, P	C, P						P			
DmCRY	R381	N382	A385	L408	D410	A411	D412	V415	C416			
PtCPF1	R389	H390	A393	L416	D418	A419	D420	I423	N424			
CraCRY	R360	H361	A364	L387	D389	Q390	D391	L394	N395			
Dm (6-4) -PL	R391	H392	A395	L418	D420	Q421	D422	L425	N426			
Xl (6-4) -PL	R357	H358	A361	L384	D386	A387	D388	L391	N392			
DpCRY1	R383	H384	A387	L410	D412	A413	D414	V417	N418			
HsCRY2	R398	H399	A402	L425	D427	A428	D429	V432	N433			
HsCRY1	R358	H359	A362	L385	D387	A388	D389	I392	N393			
MmCRY1	R358	H359	A362	L385	D387	A388	D389	I392	N393			
CryP	R383	M384	A387	L409	D411	A412	D413	I416	N417			
AtCRY3	R438	Q439	C442	L464	D466	Y467	D468	S471	N472			
DrCRY-DASH	R361	Q362	A365	L387	D389	H390	D391	S394	N395			
SynCRY-DASH	R358	Q359	A362	L384	D386	Y387	D388	S391	N392			
EcCPDI	R345	M346	A349	L371	D373	G374	D375	A378	N379			
AnCPDI	R352	M353	A356	L378	D380	G381	D382	A385	N386			
AgtCPDIII	R346	M347	A350	L372	D374	A375	D376	S379	N380			
CrCPH1	R359	V360	A363	Q385	D387	A388	D389	C392	D393			
AtCRY1	R362	V363	S366	L388	D390	A391	D392	S395	D396			
AtCRY2	R359	V360	S363	L385	D387	A389	D390	C393	D394			
*	*	.	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	C								6, AL, A, C	6, AL, A2, C, D		

Abb. 4.6: Aminosäurevergleich der FAD-Bindetasche von CryP mit ausgewählten CPF-Vertretern. Der Vergleich wurde mithilfe von Clustal Omega (EMBL-EBI) durchgeführt. Die Farben der hinterlegten Positionen sind wie folgt codiert: *grün* für die FAD-Bindung notwendige AS zur Bildung der konservierten Salzbrücke, *blau* FAD-N5-proximale AS, *rot* für CryP-einzigartige AS. Umrahmte Buchstabencodes unter einzelnen Positionen geben die Ähnlichkeit von CryP zu den jeweiligen CPF-Gruppen an mit 6 (6-4)-PL, C CPD-PL, D CRY-DASH, P pCRY, A1/2 aCRY Typ I/ II, AL animal-like CRY. Agt *Agrobacterium tumefaciens*, An *Anacystis nidulans*, At *Arabidopsis thaliana*, Cra *Chlamydomonas reinhardtii*, Dm *Drosophila melanogaster*, Dp *Danaus plexippus*, Dr *Danio rerio*, Ec *Escherichia coli*, Hs *Homo sapiens*, Mm *Mus musculus*, Pt *Phaeodactylum tricornutum*, Syn *Synechocystis* sp., Xl *Xenopus laevis*.

Nicht jede Substitution der N5-proximalen Position führt jedoch zwangsläufig zu einer Konversion der FAD-Redoxchemie, wie für CPF-Proteine aller Gruppen gezeigt wurde (vgl. Anhang Tab. A2; Holub et al. 2019). Hierbei sind die relativen pKs-Werte von FAD-N5 und der proximalen AS sowie die

Diskussion

Erreichbarkeit von externen Protonendonoren bzw. -akzeptoren entscheidend, was von der Gesamtheit der FAD-Bindetasche bestimmt wird (Schleicher et al. 2005; Müller et al. 2016).

Die Substitution in CryP_N417C, die eine zu aCRY Typ I vergleichbare Redoxumgebung schaffen sollte, führte nicht wie erwartet zur photoinduzierten Bildung des Anionradikals $FAD^{\bullet-}$ (vgl. Abb. 3.8). Diese Beobachtung ist vergleichbar mit der Substitution in CrCPH1_D393C, in der $FAD^{\bullet-}$ nur transient (10 μ s) gebildet wurde (Hense et al. 2015). Auch für CryP_N417C ist eine transiente $FAD^{\bullet-}$ -Bildung, die in der Versuchsanordnung nicht erfasst werden konnte, denkbar. In DmCRY wird die negative Ladung von $FAD^{\bullet-}$ an N1 des FAD-Isoalloxazinrings durch ein Arginin stabilisiert (Berndt et al. 2007). In CryP ist diese Position mit R382 zwar konserviert, die Seitenkette ist jedoch von FAD weggerichtet, was eine Stabilisierung erschwert und eine transiente $FAD^{\bullet-}$ -Bildung erklären würde. Zudem könnten unerwartete Wasserstoffbrücken zwischen C417 und der restlichen FAD-Bindetasche das (FADox/ $FAD^{\bullet-}$ bzw. $FADH^{\bullet}$)-Redoxpotential beeinflussen und damit eine Reduktion erschweren.

Neben dem N5-proximalen N417 wird die $FADH^{\bullet}$ -Stabilität und Photoreduktionseffizienz in CryP entscheidend durch die CTE erhöht (vgl. Abb. 3.5, Abb. 3.6). Dies ist CryP-spezifisch. In pCRYs wie AtCRY1 und CrCPH1, aCRYs Typ I wie DmCRY und dem tierähnlichen CraCRY hat die CTE keinen Einfluss auf die FAD-Photoreduktion oder -Oxidationskinetik (Öztürk et al. 2011; Müller et al. 2014; Oldemeyer et al. 2016; Goett-Zink et al. 2021). Messungen zur FAD-Oxidationskinetik in PtCPF1 und CraCRY sowie deren um die CTE verkürzten Varianten haben dies in vorliegender Arbeit bestätigt (vgl. Anhang Abb. A3, Abb. A4).

Diese Beobachtung muss auf Basis einer spezifischen Interaktion zwischen FAD bzw. der Bindetasche und der CTE erklärt werden. Im Gegensatz zu CryP wird in CryP-PHR das semireduzierte $FADH^{\bullet}$ nur nach Zugabe von DTT photoinduziert, das vollreduzierte $FADH^-$ wird nicht gebildet (vgl. Abb. 3.5, Abb. 3.6). Dies bedeutet, dass die Deletion der CTE zu einer Senkung des ($FADH^{\bullet}$ / $FADH^-$)-Redoxpotentials führt. Diese Wirkung der CTE erinnert an den substratinduzierten Anstieg des Redoxpotentials in PLs und CRY-DASHs. In beiden Gruppen bewirkt die Erhöhung des ($FADH^{\bullet}$ / $FADH^-$)-Redoxpotentials durch die CPD-Bindung eine Stabilisierung von $FADH^{\bullet}$ für eine effiziente Katalyse (Gindt et al. 2005; Gindt et al. 2015; Gindt et al. 2021). Dies wird durch ein verändertes Wasserstoffbrückennetz um FAD-N5 und -N3 des Isoalloxazinrings sowie eine Abschirmung vor exogenen Protonenakzeptoren ausgelöst. Für CryP-PHR und die CTE ist ein ähnlicher Effekt denkbar. Wie die Ergebnisse der partiellen Proteolyse und der zweidimensionalen PAGE gezeigt haben, bindet die CTE spezifisch um die FAD-Bindetasche der CryP-PHR (vgl. Abb. 3.17, Abb. 3.18). Dies kann sowohl die Wasserstoffbrücken um FAD als auch die Zugänglichkeit zu exogenen Protonen beeinflussen. Dabei bleibt jedoch weiterhin fraglich, warum die FAD-Redoxchemie in anderen CPF-Proteinen im Gegensatz zu CryP durch eine CTE-Deletion nicht verändert wird. Eine Erklärung hierfür kann die CryP-spezifische

FAD-Bindetasche geben. Diese unterscheidet sich mit R311 von den übrigen verglichenen CPF-Proteinen, die an homologer Position Glutamat oder Glutamin tragen (Abb. 4.6). In der errechneten CryP-Tertiärstruktur bildet R311 mit Q380, einer weiteren in den verglichenen CPF-Proteinen nicht konservierten AS, eine polare Interaktion am Eingang der FAD-Bindetasche (Abb. 4.7). Die Seitenkette von R311 ist zwischen dem Adenin- und Isoalloxazinring des FAD positioniert. Es ist möglich, dass R311 an der CTE-Bindung beteiligt ist. In Folge einer CTE-Deletion würde R311 anstelle mit der CTE stärker mit dem Adeninring interagieren und damit die Elektronen vom Zentrum des Isoalloxazinrings in Richtung Adenin und dem Ausgang der FAD-Bindetasche zum Lösemittel delokalisieren. Diese Delokalisation und eine gleichzeitige Bindung von Wasser an R311 durch die erhöhte Lösemittelzugänglichkeit beschleunigt eine FADH[•]-Deprotonierung und -Oxidation, wie es in CryP-PHR beobachtet wurde. Damit würde die CTE die Polarität, die Elektronendichteverteilung und die Erreichbarkeit von externen Protonenakzeptoren in der FAD-Bindetasche durch Interaktion mit R311 beeinflussen. Der Sequenzvergleich von CryP mit weiteren annotierten pflanzenähnlichen CRYs zeigt eine Konservierung der positiven Ladung an der Position von R311 in Form von Arginin oder Lysin in 13 von 14 verglichenen Sequenzen (vgl. Anhang Abb. A12).

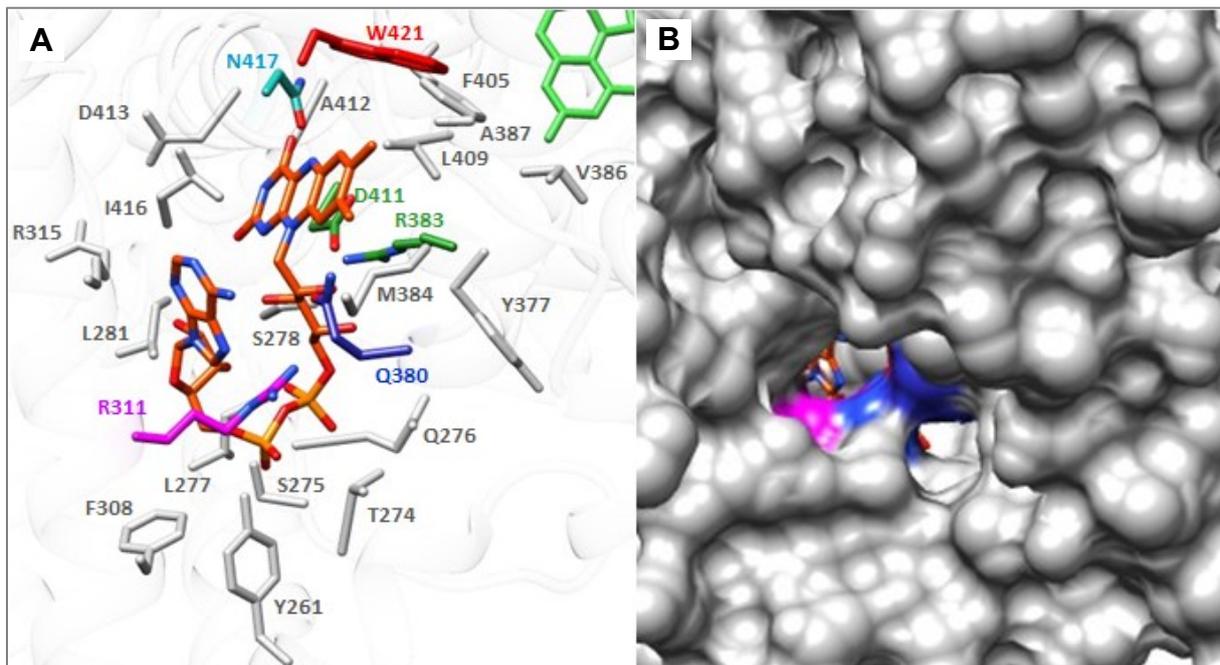


Abb. 4.7: FAD-Bindetasche von CryP. Die potentielle CryP-Tertiärstruktur wurde auf Basis der Strukturdaten der *A. tumefaciens* CPDIII-Photolyase (4U63; Scheerer et al. 2015) mittels des PHYRE2 Protein Homology/ analogy Recognition Engine Servers errechnet und mithilfe von UCSF Chimera visualisiert. **(A)** In direktem Kontakt zum FAD-Isoalloxazin liegen W421 der Trp-Triade und N417 als FAD-N5-proximale AS. Die Salzbrücke zwischen R383 und D411 ist essentiell für die FAD-Bindung. **(B)** Die Oberflächendarstellung zeigt, dass die polare Interaktion zwischen R311 und Q380 am Eingang der FAD-Bindetasche positioniert ist.

4.3.2 Die FAD-Redoxchemie in CryP ermöglicht eine duale Funktion in einem Photolyase- oder Phototropin-ähnlichen Modell

Da die Stabilisierung bestimmter FAD-Redoxformen auf Basis der spezifischen Bindetasche in direktem Zusammenhang mit der Funktionalität als Photolyase oder Photorezeptor steht, hat die FADH[•]-Stabilität auch in CryP eine funktionale Bedeutung. Unter *in vivo* Bedingungen ist daher anzunehmen, dass CryP entweder vergleichbar zu PLs permanent als CryPfullyred mit dem vollreduzierten FADH⁻ vorliegt, oder in einem Mechanismus ähnlich zu dualen CRY-DASHs bzw. tierähnlichen CRYs eine Photoreduktion zwischen FADH[•] und FADH⁻ eingeht (Kavakli und Sancar 2004; Beel et al. 2012; Nohr et al. 2016). Dies steht im Kontrast zu pCRYs und aCRYs Typ I, für die *in vivo* ein lichtinduzierter Wechsel zwischen FADox und dem semireduzierten FADH[•] bzw. FAD^{•-} beobachtet wird (Ahmad et al. 2002; VanVickle-Chavez und van Gelder 2007; Hoang et al. 2008a; Hoang et al. 2008b; Procopio et al. 2016). Aufgrund der hohen, vom Sauerstoffangebot unabhängigen FADH[•]-Stabilität liegt CryP im zellulären Umfeld nie mit gebundenem FADox vor.

Falls die CryP-Redoxchemie *in vivo* auf der Photoreduktion von FADH[•] zu FADH⁻ basiert, könnte das Auftreten einer negativen Ladung an FAD-N1 die polare Interaktion zwischen R311 und Q380 verändern und damit die Bindung der CTE an der FAD-Bindetasche lockern. Diese Lockerung würde eine folgende komplette Dissoziation der CTE auf Basis elektrostatischer Abstoßungen nach Phosphorylierungen der CTE oder einer Bindung an Partnerproteine unterstützen. In diesem Modell wäre die CryP-Aktivierung durch Konformationsänderungen nicht ausschließlich von Licht bzw. einer Änderung des FAD-Redoxzustands abhängig, was die redoxunabhängige Assoziation von PHR und CTE in der partiellen Proteolyse erklären würde (vgl. Abb. 3.18). Bestärkt wird diese These durch qRT-PCR-Messungen im *P. tricornutum* Wildtyp und CryP-Knockdown-Mutanten (Juhás 2015). Diese belegten einen Einfluss von CryP auf das Transkriptlevel von *lhc*-Genen im Blau-, Gelb- und Rotlicht, was die Präsenz von FADH[•] als Dunkelform voraussetzt.

Falls CryP wie PLs *in vivo* permanent FADH⁻ bindet, könnte R311 durch Delokalisation der Elektronen vom Imidazolring in Richtung Adeninring die negative Ladung an N1-FAD stabilisieren, die sonst von D411 als Teil der konservierten Salzbrücke abgestoßen wird. Auch in PLs muss die negative Ladung des FADH⁻ stabilisiert werden, was durch Wasserstoffbrücken innerhalb des U-förmigen FAD erreicht wird (Berndt et al. 2007). In diesem PL-ähnlichen Modell würde die CryP-Wirkung auf einem lichtinduzierten Elektronentransfer auf die CTE, einen Bindepartner oder ein Nukleinsäuresubstrat basieren. Eine Delokalisation der Elektronen in Richtung Ausgang der FAD-Bindetasche würde eine folgende Elektronenübertragung erleichtern. Dabei würde sich CryP wie PLs und aCRYs Typ II permanent in einer aktiven Konformation befinden, was die redoxunabhängige Assoziation von PHR und CTE in der partiellen Proteolyse ebenfalls erklären würde. CryP bindet DNA eher unspezifisch, eine PL-Aktivität wurde bislang nicht nachgewiesen (König 2016). Ein PL-Funktionsnachweis muss wie für alle bisher

charakterisierten PLs und dualen CRYs auch für CryP empirisch erfolgen, da außer der Fähigkeit zur FADH[•]-Stabilisierung und einer positiven Oberflächenpolarität um die FAD-Bindetasche keine durch alle PL-Gruppen konservierten katalytischen AS oder Substratbindestellen bekannt sind. Eine CryP-PL-Aktivität erscheint jedoch unwahrscheinlich, da im Gegensatz zu bekannten PLs die höchsten *cryp*-Transkriptmengen in der Dunkelphase nachweisbar sind und sowohl das Transkript- als auch Proteinlevel lichtinduziert herunterreguliert werden (vgl. Abb. 3.22, Abb. 3.23). Ein Elektronentransfer auf einen anderen Akzeptor als ein DNA-Substrat, wie die CTE oder einen Bindepartner, wurde bislang für kein CRY gezeigt und würde demnach eine neue CRY-Funktionsweise mit CryP aufdecken.

Die Hypothese zur Bedeutung der Interaktion von R311 und Q380 für die CryP-Wirkung wird durch Untersuchungen zur lichtinduzierten Konformationsänderung in DmCRY untermauert. In DmCRY wird der zu Q380 homologen Position H378 eine regulierende Funktion bei der CTE-Bindung an die PHR sowie deren lichtabhängigen Dissoziation zugeschrieben (Zoltowski et al. 2011; Ganguly et al. 2016; Berntsson et al. 2019; Chandrasekaran et al. 2021). Im Ruhezustand bindet die CTE über das FFW-Motiv ähnlich zum DNA-Substrat in PLs an die FAD-Bindetasche, wobei H378 über Wasserstoffbrücken mit der CTE verbunden ist. Infolge der FAD-Photoreduktion wird H378 protoniert und die Bindung an FAD geschwächt, sodass H378 aus der Bindetasche Richtung FFW-Motiv austrückt und die CTE gegen die PHR stabilisiert. Genau wie für das beschriebene CryP-Modell ist H378 nicht essentiell für die CTE-Dissoziation, wirkt jedoch regulativ. Die primäre FAD-Photochemie, die zu globalen Konformationsänderungen und damit zur Rezeptoraktivierung führt, beruht in diesem Modell auf einer plötzlichen, lokalen Änderung der elektrostatischen Zusammensetzung der FAD-Bindetasche infolge der FAD-Photoreduktion. Durch die negative Ladung von FAD^{•-} wird die konservierte Salzbrücke zwischen D410 und R381 aufgebrochen, sodass kontaktierende Helices verschoben, neue Wasserstoffbrücken geschlossen und die Interaktion zwischen H378 und dem WWF-Motiv der CTE geschwächt wird (Wang et al. 2021). Zudem trägt die positive Ladung am terminalen W394H^{•+} der Trp-Tetrade zur Verschiebung oberflächenexponierter Helices bei (Kutta et al. 2018).

In pCRYs wird die plötzliche negative Ladung am FAD-N5-proximalen Aspartat als Auslöser zur Neubildung von Wasserstoffbrücken betrachtet (Hense et al. 2015; Immeln et al. 2010). Diese Annahme ist jedoch fraglich, da CrCPH1_D393C in FTIR-Messungen die gleichen Konformationsänderungen wie das Wildtypprotein eingeht.

Auf Basis der phylogenetischen Nähe von CryP zu CPD-PLs und CRY-DASHs, gemeinsamer Strukturmerkmale und einer ähnlichen FAD-Redoxchemie ist für CryP auch eine duale Wirkweise in einem Photolyase- und Phototropin-ähnlichen Mechanismus möglich.

4.3.3 Die kanonische Trp-Triade ermöglicht eine schnelle FAD-Photoreduktion und ist wichtig für die Stabilität von CryP

Alle CPF-Proteine, mit Ausnahme von CPDII-PLs, weisen eine konservierte Tryptophan-Triade auf, die das Protein vom FAD (proximales Trp), über das Innere (mediales Trp) zur Oberfläche (distales Trp) durchspannt und als proteinintrinsische Elektronendonorkette für FAD nach Photoexzitation wirkt (Okafuji et al. 2010). Diese ist in (6-4)-PLs, aCRYs Typ I und tierähnlichen CRYs zu einer aromatischen Tetrade erweitert (Müller et al. 2015; Nohr et al. 2016; Kutta et al. 2018; Lacomat et al. 2019). Das Ergebnis des Elektronentransfers ist ein räumlich separiertes Radikalpaar aus semireduziertem FAD und dem distalen Tryptophan-Kation ($\text{FAD}^{\bullet-}/\text{W}_{3/4}\text{H}^{\bullet+}$; vgl. Abschnitt 1.3.1). Um das Radikalpaar gegen proteinintrinsische Elektronenrekombination zu stabilisieren und damit die Lebensdauer des FAD-Photoprodukts für eine effiziente Bildung des Signalzustands zu erhöhen, wirken verschiedene Mechanismen, die auch in CryP aktiv sind.

Die Photoreduktion mittels einer Trp-Triade anstelle eines einzelnen Trp erhöht die räumliche Distanz zwischen $\text{FAD}^{\bullet-}$ und $\text{W}_{3/4}\text{H}^{\bullet+}$, sodass die Geschwindigkeit des Elektronenrücktransfers von Pikosekunden auf Nanosekunden verlangsamt wird (Kao et al. 2008b; Liu et al. 2013). In CryP sind FAD und das proximale W421 6 Å voneinander entfernt, während die Distanz zwischen FAD und dem distalen W342 27 Å beträgt (Abb. 4.8). Bedingt durch die jeweilige Proteinumgebung weisen die einzelnen Tryptophane der Triade verschiedene chemische Umgebungen auf (Aubert et al. 2000; Biskup et al. 2013; Liu et al. 2013). Das distale Tryptophan ist oberflächenexponiert und von polaren AS umgeben, was das $\text{W}_{3/4}\text{H}^{\bullet+}$ -Kationradikal energetisch stabilisiert und eine Deprotonierung durch das Lösemittel und eine Reduktion durch exogene Reduktionsmittel (Glutathion, Thioredoxine, NAD(P)H) für eine weitere Stabilisierung ermöglicht. Die aromatische Seitenkette von W342 in CryP ist in das Lösemittel gerichtet und in Kontakt mit E341 und E347. Auch das mediale W398 befindet sich mit D330, S332, D397, T399 und Q422 in einer polaren Umgebung, dies jedoch mit weniger Interaktionsfläche zum Lösemittel, was eine Deprotonierung und damit Stabilisierung von $\text{W398H}^{\bullet+}$ erschwert. Das zu FAD proximale W421 liegt im Proteininneren und im nächsten Kontakt zu den Seitenketten der hydrophoben AS A402 und F405. Somit nimmt die freie Energie sowie das Reduktionspotential des $\text{WH}^{\bullet+}$ -Kationradikals von W421 über W398 zu W342 ab, was die Lokalisation des Kations an W342 am wahrscheinlichsten macht. Dies wurde ebenfalls für EcCPDI und XICRY-DASH festgestellt (Aubert et al. 2000; Biskup et al. 2009; Biskup et al. 2013). In pCRYs wird eine Deprotonierung zudem durch eine erhöhte Histidin-Dichte um das distale Trp erleichtert, was auf CryP jedoch nicht zutrifft (Immeln et al. 2007).

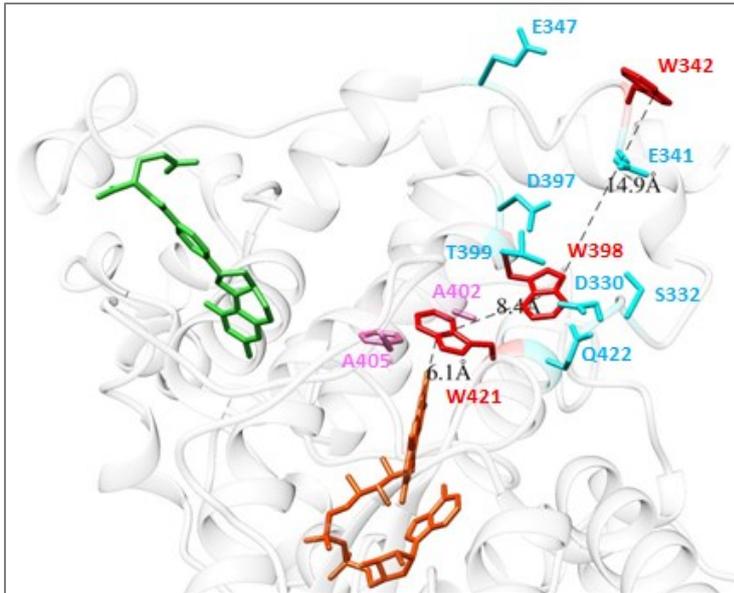


Abb. 4.8: Die kanonische Tryptophan-Triade in CryP. Die potentielle CryP-Tertiärstruktur wurde auf Basis der Strukturdaten der *A. tumefaciens* CPDIII-Photolyase (4U63; Scheerer et al. 2015) mittels des PHYRE2 *Protein Homology/ analogy Recognition Engine* Servers errechnet und mithilfe von UCSF Chimera visualisiert. Die AS der Trp-Triade durchspannen das Protein vom FAD bis zur Oberfläche. Das distale W342 ist in polarer Umgebung aus Lösemittel und den flankierenden E341 und E347. Das mediale W398 ist von den polaren AS D330, S332, D397, T399 und Q422 umgeben, während das proximale W421 in einer hydrophoben Tasche im Proteininneren mit A402 und F405 liegt. Die Abstände zwischen den einzelnen Trp und FAD sind angegeben. Orange FAD; grün MTHF.

Zur Analyse der Bedeutung der Trp-Triade für die CryP-Photoreduktion sollten die Substitutionsmutanten CryP_W421F, CryP_W398F und CryP_W342F untersucht werden. Da CryP_W421F und CryP_W398F in *E. coli* nicht exprimiert werden konnten, wurde nur die Variante CryP_W342F mit einem Austausch des distalen Trp analysiert. Der Austausch W342F hat keinen Einfluss auf die Stabilität von FADH^{*}, CryP_W342F ist unter *in vitro* Bedingungen unabhängig von der Belichtungsdauer und externen Reduktionsmitteln jedoch nicht reduzierbar (vgl. Abb. 3.7). Der gleiche Effekt wurde für eine Trp→Phe bzw. Trp→Ala-Substitution des distalen Trp in EcCPDI, den aCRYs Typ I DpCRYI und DmCRY, dem CRY-DASH AtCRY3 und dem dualen CraCRY beobachtet, während dieser Austausch in den pCRYs AtCRY1 und AtCRY2 sowie der PL AgtCPDIII die Photoreduktion lediglich verlangsamte (Li et al. 1991; Kavakli und Sancar 2004; Song et al. 2007; Hoang et al. 2008a; Öztürk et al. 2008; Moldt et al. 2009; El-Esawi et al. 2015; Scheerer et al. 2015; Gao et al. 2015; Li et al. 2011; Nohr et al. 2016; Lin et al. 2018). Ein Austausch des proximalen und medialen Tryptophan führt in diesen CPF-Proteinen ebenfalls zu einer eingeschränkten oder inhibierten Photoreduktion. Tabelle A3 (vgl. Anhang) gibt eine Übersicht über die *in vitro* und *in vivo* Effekte auf die Photoreduktion und Rezeptorfunktion der jeweiligen Trp-Substitutionen.

Die Notwendigkeit einer Trp-Triaden-gesteuerten FAD-Photoreduktion für die *in vivo* Photorezeptor- und Photolyase-Funktion wird grundsätzlich in Frage gestellt. Dies wird mit Beobachtungen zu

alternativen Trp-Elektronentransfers und Untersuchungen mit Trp-Triaden-Mutanten, die trotz fehlender *in vitro* Photoreduktion eine lichtabhängige Aktivität *in vivo* zeigen, begründet (Li et al. 1991; Kavakli und Sancar 2004; Song et al. 2007; Hoang et al. 2008b; Öztürk et al. 2008; Li et al. 2011; Engelhard et al. 2014; El-Esawi et al. 2015; Gao et al. 2015). Für XICRY-DASH, AgtCPDIII, DmCRY sowie AtCRY1 und AtCRY2 wurde eine FAD-Photoreduktion über alternative aromatische AS, d.h. über die redox-aktiven Tryptophane und Tyrosine, postuliert (Öztürk et al. 2008; Liu et al. 2010; Biskup et al. 2011; Engelhard et al. 2014; Scheerer et al. 2015). Die für SynCRY-DASH und AtCYR1 bzw. AtCRY2 angenommenen alternativen distalen Tryptophane sind in CryP (K400) nicht konserviert. Dagegen sind zwei weitere aromatische AS, die neben der kanonischen Trp-Triade in den meisten CPF-Proteinen konserviert sind, mit W355 und Y377 auch in CryP erhalten (vgl. Abb. 3.1; Gao et al. 2015). Zudem weist CryP mit W404 die gleiche Konservierung einer aromatischen AS wie pCRYS, CRY-DASHs und CPD-PLs auf. Welche dieser konservierten oder welche der sonstigen in CryP enthaltenen Tryptophane und Tyrosine als potentielle, zur kanonischen Trp-Triade als alternative Elektronendonoren wirken könnten, muss anhand der Position in der CryP-Struktur beurteilt werden.

Wie für EcCPDI können alle in CryP enthaltenen Tryptophane und Tyrosine in eine erste, zweite und dritte Schicht mit zunehmendem Abstand zum zentralen FAD unterteilt werden (Liu et al. 2013). Als potentieller, alternativer, distaler Elektronendonator in der äußersten Schicht könnte Y337 dienen, das mit 6,2 Å einen nur halb so großen Abstand zum medialen W398 als das kanonische W342 aufweist und sich mit S340 und T344 in einer polaren Umgebung befindet (vgl. Anhang Abb. A13 A). Die für eine Deprotonierung notwendige Zugänglichkeit zum Lösemittel ist jedoch eingeschränkt, da die Seitenkette von Y337 ins Proteininnere zeigt und vermutlich von der nicht in der Struktur abgebildeten CTE überdeckt wird. Die kürzere Distanz von Y337 relativ zu W398 im Vergleich zum kanonischen W342 wird somit durch die höhere Lösemittelzugänglichkeit und damit verbundene Stabilisierung des W342H^{•+}-Kationradikals von W342 überkompensiert, ein Effekt, der auch für das distale Trp in SynCRY-DASH festgestellt wurde (Brazard et al. 2010; Biskup et al. 2011).

Als alternative mediale Elektronendonoren unter Einbezug des kanonischen proximalen W421 könnte das in allen CPF-konservierte W355 oder W404 mit Distanzen von 7,7 und 10 Å relativ zu W421 wirken (vgl. Anhang Abb. A13 B). Für beide wären die nächst gelegenen und über einen Elektronentransport frei erreichbaren Elektronenüberträger Y373 oder Y407, die jedoch an der MTHF-Bindung über π - π -Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken beteiligt sind (vgl. Abb. 4.4).

Als zum proximalen W421 alternativer Elektronendonator könnte W314 wirken, das mit 9 Å Distanz zu FAD-N5 jedoch weiter entfernt ist als W421 (vgl. Anhang Abb. A13 C). Dabei könnten Y156 bzw. Y320 und W172 als mediale und distale Elektronendonoren aktiv sein, wobei W172 jedoch weniger oberflächenexponiert ist.

Die genannten alternativen aromatischen Elektronendonoren in XICRY-DASH oder AgtCPDIII werden zur Erklärung der beibehaltenen *in vivo* Photoaktivitäten von Trp-Triaden-Mutanten herangezogen. Dabei wird der zellulären Umgebung eine hohe reduktive Wirkung durch die Erreichbarkeit von Metaboliten, wie Glutathion oder Thioredoxinen, oder CPF-Interaktionspartnern zugeschrieben, sodass auch alternative, energetisch weniger favorisierte Elektronentransferwege aktiv sein können (Hoang et al. 2008b; Liu et al. 2010; Engelhard et al. 2014; El-Esawi et al. 2015). In diesem Zusammenhang löst eine ATP-Bindung in pCRYs eine lichtunabhängige Konformationsverschiebung aus, was die Flexibilität des Apoproteins erhöht und damit die relative Orientierung alternativer aromatischer AS für einen Elektronentransfer verbessert (Burney et al. 2009; Engelhard et al. 2014; Sommer et al. 2017). Die für AtCRY1 strukturierte ATP-Bindetasche ist in CryP jedoch nicht konserviert (Brautigam et al. 2004). Im Gegensatz zu vergleichbaren Messungen an AtCRY2 konnte die Lichtsensitivität in CryP_W342F durch zugeführtes ATP nicht erhöht werden (vgl. Anhang Abb. A14; Engelhard et al. 2014).

Neben der FAD-Reduktion wird der konservierten Trp-Triade eine stabilisierende Funktion für die strukturelle Integrität von CPF-Proteinen zugeschrieben (Liu et al. 2013). So weisen aCRYs Typ II trotz der fehlenden Chromophorbindung ebenfalls eine kanonische Trp-Triade auf (Czarna et al. 2013; Xing et al. 2013; Kutta et al. 2017; Michael et al. 2017a). Auch für PLs wird eine stabilisierende Wirkung angenommen, da entsprechende Mutanten von EcCPDI trotz fehlender *in vitro* Reduktion uneingeschränkt katalytisch wirksam sind (vgl. Anhang Tab. A3; Li et al. 1991; Kavakli und Sancar 2004). Dagegen weisen CPDII-PLs keine kanonische Trp-Triade oder sonstige konservierte AS an den homologen Positionen auf, sondern eine alternative, nur in CPDII konservierte Trp-Triade (Okafuji et al. 2010).

In CryP besitzt die klassische Trp-Triade eine strukturstabilisierende Funktion, da die Substitutionsmutanten CryP-W421F (proximal) und CryP_W398F (medial) in *E. coli* nicht exprimiert werden konnten. Auch für DpCRYI führte der Austausch des proximalen und medialen Trp zur Proteinstabilisierung (Song et al. 2007).

Demnach stellt die FAD-Reduktion über die kanonische Trp-Triade in CryP unter *in vitro* Bedingungen und energetischer Betrachtung die stabilste Elektronenkaskade, erkennbar an den proteinvermittelten Distanzen und Redoxumgebungen der einzelnen Positionen, dar. Zudem dient die Trp-Triade der strukturellen Stabilität von CryP. Ob die für CryP beschriebenen alternativen Elektronentransferwege FAD-W421-W398-Y337 und FAD-W421-W355/ W404-Y373/ Y407 realistische Alternativen zur FAD-Reduktion über die konservierte Trp-Triade darstellen, muss über *in vivo* Fluoreszenzexcitations- oder EPR-Messungen beantwortet werden.

4.4 Ebenen der CryP-Regulation

Weder die CryP-Oligomerisierung noch die Konformation zwischen PHR und CTE oder das Interaktionsverhalten zeigten eine Abhängigkeit vom FAD-Redoxzustand. Eine gänzlich lichtunabhängige Funktion wie für aCRYs Typ II ist aufgrund der stabilen Chromophorbindung für CryP jedoch nicht anzunehmen. Dies bedeutet, dass die CryP-Aktivität nicht ausschließlich über Licht und eine damit verbundene Photoreduktion reguliert wird. Daher muss die CryP-Wirkweise im nativen Kontext unter Berücksichtigung von (post-) transkriptionellen und (post-) translationalen Modifikationen sowie differentiellen Lokalisationen und Bindeaffinitäten zu Interaktionspartnern betrachtet werden. Ein langlebiger Signalzustand als Basis für eine wirksame Signaltransduktionskette kann in CRYs oftmals erst durch biochemische Modifikationen und Bindung von Signalkomponenten gebildet werden (Herbel et al. 2013).

4.4.1 Die CryP-Transkriptmenge und -Proteinmenge werden lichtabhängig reduziert

Die Transkription von *cryp* folgt, wie die der meisten Photorezeptoren, einer Rhythmik mit maximalen Transkriptmengen in der späten Dunkelphase (Oliveri et al. 2014). Dabei ist CryP das einzige CPF in *P. tricornutum*, das im Dunkeln exprimiert wird. Dieser Rhythmus wird sowohl circadian als auch lichtabhängig reguliert (vgl. Abb. 3.22). Bereits etwa eine Stunde vor Beginn der gewohnten Lichtphase wird die *cryp*-Transkription halbiert, eine folgende Belichtung mit BL und RL reguliert die Transkription auf nahezu null herunter, während eine fRL- oder Dunkelbehandlung keine weitere Reduktion des Transkriptniveaus bewirkt. Die Wellenlängen des hier verwendeten BL und RL liegen im Absorptionsbereich von FADH[•], was die Möglichkeit einer autoregulativen, negativen CryP-Transkriptions-Translations-Rückkopplung unter der Voraussetzung gibt, dass CryP *in vivo* im Dunkeln FADH[•] bindet. Auch aCRYs Typ II wirken durch Inhibierung des CLK-BMAL1-Transkriptionsaktivatorkomplexes negativ auf die eigene Transkription, dies jedoch lichtunabhängig als Teil des zentralen Oszillators (Griffin et al. 1999). Die circadian und lichtgesteuerte Reduzierung der *cryp*-Transkription erinnert mehr an die Expressionsregulation von DmCRY (Ceriani et al. 1999; Stanewsky 2002). Die DmCRY-Expression unterliegt einem circadianen Rhythmus, wobei DmCRY als *Input*-Photorezeptor regulativ wirkt. Dies geschieht wie für aCRYs Typ II nicht durch direkte Bindung an Promotoren, sondern durch Interaktion mit Transkriptionsfaktorkomplexen. Für CryP ist ebenfalls eine regulative Wirkung auf Transkriptionsfaktoren anstelle einer direkten Promotorbindung aufgrund der unspezifischen DNA-Bindfähigkeit am wahrscheinlichsten (König 2016).

In CryP-*Knockdown*-Mutanten wurde ebenfalls eine BL-induzierte Reduzierung der *cryp*-Transkription festgestellt (König 2016). Zudem blieb in diesen Mutanten auch die BL-Induktion der Transkription des CryP-Interaktionspartners ID42612 in gleicher Stärke erhalten. Dies macht eine alleinige Beteiligung

von CryP an der Transkriptionsregulation von *ID42612* unwahrscheinlich und setzt die Wirkung eines weiteren Photorezeptors bei der Transkriptionsregulation von *cryp* und *ID42612* voraus. In diesem Zusammenhang wurde die Wirkung von PtCPF1 in einem regulativen Netzwerk mit CryP in Betracht gezogen, da CryP reprimierend auf die *ptcpf1*-Transkription wirkt und durch CryP sowie PtCPF1 im BL regulierte Gene identifiziert wurden (Coesel et al. 2009; König et al. 2017).

Der *cryp*-Transkriptionsrhythmus korreliert mit dem Proteinexpressionsrhythmus des Phytochroms PtDPH, was auch ein gemeinsames Regulationsnetzwerk mit CryP wie für AtCRY1 bzw. AtCRY2 und PHY in *A. thaliana* zulässt (Ahmad und Cashmore 1997; Ahmad et al. 1998; Casal und Mazzella 1998; Mockler et al. 1999; Fortunato et al. 2016). Diese mögliche Ko-Regulation bezieht sich jedoch nicht auf die lichtabhängige Transkription von *cryp* und *ID42612*, die im fRL nicht beeinflusst wird (vgl. Abb. 3.22).

Über welchen Mechanismus CryP die Transkription reguliert muss durch Promotor-Interaktionsstudien und die Identifizierung circadianer Transkriptionsaktivator- und Inhibatorkomplexe analysiert werden. Die Elemente der circadianen Maschinerie müssen für *P. tricornutum* separat identifiziert werden, da keine Homologien zu bekannten circadianen Komponenten bekannt sind und keine E-Box-Enhancer in Promotoren gefunden wurden (Coesel et al. 2009).

Genau wie für die Transkriptanalyse lassen die CryP-Abbauversuche auf eine lichtinduzierte Reduktion der Proteinmenge durch Proteolyse schließen (vgl. Abb. 3.23, Abb. 3.24). CryP wurde sowohl im BL als auch RL durch eine im *P. tricornutum*-Proteinextrakt enthaltene Protease abgebaut, im fRL und Dunkeln blieb die Menge stabil. Eine ähnliche lichtabhängige Degradation über das 26S-Proteasom wurde für AtCRY2, CrCPH1 und DmCRY beobachtet, während AtCRY1 im Licht stabil ist (Lin et al. 1998; Lin et al. 2001; Shalitin et al. 2002; Reisdorph und Small 2004; Yu et al. 2007b; Liu et al. 2016). Auch PHYA aus *A. thaliana* wird im RL abgebaut (Ahmad et al. 1998; Batschauer 1998). Voraussetzung für den proteasomalen Abbau sind lichtinduzierte Phosphorylierungen, gefolgt von Ubiquitinierungen (Koh et al. 2006; Öztürk et al. 2013). Im zellulären Umfeld unterliegen CPF-Proteine sowie viele ihrer Interaktionspartner rhythmischen Phosphorylierungen durch proteinspezifische, teilweise mehrere Kinasen (Eide et al. 2002; Sanada et al. 2004; Harada et al. 2005; Kurabayashi et al. 2010; Liu et al. 2017). Auch aCRYs Typ II werden entsprechend der circadianen Rhythmik lichtunabhängig phosphoryliert (Keesler et al. 2000; Vielhaber et al. 2000; Lee et al. 2001). Phosphorylierungsstellen finden sich in MmCRY1 und MmCRY2 sowohl in der PHR als auch der CTE (Harada et al. 2005; Kurabayashi et al. 2010; Hirano et al. 2014). In AtCRY2 wurden die meisten Phosphorylierungen in einem Serincluster in der CTE gefunden (Tan et al. 2013; Wang et al. 2015). Obwohl keine Sequenzhomologien zu bekannten Kinase-motiven bestehen, besitzen AtCRY1, CrCPH1 und HsCRY1 eine lichtabhängige bzw. -unabhängige Autokinaseaktivität (Bouly et al. 2003; Shalitin et al. 2003;

Zeugner et al. 2005; Ozgür und Sancar 2006; Immeln et al. 2007). Phosphorylierungen tragen durch elektrostatische Abstoßung mit der vornehmlich negativ geladenen Oberfläche um die FAD-Tasche von pCRYs und aCRYs zu Konformationsänderungen und Stabilisierung des Signalzustands bei (Bouly et al. 2003; Yu et al. 2007b). Dies erhöht die Affinität zu CRY-spezifischen F-Box-Proteinen, die als Teil des SCF-Komplexes (*Skp, Cullin, F-box containing complex*) eine Ubiquitinierung über E3-Ligasen und damit die Markierung für den proteasomalen Abbau vermitteln (Öztürk et al. 2013; Xing et al. 2013; Liu et al. 2016). Die rhythmische Degradation von CPF-Proteine trägt zum Erhalt der Transkriptions-Translations-Rückkopplungsschleifen bei (Eide et al. 2002).

In heterolog exprimiertem CryP wurden mittels PhosTag-PAGE mehrere Phosphorylierungsstellen nachgewiesen, die bislang jedoch nicht lokalisiert und auf homolog exprimiertes CryP übertragen wurden (König 2016). Wie bereits in Abschnitt 4.2.2 erläutert, weist die CryP-CTE ähnlich wie AtCRY1 ein Cluster von basischen sowie phosphorylierbaren AS auf, das infolge lichtinduzierter Phosphorylierungen zur CryP-Konformationsänderung beitragen und CryP für folgende Ubiquitinierungen markieren kann (vgl. Abb. 3.16, Müller und Bouly 2015). Dabei sind eine Photoreduktion oder lichtabhängige Strukturänderungen für den CryP-Abbau jedoch nicht entscheidend, da auch CryP_W342F im BL und RL sowie CryPox im RL, wo diese Varianten jeweils nicht angeregt werden, abgebaut werden (vgl. Abb. 3.24). Dies schließt die Beteiligung weiterer Photorezeptoren bei der CryP-Degradation ein.

Auf Basis des Aktionsspektrums für den CryP-Abbau zwischen 400 und 600 nm und bekannter Photorezeptor-Expressionsrhythmen sind PtCPF1 und PtDPH mögliche Photorezeptoren für die Wirkung in einem regulativen Netzwerk mit CryP. PtDPH weist maximale Proteinmengen am Ende der Dunkelphase auf, wenn auch CryP exprimiert wird (Oliveri et al. 2014; Fortunato et al. 2016). PHYs sind bekannt für ihre Kinaseaktivität, die auch PtDPH besitzt, und Wirkung in Phosphorylierungskaskaden (Rockwell et al. 2006). Obwohl PHYs als RL-Rezeptoren definiert werden, deckt das breite Absorptionsspektrum von PtDPH in der Pr-Form mit Maxima im BL bei 400 nm und im RL zwischen 600 und 750 nm den Bereich ab, in dem ein CryP-Abbau beobachtet wurde. PtDPH absorbiert jedoch auch im hier verwendeten fRL-Bereich bei Wellenlängen größer als 700 nm, in dem CryP stabil ist. Dies schränkt eine Beteiligung von PtDPH1 bei der CryP-Degradation ein.

Die Transkriptionsrhythmik und das daraus anzunehmende Proteinlevel von PtCPF1 ist im Vergleich zu CryP um etwa 3 h in Richtung Beginn der Lichtphase verschoben (Oliveri et al. 2014). Für PtCPF1 wird das semireduzierte FADH[•] als Ruheform *in vivo* angenommen, was sich mit dem Aktionsspektrum des CryP-Abbaus deckt (Coesel et al. 2009). Neben der (6-4)-PL-Aktivität und dem BL-abhängigen Einfluss auf die Genexpression wurde für PtCPF1 jedoch bisher keine weitere regulative Wirkung in der Signaltransduktion wie für PHYs aufgedeckt.

Weder PtDPH noch PtCPF1 wurden als direkte CryP-Interaktionspartner identifiziert (König 2016). Falls diese in einem Netzwerk mit CryP wirken, sind weitere Signalkomponenten beteiligt. Ein mögliches Bindeglied ist der CryP-Interaktionspartner ID42612, der neben CryP auch PtCPF1 binden kann (vgl. Abb. 3.21).

Die Herunterregulation der CryP-Transkript- und Proteinmenge in Abhängigkeit vom äußeren Lichtangebot verdeutlicht eine eher lichtbezogene als circadiane Funktionsweise von CryP. Aus der maximalen *cryp*-Transkriptmenge am Ende der Dunkelphase folgt eine zeitverschobene maximale CryP-Proteinmenge zu Beginn der Lichtphase und eine rasche Proteolyse. Dies erlaubt eine CryP-Wirkung in einem engen Zeitraum basierend auf der vorhandenen Schwellenmenge an aktivem Protein. Damit verbunden ist die differentielle Regulation der Genexpression durch CryP beim Übergang von der Dunkel- zur Lichtphase, jedoch nicht beim antrainierten Übergang von Nacht zu Tag. Diese zeitlich zwischen Dunkel- und Lichtphase getaktete Aktivität erklärt die Beobachtung zur Transkriptomanalyse von *P. tricornutum*, bei der CryP die Genexpression sowohl in Dunkelheit als auch BL beeinflusst (König et al. 2017).

4.4.2 Spezifische Proteininteraktionen bestimmen die CryP-Wirkung

Im Gegensatz zu Aureochromen wirken CRYs nicht als direkte Transkriptionsfaktoren, sondern entfalten ihre Wirkung durch differentielle Interaktionen in einem regulativen Netzwerk. Neben der Bildung von aktivierenden oder reprimierenden Signalkomplexen hat die spezifische, getaktete CRY-Proteininteraktion zudem Einfluss auf die CRY-Konformation und -Stabilität sowie subzelluläre Lokalisation (Lee et al. 2001; Zuo et al. 2012).

Da für CryP das Tetramer oder Dimer die aktive Form *in vivo* darstellt, jedoch keine Änderung der Oligomerisierung und Konformation der CTE in Abhängigkeit von Licht bzw. des FAD-Redoxzustands festgestellt wurde, besteht die Möglichkeit einer substrat- oder binderpartner-induzierten CryP-Strukturänderung. Die Dimerisierung und damit verbunden die Aktivität von AtCRY2 wird durch eine BIC2 (*BL inhibitor of cryptochrome 2*)-Bindung unterdrückt (Wang et al. 2016; Ma et al. 2020). Eine Reduzierung des Dimer-Monomer-Verhältnisses von CryP in der nativen PAGE wurde durch Interaktion mit ID42612 beobachtet (vgl. Abb. 3.20). Dies beruht jedoch nicht wie im Fall der AtCRY2-BIC2-Interaktion auf einer Monomerisierung der CryP-Dimere, sondern auf einer spezifischen Interaktion von ID42612 mit dem Dimer. Eine mit BIC2 vergleichbare CryP-Inhibierung basierend auf einer Monomerisierung ist für ID42612 daher nicht anzunehmen.

Da die Dimerisierung PHR-vermittelt ist, kann die CryP-Aktivität durch Heterodimerisierung mit anderen CRYs reguliert werden. Diese Möglichkeit der Aktivitätsregulation wurde auch für AtCRY1 und

AtCRY2 in Betracht gezogen und ist für PHYA und PHYB aus *A. thaliana* nachgewiesen (Rockwell et al. 2006; Herbel et al. 2013). Die These beruht auf der Beobachtung, dass zur AtCRY-Aktivierung der Kontakt der beiden CTEs im Homodimer notwendig ist, was im Heterodimer jedoch ausbleibt (Yang et al. 2000; Yu et al. 2007b). Aufgrund der zeitlich eng getakteten Expressionen, besteht für CryP die Möglichkeit zur Heterodimerisierung mit PtCPF1. Wie bereits erläutert bestärkt die Interaktion von ID42612 mit CryP als auch mit PtCPF1 diese Möglichkeit, auch wenn PtCPF1 nicht als direkter CryP-Interaktionspartner identifiziert wurde (König 2016).

Während eine Dissoziation der CTE von der PHR in pCRYs und aCRYs Typ I Voraussetzung für die lichtinduzierte Interaktion mit nachgeschalteten Signalkomponenten ist, trifft dies nicht auf die redoxunabhängige Interaktion der CryP-CTE und Bola zu (vgl. Abb. 3.20; Partch et al. 2005; Kottke et al. 2006; Vaidya et al. 2013; Berntsson et al. 2019; Chandrasekaran et al. 2021; Goett-Zink et al. 2021). Falls die CTE mit einer höheren Affinität an Bola als an die PHR bindet, kann die Bola-CTE-Interaktion eine Loslösung der CTE von der PHR bewirken. Damit werden Kontaktflächen zu weiteren Signalkomponenten freigegeben und die Bildung größerer Signalkomplexe ermöglicht. Kompetitive Bindungen und Verdrängung von Bindepartnern regulieren vor allem die Aktivität der lichtunabhängigen aCRYs Typ II. MmCRY1 durchläuft eine Bindepartner-induzierte Konformationsänderung, indem mPER aufgrund einer höheren Bindeaffinität die CTE von der PHR verdrängt und damit die Interaktion mit dem CLK-BMAL1-Transkriptionsaktivator-komplex erleichtert (Parico et al. 2020). Zudem konkurrieren MmCRY1 und CBP (*coactivating binding protein*) um die gleiche Bindestelle in BMAL1, was die Reprimierung bzw. Aktivierung des Aktivator-komplexes bestimmt (Xu et al. 2015; Michael et al. 2017b). Unterschiedliche Affinitäten von MmCRY1 und MmCRY2 zu CLK können durch die selektive Bindung kleiner chemischer Metabolite nahe der FAD-Bindetasche allosterisch ausgeglichen werden (Fribourgh et al. 2020; Miller et al. 2020).

Auch ID42612 und Bola binden mit unterschiedlicher Affinität an CryP (vgl. Abb. 3.20). In der zweidimensionalen PAGE bindet ID42612 mit höherer Affinität als Bola an das CryP-Dimer, das die stabile Form unter physiologischen Bedingungen darstellt. Unter Berücksichtigung der lichtinduzierten Expression von ID42612 sowie der konstitutiven Expression von Bola, bindet CryP im Dunkeln den Transkriptionsfaktor Bola, der nach Übergang zur Lichtphase von ID42612 verdrängt wird. Die kompetitive Bindung bezieht sich auf einen Teil der CTE, der sowohl von ID42612 als auch Bola gebunden wird. Dieses Beispiel verbildlicht den generellen CryP-Regulationsmechanismus über kompetitive Bindungen, der auch die Wechselwirkung zwischen CryP und weiteren bisher nicht identifizierten oder charakterisierten Interaktionspartnern bestimmt. In diesem Zusammenhang kann die lichtabhängige CryP-Proteolyse durch die Bindung von Signalproteinen verzögert werden. Auch die Bindung zwischen MmCRY1 und mPER verlangsamt deren proteasomalen Abbau durch Verdrängung der jeweils spezifischen Kinasen und E3-Ubiquitin-Ligasen (Eide et al. 2002; Nangle et al. 2014).

Da dem Interaktionspartner Bola eine Funktion als redoxsensitiver Transkriptionsfaktor zugeschrieben wird, kann eine Verdrängung von Bola von der CryP-CTE auch durch einen lichtabhängigen Elektronentransfer von $(FADH^{\cdot-})^*$ auf Bola in einem PL-Modell reguliert werden (vgl. Abschnitt 4.1 und 4.3.2). Dies setzt die Stabilisierung von $FADH^{\cdot-}$ in CryPfullyred im zellulären Umfeld voraus. Durch Wechselwirkung mit den nuklearen Redoxsystemen (Glutathion/ GSH, Thioredoxine/ Trx) kann CryP dabei als Sensor des nuklearen Redoxpotentials wirken (Go und Jones 2010). Infolge eines reduzierten GSH- und Trx-Pools bei oxidativem Stress liegt CryP als CryPfullyred vor, das lichtabhängig Elektronen auf Interaktionspartner wie den postulierten Transkriptionsfaktor Bola übertragen kann und somit die Transkription als Antwort auf oxidativen Stress reguliert. In diesem Zusammenhang wiesen CryP-*Knockdown*-Mutanten eine verringerte Toleranz gegenüber Kälte- und Salzstress sowie Stickstoffmangel auf (König 2016).

Letztlich wird die CRY-Aktivität durch die subzelluläre Lokalisation bestimmt, die sowohl infolge biochemischer Modifikationen als auch Proteininteraktionen variieren kann. In MmCRY1 und MmCRY1 bewirken die Heterodimerisierung mit mPER sowie die Freilegung von NLS in PHR und CTE infolge phosphorylierungsabhängiger Konformationsänderungen eine circadian getaktete, nukleare Translokation (Lee et al. 2001; Eide et al. 2002; Zhu et al. 2003; Sakakida et al. 2005; Chaves et al. 2006). Während AtCRY2 konstitutiv im Nukleus lokalisiert ist, wechseln AtCRY1 und CrCRY lichtabhängig zwischen Cytoplasma und Nukleus (Cashmore et al. 1999; Guo et al. 1999; Kleiner et al. 1999; Yang et al. 2001; Franz et al. 2018). CRY-DASHs wie AtCRY3 und CrCRY-DASH1 werden auch in Mitochondrien und Chloroplasten gefunden (Kleine et al. 2003; Huang et al. 2006; Klar et al. 2007; Rredhi et al. 2021).

CryP befindet sich aufgrund einer in der CTE gelegenen NLS im Licht im Nukleus, wobei eine mögliche differentielle Lokalisation in Dunkelheit nicht untersucht ist (König 2016). In diesem Zusammenhang könnte der Interaktionspartner ID42612 Einfluss auf die subzelluläre CryP-Verteilung nehmen. Strukturanalysen sagen für ID42612 am N-terminalen Ende eine potentielle Transmembranhelix hervor, was die beobachtete Löslichkeit mit Detergenzien erklärt (TMHMM *Prediction of transmembrane helices in proteins*; vgl. Anhang Abb. A6). Die Vorhersage wird durch eine Deletion der betreffenden N-terminalen AS in ID42612 Δ 1-25, die ID42612 wasserlöslich macht, bestärkt (vgl. Anhang Abb. A14). Gleichzeitig zeigen erste fluoreszenzmikroskopische Bilder eine ER-bezogene Lokalisation von ID42612 (unveröffentlichte Daten Dr. M. Schmidt; Goethe-Universität). Durch die Interaktion mit ID42612 im Licht kann CryP in den Randbereich des Nukleus zum ER verlagert werden, wodurch CryP neben der Transkription auch die Translation regulieren kann. Diese Annahme wird durch die Beobachtungen bestärkt, dass CryP mit RNA koisoliert wird und die Expression von LHCs lichtabhängig auch auf Proteinebene beeinflusst (vgl. Anhang Abb. A5; Juhas et al. 2014). Zudem wird

dem dritten identifizierten und bestätigten CryP-Interaktionspartner CSDP eine Funktion als Translationsfaktor in Stresssituationen zugeschrieben (König 2016). Auch einige CRY-DASHs binden RNA und haben größere regulative Wirkung auf translationaler als auf transkriptioneller Ebene (Rredhi et al. 2021). Ein Nachweis zur ER-Assoziation von CryP muss durch einen *in vivo* Interaktionsnachweis von CryP und ID42612 erfolgen.

4.5 Modell zur CryP-Wirkweise

Auf Basis der in vorliegender Arbeit erzielten Beobachtungen kann für die CryP-Wirkweise folgendes Modell dargestellt werden (Abb. 4.9):

Die CryP-Proteinkonzentration in *P. tricornutum*-Zellen ist zwischen dem Ende der Dunkelphase und frühen Lichtphase maximal. Die lichtunabhängigen CryP-Dimere oder Tetramere sind im Nukleus lokalisiert und binden im Dunkelzustand $FADH^{\bullet}$ oder $FADH^{-}$. Im Fall von $FADH^{\bullet}$ ist CryP sensibel für UVA-, Blau-, Gelb- und Rotlicht, bei $FADH^{-}$ für UVA- und Blaulicht. Die CTE ist mit der PHR assoziiert, wobei die Konformation bindepartnerinduziert variieren kann. Durch Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktorkomplexen reguliert CryP die Expression von drei Genkategorien: Kategorie 1: nur im BL reguliert, Kategorie 2 im BL und Dunkeln reguliert, Kategorie 3: nur im Dunkeln reguliert (König et al. 2017). Zur Transkriptionsaktivierung kann CryP entweder direkt aktivierend wirken, indem ein aktivierender Transkriptionsfaktorkomplex gebildet wird, oder indirekt aktivierend, indem ein Transkriptionsdeaktivator-komplex durch die CryP-Bindung inhibiert wird. Auf gleiche Weise kann die Transkriptionsdeaktivierung erfolgen. Sobald Licht einwirkt, kann CryP abhängig von der FAD-Ruheform entweder in einem Photolyase-Modell Elektronen von $(FADH^{-})^{\bullet}$ auf die CTE, einen Bindepertner bzw. ein Substrat übertragen, oder in einem Phototropin-ähnlichen Modell Konformationsänderungen infolge einer $FADH^{\bullet}$ -Photoreduktion eingehen. Dies führt dazu, dass sich CryP von den zuvor im Dunkeln gebundenen Komplexen löst und neue lichtabhängige Interaktionen schließt. Auf diese Weise reguliert CryP die Transkription von Genen der Kategorie 1 und 3. Zudem wird das Interaktionsverhalten über kompetitive Bindungen von Bindepertnern mit verschiedenen Bindeaffinitäten reguliert. Das konstitutiv exprimierte BolA, für das eine Funktion als Transkriptionsfaktor angenommen wird, bindet redoxunabhängig an die CryP-CTE. Infolge der Belichtung wird die Expression von ID42612 induziert, das mit höherer Affinität als BolA an das CryP-Dimer bindet. Die Bindung von ID42612 und Verdrängung von BolA oder weiterer bisher nicht charakterisierter CryP-Bindepertner treten zeitlich verzögert zum Lichtstart ein, sodass die transkriptionsregulierende Wirkung von BolA und anderen Faktoren langsam abklingt. Auf Basis eines solchen kompetitiven Mechanismus werden Gene der Kategorie 2 reguliert. Die angenommene ER-Assoziation von ID42612 kann eine Verschiebung der CryP-Lokalisation zum Übergang von Nukleus

und ER führen, wo CryP im Komplex mit Translationsfaktoren wie CSDP die Translation von z.B. LhcX und LhcF lichtabhängig reguliert. Die Menge an aktivem CryP wird zügig nach Lichtstart durch eine Herunterregulation der *cryP*-Transkription sowie einer lichtinduzierten Proteolyse unter Beteiligung weiterer Photorezeptoren wie PtCPF1 oder PtDPH reduziert. Dabei können Phosphorylierungen an der CTE einen proteasomalen Abbau einleiten.

Demnach wirkt CryP basierend auf einer transkriptionellen und proteolytischen Regulation der CryP-Konzentration in einem schmalen Zeitraum zwischen Ende der Dunkel- und Start der Lichtphase. Dies erlaubt eine Differenzierung der Genexpression zur Umstellung des Metabolismus von der Dunkelheit zum Licht.

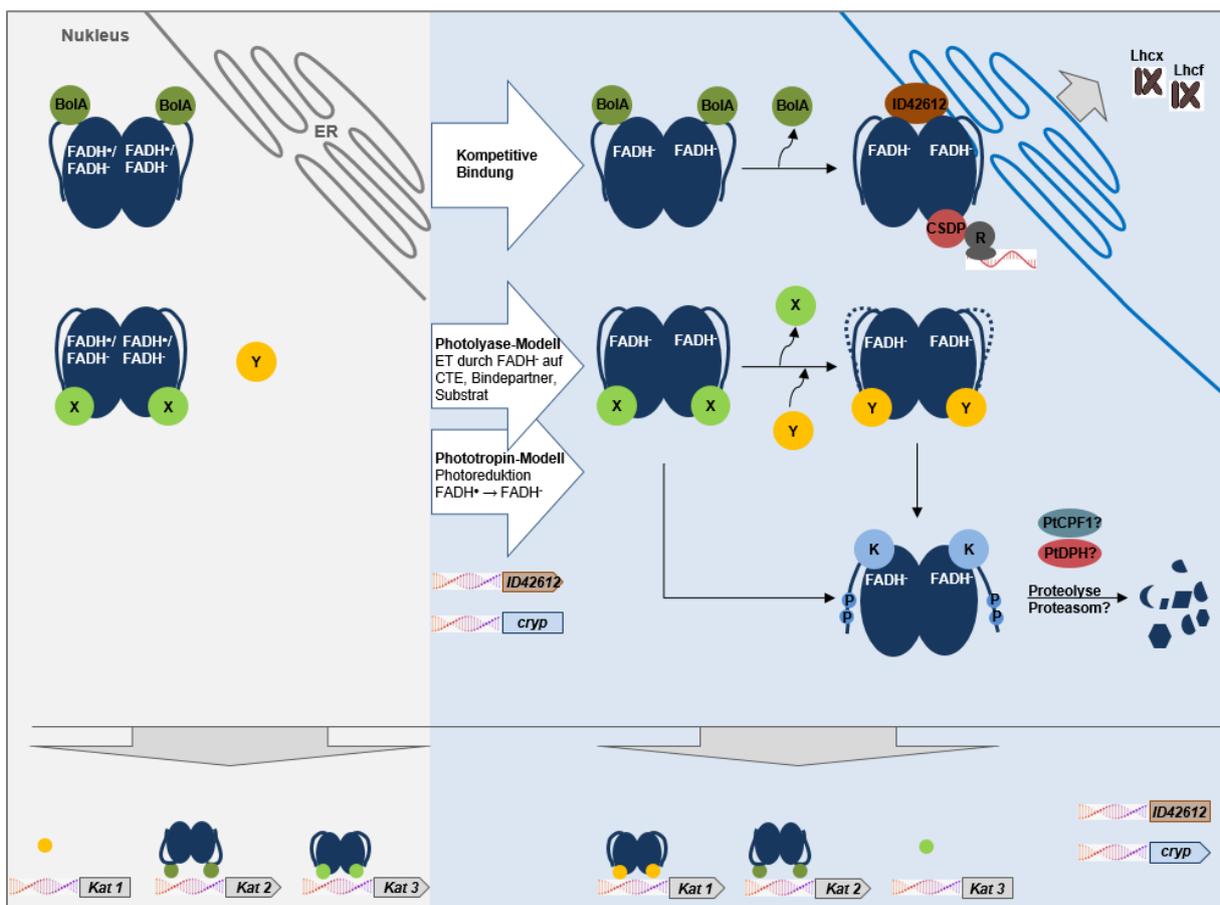


Abb. 4.9: Modell zur CryP-Wirkweise. Das CryP-Dimer bindet in Dunkelheit FADH[•] oder FADH⁻. Nach Lichtstart überträgt CryP in einem Photolyase-Modell Elektronen von (FADH[•])^{*} oder ändert in einem Phototropin-ähnlichen Modell infolge einer Photoreduktion die Konformation, sodass wechselnde Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren eingegangen werden. Über kompetitive Bindungen werden weitere Gengruppen kontrolliert. Eine lichtinduzierte Herunterregulation der *cryP*-Transkriptmenge und Proteolyse begrenzen die CryP-Wirkung auf einen engen Zeitraum zwischen Ende der Dunkel- und Start der Lichtphase. *Kat 1* nur im BL regulierte Gene, *Kat 2* im BL und Dunkeln regulierte Gene, *Kat 3* nur im BL regulierte Gene, ER Endoplasmatisches Retikulum, K Kinase, P Phosphorylierung, R Ribosomen, X und Y aktivierende oder reprimierende Transkriptionsfaktoren (-komplexe).

5 Zusammenfassung

Mitglieder der ubiquitär verbreiteten Cryptochrom-Photolyase-Familie sind Blaulicht-absorbierende Flavoproteine mit hoher Sequenzhomologie aber diversen Funktionen. Photolyasen katalysieren die Reparatur UV-Licht-induzierter DNA-Schäden. Cryptochrome (CRYs) wirken als lichtunabhängige Transkriptionsrepressoren innerhalb des Kern-Oszillators der circadianen Uhr oder als primäre Photorezeptoren zur Synchronisation dieser mit dem äußeren Tag-Nacht-Rhythmus und steuern durch Regulation der Genexpression Wachstum und Entwicklung. Gemeinsames Strukturmerkmal aller CPF-Vertreter ist die Photolyase- homologe Region (PHR), die das Chromophor Flavinadenindinukleotid (FAD) bindet, das lichtabhängig zwischen den Redoxformen oxidiert (FADox), semireduziert (FAD[•] bzw. FADH[•]) und vollreduziert (FADH⁻) wechseln kann und damit die CRY-Konformation und -Aktivität beeinflusst. Unterscheidungsmerkmale sind die spezifische C-terminale Erweiterung (CTE) sowie die Komposition der FAD-Bindetasche, die unterschiedliche FAD-Redoxformen stabilisiert. Die Mechanismen der CRY-Photosignaltransduktion sind nicht völlig erforscht.

CryP ist eines von vier CRYs in der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* und gehört zur bislang nicht charakterisierten Gruppe pflanzenähnlicher CRYs. In vorhergehenden Untersuchungen wurde für CryP eine nukleare Lokalisation und damit verbunden eine blaulicht- sowie dunkelabhängige Regulation der Transkription unterschiedlichster Gene gezeigt. Zudem reguliert CryP das Proteinlevel photosynthetischer Lichtsammelkomplexe. CryP interagiert mit bisher nicht charakterisierten Proteinen aus dem Bereich DNA und Regulation sowie Ribosomen und Translation. Heterolog exprimiertes und isoliertes CryP stabilisiert das Neutralradikal FADH[•] und das Antennenchromophor Methenyltetrahydrofolat (MTHF).

In vorliegender Dissertation wurde die Bedeutung des FAD-Redoxzustands und der C-terminalen Proteindomäne für Strukturänderungen hinsichtlich der Oligomerisierung und Konformation sowie für das CryP-Interaktionsverhalten untersucht. Hierzu wurden rekombinante CryP-Varianten heterolog isoliert, die Mutationen in für die FAD-Reduzierbarkeit entscheidenden Aminosäuren oder eine Deletion der CTE tragen.

Die Analyse der CryP-Oligomerisierungsstufe und Konformation erfolgte mittels Ko-Präzipitation, nativen und zweidimensionalen PAGEs sowie partieller Proteolyse. Dabei wurde heterolog isoliertes CryP in seinen drei Redoxformen oxidiert (mit FADox), semireduziert (mit FADH[•]) und vollreduziert (mit FADH⁻) sowie das um die CTE-verkürzte CryP-PHR verglichen. Für CryP wurde eine redoxunabhängige, PHR-vermittelte Di- und Tetramerisierung über elektrostatische Wechselwirkung der Monomere beobachtet. Die CTE bindet spezifisch und redoxunabhängig an die PHR in einem Bereich um die FAD-Bindetasche. Dies schließt eine großräumige Konformationsänderung zwischen PHR und CTE infolge einer FAD-Photoreduktion wie für pflanzliche und viele tierische CRYs als Aktivierungsmechanismus für CryP aus.

Zusammenfassung

Interaktionsstudien mittels zweidimensionaler PAGE gaben Aufschluss über unterschiedliche Bindeverhalten der beiden betrachteten Interaktionspartner an CryP. Sowohl BolA, ein potentieller redoxregulierter Transkriptionsfaktor, als auch ID42612 mit unbekannter Funktion interagieren mit CryP unabhängig von der FAD-Redoxform. Dabei bindet BolA an die CTE des CryP-Dimers und -Monomers, während ID42612 einen Komplex mit dem CryP-Dimer bildet.

Mittels *in vitro* Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie wurde die FAD-Redoxchemie von CryP und CryP-PHR verglichen. Die beiden Varianten unterscheiden sich in der FAD-Photoreduzierbarkeit und -Oxidationskinetik. Das Volllängenprotein CryP kann ohne externes Reduktionsmittel zum semireduzierten FADH[•] photoreduziert werden, das im Gegensatz zu bekannten CRYs über Tage im Dunkeln stabil gegen aerobe Oxidation ist. Eine Belichtung mit Reduktionsmittel führt zur Bildung des vollreduzierten FADH⁻, das innerhalb von Minuten zu FADH[•] rückoxidiert. Das um die CTE verkürzte CryP-PHR kann nur mit externem Reduktionsmittel zu FADH[•] photoreduziert werden, der vollreduzierte Zustand wird nie erreicht. Die Stabilisierung von FADH[•] gegen aerobe Oxidation im CryP-Holoprotein ist vergleichbar zur FAD-Redoxchemie von Photolyasen. Verglichen mit sonstigen charakterisierten CRYs ist die Wichtigkeit der CTE für eine effiziente FAD-Photoreduktion und FADH[•]-Stabilisierung eine CryP-spezifische Charakteristik.

Neben der CTE trägt die zu FAD-N5 proximal gelegene Position zur FADH[•]-Stabilisierung bei, wie Absorptionsmessungen an CryP_N417C zeigten. CryP weist mit Asparagin die gleiche Konservierung an dieser Position wie Photolyasen auf und unterscheidet sich damit ebenfalls von klassischen CRYs.

Analysen zur *cryp*-Transkription mittels qRT-PCR zeigten eine rhythmische Expression mit maximalen Transkriptmengen in der Nacht und eine rasche photoinduzierte Herunterregulation der Transkription. Das CryP-Protein wird lichtabhängig im zellulären Umfeld degradiert, die verantwortliche Protease konnte nicht identifiziert werden.

Zusammenfassend liegt CryP in der Zelle permanent als Dimer oder Tetramer vor, wobei die CTE an der PHR anliegt. Aus der maximalen *cryp*-Transkription am Ende der Dunkelphase folgt eine zeitverschobene maximale CryP-Proteinmenge zu Beginn der Lichtphase und eine rasche Proteolyse. Dies erlaubt eine CryP-Wirkung in einem engen Zeitraum beim Übergang von der Dunkel- zur Lichtphase. Damit verbunden ist die differentielle Regulation der Genexpression durch CryP auf Basis wechselnder Proteininteraktionen. Verschiedene CryP-Aktivierungsmechanismen sind denkbar. Falls CryP *in vivo* FADH⁻ bindet, ist aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten eine Photolyase-ähnliche Wirkweise basierend auf einem photoinduzierten Elektronentransfer auf einen unidentifizierten Akzeptor möglich. Alternativ, im Fall einer *in vivo* FADH[•]-Stabilisierung, ist eine Aktivierung durch kleinräumige, hier nicht erfasste, Strukturänderungen infolge einer Photoreduktion von FADH[•] zu FADH⁻ möglich.

6 Literatur

Agalarov SC, Sogorin EA, Shirokikh NE, Spirin AS (2011) Insight into the structural organization of the omega leader of TMV RNA: the role of various regions of the sequence in the formation of a compact structure of the omega RNA. *Biochemical and biophysical research communications* 404:250–253. doi:10.1016/j.bbrc.2010.11.102

Ahmad M, Cashmore AR (1993) HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 366:162–166. doi:10.1038/366162a0

Ahmad M, Cashmore AR (1997) The blue-light receptor cryptochrome 1 shows functional dependence on phytochrome A or phytochrome B in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 11:421–427. doi:10.1046/j.1365-313x.1997.11030421.x

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* 10:197. doi:10.2307/3870698

Ahmad M, Grancher N, Heil M, Black RC, Giovani B, Galland P, Lardemer D (2002) Action spectrum for cryptochrome-dependent hypocotyl growth inhibition in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 129:774–785. doi:10.1104/pp.010969

Anderson S, Dragnea V, Masuda S, Ybe J, Moffat K, Bauer C (2005) Structure of a novel photoreceptor, the BLUF domain of AppA from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* 44:7998–8005. doi:10.1021/bi0502691

Apt KE, Kroth-Pancic PG, Grossman AR (1996) Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Molecular & general genetics : MGG* 252:572–579. doi:10.1007/BF02172403

Armbrust EV, Berges JA, Bowler C et al (2004) The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science (New York, N.Y.)* 306:79–86. doi:10.1126/science.1101156

Aubert C, Vos MH, Mathis P, Eker AP, Brettel K (2000) Intraprotein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase. *Nature* 405:586–590. doi:10.1038/35014644

Balland V, Byrdin M, Eker APM, Ahmad M, Brettel K (2009) What makes the difference between a cryptochrome and DNA photolyase? A spectroelectrochemical comparison of the flavin redox transitions. *J. Am. Chem. Soc.* 131:426–427. doi:10.1021/ja806540j

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* 282:14916–14922. doi:10.1074/jbc.M700616200

Banerjee A, Herman E, Serif M, Maestre-Reyna M, Hepp S, Pokorny R, Kroth PG, Essen L-O, Kottke T (2016) Allosteric communication between DNA-binding and light-responsive domains of diatom class I aureochromes. *Nucleic acids research* 44:5957–5970. doi:10.1093/nar/gkw420

Batschauer A (1998) Photoreceptors of higher plants. *Planta* 206:479–492. doi:10.1007/s004250050425

Beel B, Prager K, Spexard M, Sasso S, Weiss D, Müller N, Heinnickel M, Dewez D, Ikoma D, Grossman AR, Kottke T, Mittag M (2012) A flavin binding cryptochrome photoreceptor responds to both blue and red light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell* 24:2992–3008. doi:10.1105/tpc.112.098947

- Berndt A, Kottke T, Breitkreuz 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* 282:13011–13021. doi:10.1074/jbc.M608872200
- Berntsson O, Rodriguez R, Henry L, Panman MR, Hughes AJ, Einholz C, Weber S, Ihalainen JA, Henning R, Kosheleva I, Schleicher E, Westenhoff S (2019) Photoactivation of *Drosophila melanogaster* cryptochrome through sequential conformational transitions. *Science advances* 5:eaaw1531. doi:10.1126/sciadv.aaw1531
- Biskup T, Schleicher E, Okafuji A, Link G, Hitomi K, Getzoff ED, Weber S (2009) Direct observation of a photoinduced radical pair in a cryptochrome blue-light photoreceptor. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 48:404–407. doi:10.1002/anie.200803102
- Biskup T, Hitomi K, Getzoff ED, Krapf S, Koslowski T, Schleicher E, Weber S (2011) Unexpected electron transfer in cryptochrome identified by time-resolved EPR spectroscopy. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 50:12647–12651. doi:10.1002/anie.201104321
- Biskup T, Paulus B, Okafuji A, Hitomi K, Getzoff ED, Weber S, Schleicher E (2013) Variable electron transfer pathways in an amphibian cryptochrome: tryptophan versus tyrosine-based radical pairs. *The Journal of biological chemistry* 288:9249–9260. doi:10.1074/jbc.M112.417725
- Bouly J-P, 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* 270:2921–2928. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03691.x
- Bouly J-P, Schleicher E, Dionisio-Sese M, Vandenbussche F, van der Straeten D, Bakrim N, Meier S, Batschauer A, Galland P, Bittl R, Ahmad M (2007) Cryptochrome blue light photoreceptors are activated through interconversion of flavin redox states. *The Journal of biological chemistry* 282:9383–9391. doi:10.1074/jbc.M609842200
- Bowler C, Allen AE, Badger JH et al (2008) The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* 456:239–244. doi:10.1038/nature07410
- 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* 101:12142–12147. doi:10.1073/pnas.0404851101
- Brazard J, Usman A, Lacombat F, Ley C, Martin MM, Plaza P, Mony L, Heijde M, Zabulon G, Bowler C (2010) Spectro-temporal characterization of the photoactivation mechanism of two new oxidized cryptochrome/photolyase photoreceptors. *Journal of the American Chemical Society* 132:4935–4945. doi:10.1021/ja1002372
- Brazard J, Ley C, Lacombat F, Plaza P, Mony L, Heijde M, Zabulon G, Bowler C (2012) Photoantenna in two cryptochrome–photolyase proteins from *O. tauri*: Presence, nature and ultrafast photoinduced dynamics. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 234:135–145. doi:10.1016/j.jphotochem.2012.01.012
- Briggs WR, Christie JM (2002) Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends in plant science* 7:204–210. doi:10.1016/S1360-1385(02)02245-8
- 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. *Molecular Cell* 11:59–67. doi:10.1016/S1097-2765(03)00008-X

- 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* 43:509–518. doi:10.1111/j.1529-8817.2007.00339.x
- Burnette W (1981) “Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry* 112:195–203. doi:10.1016/0003-2697(81)90281-5
- Burney S, Hoang N, Caruso M, Dudkin EA, Ahmad M, Bouly J-P (2009) Conformational change induced by ATP binding correlates with enhanced biological function of Arabidopsis cryptochrome. *FEBS letters* 583:1427–1433. doi:10.1016/j.febslet.2009.03.040
- Busza A, Emery-Le M, Rosbash M, Emery P (2004) Roles of the two Drosophila CRYPTOCHROME structural domains in circadian photoreception. *Science (New York, N.Y.)* 304:1503–1506. doi:10.1126/science.1096973
- Carolaing Gabaldón M, Labrador L, Arraiz G, Concepción JL, Avilan L (2010) Trypanosoma cruzi: A kinetoplast-associated protein of the photolyase/cryptochrome family. *Experimental parasitology* 124:350–356. doi:10.1016/j.exppara.2009.11.004
- Caron DA, Alexander H, Allen AE, Archibald JM, Armbrust EV, Bachy C, Bell CJ, Bharti A, Dyhrman ST, Guida SM, Heidelberg KB, Kaye JZ, Metzner J, Smith SR, Worden AZ (2017) Probing the evolution, ecology and physiology of marine protists using transcriptomics. *Nature reviews. Microbiology* 15:6–20. doi:10.1038/nrmicro.2016.160
- Casal JJ, Mazzella MA (1998) Conditional synergism between cryptochrome 1 and phytochrome B is shown by the analysis of phyA, phyB, and hy4 simple, double, and triple mutants in Arabidopsis. *Plant physiology* 118:19–25. doi:10.1104/pp.118.1.19
- Cashmore AR (2003) Cryptochromes Enabling Plants and Animals to Determine Circadian Time. *Cell* 114:537–543. doi:10.1016/S0092-8674(03)00647-0
- Cashmore AR, Jarillo JA, Wu YJ, Liu D (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science (New York, N.Y.)* 284:760–765. doi:10.1126/science.284.5415.760
- Castrillo M, García-Martínez J, Avalos J (2013) Light-dependent functions of the Fusarium fujikuroi CryD DASH cryptochrome in development and secondary metabolism. *Applied and environmental microbiology* 79:2777–2788. doi:10.1128/AEM.03110-12
- Castrillo M, Bernhardt A, Ávalos J, Batschauer A, Pokorny R (2015) Biochemical Characterization of the DASH-Type Cryptochrome CryD From Fusarium fujikuroi. *Photochemistry and photobiology* 91:1356–1367. doi:10.1111/php.12501
- Ceriani MF, Darlington TK, Staknis D, Más P, Petti AA, Weitz CJ, Kay SA (1999) Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. *Science (New York, N.Y.)* 285:553–556. doi:10.1126/science.285.5427.553
- Chandrasekaran S, Schneps CM, Dunleavy R, Lin C, DeOliveira CC, Ganguly A, Crane BR (2021) Tuning flavin environment to detect and control light-induced conformational switching in Drosophila cryptochrome. *Communications biology* 4:249. doi:10.1038/s42003-021-01766-2
- Chaves I, Yagita K, Barnhoorn S, Okamura H, van der Horst GTJ, 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* 26:1743–1753. doi:10.1128/MCB.26.5.1743-1753.2006

- Chaves I, Pokorný R, Byrdin M, Hoang N, Ritz T, Brettel K, Essen L-O, van der Horst GTJ, Batschauer A, Ahmad M (2011) The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annual review of plant biology* 62:335–364. doi:10.1146/annurev-arplant-042110-103759
- Chen M, Schwab R, Chory J (2003) Characterization of the requirements for localization of phytochrome B to nuclear bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:14493–14498. doi:10.1073/pnas.1935989100
- Christie JM, Salomon M, Nozue K, Wada M, Briggs WR (1999) LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (*nph1*): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:8779–8783. doi:10.1073/pnas.96.15.8779
- Christie JM, Yang H, Richter GL, Sullivan S, Thomson CE, Lin J, Titapiwatanakun B, Ennis M, Kaiserli E, Lee OR, Adamec J, Peer WA, Murphy AS (2011) phot1 inhibition of ABCB19 primes lateral auxin fluxes in the shoot apex required for phototropism. *PLoS biology* 9:e1001076. doi:10.1371/journal.pbio.1001076
- Christie JM, Blackwood L, Petersen J, Sullivan S (2015) Plant flavoprotein photoreceptors. *Plant & cell physiology* 56:401–413. doi:10.1093/pcp/pcu196
- 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. *EMBO reports* 10:655–661. doi:10.1038/embor.2009.59
- Cohen SN, Chang AC, Hsu L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69:2110–2114. doi:10.1073/pnas.69.8.2110
- Crosson S, Moffat K (2001) Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: insights into light-mediated signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:2995–3000. doi:10.1073/pnas.051520298
- Crosson S, Rajagopal S, Moffat K (2003) The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry* 42:2–10. doi:10.1021/bi026978l
- Czarna A, Berndt A, Singh HR, Grudziecki A, Ladurner AG, Timinszky G, Kramer A, Wolf E (2013) Structures of *Drosophila* cryptochrome and mouse cryptochrome1 provide insight into circadian function. *Cell* 153:1394–1405. doi:10.1016/j.cell.2013.05.011
- Czeisler CA, Duffy JF, Shanahan TL, Brown EN, Mitchell JF, Rimmer DW, Ronda JM, Silva EJ, Allan JS, Emens JS, Dijk DJ, Kronauer RE (1999) Stability, precision, and near-24-hour period of the human circadian pacemaker. *Science (New York, N.Y.)* 284:2177–2181. doi:10.1126/science.284.5423.2177
- Daboussi F, Leduc S, Maréchal A, Dubois G, Guyot V, Perez-Michaut C, Amato A, Falciatore A, Juillerat A, Beurdeley M, Voytas DF, Cavarec L, Duchateau P (2014) Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricornutum* for biotechnology. *Nature communications* 5:3831. doi:10.1038/ncomms4831
- Daiyasu H, Ishikawa T, Kuma K, Iwai S, Todo T, Toh H (2004) Identification of cryptochrome DASH from vertebrates. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 9:479–495. doi:10.1111/j.1356-9597.2004.00738.x
- Damiani MJ, Yalloway GN, Lu J, McLeod NR, O'Neill MA (2009) Kinetic stability of the flavin semiquinone in photolyase and cryptochrome-DASH. *Biochemistry* 48:11399–11411. doi:10.1021/bi901371s

Literatur

- Damiani MJ, Nostedt JJ, O'Neill MA (2011) Impact of the N5-proximal Asn on the thermodynamic and kinetic stability of the semiquinone radical in photolyase. *The Journal of biological chemistry* 286:4382–4391. doi:10.1074/jbc.M110.194696
- Deisseroth K, Hegemann P (2017) The form and function of channelrhodopsin. *Science (New York, N.Y.)* 357. doi:10.1126/science.aan5544
- Depauw FA, Rogato A, Ribera d'Alcalá M, Falciatore A (2012) Exploring the molecular basis of responses to light in marine diatoms. *Journal of experimental botany* 63:1575–1591. doi:10.1093/jxb/ers005
- Dissel S, Codd V, Fedic R, Garner KJ, Costa R, Kyriacou CP, Rosato E (2004) A constitutively active cryptochrome in *Drosophila melanogaster*. *Nature neuroscience* 7:834–840. doi:10.1038/nn1285
- Dröge-Laser W, Snoek BL, Snel B, Weiste C (2018) The Arabidopsis bZIP transcription factor family—an update. *Current opinion in plant biology* 45:36–49. doi:10.1016/j.pbi.2018.05.001
- Duanmu D, Bachy C, Sudek S, Wong C-H, Jiménez V, Rockwell NC, Martin SS, Ngan CY, Reistetter EN, van Baren MJ, Price DC, Wei C-L, Reyes-Prieto A, Lagarias JC, Worden AZ (2014) Marine algae and land plants share conserved phytochrome signaling systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:15827–15832. doi:10.1073/pnas.1416751111
- Duanmu D, Rockwell NC, Lagarias JC (2017) Algal light sensing and photoacclimation in aquatic environments. *Plant, cell & environment* 40:2558–2570. doi:10.1111/pce.12943
- Eide EJ, Vielhaber EL, Hinz WA, Virshup DM (2002) The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase Iε. *The Journal of biological chemistry* 277:17248–17254. doi:10.1074/jbc.M111466200
- El-Esawi M, Glascoe A, Engle D, Ritz T, Link J, Ahmad M (2015) Cellular metabolites modulate in vivo signaling of Arabidopsis cryptochrome-1. *Plant signaling & behavior* 10:e1063758. doi:10.1080/15592324.2015.1063758
- Emery P, So W, 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* 95:669–679. doi:10.1016/S0092-8674(00)81637-2
- Engelhard C, Wang X, Robles D, Moldt J, Essen L-O, Batschauer A, Bittl R, Ahmad M (2014) Cellular metabolites enhance the light sensitivity of Arabidopsis cryptochrome through alternate electron transfer pathways. *The Plant Cell* 26:4519–4531. doi:10.1105/tpc.114.129809
- Ernst OP, Lodowski DT, Elstner M, Hegemann P, Brown LS, Kandori H (2014) Microbial and animal rhodopsins: structures, functions, and molecular mechanisms. *Chemical reviews* 114:126–163. doi:10.1021/cr4003769
- Essen L-O, Franz S, Banerjee A (2017) Structural and evolutionary aspects of algal blue light receptors of the cryptochrome and aureochrome type. *Journal of plant physiology* 217:27–37. doi:10.1016/j.jplph.2017.07.005
- Falciatore, Casotti, Leblanc, Abrescia, Bowler (1999) Transformation of Nonselectable Reporter Genes in Marine Diatoms. *Marine biotechnology (New York, N.Y.)* 1:239–251. doi:10.1007/pl00011773
- Falciatore A, Mock T (Hrsg) (2022) *The Molecular Life of Diatoms*. Springer International Publishing AG, Cham
- Falciatore A, Jaubert M, Bouly J-P, Bailleul B, Mock T (2020) Diatom Molecular Research Comes of Age: Model Species for Studying Phytoplankton Biology and Diversity. *The Plant Cell* 32:547–572. doi:10.1105/tpc.19.00158

Literatur

- Falkowski, Barber, Smetacek (1998) Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production. *Science (New York, N.Y.)* 281:200–207. doi:10.1126/science.281.5374.200
- Ferguson LN, Branch GEK (1944) Absorption Spectra of Some Linear Conjugated Systems. *J. Am. Chem. Soc.* 66:1467–1475. doi:10.1021/ja01237a016
- Fontana A, Laureto PP de, Spolaore B, Frare E, Picotti P, Zambonin M (2004) Probing protein structure by limited proteolysis. *Acta biochimica Polonica* 51:299–321. doi:Review
- Fortunato AE, Annunziata R, Jaubert M, Bouly J-P, Falciatore A (2015) Dealing with light: the widespread and multitasking cryptochrome/photolyase family in photosynthetic organisms. *Journal of plant physiology* 172:42–54. doi:10.1016/j.jplph.2014.06.011
- Fortunato AE, Jaubert M, Enomoto G, Bouly J-P, Raniello R, Thaler M, Malviya S, Bernardes JS, Rappaport F, Gentili B, Huysman MJJ, Carbone A, Bowler C, d'Alcalà MR, Ikeuchi M, Falciatore A (2016) Diatom Phytochromes Reveal the Existence of Far-Red-Light-Based Sensing in the Ocean. *The Plant Cell* 28:616–628. doi:10.1105/tpc.15.00928
- Franz S, Ignatz E, Wenzel S, Zielosko H, Putu EPGN, Maestre-Reyna M, Tsai M-D, Yamamoto J, Mittag M, Essen L-O (2018) Structure of the bifunctional cryptochrome aCRY from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nucleic acids research* 46:8010–8022. doi:10.1093/nar/gky621
- Franz-Badur S, Penner A, Straß S, Horsten S von, Linne U, Essen L-O (2019) Structural changes within the bifunctional cryptochrome/photolyase CraCRY upon blue light excitation. *Scientific reports* 9:9896. doi:10.1038/s41598-019-45885-7
- Fribourgh JL, Srivastava A, Sandate CR, Michael AK, Hsu PL, Rakers C, Nguyen LT, Torgrimson MR, Parico GCG, Tripathi S, Zheng N, Lander GC, Hirota T, Tama F, Partch CL (2020) Dynamics at the serine loop underlie differential affinity of cryptochromes for CLOCK:BMAL1 to control circadian timing. *eLife* 9. doi:10.7554/eLife.55275
- Fu C, Donovan WP, Shikapwashya-Hasser O, Ye X, Cole RH (2014) Hot Fusion: an efficient method to clone multiple DNA fragments as well as inverted repeats without ligase. *PloS one* 9:e115318. doi:10.1371/journal.pone.0115318
- Fujihashi M, Numoto N, Kobayashi Y, Mizushima A, Tsujimura M, Nakamura A, Kawarabayasi Y, Miki K (2007) Crystal structure of archaeal photolyase from *Sulfolobus tokodaii* with two FAD molecules: implication of a novel light-harvesting cofactor. *Journal of molecular biology* 365:903–910. doi:10.1016/j.jmb.2006.10.012
- Gallagher SR, Desjardins PR (2006) Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Current protocols in molecular biology Appendix 3:Appendix 3D*. doi:10.1002/0471142727.mba03ds76
- Ganguly A, Manahan CC, Top D, Yee EF, Lin C, Young MW, Thiel W, Crane BR (2016) Changes in active site histidine hydrogen bonding trigger cryptochrome activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113:10073–10078. doi:10.1073/pnas.1606610113
- Gao J, Wang X, Zhang M, Bian M, Deng W, Zuo Z, Yang Z, Zhong D, Lin C (2015) Trp triad-dependent rapid photoreduction is not required for the function of Arabidopsis CRY1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112:9135–9140. doi:10.1073/pnas.1504404112
- Gauden M, van Stokkum IHM, Key JM, Lührs DC, van Grondelle R, Hegemann P, Kennis JTM (2006) Hydrogen-bond switching through a radical pair mechanism in a flavin-binding photoreceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:10895–10900. doi:10.1073/pnas.0600720103

- Geegar RJ, Casselman A, Waddell S, Reppert SM (2008) Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity in *Drosophila*. *Nature* 454:1014–1018. doi:10.1038/nature07183
- Geisselbrecht Y, Frühwirth S, Schroeder C, Pierik AJ, Klug G, Essen L-O (2012) CryB from *Rhodobacter sphaeroides*: a unique class of cryptochromes with new cofactors. *EMBO reports* 13:223–229. doi:10.1038/embor.2012.2
- Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, Weitz CJ (1998) Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science (New York, N.Y.)* 280:1564–1569. doi:10.1126/science.280.5369.1564
- Gindt YM, Schelvis JPM, Thoren KL, Huang TH (2005) Substrate binding modulates the reduction potential of DNA photolyase. *J. Am. Chem. Soc.* 127:10472–10473. doi:10.1021/ja051441r
- Gindt YM, Messyas A, Jumbo PI (2015) Binding of Substrate Locks the Electrochemistry of CRY-DASH into DNA Repair. *Biochemistry* 54:2802–2805. doi:10.1021/acs.biochem.5b00307
- Gindt YM, Connolly G, Vonder Haar AL, Kikhwa M, Schelvis JPM (2021) Investigation of the pH-dependence of the oxidation of FAD in VcCRY-1, a member of the cryptochrome-DASH family. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 20:831–841. doi:10.1007/s43630-021-00063-5
- Giovani B, Byrdin M, Ahmad M, Brettel K (2003) Light-induced electron transfer in a cryptochrome blue-light photoreceptor. *Nature structural biology* 10:489–490. doi:10.1038/nsb933
- Go Y-M, Jones DP (2010) Redox control systems in the nucleus: mechanisms and functions. *Antioxidants & redox signaling* 13:489–509. doi:10.1089/ars.2009.3021
- Göbel T, Reisbacher S, Batschauer A, Pokorny R (2017) Flavin Adenine Dinucleotide and N5 ,N10 -Methenyltetrahydrofolate are the in planta Cofactors of *Arabidopsis thaliana* Cryptochrome 3. *Photochemistry and photobiology* 93:355–362. doi:10.1111/php.12622
- Goett-Zink L, Kottke T (2021) Plant Cryptochromes Illuminated: A Spectroscopic Perspective on the Mechanism. *Frontiers in chemistry* 9:780199. doi:10.3389/fchem.2021.780199
- Goett-Zink L, Toschke AL, Petersen J, Mittag M, Kottke T (2021) C-Terminal Extension of a Plant Cryptochrome Dissociates from the β -Sheet of the Flavin-Binding Domain. *The journal of physical chemistry letters* 12:5558–5563. doi:10.1021/acs.jpcllett.1c00844
- Griffin EA, Staknis D, Weitz CJ (1999) Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science (New York, N.Y.)* 286:768–771. doi:10.1126/science.286.5440.768
- Grote M, Engelhard M, Hegemann P (2014) Of ion pumps, sensors and channels - perspectives on microbial rhodopsins between science and history. *Biochimica et biophysica acta* 1837:533–545. doi:10.1016/j.bbabi.2013.08.006
- Gundermann K, Büchel C (2014) Structure and Functional Heterogeneity of Fucoxanthin-Chlorophyll Proteins in Diatoms. In: Hohmann-Marriott MF (Hrsg) *The Structural Basis of Biological Energy Generation*. Springer Netherlands; Imprint; Springer, Dordrecht, S 21–37
- Guo H, Duong H, Ma N, Lin C (1999) The *Arabidopsis* blue light receptor cryptochrome 2 is a nuclear protein regulated by a blue light-dependent post-transcriptional mechanism. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 19:279–287. doi:10.1046/j.1365-313x.1999.00525.x

Literatur

- 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* 280:31714–31721. doi:10.1074/jbc.M506225200
- Hegemann P (2008) Algal sensory photoreceptors. *Annual review of plant biology* 59:167–189. doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092847
- Heijde M, Zabulon G, Corellou F, Ishikawa T, Brazard J, Usman A, Sanchez F, Plaza P, Martin M, Falciatore A, Todo T, Bouget F-Y, Bowler C (2010) Characterization of two members of the cryptochrome/photolyase family from *Ostreococcus tauri* provides insights into the origin and evolution of cryptochromes. *Plant, cell & environment* 33:1614–1626. doi:10.1111/j.1365-3040.2010.02168.x
- Heintz U, Schlichting I (2016) Blue light-induced LOV domain dimerization enhances the affinity of Aureochrome 1a for its target DNA sequence. *eLife* 5:e11860. doi:10.7554/eLife.11860
- 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* 290:1743–1751. doi:10.1074/jbc.M114.606327
- Herbel V, Orth C, Wenzel R, Ahmad M, Bittl R, Batschauer A (2013) Lifetimes of Arabidopsis cryptochrome signaling states in vivo. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 74:583–592. doi:10.1111/tpj.12144
- Hirano A, Kurabayashi N, Nakagawa T, Shioi G, Todo T, Hirota T, Fukada Y (2014) In vivo role of phosphorylation of cryptochrome 2 in the mouse circadian clock. *Molecular and cellular biology* 34:4464–4473. doi:10.1128/MCB.00711-14
- Hirayama J, Nakamura H, Ishikawa T, Kobayashi Y, Todo T (2003) Functional and structural analyses of cryptochrome. Vertebrate CRY regions responsible for interaction with the CLOCK:BMAL1 heterodimer and its nuclear localization. *The Journal of biological chemistry* 278:35620–35628. doi:10.1074/jbc.M305028200
- Hitomi K, DiTacchio L, Arvai AS, Yamamoto J, Kim S-T, Todo T, Tainer JA, Iwai S, Panda S, Getzoff ED (2009) Functional motifs in the (6-4) photolyase crystal structure make a comparative framework for DNA repair photolyases and clock cryptochromes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:6962–6967. doi:10.1073/pnas.0809180106
- Hoang N, Bouly J-P, Ahmad M (2008a) Evidence of a light-sensing role for folate in Arabidopsis cryptochrome blue-light receptors. *Molecular plant* 1:68–74. doi:10.1093/mp/ssm008
- Hoang N, Schleicher E, Kacprzak S, Bouly J-P, Picot M, Wu W, Berndt A, Wolf E, Bittl R, Ahmad M (2008b) Human and Drosophila cryptochromes are light activated by flavin photoreduction in living cells. *PLoS biology* 6:e160. doi:10.1371/journal.pbio.0060160
- Hogenesch JB, Gu YZ, Jain S, Bradfield CA (1998) The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:5474–5479. doi:10.1073/pnas.95.10.5474
- Holub D, Kubař T, Mast T, Elstner M, Gillet N (2019) What accounts for the different functions in photolyases and cryptochromes: a computational study of proton transfers to FAD. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 21:11956–11966. doi:10.1039/c9cp00694j
- Hopes A, Mock T (2005-2010) Evolution of Microalgae and Their Adaptations in Different Marine Ecosystems. In: John Wiley & Sons L (Hrsg) *Encyclopedia of life sciences*. John Wiley & Sons, London, New York, S 1–9

- Huang K, Beck CF (2003) Phototropin is the blue-light receptor that controls multiple steps in the sexual life cycle of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:6269–6274. doi:10.1073/pnas.0931459100
- Huang Y, Baxter R, Smith BS, Partch CL, Colbert CL, Deisenhofer J (2006) Crystal structure of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana* and its implications for photolyase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:17701–17706. doi:10.1073/pnas.0608554103
- Huq E, Al-Sady B, Quail PH (2003) Nuclear translocation of the photoreceptor phytochrome B is necessary for its biological function in seedling photomorphogenesis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 35:660–664. doi:10.1046/j.1365-313x.2003.01836.x
- Huysman MJJ, 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, Veylder L de (2013) AUREOCHROME1a-mediated induction of the diatom-specific cyclin dsCYC2 controls the onset of cell division in diatoms (*Phaeodactylum tricornutum*). *The Plant Cell* 25:215–228. doi:10.1105/tpc.112.106377
- Iakoucheva LM, Radivojac P, Brown CJ, O'Connor TR, Sikes JG, Obradovic Z, Dunker AK (2004) The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic acids research* 32:1037–1049. doi:10.1093/nar/gkh253
- 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* 282:21720–21728. doi:10.1074/jbc.M700849200
- 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* 114:17155–17161. doi:10.1021/jp1076388
- Immeln D, Weigel A, Kottke T, Pérez Lustres JL (2012) Primary events in the blue light sensor plant cryptochrome: intraprotein electron and proton transfer revealed by femtosecond spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* 134:12536–12546. doi:10.1021/ja302121z
- Inoue K, Tsukamoto T, Sudo Y (2014) Molecular and evolutionary aspects of microbial sensory rhodopsins. *Biochimica et biophysica acta* 1837:562–577. doi:10.1016/j.bbabi.2013.05.005
- Ito S, Song YH, Imaizumi T (2012) LOV domain-containing F-box proteins: light-dependent protein degradation modules in *Arabidopsis*. *Molecular plant* 5:573–582. doi:10.1093/mp/sss013
- Jäger S (2013) Localisation of Cryptochrome P in *Phaeodactylum tricornutum*. Masterarbeit, Frankfurt/M.
- Jaubert M, Bouly J-P, Ribera d'Alcalà M, Falciatore A (2017) Light sensing and responses in marine microalgae. *Current opinion in plant biology* 37:70–77. doi:10.1016/j.pbi.2017.03.005
- 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* 85:2046–2050. doi:10.1073/pnas.85.7.2046
- Jorns MS, Wang B, Jordan SP (1987) DNA repair catalyzed by *Escherichia coli* DNA photolyase containing only reduced flavin: elimination of the enzyme's second chromophore by reduction with sodium borohydride. *Biochemistry* 26:6810–6816. doi:10.1021/bi00395a034

Literatur

- Jorns MS, Wang BY, Jordan SP, Chanderkar LP (1990) Chromophore function and interaction in *Escherichia coli* DNA photolyase: reconstitution of the apoenzyme with pterin and/or flavin derivatives. *Biochemistry* 29:552–561. doi:10.1021/bi00454a032
- Juhas M (2015) Der Einfluss eines potentiellen Cryptochroms auf die lichtabhängige Expressionsregulation der Lichtsammelproteine in *Phaeodactylum tricornutum*. Dissertation, Frankfurt/ M.
- Juhas M, Zadow A von, 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. *The FEBS journal* 281:2299–2311. doi:10.1111/febs.12782
- Jungandreas A, Schellenberger Costa B, Jakob T, Bergen M von, 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. *PloS one* 9:e99727. doi:10.1371/journal.pone.0099727
- Kanai S, Kikuno R, Toh H, Ryo H, Todo T (1997) Molecular evolution of the photolyase-blue-light photoreceptor family. *Journal of molecular evolution* 45:535–548. doi:10.1007/pl00006258
- Kang C-Y, Lian H-L, Wang F-F, Huang J-R, Yang H-Q (2009) Cryptochromes, phytochromes, and COP1 regulate light-controlled stomatal development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21:2624–2641. doi:10.1105/tpc.109.069765
- Kao Y-T, Tan C, Song S-H, Oztürk N, Li J, Wang L, Sancar A, Zhong D (2008a) Ultrafast dynamics and anionic active states of the flavin cofactor in cryptochrome and photolyase. *Journal of the American Chemical Society* 130:7695–7701. doi:10.1021/ja801152h
- Kao Y-T, Saxena C, He T-F, Guo L, Wang L, Sancar A, Zhong D (2008b) Ultrafast dynamics of flavins in five redox states. *J. Am. Chem. Soc.* 130:13132–13139. doi:10.1021/ja8045469
- Karas BJ, Diner RE, Lefebvre SC, McQuaid J, Phillips APR, Noddings CM, Brunson JK, Valas RE, Deerinck TJ, Jablanovic J, Gillard JTF, Beerli K, Ellisman MH, Glass JI, Hutchison CA, Smith HO, Venter JC, Allen AE, Dupont CL, Weyman PD (2015) Designer diatom episomes delivered by bacterial conjugation. *Nature communications* 6:6925. doi:10.1038/ncomms7925
- Karki N, Vergish S, Zoltowski BD (2021) Cryptochromes: Photochemical and structural insight into magnetoreception. *Protein science : a publication of the Protein Society* 30:1521–1534. doi:10.1002/pro.4124
- Kavakli IH, Sancar A (2004) Analysis of the role of intraprotein electron transfer in photoreactivation by DNA photolyase in vivo. *Biochemistry* 43:15103–15110. doi:10.1021/bi0478796
- Kavakli IH, Baris I, Tardu M, Gül Ş, Öner H, Çal S, Bulut S, Yarpavar D, Berkel Ç, Ustaoglu P, Aydın C (2017) The Photolyase/Cryptochrome Family of Proteins as DNA Repair Enzymes and Transcriptional Repressors. *Photochemistry and photobiology* 93:93–103. doi:10.1111/php.12669
- Keesler GA, Camacho F, Guo Y, Virshup D, Mondadori C, Yao Z (2000) Phosphorylation and destabilization of human period I clock protein by human casein kinase I epsilon. *Neuroreport* 11:951–955. doi:10.1097/00001756-200004070-00011
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols* 10:845–858. doi:10.1038/nprot.2015.053
- Kerruth S, Ataka K, Frey D, Schlichting I, Heberle J (2014) Aureochrome 1 illuminated: structural changes of a transcription factor probed by molecular spectroscopy. *PloS one* 9:e103307. doi:10.1371/journal.pone.0103307

Literatur

- Kim W-Y, Fujiwara S, Suh S-S, Kim J, Kim Y, Han L, David K, Putterill J, Nam HG, Somers DE (2007) ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature* 449:356–360. doi:10.1038/nature06132
- Kim ST, Heelis PF, Sancar A (1992) Energy transfer (deazaflavin--FADH₂) and electron transfer (FADH₂-T < T) kinetics in *Anacystis nidulans* photolyase. *Biochemistry* 31:11244–11248. doi:10.1021/bi00160a040
- Kiontke S, Geisselbrecht Y, Pokorny R, Carell T, Batschauer A, Essen L-O (2011) Crystal structures of an archaeal class II DNA photolyase and its complex with UV-damaged duplex DNA. *The EMBO journal* 30:4437–4449. doi:10.1038/emboj.2011.313
- Kiontke S, Göbel T, Brych A, Batschauer A (2020) DASH-type cryptochromes - solved and open questions. *Biological chemistry* 401:1487–1493. doi:10.1515/hsz-2020-0182
- Kira N, Ohnishi K, Miyagawa-Yamaguchi A, Kadono T, Adachi M (2016) Nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* using PCR-amplified DNA fragments by microparticle bombardment. *Marine genomics* 25:49–56. doi:10.1016/j.margen.2015.12.004
- Kirk JTO (2011) *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, New York
- Klar T, Pokorny R, Moldt J, Batschauer A, Essen L-O (2007) Cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*: structural and functional analysis of its complex with a folate light antenna. *Journal of molecular biology* 366:954–964. doi:10.1016/j.jmb.2006.11.066
- Kleine T, Lockhart P, Batschauer A (2003) An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 35:93–103. doi:10.1046/j.1365-313x.2003.01787.x
- Kleiner O, Kircher S, Harter K, Batschauer A (1999) Nuclear localization of the *Arabidopsis* blue light receptor cryptochrome 2. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 19:289–296. doi:10.1046/j.1365-313x.1999.00535.x
- Koh K, Zheng X, Sehgal A (2006) JETLAG resets the *Drosophila* circadian clock by promoting light-induced degradation of TIMELESS. *Science (New York, N.Y.)* 312:1809–1812. doi:10.1126/science.1124951
- Kondoh M, Shiraiishi 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* 413:128–137. doi:10.1016/j.jmb.2011.08.031
- König S (2016) Untersuchungen zur Wirkweise des pflanzenähnlichen Untersuchungen zur Wirkungsweise des pflanzenähnlichen Cryptochroms CryP im Modellorganismus *Phaeodactylum tricornutum*. Dissertation, Frankfurt/ M.
- König S, Eisenhut M, Bräutigam A, Kurz S, Weber APM, Büchel C (2017) The Influence of a Cryptochrome on the Gene Expression Profile in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum* under Blue Light and in Darkness. *Plant & cell physiology* 58:1914–1923. doi:10.1093/pcp/pcx127
- Kottke T, Batschauer A, Ahmad M, Heberle J (2006) Blue-light-induced changes in *Arabidopsis* cryptochrome 1 probed by FTIR difference spectroscopy. *Biochemistry* 45:2472–2479. doi:10.1021/bi051964b
- Kottke T, Xie A, Larsen DS, Hoff WD (2018) Photoreceptors Take Charge: Emerging Principles for Light Sensing. *Annual review of biophysics* 47:291–313. doi:10.1146/annurev-biophys-070317-033047

Literatur

- Krischer J, König S, Weisheit W, Mittag M, Büchel C (2022) The C-terminus of a diatom plant-like cryptochrome influences the FAD redox state and binding of interaction partners. *Journal of experimental botany* 73:1934–1948. doi:10.1093/jxb/erac012
- Kritsky MS, Telegina TA, Vechtomova YL, Kolesnikov MP, Lyudnikova TA, Golub OA (2010) Excited flavin and pterin coenzyme molecules in evolution. *Biochemistry. Biokhimiia* 75:1200–1216. doi:10.1134/s0006297910100020
- Kroth PG, Wilhelm C, Kottke T (2017) An update on aureochromes: Phylogeny - mechanism - function. *Journal of plant physiology* 217:20–26. doi:10.1016/j.jplph.2017.06.010
- Kuczynska P, Jemiola-Rzeminska M, Strzalka K (2015) Photosynthetic Pigments in Diatoms. *Marine drugs* 13:5847–5881. doi:10.3390/md13095847
- Kurabayashi N, Hirota T, Sakai M, Sanada K, Fukada Y (2010) DYRK1A and glycogen synthase kinase 3beta, a dual-kinase mechanism directing proteasomal degradation of CRY2 for circadian timekeeping. *Molecular and cellular biology* 30:1757–1768. doi:10.1128/MCB.01047-09
- Kutta RJ, Archipowa N, Johannissen LO, Jones AR, Scrutton NS (2017) Vertebrate Cryptochromes are Vestigial Flavoproteins. *Scientific reports* 7:44906. doi:10.1038/srep44906
- Kutta RJ, Archipowa N, Scrutton NS (2018) The sacrificial inactivation of the blue-light photosensor cryptochrome from *Drosophila melanogaster*. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 20:28767–28776. doi:10.1039/c8cp04671a
- Lacombat F, Espagne A, Dozova N, Plaza P, Müller P, Brettel K, Franz-Badur S, Essen L-O (2019) Ultrafast Oxidation of a Tyrosine by Proton-Coupled Electron Transfer Promotes Light Activation of an Animal-like Cryptochrome. *Journal of the American Chemical Society* 141:13394–13409. doi:10.1021/jacs.9b03680
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685. doi:10.1038/227680a0
- 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* 131:14274–14280. doi:10.1021/ja901628y
- Langmesser S, Tallone T, Bordon A, Rusconi S, Albrecht U (2008) Interaction of circadian clock proteins PER2 and CRY with BMAL1 and CLOCK. *BMC Molecular Biology* 9:41. doi:10.1186/1471-2199-9-41
- Lee C, Etchegaray J-P, Cagampang FR, Loudon AS, Reppert SM (2001) Posttranslational Mechanisms Regulate the Mammalian Circadian Clock. *Cell* 107:855–867. doi:10.1016/S0092-8674(01)00610-9
- Li J, Uchida T, Ohta T, Todo T, Kitagawa T (2006) Characteristic structure and environment in FAD cofactor of (6-4) photolyase along function revealed by resonance Raman spectroscopy. *The journal of physical chemistry. B* 110:16724–16732. doi:10.1021/jp062998b
- Li X, Wang Q, Yu X, Liu H, Yang H, Zhao C, Liu X, Tan C, Klejnot J, Zhong D, Lin C (2011) Arabidopsis cryptochrome 2 (CRY2) functions by the photoactivation mechanism distinct from the tryptophan (trp) triad-dependent photoreduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:20844–20849. doi:10.1073/pnas.1114579108
- Li F-W, Rothfels CJ, Melkonian M, Villarreal JC, Stevenson DW, Graham SW, Wong GK-S, Mathews S, Pryer KM (2015) The origin and evolution of phototropins. *Frontiers in plant science* 6:637. doi:10.3389/fpls.2015.00637

- 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* 30:6322–6329. doi:10.1021/bi00239a034
- Lin C, Yang H, Guo H, 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 Sciences of the United States of America* 95:2686–2690. doi:10.1073/pnas.95.5.2686
- Lin C, Top D, Manahan CC, Young MW, Crane BR (2018) Circadian clock activity of cryptochrome relies on tryptophan-mediated photoreduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115:3822–3827. doi:10.1073/pnas.1719376115
- Lin C, Schneps CM, Chandrasekaran S, Ganguly A, Crane BR (2022) Mechanistic insight into light-dependent recognition of Timeless by Drosophila Cryptochrome. *Structure (London, England : 1993)* 30:851-861.e5. doi:10.1016/j.str.2022.03.010
- Lin FJ, Song W, Meyer-Bernstein E, Naidoo N, Sehgal A (2001) Photic signaling by cryptochrome in the Drosophila circadian system. *Molecular and cellular biology* 21:7287–7294. doi:10.1128/MCB.21.21.7287-7294.2001
- Liu B, Liu H, Zhong D, Lin C (2010) Searching for a photocycle of the cryptochrome photoreceptors. *Current opinion in plant biology* 13:578–586. doi:10.1016/j.pbi.2010.09.005
- Liu B, Zuo Z, Liu H, Liu X, Lin C (2011a) Arabidopsis cryptochrome 1 interacts with SPA1 to suppress COP1 activity in response to blue light. *Genes & development* 25:1029–1034. doi:10.1101/gad.2025011
- Liu H, Liu B, Zhao C, Pepper M, Lin C (2011b) The action mechanisms of plant cryptochromes. *Trends in plant science* 16:684–691. doi:10.1016/j.tplants.2011.09.002
- Liu Z, Tan C, Guo X, Li J, Wang L, Sancar A, Zhong D (2013) Determining complete electron flow in the cofactor photoreduction of oxidized photolyase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:12966–12971. doi:10.1073/pnas.1311073110
- Liu Q, Wang Q, Liu B, Wang W, Wang X, Park J, Yang Z, Du X, Bian M, Lin C (2016) The Blue Light-Dependent Polyubiquitination and Degradation of Arabidopsis Cryptochrome2 Requires Multiple E3 Ubiquitin Ligases. *Plant & cell physiology* 57:2175–2186. doi:10.1093/pcp/pcw134
- Liu Q, Wang Q, Deng W, Wang X, Piao M, Cai D, Li Y, Barshop WD, Yu X, Zhou T, Liu B, Oka Y, Wohlschlegel J, Zuo Z, Lin C (2017) Molecular basis for blue light-dependent phosphorylation of Arabidopsis cryptochrome 2. *Nature communications* 8:15234. doi:10.1038/ncomms15234
- Liu Q, Su T, He W, Ren H, Liu S, Chen Y, Gao L, Hu X, Lu H, Cao S, Huang Y, Wang X, Wang Q, Lin C (2020) Photooligomerization Determines Photosensitivity and Photoreactivity of Plant Cryptochromes. *Molecular plant* 13:398–413. doi:10.1016/j.molp.2020.01.002
- Lopez L, Fasano C, Perrella G, Facella P (2021) Cryptochromes and the Circadian Clock: The Story of a Very Complex Relationship in a Spinning World. *Genes* 12. doi:10.3390/genes12050672
- Losi A (2007) Flavin-based Blue-Light photosensors: a photobiophysics update. *Photochemistry and photobiology* 83:1283–1300. doi:10.1111/j.1751-1097.2007.00196.x
- Losi A, Gärtner W (2011) Old chromophores, new photoactivation paradigms, trendy applications: flavins in blue light-sensing photoreceptors. *Photochemistry and photobiology* 87:491–510. doi:10.1111/j.1751-1097.2011.00913.x

Literatur

- Ma L, Wang X, Guan Z, Wang L, Wang Y, Le Zheng, Gong Z, Shen C, Wang J, Zhang D, Liu Z, Yin P (2020) Structural insights into BIC-mediated inactivation of Arabidopsis cryptochrome 2. *Nature structural & molecular biology* 27:472–479. doi:10.1038/s41594-020-0410-z
- Malhotra K, Kim ST, Walsh C, Sancar A (1992) Roles of FAD and 8-hydroxy-5-deazaflavin chromophores in photoreactivation by *Anacystis nidulans* DNA photolyase. *The Journal of biological chemistry* 267:15406–15411. doi:10.1016/S0021-9258(19)49548-3
- 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* 34:6892–6899. doi:10.1021/bi00020a037
- Mann M, Serif M, Jakob T, Kroth PG, Wilhelm C (2017) PtAUREO1a and PtAUREO1b knockout mutants of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* are blocked in photoacclimation to blue light. *Journal of plant physiology* 217:44–48. doi:10.1016/j.jplph.2017.05.020
- Mao J, Zhang Y-C, Sang Y, Li Q-H, Yang H-Q (2005) From The Cover: A role for Arabidopsis cryptochromes and COP1 in the regulation of stomatal opening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:12270–12275. doi:10.1073/pnas.0501011102
- Martino A de, Meichenin A, Shi J, Pan K, Bowler C (2007) Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) accessions 1. *Journal of Phycology* 43:992–1009. doi:10.1111/j.1529-8817.2007.00384.x
- Martino A de, Bartual A, Willis A, Meichenin A, Villazán B, Maheswari U, Bowler C (2011) Physiological and molecular evidence that environmental changes elicit morphological interconversion in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Protist* 162:462–481. doi:10.1016/j.protis.2011.02.002
- Mehra A, Baker CL, Loros JJ, Dunlap JC (2009) Post-translational modifications in circadian rhythms. *Trends in biochemical sciences* 34:483–490. doi:10.1016/j.tibs.2009.06.006
- Mei Q, Dvornyk V (2015) Evolutionary History of the Photolyase/Cryptochrome Superfamily in Eukaryotes. *PLoS one* 10:e0135940. doi:10.1371/journal.pone.0135940
- Mello CC, Conte D (2004) Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431:338–342. doi:10.1038/nature02872
- Michael AK, Fribourgh JL, van Gelder RN, Partch CL (2017a) Animal Cryptochromes: Divergent Roles in Light Perception, Circadian Timekeeping and Beyond. *Photochemistry and photobiology* 93:128–140. doi:10.1111/php.12677
- Michael AK, Fribourgh JL, Chelliah Y, Sandate CR, Hura GL, Schneidman-Duhovny D, Tripathi SM, Takahashi JS, Partch CL (2017b) Formation of a repressive complex in the mammalian circadian clock is mediated by the secondary pocket of CRY1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114:1560–1565. doi:10.1073/pnas.1615310114
- Miller S, Son YL, Aikawa Y, Makino E, Nagai Y, Srivastava A, Oshima T, Sugiyama A, Hara A, Abe K, Hirata K, Oishi S, Hagihara S, Sato A, Tama F, Itami K, Kay SA, Hatori M, Hirota T (2020) Isoform-selective regulation of mammalian cryptochromes. *Nature chemical biology* 16:676–685. doi:10.1038/s41589-020-0505-1
- Miyahara M, Aoi M, Inoue-Kashino N, Kashino Y, Ifuku K (2013) Highly efficient transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* by multi-pulse electroporation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 77:874–876. doi:10.1271/bbb.120936

Literatur

- Mockler TC, Guo H, Yang H, Duong H, Lin C (1999) Antagonistic actions of Arabidopsis cryptochromes and phytochrome B in the regulation of floral induction. *Development (Cambridge, England)* 126:2073–2082. doi:10.1242/dev.126.10.2073
- Möglich A, Yang X, Ayers RA, Moffat K (2010) Structure and function of plant photoreceptors. *Annual review of plant biology* 61:21–47. doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112259
- Moldt J, Pokorny R, Orth C, Linne U, Geisselbrecht Y, Marahiel MA, Essen L-O, Batschauer A (2009) Photoreduction of the folate cofactor in members of the photolyase family. *The Journal of biological chemistry* 284:21670–21683. doi:10.1074/jbc.M109.018697
- Montsant A, Jabbari K, Maheswari U, Bowler C (2005) Comparative genomics of the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant physiology* 137:500–513. doi:10.1104/pp.104.052829
- Moustafa A, Beszteri B, Maier UG, Bowler C, Valentin K, Bhattacharya D (2009) Genomic footprints of a cryptic plastid endosymbiosis in diatoms. *Science (New York, N.Y.)* 324:1724–1726. doi:10.1126/science.1172983
- Müller P, Bouly J-P (2015) Searching for the mechanism of signalling by plant photoreceptor cryptochrome. *FEBS letters* 589:189–192. doi:10.1016/j.febslet.2014.12.008
- Müller P, Bouly J-P, Hitomi K, Balland V, Getzoff ED, Ritz T, Brettel K (2014) ATP binding turns plant cryptochrome into an efficient natural photoswitch. *Scientific reports* 4:5175. doi:10.1038/srep05175
- Müller P, Yamamoto J, Martin R, Iwai S, Brettel K (2015) Discovery and functional analysis of a 4th electron-transferring tryptophan conserved exclusively in animal cryptochromes and (6-4) photolyases. *Chemical communications (Cambridge, England)* 51:15502–15505. doi:10.1039/c5cc06276d
- Müller P, Brettel K, Grama L, Nyitrai M, Lukacs A (2016) Photochemistry of Wild-Type and N378D Mutant *E. coli* DNA Photolyase with Oxidized FAD Cofactor Studied by Transient Absorption Spectroscopy. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* 17:1329–1340. doi:10.1002/cphc.201501077
- Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:13940–13945. doi:10.1073/pnas.1936192100
- Nangle SN, Rosensweig C, Koike N, Tei H, Takahashi JS, Green CB, Zheng N (2014) Molecular assembly of the period-cryptochrome circadian transcriptional repressor complex. *eLife* 3:e03674. doi:10.7554/eLife.03674
- Neißner K (2017) Heterologe Expression des Diatomeen-Proteins Cryptochrom P mit einem HA-Tag. Bachelorarbeit, Frankfurt/ M.
- Niu Y-F, Yang Z-K, Zhang M-H, Zhu C-C, Yang W-D, Liu J-S, Li H-Y (2012) Transformation of diatom *Phaeodactylum tricornutum* by electroporation and establishment of inducible selection marker. *BioTechniques* 52. doi:10.2144/000113881
- Nohr D, Franz S, Rodriguez R, Paulus B, Essen L-O, Weber S, Schleicher E (2016) Extended Electron-Transfer in Animal Cryptochromes Mediated by a Tetrad of Aromatic Amino Acids. *Biophysical journal* 111:301–311. doi:10.1016/j.bpj.2016.06.009
- Noordally ZB, Millar AJ (2015) Clocks in algae. *Biochemistry* 54:171–183. doi:10.1021/bi501089x

- Nymark M, Sharma AK, Sparstad T, Bones AM, Winge P (2016) A CRISPR/Cas9 system adapted for gene editing in marine algae. *Scientific reports* 6:24951. doi:10.1038/srep24951
- Okafuji A, Biskup T, Hitomi K, Getzoff ED, Kaiser G, Batschauer A, Bacher A, Hidema J, Teranishi M, Yamamoto K, Schleicher E, Weber S (2010) Light-induced activation of class II cyclobutane pyrimidine dimer photolyases. *DNA repair* 9:495–505. doi:10.1016/j.dnarep.2010.01.014
- 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 (New York, N.Y.)* 286:2531–2534. doi:10.1126/science.286.5449.2531
- Oldemeyer S, Franz S, Wenzel S, Essen L-O, Mittag M, Kottke T (2016) Essential Role of an Unusually Long-lived Tyrosyl Radical in the Response to Red Light of the Animal-like Cryptochrome aCRY. *The Journal of biological chemistry* 291:14062–14071. doi:10.1074/jbc.M116.726976
- Oldemeyer S, Mittag M, Kottke T (2019) Time-Resolved Infrared and Visible Spectroscopy on Cryptochrome aCRY: Basis for Red Light Reception. *Biophysical journal* 117:490–499. doi:10.1016/j.bpj.2019.06.027
- 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. doi:10.1016/j.margen.2014.02.001
- Ozber N, Baris I, Tatlici G, Gur I, Kilinc S, Unal EB, Kavakli IH (2010) Identification of two amino acids in the C-terminal domain of mouse CRY2 essential for PER2 interaction. *BMC Molecular Biology* 11:69. doi:10.1186/1471-2199-11-69
- Ozgür S, Sancar A (2006) Analysis of autophosphorylating kinase activities of Arabidopsis and human cryptochromes. *Biochemistry* 45:13369–13374. doi:10.1021/bi061556n
- Öztürk N, Selby CP, Song S-H, Ye R, Tan C, Kao Y-T, Zhong D, Sancar A (2009) Comparative photochemistry of animal type 1 and type 4 cryptochromes. *Biochemistry* 48:8585–8593. doi:10.1021/bi901043s
- Öztürk N, Selby CP, Annayev Y, Zhong D, Sancar A (2011) Reaction mechanism of *Drosophila* cryptochrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:516–521. doi:10.1073/pnas.1017093108
- Öztürk N, VanVickle-Chavez SJ, Akileswaran L, van Gelder RN, Sancar A (2013) Ramshackle (Brwd3) promotes light-induced ubiquitylation of *Drosophila* Cryptochrome by DDB1-CUL4-ROC1 E3 ligase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:4980–4985. doi:10.1073/pnas.1303234110
- Öztürk N, Selby CP, Zhong D, Sancar A (2014) Mechanism of photosignaling by *Drosophila* cryptochrome: role of the redox status of the flavin chromophore. *The Journal of biological chemistry* 289:4634–4642. doi:10.1074/jbc.M113.542498
- Öztürk N, Song S-H, Selby CP, Sancar A (2008) Animal type 1 cryptochromes. Analysis of the redox state of the flavin cofactor by site-directed mutagenesis. *The Journal of biological chemistry* 283:3256–3263. doi:10.1074/jbc.M708612200
- Palayam M, Ganapathy J, Guercio AM, Tal L, Deck SL, Shabek N (2021) Structural insights into photoactivation of plant Cryptochrome-2. *Communications biology* 4:28. doi:10.1038/s42003-020-01531-x
- Parico GCG, Perez I, Fribourgh JL, Hernandez BN, Lee H-W, Partch CL (2020) The human CRY1 tail controls circadian timing by regulating its association with CLOCK:BMAL1. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America 117:27971–27979. doi:10.1073/pnas.1920653117
- Park HW, Kim ST, Sancar A, Deisenhofer J (1995) Crystal structure of DNA photolyase from *Escherichia coli*. *Science (New York, N.Y.)* 268:1866–1872. doi:10.1126/science.7604260
- Parks MB, Nakov T, Ruck EC, Wickett NJ, Alverson AJ (2018) Phylogenomics reveals an extensive history of genome duplication in diatoms (Bacillariophyta). *American journal of botany* 105:330–347. doi:10.1002/ajb2.1056
- 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* 44:3795–3805. doi:10.1021/bi047545g
- Payne G, Sancar A (1990) Absolute action spectrum of E-FADH2 and E-FADH2-MTHF forms of *Escherichia coli* DNA photolyase. *Biochemistry* 29:7715–7727. doi:10.1021/bi00485a021
- Peschel N, Chen KF, Szabo G, Stanewsky R (2009) Light-dependent interactions between the *Drosophila* circadian clock factors cryptochrome, jetlag, and timeless. *Current biology : CB* 19:241–247. doi:10.1016/j.cub.2008.12.042
- Petersen J, Rredhi A, Szyttenholm J, Oldemeyer S, Kottke T, Mittag M (2021) The World of Algae Reveals a Broad Variety of Cryptochrome Properties and Functions. *Frontiers in plant science* 12:766509. doi:10.3389/fpls.2021.766509
- Petersen J, Rredhi A, Szyttenholm J, Mittag M (2022) Evolution of circadian clocks along the green lineage. *Plant physiology* 190:924–937. doi:10.1093/plphys/kiac141
- Pfeifer A, Mathes T, Lu Y, Hegemann P, Kottke T (2010) Blue light induces global and localized conformational changes in the kinase domain of full-length phototropin. *Biochemistry* 49:1024–1032. doi:10.1021/bi9016044
- Pittendrigh CS (1993) Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annual review of physiology* 55:16–54. doi:10.1146/annurev.ph.55.030193.000313
- Pokorny R, Klar T, Hennecke U, Carell T, Batschauer A, Essen L-O (2008) Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:21023–21027. doi:10.1073/pnas.0805830106
- Procopio M, Link J, Engle D, Witczak J, Ritz T, Ahmad M (2016) Kinetic Modeling of the Arabidopsis Cryptochrome Photocycle: FADH(o) Accumulation Correlates with Biological Activity. *Frontiers in plant science* 7:888. doi:10.3389/fpls.2016.00888
- Provasoli L, McLaughlin JJA, Droop MR (1957) The development of artificial media for marine algae. *Archiv für Mikrobiologie* 25:392–428. doi:10.1007/BF00446694
- Radev D (2016) The cryptochrome CryP and its novel interaction partner in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. Masterarbeit, Frankfurt/ M.
- Rastogi A, Vieira FRJ, Deton-Cabanillas A-F, Veluchamy A, Cantrel C, Wang G, Vanormelingen P, Bowler C, Piganeau G, Hu H, Tirichine L (2020) A genomics approach reveals the global genetic polymorphism, structure, and functional diversity of ten accessions of the marine model diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *The ISME journal* 14:347–363. doi:10.1038/s41396-019-0528-3

- Reisdorph NA, Small GD (2004) The CPH1 gene of *Chlamydomonas reinhardtii* encodes two forms of cryptochrome whose levels are controlled by light-induced proteolysis. *Plant physiology* 134:1546–1554. doi:10.1104/pp.103.031930
- Riso V de, Raniello R, Maumus F, Rogato A, Bowler C, Falciatore A (2009) Gene silencing in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Nucleic acids research* 37:e96. doi:10.1093/nar/gkp448
- Rockwell NC, Lagarias JC (2020) Phytochrome evolution in 3D: deletion, duplication, and diversification. *The New phytologist* 225:2283–2300. doi:10.1111/nph.16240
- Rockwell NC, Su Y-S, Lagarias JC (2006) Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annual review of plant biology* 57:837–858. doi:10.1146/annurev.arplant.56.032604.144208
- Rockwell NC, Duanmu D, Martin SS, Bachy C, Price DC, Bhattacharya D, Worden AZ, Lagarias JC (2014) Eukaryotic algal phytochromes span the visible spectrum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:3871–3876. doi:10.1073/pnas.1401871111
- Rosato E, Codd V, Mazzotta G, Piccin A, Zordan M, Costa R, Kyriacou CP (2001) Light-dependent interaction between *Drosophila* CRY and the clock protein PER mediated by the carboxy terminus of CRY. *Current Biology* 11:909–917. doi:10.1016/S0960-9822(01)00259-7
- Rosenbaum DM, Rasmussen SGF, Kobilka BK (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459:356–363. doi:10.1038/nature08144
- Rosenfeldt G, Viana RM, Mootz HD, Arnim AG von, Batschauer A (2008) Chemically induced and light-independent cryptochrome photoreceptor activation. *Molecular plant* 1:4–14. doi:10.1093/mp/ssm002
- Rredhi A, Petersen J, Schubert M, Li W, Oldemeyer S, Li W, Westermann M, Wagner V, Kottke T, Mittag M (2021) DASH cryptochrome 1, a UV-A receptor, balances the photosynthetic machinery of *Chlamydomonas reinhardtii*. *The New phytologist* 232:610–624. doi:10.1111/nph.17603
- Sachse M, Sturm S, Gruber A, Kroth P (2013) Identification and evaluation of endogenous reference genes for steady state transcript quantification by qPCR in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* with constitutive expression independent from time and light. *Journal of Endocytobiosis and Cell Research* 24:1–7
- Sakakida Y, Miyamoto Y, Nagoshi E, Akashi M, Nakamura TJ, Mamine T, Kasahara M, Minami Y, Yoneda Y, Takumi T (2005) Importin alpha/beta mediates nuclear transport of a mammalian circadian clock component, mCRY2, together with mPER2, through a bipartite nuclear localization signal. *Journal of Biological Chemistry* 280:13272–13278. doi:10.1074/jbc.M413236200
- Sakaue K, Harada H, Matsuda Y (2008) Development of gene expression system in a marine diatom using viral promoters of a wide variety of origin. *Physiologia plantarum* 133:59–67. doi:10.1111/j.1399-3054.2008.01089.x
- Salomon M, Christie JM, Knieb E, Lempert U, Briggs WR (2000) Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin. *Biochemistry* 39:9401–9410. doi:10.1021/bi000585
- Sanada K, Harada Y, Sakai M, Todo T, Fukada Y (2004) Serine phosphorylation of mCRY1 and mCRY2 by mitogen-activated protein kinase. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 9:697–708. doi:10.1111/j.1356-9597.2004.00758.x
- Sancar A (2003) Structure and Function of DNA Photolyase and Cryptochrome Blue-Light Photoreceptors. *ChemInform* 34. doi:10.1002/chin.200332276

- Sang Y, Li Q-H, Rubio V, Zhang Y-C, Mao J, Deng X-W, Yang H-Q (2005) N-terminal domain-mediated homodimerization is required for photoreceptor activity of Arabidopsis CRYPTOCHROME 1. *The Plant Cell* 17:1569–1584. doi:10.1105/tpc.104.029645
- Sasso S, Pohnert G, Lohr M, Mittag M, Hertweck C (2012) Microalgae in the postgenomic era: a blooming reservoir for new natural products. *FEMS microbiology reviews* 36:761–785. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00304.x
- Scala S, Carels N, Falciatore A, Chiusano ML, Bowler C (2002) Genome properties of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant physiology* 129:993–1002. doi:10.1104/pp.010713
- Scheerer P, Zhang F, Kalms J, Stetten D von, Krauß N, Oberpichler I, Lamparter T (2015) The class III cyclobutane pyrimidine dimer photolyase structure reveals a new antenna chromophore binding site and alternative photoreduction pathways. *The Journal of biological chemistry* 290:11504–11514. doi:10.1074/jbc.M115.637868
- Schellenberger Costa B, Sachse M, Jungandreas A, Bartulos CR, Gruber A, Jakob T, Kroth PG, Wilhelm C (2013a) Aureochrome 1a is involved in the photoacclimation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PloS one* 8:e74451. doi:10.1371/journal.pone.0074451
- Schellenberger Costa B, Jungandreas A, Jakob T, Weisheit W, Mittag M, Wilhelm C (2013b) Blue light is essential for high light acclimation and photoprotection in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of experimental botany* 64:483–493. doi:10.1093/jxb/ers340
- Schleicher E, Hessling B, Illarionova V, Bacher A, Weber S, Richter G, Gerwert K (2005) Light-induced reactions of *Escherichia coli* DNA photolyase monitored by Fourier transform infrared spectroscopy. *The FEBS journal* 272:1855–1866. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04617.x
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols* 3:1101–1108. doi:10.1038/nprot.2008.73
- Schroeder L, Oldemeyer S, Kottke T (2018) Time-Resolved Infrared Spectroscopy on Plant Cryptochrome-Relevance of Proton Transfer and ATP Binding for Signaling. *The journal of physical chemistry. A* 122:140–147. doi:10.1021/acs.jpca.7b10249
- 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* 103:17696–17700. doi:10.1073/pnas.0607993103
- Seo S, Jeon H, Hwang S, Jin E, Chang KS (2015) Development of a new constitutive expression system for the transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Research* 11:50–54. doi:10.1016/j.algal.2015.05.012
- Serif M, Dubois G, Finoux A-L, Teste M-A, Jallet D, Daboussi F (2018) One-step generation of multiple gene knock-outs in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* by DNA-free genome editing. *Nature communications* 9:3924. doi:10.1038/s41467-018-06378-9
- 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* 417:763–767. doi:10.1038/nature00815
- 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* 15:2421–2429. doi:10.1105/tpc.013011

Literatur

- Shao K, Zhang X, Li X, Hao Y, Huang X, Ma M, Zhang M, Yu F, Liu H, Zhang P (2020) The oligomeric structures of plant cryptochromes. *Nature structural & molecular biology* 27:480–488. doi:10.1038/s41594-020-0420-x
- Sharrock RA, Clack T (2004) Heterodimerization of type II phytochromes in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:11500–11505. doi:10.1073/pnas.0404286101
- Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B, Kume K, Lee CC, van der Horst GT, Hastings MH, Reppert SM (2000) Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science (New York, N.Y.)* 288:1013–1019. doi:10.1126/science.288.5468.1013
- 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* 406:23–35. doi:10.1016/j.gene.2007.05.022
- Slattery SS, Diamond A, Wang H, Therrien JA, Lant JT, Jazey T, Lee K, Klassen Z, Desgagné-Penix I, Karas BJ, Edgell DR (2018) An Expanded Plasmid-Based Genetic Toolbox Enables Cas9 Genome Editing and Stable Maintenance of Synthetic Pathways in *Phaeodactylum tricornutum*. *ACS synthetic biology* 7:328–338. doi:10.1021/acssynbio.7b00191
- Smetacek V (1999) Diatoms and the Ocean Carbon Cycle. *Protist* 150:25–32. doi:10.1016/S1434-4610(99)70006-4
- Sokolowsky K, Newton M, Lucero C, Wertheim B, Freedman J, Cortazar F, Czocho J, Schelvis JPM, Gindt YM (2010) Spectroscopic and thermodynamic comparisons of *Escherichia coli* DNA photolyase and *Vibrio cholerae* cryptochrome 1. *The journal of physical chemistry. B* 114:7121–7130. doi:10.1021/jp102275r
- Sommer C, Dietz MS, Patschkowski T, Mathes T, Kottke T (2017) Light-Induced Conformational Changes in the Plant Cryptochrome Photolyase Homology Region Resolved by Selective Isotope Labeling and Infrared Spectroscopy. *Photochemistry and photobiology* 93:881–887. doi:10.1111/php.12750
- Song S-H, Dick B, Penzkofer A, Pokorny R, Batschauer A, Essen L-O (2006) Absorption and fluorescence spectroscopic characterization of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 85:1–16. doi:10.1016/j.jphotobiol.2006.03.007
- Song S-H, Oztürk N, Denaro TR, Arat NO, Kao Y-T, Zhu H, Zhong D, Reppert SM, Sancar A (2007) Formation and function of flavin anion radical in cryptochrome 1 blue-light photoreceptor of monarch butterfly. *The Journal of biological chemistry* 282:17608–17612. doi:10.1074/jbc.M702874200
- Spexard M, Thöing 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* 53:1041–1050. doi:10.1021/bi401599z
- Stanewsky R (2002) Clock mechanisms in *Drosophila*. *Cell and tissue research* 309:11–26. doi:10.1007/s00441-002-0569-0
- 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* 95:681–692. doi:10.1016/S0092-8674(00)81638-4
- Stukenberg D, Zauner S, Dell'Aquila G, Maier UG (2018) Optimizing CRISPR/Cas9 for the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Frontiers in plant science* 9:740. doi:10.3389/fpls.2018.00740
- 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* 104:19625–19630. doi:10.1073/pnas.0707692104

Takahashi S, Ono M, Uchida A, Nakayama K, Satoh H (2013) Molecular cloning and functional expression of a water-soluble chlorophyll-binding protein from Japanese wild radish. *Journal of plant physiology* 170:406–412. doi:10.1016/j.jplph.2012.10.007

Takase T, Nishiyama Y, Tanihigashi H, Ogura Y, Miyazaki Y, Yamada Y, Kiyosue T (2011) LOV KELCH PROTEIN2 and ZEITLUPE repress Arabidopsis photoperiodic flowering under non-inductive conditions, dependent on FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F-BOX1. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 67:608–621. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04618.x

Takemiya A, Sugiyama N, Fujimoto H, Tsutsumi T, Yamauchi S, Hiyama A, Tada Y, Christie JM, Shimazaki K (2013) Phosphorylation of BLUS1 kinase by phototropins is a primary step in stomatal opening. *Nature communications* 4:2094. doi:10.1038/ncomms3094

Tamada T, Kitadokoro K, Higuchi Y, Inaka K, Yasui A, Rüter PE de, Eker AP, Miki K (1997) Crystal structure of DNA photolyase from *Anacystis nidulans*. *Nature structural biology* 4:887–891. doi:10.1038/nsb1197-887

Tan S-T, Dai C, Liu H-T, Xue H-W (2013) Arabidopsis casein kinase1 proteins CK1.3 and CK1.4 phosphorylate cryptochrome2 to regulate blue light signaling. *The Plant Cell* 25:2618–2632. doi:10.1105/tpc.113.114322

Thöing C, Oldemeyer S, Kottke T (2015) Microsecond Deprotonation of Aspartic Acid and Response of the α/β Subdomain Precede C-Terminal Signaling in the Blue Light Sensor Plant Cryptochrome. *Journal of the American Chemical Society* 137:5990–5999. doi:10.1021/jacs.5b01404

Thompson CL, Sancar A (2002) Photolyase/cryptochrome blue-light photoreceptors use photon energy to repair DNA and reset the circadian clock. *Oncogene* 21:9043–9056. doi:10.1038/sj.onc.1205958

Tirichine L, Bowler C (2011) Decoding algal genomes: tracing back the history of photosynthetic life on Earth. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 66:45–57. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04540.x

Todo T, Kim ST, Hitomi K, Otoshi E, Inui T, Morioka H, Kobayashi H, Ohtsuka E, Toh H, Ikenaga M (1997) Flavin adenine dinucleotide as a chromophore of the *Xenopus* (6-4)photolyase. *Nucleic acids research* 25:764–768. doi:10.1093/nar/25.4.764

Toyooka T, Hisatomi O, Takahashi F, Kataoka H, Terazima M (2011) Photoreactions of aureochrome-1. *Biophysical journal* 100:2801–2809. doi:10.1016/j.bpj.2011.02.043

Trudeau T, Nassar R, Cumberworth A, Wong ETC, Woollard G, Gsponer J (2013) Structure and intrinsic disorder in protein autoinhibition. *Structure (London, England : 1993)* 21:332–341. doi:10.1016/j.str.2012.12.013

Ueda T, Kato A, Kuramitsu S, Terasawa H, Shimada I (2005) Identification and characterization of a second chromophore of DNA photolyase from *Thermus thermophilus* HB27. *Journal of Biological Chemistry* 280:36237–36243. doi:10.1074/jbc.M507972200

Usman A, Brazard J, Martin MM, Plaza P, Heijde M, Zabulon G, Bowler C (2009) Spectroscopic characterization of a (6-4) photolyase from the green alga *Ostreococcus tauri*. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 96:38–48. doi:10.1016/j.jphotobiol.2009.04.003

Vaidya AT, Top D, Manahan CC, Tokuda JM, Zhang S, Pollack L, Young MW, Crane BR (2013) Flavin reduction activates *Drosophila* cryptochrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:20455–20460. doi:10.1073/pnas.1313336110

Literatur

- van der Horst GT, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, Wit J de, Verkerk A, Eker AP, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Yasui A (1999) Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398:627–630. doi:10.1038/19323
- 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* 27:2120–2129. doi:10.1128/MCB.01638-06
- VanVickle-Chavez SJ, van Gelder RN (2007) Action spectrum of *Drosophila* cryptochrome. *The Journal of biological chemistry* 282:10561–10566. doi:10.1074/jbc.M609314200
- Vardi A, Thamatrakoln K, Bidle KD, Falkowski PG (2008) Diatom genomes come of age. *Genome biology* 9:245. doi:10.1186/gb-2008-9-12-245
- Vargas C de, Audic S, Henry N et al (2015) Ocean plankton. Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science (New York, N.Y.)* 348:1261605. doi:10.1126/science.1261605
- Vass I-Z, Kós PB, Knoppová J, Komenda J, Vass I (2014) The cry-DASH cryptochrome encoded by the *sll1629* gene in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 is required for Photosystem II repair. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 130:318–326. doi:10.1016/j.jphotobiol.2013.12.006
- Vechtomova YL, Telegina TA, Kritsky MS (2020) Evolution of Proteins of the DNA Photolyase/Cryptochrome Family. *Biochemistry. Biokhimiia* 85:S131-S153. doi:10.1134/S0006297920140072
- Vielhaber E, Eide E, Rivers A, Gao ZH, Virshup DM (2000) Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon. *Molecular and cellular biology* 20:4888–4899. doi:10.1128/MCB.20.13.4888-4899.2000
- 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* 96:12114–12119. doi:10.1073/pnas.96.21.12114
- Wang H, Ma LG, Li JM, Zhao HY, Deng XW (2001) Direct interaction of *Arabidopsis* cryptochromes with COP1 in light control development. *Science (New York, N.Y.)* 294:154–158. doi:10.1126/science.1063630
- Wang Q, Lin C (2020) Mechanisms of Cryptochrome-Mediated Photoresponses in Plants. *Annual review of plant biology* 71:103–129. doi:10.1146/annurev-arplant-050718-100300
- 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* 8:631–643. doi:10.1016/j.molp.2015.03.005
- Wang Q, Zuo Z, Wang X, Gu L, Yoshizumi T, Yang Z, Yang L, Liu Q, Liu W, Han Y-J, Kim J-I, Liu B, Wohlschlegel JA, Matsui M, Oka Y, Lin C (2016) Photoactivation and inactivation of *Arabidopsis* cryptochrome 2. *Science (New York, N.Y.)* 354:343–347. doi:10.1126/science.aaf9030
- Wang F, Song X, Dong X, Zhang J, Dong C (2017) DASH-type cryptochromes regulate fruiting body development and secondary metabolism differently than CmWC-1 in the fungus *Cordyceps militaris*. *Applied microbiology and biotechnology* 101:4645–4657. doi:10.1007/s00253-017-8276-7
- Wang Y, Veglia G, Zhong D, Gao J (2021) Activation mechanism of *Drosophila* cryptochrome through an allosteric switch. *Science advances* 7. doi:10.1126/sciadv.abg3815

- Wijaya IMM, Zhang Y, Iwata T, Yamamoto J, Hitomi K, Iwai S, Getzoff ED, Kandori H (2013) Detection of distinct α -helical rearrangements of cyclobutane pyrimidine dimer photolyase upon substrate binding by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* 52:1019–1027. doi:10.1021/bi3016179
- 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*. *Journal of Biological Chemistry* 278:39143–39154. doi:10.1074/jbc.M305792200
- Wu G, Spalding EP (2007) Separate functions for nuclear and cytoplasmic cryptochrome 1 during photomorphogenesis of *Arabidopsis* seedlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:18813–18818. doi:10.1073/pnas.0705082104
- Xie W-H, Zhu C-C, Zhang N-S, Li D-W, Yang W-D, Liu J-S, Sathishkumar R, Li H-Y (2014) Construction of novel chloroplast expression vector and development of an efficient transformation system for the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine biotechnology (New York, N.Y.)* 16:538–546. doi:10.1007/s10126-014-9570-3
- Xing W, Busino L, Hinds TR, Marionni ST, Saifee NH, Bush MF, Pagano M, Zheng N (2013) SCF(FBXL3) ubiquitin ligase targets cryptochromes at their cofactor pocket. *Nature* 496:64–68. doi:10.1038/nature11964
- Xu L, Mu W, Ding Y, Luo Z, Han Q, Bi F, Wang Y, Song Q (2008) Active site of *Escherichia coli* DNA photolyase: Asn378 is crucial both for stabilizing the neutral flavin radical cofactor and for DNA repair. *Biochemistry* 47:8736–8743. doi:10.1021/bi800391j
- Xu H, Gustafson CL, Sammons PJ, Khan SK, Parsley NC, Ramanathan C, Lee H-W, Liu AC, Partch CL (2015) Cryptochrome 1 regulates the circadian clock through dynamic interactions with the BMAL1 C terminus. *Nature structural & molecular biology* 22:476–484. doi:10.1038/nsmb.3018
- Xu L, Wen B, Shao W, Yao P, Zheng W, Zhou Z, Zhang Y, Zhu G (2019) Impacts of Cys392, Asp393, and ATP on the FAD Binding, Photoreduction, and the Stability of the Radical State of *Chlamydomonas reinhardtii* Cryptochrome. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 20:940–948. doi:10.1002/cbic.201800660
- Yamada D, Yamamoto J, Zhang Y, Iwata T, Hitomi K, Getzoff ED, Iwai S, Kandori H (2016) Structural Changes of the Active Center during the Photoactivation of *Xenopus* (6-4) Photolyase. *Biochemistry* 55:715–723. doi:10.1021/acs.biochem.5b01111
- Yang H-Q, Wu Y-J, Tang R-H, Liu D, Liu Y, Cashmore AR (2000) The C Termini of *Arabidopsis* Cryptochromes Mediate a Constitutive Light Response. *Cell* 103:815–827. doi:10.1016/S0092-8674(00)00184-7
- Yang HQ, Tang RH, Cashmore AR (2001) The signaling mechanism of *Arabidopsis* CRY1 involves direct interaction with COP1. *The Plant Cell* 13:2573–2587. doi:10.1105/tpc.010367
- Yu X, Klejnot J, Zhao X, Shalitin D, Maymon M, Yang H, Lee J, Liu X, Lopez J, Lin C (2007a) *Arabidopsis* cryptochrome 2 completes its posttranslational life cycle in the nucleus. *The Plant Cell* 19:3146–3156. doi:10.1105/tpc.107.053017
- Yu X, Shalitin D, Liu X, Maymon M, Klejnot J, Yang H, Lopez J, Zhao X, Bendehakalu KT, Lin C (2007b) 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* 104:7289–7294. doi:10.1073/pnas.0701912104

Literatur

- 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* 21:118–130. doi:10.1105/tpc.108.061663
- Zaslavskaja LA, Lippmeier JC, Shih C, Ehrhardt D, Grossman AR, Apt KE (2001) Trophic conversion of an obligate photoautotrophic organism through metabolic engineering. *Science (New York, N.Y.)* 292:2073–2075. doi:10.1126/science.160015
- Zeugner A, Byrdin M, Bouly J-P, Bakrim N, Giovani B, Brettel K, Ahmad M (2005) Light-induced electron transfer in Arabidopsis cryptochrome-1 correlates with in vivo function. *The Journal of biological chemistry* 280:19437–19440. doi:10.1074/jbc.C500077200
- Zhang F, Scheerer P, Oberpichler I, Lamparter T, Krauß N (2013) Crystal structure of a prokaryotic (6-4) photolyase with an Fe-S cluster and a 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine antenna chromophore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:7217–7222. doi:10.1073/pnas.1302377110
- Zhang C, Hu H (2014) High-efficiency nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricorutum* by electroporation. *Marine genomics* 16:63–66. doi:10.1016/j.margen.2013.10.003
- Zhao X, Liu J, Hsu DS, Zhao S, Taylor JS, Sancar A (1997) Reaction mechanism of (6-4) photolyase. *The Journal of biological chemistry* 272:32580–32590. doi:10.1074/jbc.272.51.32580
- Zhu H, Conte F, Green CB (2003) Nuclear localization and transcriptional repression are confined to separable domains in the circadian protein CRYPTOCHROME. *Current biology : CB* 13:1653–1658. doi:10.1016/j.cub.2003.08.033
- Zikihara K, Ishikawa T, Todo T, Tokutomi S (2008) Involvement of electron transfer in the photoreaction of zebrafish Cryptochrome-DASH. *Photochemistry and photobiology* 84:1016–1023. doi:10.1111/j.1751-1097.2007.00364.x
- Zirak P, Penzkofer A, Moldt J, Pokorny R, Batschauer A, Essen L-O (2009) Photocycle dynamics of the E149A mutant of cryptochrome 3 from Arabidopsis thaliana. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 97:94–108. doi:10.1016/j.jphotobiol.2009.08.005
- Zoltowski BD, Vaidya AT, Crane BR (2011) Structure of Full-length Drosophila Cryptochrome
- Zoltowski BD, Gardner KH (2011) Tripping the light fantastic: blue-light photoreceptors as examples of environmentally modulated protein-protein interactions. *Biochemistry* 50:4–16. doi:10.1021/bi101665s
- 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 : CB* 21:841–847. doi:10.1016/j.cub.2011.03.048
- Zuo Z-C, Meng Y-Y, Yu X-H, Zhang Z-L, Feng D-S, Sun S-F, Liu B, Lin C-T (2012) A study of the blue-light-dependent phosphorylation, degradation, and photobody formation of Arabidopsis CRY2. *Molecular plant* 5:726–733. doi:10.1093/mp/sss007

Anhang

Species	6-4 Photolysaeal PCFF1	PlantCRY-like	CyDASH	AUREO1a	AUREO1b	AUREO1c	Protoo- rhodopsin	Heliorhodopsin	DPH
<i>Tp</i> centric	262946	7368	23500, 268988, 35005	33340	20065	37198			22848
<i>To</i> centric	58421.1	58052.1 62994.1	51584.1, 57652.1, 70255.1 ^a , 57807.1	65981.1	47540.1	75561.1			
<i>Cc</i> centric	g1243.t1		g11904.t1, g3306.t1	g18270.t1	g20747.t1	g23579.t1			g17859.t1
<i>Pt</i> pennate	J27429.p1	J54342.p1	J55091.p1, J34592.p1	J8113.p1	J15977.p1	J51933.p1		J43903.p1	J54330.p1
<i>Fc</i> pennate	16032.1	23746.1	18916.1, 15165.1, 21140.1	18451.1	21654.1	06878.1, 17811.1 ^a	10445.1, 23745.1 ^a		
<i>Sr</i> pennate	82_g043740.1	580_g170080.1	147_g068020.1, 2726_g335660.1 ^a	5_g004540.1, 624_g177380.1	1194_g251270.1	971_g226430.1		149_g068360.1, 149_g068370.1	219_g090570.1, 537_g162340.1, 537_g162360.1, 537_g162370.1
<i>Pme</i> pennate	133684	107549, 107549	285541, 190760	172818	294561	202247			
<i>Pmu</i> pennate	36634.1	42420.1, 44083.1	40361.1, 41071.1	?	34876.1, 34877.1 ^a	?			
<i>Fs</i> pennate	14982.1, 23745.1 ^a		14744.1, 19840.1 ^a , 23334.1, 28242.1 ^a	11767.1, 20834.1 ^a	09413.1, 20262.1 ^a	16809.1, 13918.1 ^a			
<i>Sa</i> pennate	19225	1435, 23010	6021	24026, 25403 ^a	24510	?		16855, 16858 ^a	18038, 1907, 1973, 22009, 24689

Abb. A1: Photorezeptoren in Diatomeen. Spezies-Abkürzungen und Quelle der angegebenen Sequenzen: *Tp* Thalassiosira pseudonana, JGI; *To* Thalassiosira oceanica, GenBank; *Cyclotella cryptica*, <http://genomes.mcdb.ucla.edu/Cyclotella/download.html>; *Pt* Phaeodactylum tricornutum, Ensembl Genomes; *Fragilariopsis cylindrus*, GenBank; *Sr* Seminavis robusta, <https://bioinformatics.psb.ugent.be/orcae/overview/Semro>; *Pme* Pseudonitzschia multiseriata, JGI; *Pmu* Pseudonitzschia multistriata, GenBank; *Fs* Fistulifera solaris, GenBank; *Sa* Synedra acus, <http://www.lin.irk.ru/sacus/index.php?r=site/page&view=downloads>. Verändert nach Jaubert et al. in Falciatore und Mock (2022).

DmCRY1-PHR	-----	0
PtCPF1-PHR	-----	0
CraCRY-PHR	-----	0
Dm (6-4) PL	-----MASWSHPQFE-----	10
Xl (6-4) PL	-----	0
DpCRY1-PHR	-----MSVAET---LPLRA-----	11
HsCRY2-PHR	-----MGGVHVAY-----RGGAGVAGAVVTVMAAT-----	25
HsCRY1-PHR	-----	0
MmCRY1-PHR	-----	0
CryP-PHR	-----MSNSDH-----	6
AtCRY3-PHR	MAASSLSLSSPLSNPLRRFTLHHLHLSKPKLSSSSFLCSAAKMNNDHIHRVPALTEEEID	60
DrCRY-DASH	-----	0
SynCRY-DASH	-----	0
EcCPDI	-----	0
AnPL	-----	0
AgtCPDIII	-----	0
CrCPH1-PHR	-----	0
AtCRY1-PHR	-----	0
AtCRY2-PHR	-----	0
DmCRY1-PHR	-----MATRGANVIWFRHGLRLHNDPALLAALADKD---QG-IALI	37
PtCPF1-PHR	-----MAKSEKKHDVAIHWFNGLRFHDNPCLLDACQ-----KS-ESLL	39
CraCRY-PHR	-----MAGVKNSI I WFRKGLRLHNDPALLEACK-----DA-KHVY	34
Dm (6-4) PL	-----KGASTSLYKAGLMDSORSTLVHWFRRKGLRLHNDPALSHI FTAANAAPGR-YFVR	64
Xl (6-4) PL	-----MRHNSIHWFRRKGLRLHNDPALLAAMK-----DC-AELH	32
DpCRY1-PHR	-----RSPTA-QKSSQPAGVPKEKHTVHWFRKGLRLHNDPALREGLV-----DA-TTFR	58
HsCRY2-PHR	-----VATAA-AVAPAPAPGTDASASSVHWFRKGLRLHNDPALLAAVR-----GA-RCVR	72
HsCRY1-PHR	-----MGVNAVHWFRRKGLRLHNDPALKECIQ-----GA-DTIR	32
MmCRY1-PHR	-----MGVNAVHWFRRKGLRLHNDPALKECIQ-----GA-DTIR	32
CryP-PHR	-----GGKQR-ILAPAVDAHLSRPAVVLFGTHDIRIHNEALLACH-----H--NHVL	53
AtCRY3-PHR	SVAIKTFERYALPSSSSVKRKGKGTILWFRNDRVLDNDALYKAWS-----SS-DTIL	113
DrCRY-DASH	-----MSASRTVICLLRNDLRLHNDNEVFHWAQR-----NA-EHII	34
SynCRY-DASH	-----MKHVPTVLVWFRNDRVLDNEPLHRAK-----SG-LAIT	35
EcCPDI	-----MTHLVWFRQDLRLHNDLALAAACR-----NSSARVL	32
AnPL	-----MAAPILFWHRRDLRLSDNIGLAAARA-----QS-AQLI	32
AgtCPDIII	-----MSLKTAPVIVWFRKDLRLSDNLALLAAVE-----HG-GPVI	35
CrCPH1-PHR	-----MPHEFKTAVVWFRDLRVDDNPALVAALA-----AA-PNVI	35
AtCRY1-PHR	-----MSGSVSGCGSGGCSIVWFRDLRVEDNPALAAAVR-----A--GPVI	40
AtCRY2-PHR	-----MKMDKKTIVWFRDLRIEDNPALAAAAH-----E--GSVF	33
: . . . * . * : :		
DmCRY1-PHR	PVFIFDGESAGT-----KNVGYNRMRFLDLSLQDIDDQLQAATDG	77
PtCPF1-PHR	PIYVVDPEFFPA-----QTACRAGTIRANFLESINEVDEKLRKM---	80
CraCRY-PHR	PVFVLDPHFLQ-----SSYKVSVMRYNFLESLEDLQRSFQAR---	73
Dm (6-4) PL	PIFILDPGILDW-----MQVGANRWRFLQQTLELDLNDQLRKL---	101
Xl (6-4) PL	PIFILDPFWPKN-----MQVSVNRWRFLIDALKDLDENLKKI---	69
DpCRY1-PHR	CVFIIDPWFASS-----SNVGINKWRFLLOCLEDLDKNLRKL---	95
HsCRY2-PHR	CVYILDPFWAAS-----SSVGINRWRFLLOCLEDLDTSLRKL---	109
HsCRY1-PHR	CVYILDPFWAGS-----SNVGINRWRFLLOCLELDANLRKL---	69
MmCRY1-PHR	CVYILDPFWAGS-----SNVGINRWRFLLOCLELDANLRKL---	69
CryP-PHR	PVFLWQVPVHH-----WGAR---GALQVVLKEALHQLSLQLSQE---	89
AtCRY3-PHR	PVYCLDPRLFHT-----THFFNFPKTGALRGGFMECLVDRKNNLMKR---	156
DrCRY-DASH	PLYCFDPRHYQG-----TYHYNFPKTGPFRLRFLDLSVKDLRALLKHH---	77
SynCRY-DASH	AVYCYDPRQFAQ-----THQGFAGTGPWRSNFLQOSVQNLAESLQKV---	77
EcCPDI	ALYIATPRQHACRNSSARVLALYIATPRQWATHNMSPRQAEELINAQLNGLQIALAEK---	89
AnPL	GLFCLDPQI-----LQADMAPARVAYLQGCLELQQRYYQA---	69
AgtCPDIII	FVYIREK-----SAGPLGGAQEWLHSLAALSSSLEKA---	69
CrCPH1-PHR	PVFIWAPPE-----EGQFPGRCSRWWWSKHSVLDLQQALAL---	72
AtCRY1-PHR	ALFVWAPPE-----EGHYHPGRVSRWWLKNLSLAQLDSSLRSL---	77
AtCRY2-PHR	PVFIWCPPE-----EGQFYPRASRWWMKQSLAHLSSQLKAL---	70
: :		

Abb. A2: PHR-Sequenzvergleich von CryP und ausgewählten CPF-Vertretern. Der Vergleich wurde mithilfe von Clustal Omega (EMBL-EBI) durchgeführt. Die Farben der hinterlegten Positionen sind wie folgt codiert: *rot* kanonische Trp-Triade, *gelb* FAD-Bindestellen, *türkis* FAD-N5-proximale Position, *blau* MTHF-Bindestellen, *rote Buchstaben* mögliche alternative aromatische Elektronendonoren. Punkte und Sterne markieren den Konservierungsgrad der jeweiligen Position. Agt *Agrobacterium tumefaciens*, An *Anacystis nidulans*, At *Arabidopsis thaliana*, Cra *Chlamydomonas reinhardtii*, Dm *Drosophila melanogaster*, Dp *Danaus plexippus*, Dr *Danio rerio*, Ec *Escherichia coli*, Hs *Homo sapiens*, Mm *Mus musculus*, Pt *Phaeodactylum tricorutum*, Syn *Synechocystis* sp., Xl *Xenopus laevis*. Fortführung auf folgenden Seiten.

DmCRY1-PHR	RGRLLVF-EGEP---AYIFRRLHEQVRL-HRICIEQDCEPIWNERDESIRSLC-----	125
PtCPF1-PHR	GSQLVVV-LGKS---HEVLPEIVATTQA-KALFYEQEAAAAPVREQDAETIQAIKNRLKRD	135
CraCRY-PHR	GSRLLVV-RGKP---EEVFPFVRFREWGV-TQLCFEHDTEPYAKVRDAAVRRLA-----	121
Dm (6-4) PL	NSRFLVV-RGKP---AEVFPRIFKSWRV-EMLTFEIDIEPYSVTRDAAVQKLA-----	149
X1 (6-4) PL	NSRFLVV-RGKP---AEVFPPLFKKWKV-TRLTFEVDIEPYSRQRDAEVEKLA-----	117
DpCRY1-PHR	NSRFLVV-RGQP---ADALPKLFRWGT-TALTFEEDPEPYGRVDRHNIMTKC-----	143
HsCRY2-PHR	NSRFLVV-RGQP---ADVFPRLFKEWGV-TRLTFEYDSEFPFKERDAAIMKMA-----	157
HsCRY1-PHR	NSRFLVI-RGQP---ADVFPRLFKEWNI-TKLSIEYDSEFPFKERDAAIKKLA-----	117
MmCRY1-PHR	NSRFLVI-RGQP---ADVFPRLFKEWNI-TKLSIEYDSEFPFKERDAAIKKLA-----	117
CryP-PHR	SINLPLV-CGNTADSVSELCKIASEIGA-SAVYWNREMPESREMERHRATSL-----	140
AtCRY3-PHR	GLNLLIR-SGKP---EELPLSLAKDFGA-RTVFAHKETCSEEVDVERLVNQGL-----	204
DrCRY-DASH	GSTLLVR-QGKP---EDVVCELIKQLGSVSTVAFHEEVASEEKSVEEKLKEIC-----	126
SynCRY-DASH	GNKLLVT-TGLP---EQVIPQIAKQINA-KTIYYHREVTQEELDVERNLVKQL-----	125
EccPDI	GIPLLFREVDVDFVASVEIVKQVCAENSV-THLFYNYQYEVNERARDVEVERAL-----	141
AnPL	GSRLLLV-QGDP---QHLLPQLAQLQA-EAVYWNQDIEPYGRDRDQGVAAAL-----	117
AgtCPDIII	GGRLVLA-SGDA---ERILRDLISETGA-DTVVWNRDYPDMATDKALKQKQL-----	117
CrCPH1-PHR	GSRLVIRSTDS---TAALLQVTELGA-EAVFFNHLYDPISLMRDHDCKRGL-----	121
AtCRY1-PHR	GTCLITKRSTDS---VASLLDVVKSTGA-SQIFFNHLYDPLSLVRDHRRAKDV-----	126
AtCRY2-PHR	GSDLTLIKHTNT---ISAILDICRVTGA-TKVVFNHLYDPVSLVRDHTVKEKL-----	119
	* . : . :	
DmCRY1-PHR	-RE--LNIDFVEKVSHTLWDPQLVIE-TN-GGIPPLTYQMFLHTVQIIGL-PPRPTADAR	179
PtCPF1-PHR	GKN--YECKFEAYATHLHPMERYLAQCK-DHTAPSTYGSFTKIFNKMSV-AKEVNEVKE	191
CraCRY-PHR	-AE--AGVEVVTPISTLYDITDMLVA-RN-GGAAPLTMQSFTKLVDRVGD-PPAPAPPPP	175
Dm (6-4) PL	-KA--EGVRVETHCSHTIYNPELVIA-KN-LGKAPITYQKFLGIVEQLKV-PKVLGVPEK	203
X1 (6-4) PL	-AE--HDVQVIQKVSNTLYDIDRIIA-EN-NGKPPLTYVRFQIVLAPLGP-PKRPIKAPT	171
DpCRY1-PHR	-RE--VGIQVTSRVSHSTLYKLDIIIE-KN-GGKAPLTYHQFQALIASMPP-PPSAEPTIS	197
HsCRY2-PHR	-KE--AGVEVVTENSHTLYDLDRIE-LN-GQKPPLTYKRFQAIISRMEL-PKKPVGLVT	211
HsCRY1-PHR	-TE--AGVEVIVRISHTLYDLDKIE-LN-GGQPPLTYKRFQTLISKMEP-LEIPVETIT	171
MmCRY1-PHR	-TE--AGVEVIVRISHTLYDLDKIE-LN-GGQPPLTYKRFQTLVSKMEP-LEMPADTIT	171
CryP-PHR	-KQ--LDIAAVACQSALLYDVEKLELDEGPHGGHWGTLMPFKRACEKQLGKPDPRPILMKE	197
AtCRY3-PHR	-KRVGNSTKLELIWGSTMYHKDDL--FD-VFDLPDVTYQFRKSVEAKC-SIR-----	252
DrCRY-DASH	-CQ--NKVRVQTFWGSTLYHRDDL--FSHIGGLPDVYQFRKAVEAAG-RVR-----	173
SynCRY-DASH	-TI--LGIEAKGYWGSTLCHPEDLP--FS-IQDLPDLFTKFRKDIEKKKISIR-----	172
EccPDI	-R---NVVCEGFDDSVILPPGAVM--TG-NHEMYKVFTPFKNAWLKRLEGM-----	188
AnPL	-KT--AGIRAVQLWQLLHSPDQIL--SG-SGNPYSVYGPFWKNWQAQPKPTP--VATPT	169
AgtCPDIII	-RD--DGLTVRSFSGQLLHESRSLQ--TK-SGGPYRVYTPFWRALEGS-DEPHAPADPPK	170
CrCPH1-PHR	-TA--AGVAHRTFNGDMLYEPWDVL--DP-NKQPYSTFDDFWNSVRAMPVPPFPVSAPA	175
AtCRY1-PHR	-TA--QGIAVRSFNADLLYEPWEVT--DE-LGRPFSMFAAFWERCLSMYPDPESPLLP-	179
AtCRY2-PHR	-VE--RGISVQSYNGDLLYEPWEIY--CE-KGKPFSTFNSYWKKCLDMSIESV--MLPPP	171
	:	
DmCRY1-PHR	LEDATF---V---ELDPEFCRSLKLFELPTPEHFNV--YGDNM--GFLAKINWRGGETQ	229
PtCPF1-PHR	VPSLPNKSVK---LLEKFAE----ALRMP TLKDLGYAAAADDMKNNSGKGGYAFAGGENA	244
CraCRY-PHR	AA-MP-PPAE---DMPSAAPA---ATGVPTWQEVGFKE-----PPL--TVFKGGETE	217
Dm (6-4) PL	LKNMPTPPKD---EVEQKDSA---AYDCPTMKQLVKRP-----EELGPNKFPGGETE	249
X1 (6-4) PL	LENMKD-CHT---PWKSSYDE---KYGVPTLEELGQDP-----MKLGP HLYPGGESE	216
DpCRY1-PHR	LETLNR-AVT---PISDNHDE---RFGVPTLEELGFDT-----EGLKPP I WIGGENE	242
HsCRY2-PHR	SQOMES-CRA---EIQENHDE---TYGVPSLEELGFPT-----EGLGPAVWQGGETE	256
HsCRY1-PHR	SEVIEK-CTT---PLSDDHDE---KYGVPSLEELGFDT-----DGLSSAVWPGGETE	216
MmCRY1-PHR	SDVIGK-CMT---PLSDDHDE---KYGVPSLEELGFDT-----DGLSSAVWPGGETE	216
CryP-PHR	SLACLYSVAPPPQDCKSV---PIELGFETV-----PPSTRWD--EPIRERFPMIHYL	245
AtCRY3-PHR	----SSTRIP--LSLGPT--PSVDDWGDVPTLEKLGVEP--QEV--RGM--RFVGGESA	298
DrCRY-DASH	----PVLSTP--EQVKSP--PSGLEEGPIPTFDSLQTEPLDDCR--SAF--PCRGGETE	221
SynCRY-DASH	----PCFFAP--SQLLPS--PNIKLELTAPPPEFFP--QINFDR--SVL--AFQGGETA	218
EccPDI	CVAAPKVRSS--GSIEPS--PSITLNY--RQ----SFD----T--AHF----PVEEKA	227
AnPL	ELVDL---SP--EQLTA----I---APLLLSELPTLQKLGFDWD--GGF--PVEPGETA	212
AgtCPDIII	SLTAP-----KVWPK--SEKLSNWKLLPTKPDWAKDFSDIW-----TPGETG	210
CrCPH1-PHR	S--MPAV--P--AAVPSM--TVAEVDWFFTEQEASSDQLKFKW-----KPGVGG	217
AtCRY1-PHR	-----KKIIS--GDVSK--CVADPLVFEDDSEKGSNALLARAW-----SPGWSN	219
AtCRY2-PHR	WRLMPITAAA--EAIWA---CSIEELGLENAEKPSNALLTRAW-----SPGWSN	216

Abb. A2: Fortführung.

DmCRY1-PHR	ALLLLDERLKVQHAFAFERG	FYLPNQALPNIH-DS	PKSMSAHL	RFGLSVRRFYWSVHDLF	288					
PtCPF1-PHR	AIELLAQNMARS--QWVAT	FEKPKTSPNDATRPS	TTALS	SPYVKHGCSIPRRFYHELKSVY	302					
CraCRY-PHR	ALARLEAAAFQDP--KVVAG	FQKPDTPSAWEKPA	TTVLS	PYLKFGCLSARLFHARLLEVY	275					
Dm (6-4) PL	ALRRMEESLKDE--IWVAR	FEKPNLAPNSLE-PS	TTVLS	PYLKFGCLSARLFNQKLKEII	306					
X1 (6-4) PL	ALSRLDLHMKRT--SWVCN	FKKPETEPNSLT-PS	TTVLS	PYKFGCLSARTFWWKIADIY	273					
DpCRY1-PHR	ALLRLERHLERK--AWVAS	FGRPKMTPESELL-SS	QTGLS	PYLRFGLSTRLFYYQLSELY	299					
HsCRY2-PHR	ALARLDKHLERK--AWVAN	YERPRMNANSLL-AS	PTGLS	PYLRFGLSCLRFYYRLWDLY	313					
HsCRY1-PHR	ALTRLERHLERK--AWVAN	FERPRMNANSLL-AS	PTGLS	PYLRFGLSCLRFYFKLTDLY	273					
MmCRY1-PHR	ALTRLERHLERK--AWVAN	FERPRMNANSLL-AS	PTGLS	PYLRFGLSCLRFYFKLTDLY	273					
CryP-PHR	AQRRLDHFL--I--KGLPL	YESDRSRA-DM-EYAT	SQLSVY	LRIGIISPRELYWRIEDSS	299					
AtCRY3-PHR	GVGRVFEYFVKK--DLLKV	YKETRNGM-LG-PDY	STKFS	PWLAFGCISPRFIYEEVQRYE	354					
DrCRY-DASH	ALARLKHYFWDI--NAVAT	YKETRNGM-IG-VDF	STKFS	PWLALGCISPRYIYEQIKKYE	277					
SynCRY-DASH	GLARLQDYFWHG--DRLKD	YKETRNGM-VG-ADY	SSKFS	PWLALGCLSPRFIYQEVKRYE	274					
EccPDI	AIAQLRQFC--Q--NGAGE	YEQRDFP-AV--EGT	SRLSAS	LATGGLSPRQCLHRLLAEQ	280					
AnPL	AIARLQEF--D--RAIADY	DPQRNFP-AE--AGT	SGLS	PALKFGAIGIRQAWQAASAAH	265					
AgtCPDIII	ALDKLDDFI--D--GALKG	YEEGRDFP-AK--PAT	SLLS	PHLAAGEISPAAVWHATKGLS	263					
CrCPH1-PHR	AISELEHFL--A--ERLTF	FEHRAKV-DR--DST	SRLS	PWLIHIGSISVRYIFYRVRQCQ	270					
AtCRY1-PHR	GDKALTTFI--N--GPLLE	YSKNRRKA-DS--AT	TSFLS	PHLHFGEVSVRKFVHLVRIKQ	272					
AtCRY2-PHR	ADKLLNEFI--E--KQLID	YAKNSKKV-VG--NST	SLLS	PYLHFGEISVRHVQCARMKQ	269					
.	:	:	:	* : * :						
DmCRY1-PHR	KNVQLRACVRGVQMTGGAH	ITGOLIWREYFYTMSVNNPNY	-DRMEGNDICLSIP	PAK---	344					
PtCPF1-PHR	SKYNSKET-----SKPPV	SLHGOLMWRDFNYLVGYSTPNF	-DKMIDNPIARQIP	DD---	353					
CraCRY-PHR	RRH--PAH-----SQPPV	SLRGOLLRWREFFYTVGSTITPNF	-HRMAGNPVCKQID	DD---	324					
Dm (6-4) PL	KRQ--PKH-----SQPPV	SLIGOLMWRREFFYTVAAAEPNF	-DRMLGNVYCMQIP	QE---	355					
X1 (6-4) PL	QGK--K-H-----SDPPV	SLHGOLLRWREFFYTTGAGIPNF	-NKMEGNPVCVQVD	DN---	321					
DpCRY1-PHR	KRI--KQ-----ERPPL	SLHGOLLRWREFFYCAATRNPNF	-DRMEGNPICVQIP	DK---	347					
HsCRY2-PHR	KKV--KRN-----STPPL	SLFGOLLRWREFFYTAATNNPRF	-DRMEGNPICQIP	DR---	362					
HsCRY1-PHR	KKV--KKN-----SSPPL	SLYGOLLRWREFFYTAATNNPRF	-DKMEGNPICVQIP	DK---	322					
MmCRY1-PHR	KKV--KKN-----SSPPL	SLYGOLLRWREFFYTAATNNPRF	-DKMEGNPICVQIP	DK---	322					
CryP-PHR	-----LSPEAKKT	FARRLIWRELAYQLFC	PKM-RDRSIRKHYEASE	VTGDE	347					
AtCRY3-PHR	KER-----VANNSTY	WVLFELLRDYFRFLS	IKCGNSLPHLGG-PRNVQ	GK---	402					
DrCRY-DASH	VER-----TANQSTY	WVIFELLRDYFKFVALKYGNRI	FYMNG-LQDKHVP	DK---	325					
SynCRY-DASH	QER-----VSNDS	THWLFELLRDFFRFVAQKYGNKL	FNRGG-LLNKNF	PFQE---	322					
EccPDI	PQA-----LDGGAGS	VWLNELIWRREFYRHLITYHPS	LCKHRFFIAWTRD	RVQMS---	329					
AnPL	A---LSRS--DEARNS	IRVWQCELAWREFYQHLYHFP	SL-ADGPYRSLWQQ	FFEN---	316					
AgtCPDIII	RH-----IASND	ISRFRKEIVWREFCYHLLFHFP	PEL-GEKNWNS	SFDFAS	DRD---	310				
CrCPH1-PHR	AEWLAGT--DR-AQSCD	DFLQOMGYREYSRYLAFHF	FFFI-HERSLLRHL	RACPF	RI---	323				
AtCRY1-PHR	VAWANEGN--EAGEES	VNLFKLSIGLREYSRYISFN	HPYS-HERPLLGH	LKFFP	AV---	326				
AtCRY2-PHR	IIWARDKN--SEGEES	ADFLRGLREYSRYICFN	FFPT-HEQSLLS	HLRFFP	DA---	323				
.	:	:	:	*						
DmCRY1-PHR	PNENLQSWRLGQTGFPLID	GAMRQLLAEGV	LHHTL	RNTVATFLTRGGLWQ	SEHGLQHF	404				
PtCPF1-PHR	DF-DLLAWKMSKTGYPI	DAIMTQLRETGV	IHHLARH	SVACFLTRGDLWQ	SEWGATVF	412				
CraCRY-PHR	NP-EFLAAWREARTGFP	WIDAIMTQLVTGW	MHHLARH	SVACFLTRGDLV	SEERGMEVF	383				
Dm (6-4) PL	HP-DHLEAWTHGRTGYP	FIDAIMRQLRQEG	IHNLARH	AVACFLTRGDLW	SEEGQRVF	414				
X1 (6-4) PL	NK-EHLEAWSEGRTGYP	FIDAIMTQLRTEG	IHHLARH	AVACFLTRGDLW	SEEGQKVF	380				
DpCRY1-PHR	NQ-EALKKWANGQTGF	PWIDAIMTQLRNDG	IHHLARH	AVACFLTRGDLW	SEEGMKVF	406				
HsCRY2-PHR	NP-EALAKWAEKGTGF	PWIDAIMTQLRQEG	IHHLARH	AVACFLTRGDLW	SESGVRVF	421				
HsCRY1-PHR	NP-EALAKWAEKGTGF	PWIDAIMTQLRQEG	IHHLARH	AVACFLTRGDLW	SEEGMKVF	381				
MmCRY1-PHR	NP-EALAKWAEKGTGF	PWIDAIMTQLRQEG	IHHLARH	AVACFLTRGDLW	SEEGMKVF	381				
CryP-PHR	EK-GRFNAWKRLTGYP	PLVDAGMRELYTTG	YLTQSVRMV	VAASFLVE-YLRVD	WTKGAWF	405				
AtCRY3-PHR	DQ-KLFESWRDAKTGY	PLIDANMKELSTTG	FMSNRGRQ	IVCSFLVR-DMGLD	WRMGAWF	460				
DrCRY-DASH	DM-KMFDAWKEGRTG	VFPVDANMRELALTG	FMSNRGRQ	NVASFLTK-DLGLD	WRLGAWF	383				
SynCRY-DASH	DQ-VRFELWRSQTGY	PLVDANMRELNLTG	FMSNRGRQ	NVASFLCK-NLGID	WRGAWF	380				
EccPDI	NP-AHLQAWQEGKTGY	PVDAAMRQLNSTG	MHNRLR	MITASFLVK-DLLID	WREGERYF	387				
AnPL	RE-ALFTA	WTQAQTGYPIVDAAM	RQLTETG	MHNRCRMIVAS	FLTK-DLIID	WRGEQFF	374			
AgtCPDIII	DE-KSFKA	WTRGMTGYPIVDAAM	RQLWQHG	MHNVRMIVAS	FLIK-HLLID	WRKGEKWF	368			
CrCPH1-PHR	DQ-HAFKA	WRQGTGYPIVDAAM	RQLWSSG	CHNRGRV	VASFLVK-DLLLP	WRGLKHY	381			
AtCRY1-PHR	DE-NYFKA	WRQGTGYPLVDAGM	RELWATG	LHDRIRVVV	SFFVK-VLQLP	WRGMKYF	384			
AtCRY2-PHR	DV-DKFA	WRQGTGYPLVDAGM	RELWATG	MHNRI	RIVV	SFAVK-FLLLP	WRGMKYF	381		
.	:	:	:	*	*	*	:	*	*	:

Abb. A2: Fortführung.

DmCRY1-PHR	LKYLLDADWSV	CAGN	MWVSSSAFERLLDSSLVTC	PVALAKRLDPDGT	YIKQYVPELMNV	464		
PtCPF1-PHR	EEYLLDADWS	INNFNQWLSCTAHFYQY	--FRCYSP	IAFGKKTDPNGDY	IRKWLPQFKDM	470		
CraCRY-PHR	EEHLLDQDHY	LNANM	MWLSASAFFSQY	--FRVYSP	VVFGKKYDPEGRF	IRKFLPVLKDM	441	
Dm(6-4) PL	EQLLLDQDWAL	NAGNM	MWLSASAFFHQY	--FRVYSP	VAFGKKTDPQGHY	IRKYVPELSKY	472	
X1(6-4) PL	EELLDDADWS	LNAGN	LWLSASAFFHQF	--FRVYSP	VAFGKKTDKNGDY	IKKYLPIKKF	438	
DpCRY1-PHR	DELLLDADWS	VNAGM	MWLSLSCSSFFQQF	--FHCYCP	VRFGRKTDPNGD	FIRKYIPVLKMM	464	
HsCRY2-PHR	DELLLDADFS	VNAGS	MWLSLSCSAFFQQF	--FHCYCP	VGFGRRTDPSGDY	IRRYLPKLKAF	479	
HsCRY1-PHR	EELLLDADWS	INAGS	MWLSLSCSSFFQQF	--FHCYCP	VGFGRRTDPNGDY	IRRYLPVLRGF	439	
MmCRY1-PHR	EELLLDADWS	INAGS	MWLSLSCSSFFQQF	--FHCYCP	VGFGRRTDPNGDY	IRRYLPVLRGF	439	
CryP-PHR	HYTLADADSA	INSM	QVQVAGSGIDQWN	-F----	VLSPENASQDPY	GEYTRKWPELSPL	460	
AtCRY3-PHR	ETCLLDYD	PCSN	YGNNTYAGVGNPRE	-D-RYFS	IPKQAQNYDPEGEY	VAF-----	510	
DrCRY-DASH	EYLLVDH	DVCS	NYGNWLYSAGIGNPRE	-N-RKF	NMIKQGLDYDNNGD	YVRQWVPELRGI	441	
SynCRY-DASH	ESCLLDYD	VCSN	WGNWNYTAGIGNDARD	-F-RYF	NIPKQSQYDPOGT	YLRHWLPKLN	438	
EccPDI	MSQLIDGD	LAAN	NGGQWAASTGTDAAP	-YFR	IFNPTTQGEKFDHEGE	FIRQWLPVLRDV	446	
AnPL	MQHLVDGD	LAAN	NGGQWAASTGTDAAP	-L-RIF	NPASQAKKFDATAT	YIKRWLPVLRHV	432	
AgtCPDIII	RDTLLDAD	PASNA	ANWQVWAGSGADASP	-FFR	IFNPTTQGEKFDG	GDYVRRFVPELEK	427	
CrCPH1-PHR	WDAQIDAD	LECD	ALGQYVSGGMSDAHP	-FSY	MDLEKEARFDPDGE	YVRRWLPALSRL	440	
AtCRY1-PHR	WDTLLDAD	LES	DALGQYITGLPDSRE	-FDR	IDNPQFEGYKFD	PNGEYVRRWLPALSRL	443	
AtCRY2-PHR	WDTLLDAD	LECD	ILGQYISGSI	PDGHE-LDRL	DNPALQAKYDPEGEY	IRQWLPVLRARL	440	
	*	*	*		*	.	:	
DmCRY1-PHR	PKEFVHEP	WRMSAE	QQEQYECLIGVHY	-----	-----	-----	491	
PtCPF1-PHR	PAKYIYEP	WEAP	IELQKKVGVIVGENY	PHPIVD	HKLVSKNNMSR----	MKEAYD-----	520	
CraCRY-PHR	PAKYIYEP	WTAP	LEVQRKAGCVGRDYP	PAPIVD	HAVASKACIAR----	MAAAYRRSKGE-	496	
Dm(6-4) PL	PAGCIYEP	WKAS	LVDQRAYGCVLGT	DYPHR	IVKHEVWH-----	-----	510	
X1(6-4) PL	PAEYIYEP	WKSP	RSRLOERAGCIIGKDY	PKPIVE	HNVVSKQNIQR----	MKAAYARRSGST	494	
DpCRY1-PHR	PTRYIHEP	WVCE	IEIKSIRCIIGKDY	PMPIVD	HTKASEINLER----	IK-----	510	
HsCRY2-PHR	PSRYIYEP	WNAPE	SIQKAACIIIGVDY	PRPI-	-----	-----	510	
HsCRY1-PHR	PAKYIYDP	WNAPE	GIQKVAKCLIGVNY	PKPMVNHAEASRL	NIER----	MKQIYQQLSRYR	495	
MmCRY1-PHR	PAKYIYDP	WNAPE	GIQKVAKCLIGVNY	PKPMVNHAEASRL	NIER----	MKQIYQQLSRYR	495	
CryP-PHR	PLQYLQRP	WQTF	EGDLRMAGIVLGETY	PHRIVQ	DLKGERQKSVE	SVLAMRRR-----	512	
AtCRY3-PHR	-----	-----	-----	-----	-----	-----	510	
DrCRY-DASH	KGGDVHTP	WTLS	NSALSASHQVSLNQ	TYPCPIIT	APWSRHVNN-----	KSSGP----SS	491	
SynCRY-DASH	PGDKIHQP	WLLS	ATEQKQWVQLGV	DYPRPC	VNFHQSVARRKI----	EQMGV----IA	489	
EccPDI	PGKVVHEP	WKWAQ	----KAG--	VTLDP	QPPIVEHKEARVQT	LAA-YEAARKGK-	492	
AnPL	HPKDLISGEI	-----	-----	-----	-----	-----	482	
AgtCPDIII	ERKYIHKP	PFEAP	KDALKKAGVELGKTY	PLPIVD	HGKARERALAA-	YAAVKTT-----	479	
CrCPH1-PHR	PTEYIHAP	WKAP	ASVLAADVELGCNY	PLPIIT	RSDAKANVDYA-	CGVLEKSAV----	AP	495
AtCRY1-PHR	PTDWHIHP	WNAPE	SVLQAAGIELGSNY	PLPIVGL	DEAKARLHEA-	LSQMWQLEAASRAAI	502	
AtCRY2-PHR	PTEWIHHP	WDAP	LTVLKASGVELGTNY	AKPIVD	IDTARELLAKA-	ISRTREQIMIGAAP	499	
DmCRY1-PHR	-----	-----	-----	-----	-----	-----	491	
PtCPF1-PHR	-----	-----	-----	-----	-----	-----	520	
CraCRY-PHR	-----	-----	-----	-----	-----	-----	496	
Dm(6-4) PL	-----	-----	-----	-----	-----	-----	510	
X1(6-4) PL	EGVDKDSG	QNNK	KGKRVAAAGT	SVAE	LFKKK---	-----	526	
DpCRY1-PHR	-----	-----	-----	-----	-----	-----	510	
HsCRY2-PHR	-----	-----	-----	-----	-----	-----	510	
HsCRY1-PHR	G-L-----	-----	-----	-----	-----	-----	497	
MmCRY1-PHR	G-L-----	-----	-----	-----	-----	-----	497	
CryP-PHR	-----	-----	-----	-----	-----	-----	512	
AtCRY3-PHR	-----	-----	-----	-----	-----	-----	510	
DrCRY-DASH	SKGRKGS	SYTAR	QHKD-----	-----	RGIDFYFS	KNKHF	520	
SynCRY-DASH	-----	-----	-----	-----	-----	-----	489	
EccPDI	-----	-----	-----	-----	-----	-----	492	
AnPL	DS-----	-----	-----	-----	-----	-----	484	
AgtCPDIII	-----	-----	-----	-----	-----	-----	479	
CrCPH1-PHR	TGSESS	GRY-----	-----	-----	-----	-----	504	
AtCRY1-PHR	ENGSEEG	-----	-----	-----	-----	-----	509	
AtCRY2-PHR	DEIVAD	-----	-----	-----	-----	-----	505	

Abb. A2: Fortführung.

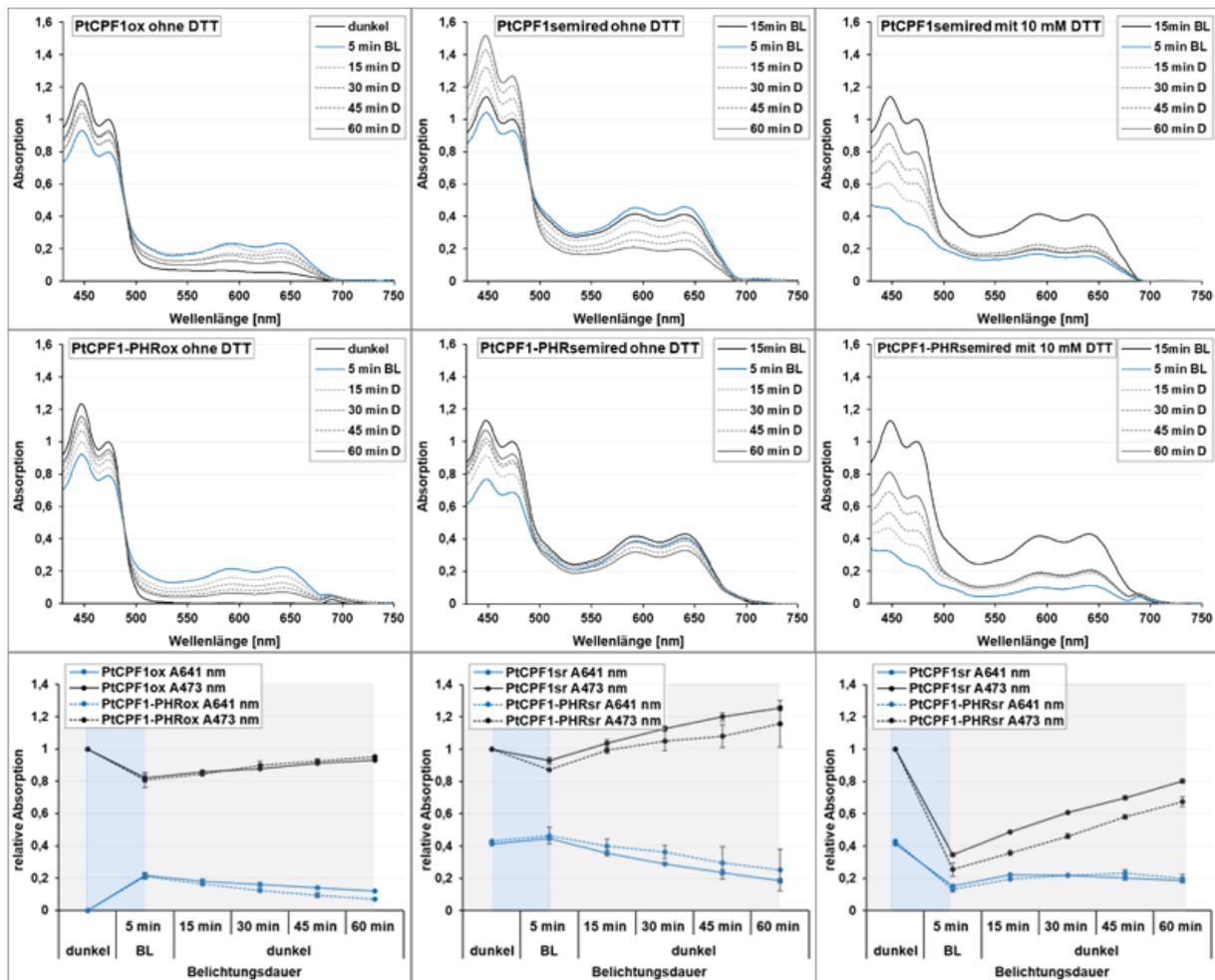


Abb. A3: Vergleich der blaulichtabhängigen FAD-Reduktion und -Reoxidation in PtCPF1 und PtCPF1-PHR. UV-Vis-Absorptionsspektren (370-750 nm) von PtCPF1 bzw. PtCPF1-PHR nach 5 min BL (465 nm, $10 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) direkt nach Isolation mit oxidiertem FAD (PtCPF1ox bzw. PtCPF1-PHRox) oder nach 15 min Vorbelichtung, um semireduziertes FADH[•] zu induzieren (PtCPF1semired bzw. PtCPF1-PHRsemired). Die Belichtung erfolgte ohne oder nach Zugabe von 10 mM DTT. Es folgte eine 60-minütige Dunkel-Reoxidation. Die Spektren wurden relativ zur Absorption bei 473 nm normiert. Zum Vergleich der beiden CPF-Varianten wurden die Absorptionswerte A473 nm und A641 nm als Maß für die relativen Mengen von FADox, FADH[•] bzw. FADH⁻ dargestellt. Die Messwerte stellen Mittelwerte und daraus abgeleitete Standardabweichungen aus jeweils drei technischen Replikaten dar.

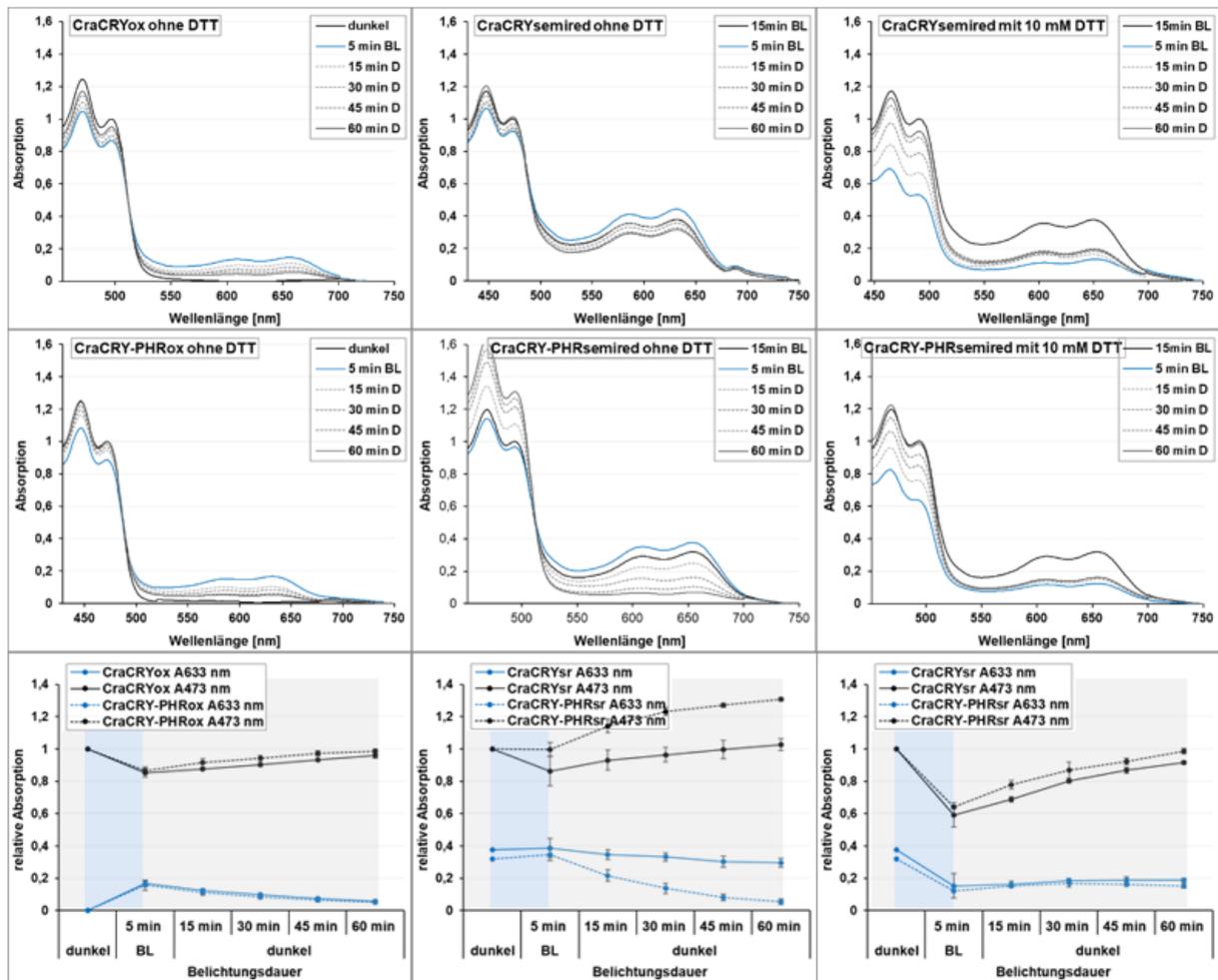


Abb. A4: Vergleich der blaulichtabhängigen FAD-Reduktion und -Reoxidation in CraCRY und CraCRY-PHR. UV-Vis-Absorptionsspektren (370-750 nm) von CraCRY bzw. CraCRY-PHR nach 5 min BL (465 nm, $10 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) direkt nach Isolation mit oxidiertem FAD (CraCRYox bzw. CraCRY-PHRox) oder nach 15 min Vorbelichtung, um semireduziertes FADH[•] zu induzieren (CraCRYsemired bzw. CraCRY-PHRsemired). Die Belichtung erfolgte ohne oder nach Zugabe von 10 mM DTT. Es folgte eine 60-minütige Dunkel-Reoxidation. Die Spektren wurden relativ zur Absorption bei 473 nm normiert. Zum Vergleich der beiden CraCRY-Varianten wurden die Absorptionswerte A473 nm und A633 nm als Maß für die relativen Mengen von FADox, FADH[•] bzw. FADH⁻ dargestellt. Die Messwerte stellen Mittelwerte und daraus abgeleitete Standardabweichungen aus jeweils drei technischen Replikaten dar.

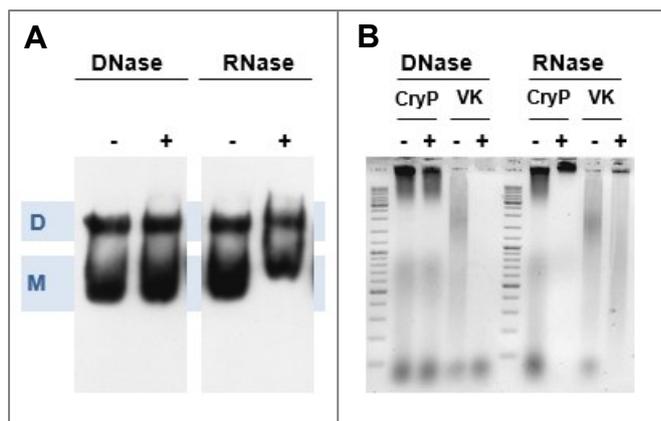


Abb. A5: Abhängigkeit der CryP-Dimerisierung von gebundenen Nucleinsäuren. 200 ng rekombinant aufgereinigtes CryPsemired wurde 1 h bei 18 °C mit bzw. ohne DNase bzw. RNase inkubiert. Als Kontrolle von CryP unabhängig aufgereinigten Nucleinsäuren diente eine Proteinaufreinigung nach Induktion und Expression des pET303/CT-His Leervektors (VK) unter gleichen Bedingungen wie für CryP. Die einzelnen Ansätze wurden in einer 4-10 %igen BN-PAGE (**A**) bzw. auf einem 2 %igen Agarosegel (**B**) aufgetrennt. Nach elektrophoretischer Auftrennung erfolgte der Proteintransfer auf eine PVDF-Membran sowie der immunologische Nachweis mit einem His-Antikörper (**A**) bzw. die Detektion von Nucleinsäuren mittels Ethidiumbromid nach Exzitation bei 254 nm (**B**). (-) Inkubation ohne Enzym, (+) Inkubation mit Enzym. Blau hervorgehoben sind die elektrophoretischen Laufweiten von CryP-Monomer (M) bzw. -Dimer (D).

Tab. A1: Trypsin-Schnittmuster für CryP-His (68,2 kDa). Fortführung auf folgenden Seiten.

Position der Schnittstelle	Resultierende Peptidsequenz	Peptidmasse von Schnittstelle bis Histidinmarkierung [Da]
9	MSNSDHGGK	931.976
11	QR	302.333
36	ILAPAVQAHSLSRPAVVLFGTHDIR	2669.125
68	IHDNEALLLACHHNHVLPLVFLWQVPVHHWGAR	3760.342
76	GALQVVVK	827.035
109	EALHQLSLQLSQESINLPLVCGNTADSVSELCK	3541.006
123	IASEIGASAVYWNR	1536.707
130	EMTPESR	848.926
134	EMER	563.626
136	HR	311.344
141	ATSLK	518.611
160	QLDIAAVACQSALLYDVEK	2050.354
179	LELDEGFHGGHWGTLMPFK	2171.458
180	R	174.203
184	ACEK	449.522
196	QLGKPD RPILMK	1395.726
213	ESLACLYSVAPPPQDCK	1821.093
230	SVPIEELGFETVPPSTK	1830.065
236	WDEPIR	814.896
238	ER	303.318
248	FPMIHYLAQR	1275.534
249	R	174.203
256	LDHFLIK	885.074

Tab. A1: Fortführung.

Position der Schnittstelle	Resultierende Peptidsequenz	Peptidmasse von Schnittstelle bis Histidinmarkierung [Da]
265	GLPLYESDR	1049.148
267	SR	261.281
282	ADMEYATSQLSVYLR	1746.953
289	IGIISPR	754.928
294	ELYWR	765.867
305	IEDSSLSPEAK	1175.258
306	K	146.189
310	TFAR	493.563
311	R	174.203
315	LIWR	586.735
327	ELAYYQLFCFPK	1521.794
329	MR	305.395
331	DR	289.291
334	SIR	374.440
335	K	146.189
349	HYEASEWVTGDEEK	1679.717
351	GR	231.255
356	FNAWK	664.762
357	R	174.203
370	GLTGYPLVDAGMR	1349.568
383	ELYTTGYLTQSVR	1530.698
395	MVVASFLVEYLR	1426.737
400	VDWTK	647.729
426	GAEFHYTLADADSAINSMWQNAGR	2943.217
451	SGIDQWNFVLSPENASQDPYGEYTR	2874.029
452	K	146.189
477	WVPELSPLPLQYLQRPWQTFEGDLR	3069.513
490	MAGIVLGETYPHR	1443.684
496	IVQDLK	714.860
499	GER	360.370
501	QK	274.320
510	SVESVLAMR	991.171
512	RR	330.390
516	SQEK	490.514
538	NDENGYDLIDLPSGIETVVFTK	2439.658
539	K	146.189
542	EYR	466.494
545	IDR	402.451
548	LGK	316.401
555	VLQGKPK	768.955
562	TATSTVK	706.794
563	R	174.203
564	R	174.203
565	K	146.189
567	TK	247.294
568	R	174.203

Tab. A1: Fortführung.

Position der Schnittstelle	Resultierende Peptidsequenz	Peptidmasse von Schnittstelle bis Histidinmarkierung [Da]
571	TTK	348.400
575	TDGR	447.448
576	R	174.203
577	K	146.189
579	NR	288.307
593	LPSSLALEHHHHHH	1651.807

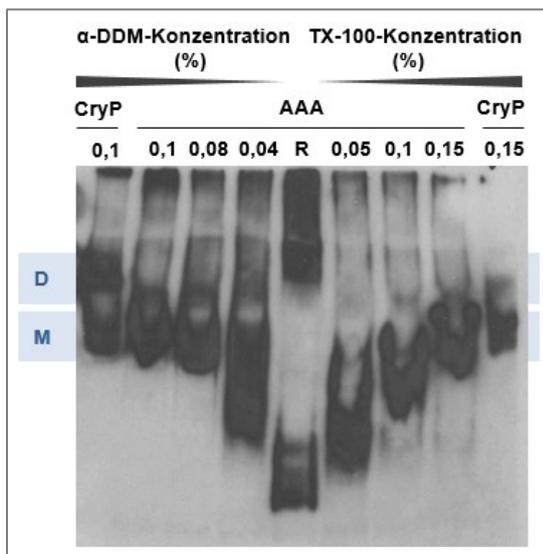


Abb. A6: BN-PAGE zur Interaktion von CryP und ID42612. 200 ng rekombinant aufgereinigtes ID42612 und CryPsemired wurden unter steigender α -DDM (0-0.1 %) bzw. steigender TX-100 (0-1.5 %) -Konzentration in einer 4-10 %igen BN-PAGE aufgetrennt. Als Referenzwert (R) für das ID42612-Laufverhalten diente isoliertes ID42612 ohne weitere Additive (50 mM NaP, 100 mM NaCl, 20% Glycerol, pH 7.8). Nach Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte der immunologische Nachweis mit einem Histidin-Antikörper.

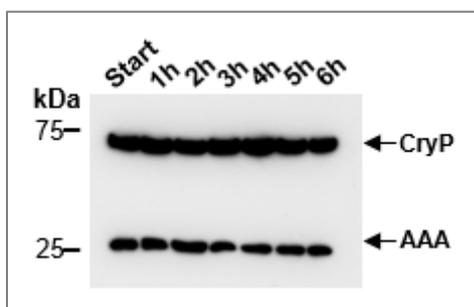


Abb. A7: SDS-PAGE zur Analyse des Einflusses von ID42612 auf die Stabilität von CryPsemired. Nach heterologer Expression und Isolation von ID42612 und CryPsemired erfolgte eine Inkubation für 6 h unter denselben Bedingungen wie in Abb. 3.20 beschrieben. Es folgte eine 10 %ige SDS-PAGE und ein immunologischer Nachweis per Histidin-Antikörper.

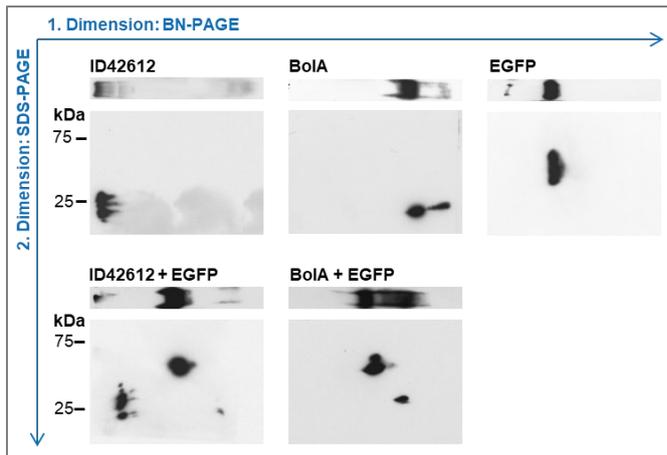


Abb. A8: 2D-PAGE zur Interaktion von EGFP mit ID42612 und BoIA (Kontrolle). Je 200 ng rekombinant aufgereinigtes ID42612 bzw. BoIA wurden separat oder mit einer äquimolaren Menge EGFP 30 min dunkel auf Eis inkubiert und anschließend in einer 4-10 %igen BN-PAGE aufgetrennt. Es folgte eine 10 %ige SDS-PAGE in zweiter Dimension zur Auftrennung der Interaktionskomplexe. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte der immunologische Nachweis mit einem Histidin-Antikörper.

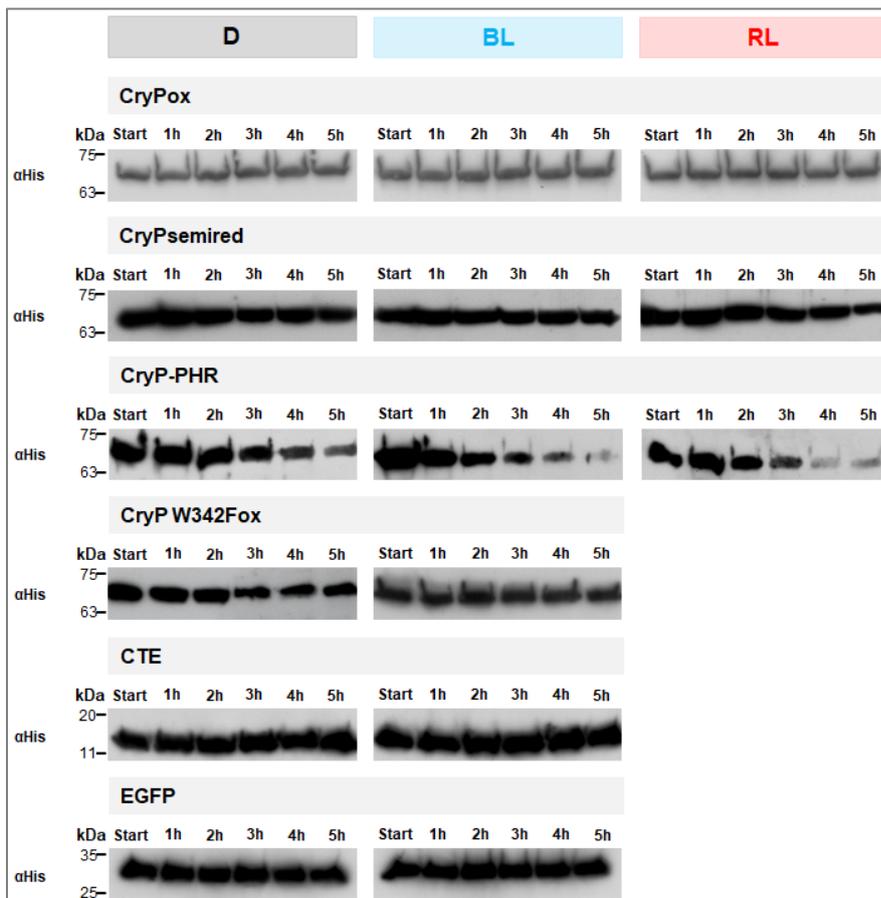


Abb. A9: Lichtabhängige Stabilität von CryP in Lagerpuffer. Je 50 µg/ml rekombinant aufgereinigtes CryPox-His, CryPsemired-His, CryP-PHR, CryP W342F bzw. CTE wurden im Dunkeln (**D**) oder unter $20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ Blaulicht (**BL**, λ_{max} 466 nm) bzw. Rotlicht (**RL**, λ_{max} 591 nm) inkubiert, um einem möglichen lichtabhängigen, autokatalytischen Abbau zu induzieren. Die Proben nach 0-5 h Inkubation wurden in einer 10 %igen SDS-PAGE nach Lämmli aufgetrennt. Der CryP-Nachweis erfolgte mit einem Histidin-Antikörper nach Transfer auf eine PVDF-Membran. Als Kontrolle wurde EGFP unter sonst gleichen Bedingungen untersucht.

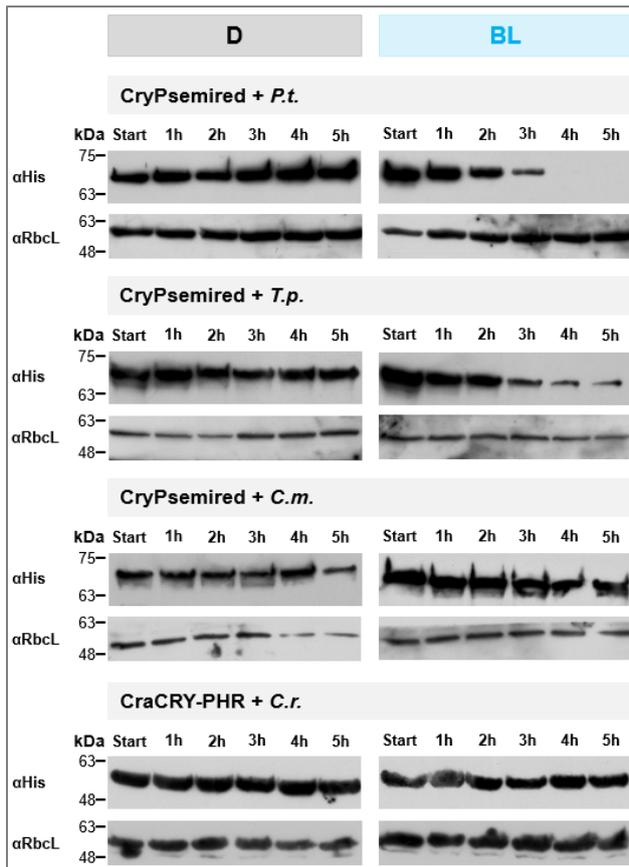


Abb. A10: Lichtinduzierter, proteasevermittelter CryP-Abbau. Je 50 µg/ml rekombinant aufgereinigtes CryPsemired wurde mit 100 µg/µl Proteinlysate aus *P. tricornutum* (*P. t.*), *T. pseudonana* (*T. p.*) bzw. *C. meneghiniana* (*C. m.*) im Dunkeln (**D**) oder unter 20 µE*m⁻²*s⁻¹ Blaulicht (**BL**, λ_{max} 466 nm) inkubiert, um den lichtabhängigen proteasevermittelten Abbau zu induzieren. Die Proben nach 0-5 h Inkubation wurden in einer 10 %igen SDS-PAGE nach Lämmli aufgetrennt. Der CryP-Nachweis erfolgte mit einem Histidin-Antikörper nach Transfer auf eine PVDF-Membran. Als Ladekontrolle diente der Proteinnachweis mit einem RuBisCO(RbcL)-Antikörper. Als Abbaukontrolle wurde CraCRY mit einem Proteinlysate aus *C. reinhardtii* (*C. r.*) unter sonst gleichen Bedingungen untersucht.

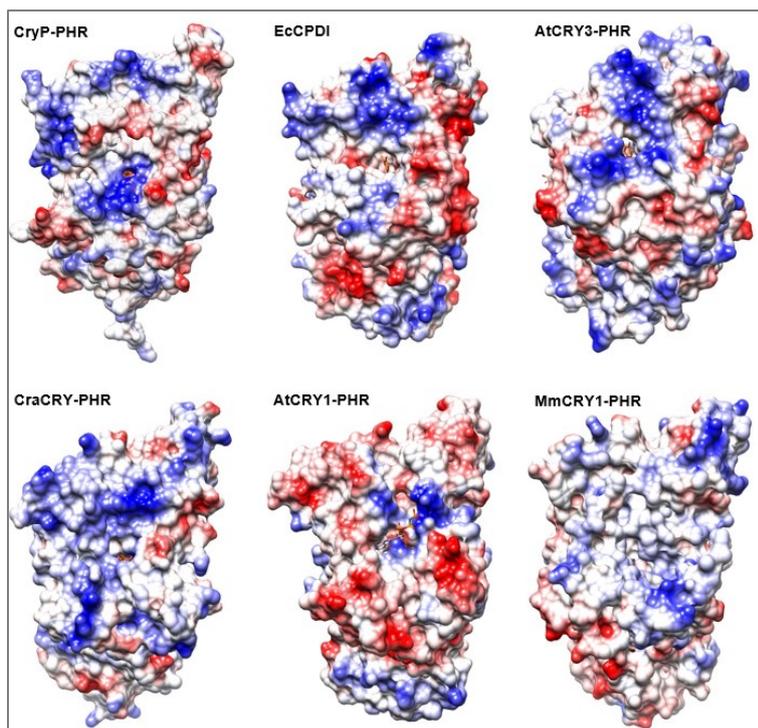


Abb. A11: Elektrostatisches Oberflächenpotential um die FAD-Bindetasche in verschiedenen CPF-Proteinen. Die Oberflächenpotentiale um die FAD-Bindetasche von CryP-PHR (berechnet auf Basis der *A. tumefaciens* CPDIII-Photolyase 4U63; (Scheerer et al. 2015)), EcCPDI (1DNP, Park et al. 1995), AtCRY3-PHR (2J4D, Klar et al. 2007), CraCRY-PHR (6FN3; (Franz et al. 2018)), AtCRY1-PHR (1U3C, (Brautigam et al. 2004)) und MmCRY1 (4K0R, (Czarna et al. 2013)) wurden mittels des *Electrostatic Surface Coloring Tools* in UCSF Chimera visualisiert. *Blau* positives Oberflächenpotential, *rot* negatives Oberflächenpotential.

Tab. A2: Auswirkungen auf die FAD-Redoxchemie durch Substitution der FAD-N5-proximalen Aminosäure in verschiedenen CPF-Proteinen.

Austausch	lichtinduzierte FAD-Redoxform	Eigenschaften	Referenz
EcCPDI N378S	FADox → FADH ⁻	wie WT, katalytisch inert wegen fehlender FADH [•] -Stabilisierung	(Xu et al. 2008)
EcCPDI N378D	FADox → (FAD [•] D378)	keine FAD [•] -Protonierung durch D, da pKs(FAD [•]) > pKs(D)	(Müller et al. 2016)
AnCPDI N386D	FADox → FADH ⁻	wie pCRY, schnelle Oxidation zu FADox (Stunden) wegen fehlender FADH [•] -Stabilisierung	(Damiani et al. 2011)
CrCPH1 D393N	keine Photoreduktion FADox → FADH [•] für D393N/ L378E	L378 blockiert Lösemittel-zugänglichkeit für N5-Protonierung	(Xu et al. 2019)
CrCPH1 D393C	FADox → FAD [•] (transient)	wie aCRY Typ I, aber fehlende FAD [•] -Stabilisierung	(Hense et al. 2015)
DmCRY C416N	FADox → FAD [•] FADox → FADH [•] für C416N/ L405E	L405 blockiert Lösemittel-zugänglichkeit für N5-Protonierung	(Chandrasekaran et al. 2021)
DmCRY C416D	FADox → FAD [•]	keine FAD [•] -Protonierung durch D, da pKs(FAD [•]) > pKs(D)	
AgCRY1 C413D	FADox → FAD [•]	keine FAD [•] -Protonierung durch D, da pKs(FAD [•]) > pKs(D)	
AgCRY1 C413N ApCRY1 C402N	FADox → FADH [•]	wie CRY-DASHs, Oxidation zu FADox (Stunden) durch FADH [•] -Stabilisierung	(Öztürk et al. 2008)

Eh (R1E582)	ESSRL----RGGES-AALARLDAAVCARAGWVCAFSK-PDTNPLPYSPGSTTMLSPLYLSL	75
Tp (7368)	WTRQLLLDWGEVSEDEAIRRAKSTKSNISSLLTTE-----GSQNTKLSPYLRW	231
Eh (R1CPW3)	WSAAMMAGWEVSEA-AAARAMEDFVG--GGGLAGYEA-RRSRAD--PGAVSRLSAFLRF	632
Fc (23746)	WDEPIRKRFPMSEK-AAANDAMEVFAK---NGMKKYEM-ERSRADQ---DGATSQLSPHLRI	614
CryP	WDEPIRERFPMIHY-LAQRRLDHFLI---KGLPLYES-DRSRADM--EYATSQLSVYLRI	283
Ni (IV203_007066)	WDEPIRKRFPMNEK-LALEAMESFCR---SGLKSYEQ-ERSRADK--EGATGCLSHHLRI	566
Mc (C1EA54)	WSAGLRAEWDMSSES-GASEAWAQFKR---MGLAGYEA-THGRCDLTHKSSSTLSLSPYLRF	354
Gt (L1JGS1)	WGAGVKSWSKFGEE-AAEMEENKFKI---SKLIKYES-SRSRADV---PVVSRLSPYLRF	980
Cm (M1V522)	WDTVLLGSAVDEE-RVRAFLRDFLE---HRLPLYEK-NKSRADL---EVVSRLSPYLAL	403
Pd (A0A068LF35)	-----	0
Dr (E7FFE4)	WAVDIRKTWDFSEE-GAHTHLEAFLR---DGVYRYEK-ESCRADA---PNTSCLSPYLHF	445
Tr (H2UJL0)	WAANIRKSWDFSEG-GAHARLEAFLH---DGVYRYEK-ESGRADA---PNTSCVSPYLHF	494
Mc (C1FGJ5)	EHGGVQSNPQNGQS-N-----G---QSNAPKASTERFRADV---RTTARISPYVRH	238
Gt (L1J295)	WAKGMREWFEGEE-GALKALEEFVR---FGCHHFEGRQRFRADR---KYTAVISPYVRF	277
Eh (R1D8F8)	WAAGIRRSWAVGEI-GAQRALAEFVS---GGIQRFEGERFRADQ---ANTAAISPHLRF	260
Eh (R1E582)	GCLSCRTMHAALDAIVR--QAEG-QHTTPQSLHGQLYFEFFHLLSASSPHFGQTRDNP	132
Tp (7368)	GVLSPQRAAKC-----GVRRLDLLWRDWSHLCYGLVGLPRLRRGDAVL	272
Eh (R1CPW3)	GQLSPRALHFAVRDAGL-----PREQVKTFAARLHWRDLASFHLSVFPMPWRPIRA	684
Fc (23746)	GTLSFNQLYWRIEDSGL-----SP---KTLARLLIWRDLAYYQLSVFPMRTRCIRS	663
CryP	GIISPRELYWRIEDSSL-----SPEAKKTFARRLIWRDLAYYQLFCPPKMRDRSIRK	335
Ni (IV203_007066)	GTLSFNQLYWRIEDSGL-----SYDKVKTFSRRLFWRDLAYYQLACFPNMRYKIRS	618
Mc (C1EA54)	GQLSPRRVYSELRDARFGTAVDGVVEGRRLSRTFWHRLYRREFAYWQLGVFPQLAVTSWRS	414
Gt (L1JGS1)	GILSPRTLHFVVDTRL-----SQDKIKTFSRRLFWRDLAYFHLHTFPDM-----1025	
Cm (M1V522)	GMLSAREVFHATRAA---SRRL---AASKRSKTFERRLIWRDLAYWTLYMFPEAVTPIRS	458
Pd (A0A068LF35)	-----	0
Dr (E7FFE4)	GQLSARQVLWAARG-----ARCKSPKFORKLAWRDLAYWQISLFPDLPWESLRP	494
Tr (H2UJL0)	GQLSPRWLLWDAGK-----ARCRPPKFORKLAWRDLAYWQLTLFPDLPWESLRP	543
Mc (C1FGJ5)	GELSVREYVHSAKAIQVGSRK---SPARSAAVFLRLAWRDLAYWLNRFPRCDEPLRP	295
Gt (L1J295)	GELSPRRIFHEIVVR-----HRYKAKTFLRLAWRDLAYWCLWKFFPTMADHPLRP	327
Eh (R1D8F8)	GELSARAVLHSV--R-----ERASAPTFRLRLAWRDLAYWALWRFPHLPSRPFPR	308
Eh (R1E582)	LCLTV-EW----RDPARDANAAEALRRREGGTTGVFLIDAAMVQLKE-----	174
Tp (7368)	EYMNKACSDDTSDDKLNADNKDELFRKLCVGNTRYELVDAGMRQLWAEGWMSKARLLAA	332
Eh (R1CPW3)	HYASH-----EWSGD---ASALRAVQRGNTGFPMVDAGMRCLYATGWMHOSVRMVVA	733
Fc (23746)	HYEDM-----EWDVDPDEEERRFHAKTGMTGFFIVDAGMRLEYATGWMTQSI RMVVA	716
CryP	HYEAS-----EWTGDEEKGRFNAMKRGLTGYPLVDAGMRELYTTGYLQSVRMVVA	387
Ni (IV203_007066)	HYEDL-----EWVIGE-EKRRFNAMKRGKTFPPIVDAAMRELYETGWIITQSLRMVVA	670
Mc (C1EA54)	HYESRGDW---RWPERDPAEAEDLRRNQKGETGFPPVDAGMRRLIRTGWMHQTERRMLAA	470
Gt (L1JGS1)	---SH-----WVRE---DEELLSAKQGRGTGFPMVDAGMRELYATGWMHONVRMIAA	1071
Cm (M1V522)	HYASQ-----EWNE---DPRLLAAVQRGSTGYPIIDAGMRQLWQTGWMPQNIIRMAAA	507
Pd (A0A068LF35)	HYEHQ-----KWSN---DQSHLKAVQRGNTGYPLVDASMRQLWLTGWMNNYMRHVVA	49
Dr (E7FFE4)	PYKAL-----RWSS---DHAHLKAVQRGRTGYPLVDAAMRQLWQTGWMNNYMRHVVA	543
Tr (H2UJL0)	PYKAL-----RWST---DRRHLEAVQRGRTGYPLVDAAMRQLWLTGWMNNYMRHVVA	592
Mc (C1FGJ5)	QYATQ-----WWAL---PVDVAFQGTGYPLVDAGMRELWATGYVFNYYVRHVVA	343
Gt (L1J295)	QYAHQ-----TWDY---DQKQLRAVQRGRTGFPLVDAAMRQLWVTGWMPNYMRHVVA	376
Eh (R1D8F8)	WFEAQ-----AWSS---DQPALEAVQAGATGFPLVDAAMAQLWATGWMPNYMRHVVA	357
* * * * * : : * * *		
Eh (R1E582)	-----AGRNVFDRHLLDADWAINSANMMWLSATSFY-----	205
Tp (7368)	ACLVEGMGVSNQ-----LGRDWFAYTLIDHDPAINEMMQNAGLCGVDPFFYYG----	380
Eh (R1CPW3)	SFLIEYLGISNV-----D GARWFHDTLVDADLAINSMMQNAGRSID-----	776
Fc (23746)	SFLVEYLVRVNT-----KGCEWFHYTLVDADSAINAMMQNAGRSID-----	59
CryP	SFLVEYLVRVNT-----KGAEWPHYTLADADSAINSMMQNAGRSID-----	430
Ni (IV203_007066)	SFLVEYLVRVNT-----KGCEWFHYTLVDADSAINPMMQNAGKSGTD-----	713
Mc (C1EA54)	TFLVDYLHIHNS-----HGARWFHDYLVDAADLAINSMMQNAGKSGLD-----	513
Gt (L1JGS1)	SFLCEYLCLISNV-----KGLEWFHETLVDDLHAINAMMQNAGRSIDQASRSRGGRR	1123
Cm (M1V522)	SFLVEYLNINHI-----HGLQWFHRTLIDLIDAINAMMQNAGRTGLD-----	550
Pd (A0A068LF35)	SFLISYLRHLHI-----HGYEWFQDTLVDAVDAINAMMQNAGGSGLD-----	92
Dr (E7FFE4)	SFLIAYLHFPNQ-----EGYRWFQDTLVDAVDVAIDAMMQNAGGMCGLD-----	586
Tr (H2UJL0)	SFLIAYLHLPNQ-----EGYRWFQDTLVDAVDVAIDAMMQNAGGMCGLD-----	635
Mc (C1FGJ5)	GFLIEYLVNDR-----HGQLWFHDTLVDAVDVAIOGFMMQNGGHSGLD-----	386
Gt (L1J295)	GFLIEHMNMHV-----DGEKWFHDTLVDAVDVAINAYMMQNGGHSGLD-----	419
Eh (R1D8F8)	GFLVEFLNLDNRFLPVPVRHGLRWFDYTLVDADTAINAYMMQNGGHSGLD-----	408
* * * * * * * * * * * * * *		

Abb. A12: Sequenzvergleich von CryP und weiteren pflanzenähnlichen CRYs. Der Vergleich wurde mithilfe von Clustal Omega (EMBL-EBI) durchgeführt. Die Farben der hinterlegten Positionen sind wie folgt codiert: *rot hinterlegt* kanonische Trp-Triade, *gelb hinterlegt* FAD-Bindestellen, *türkis hinterlegt* FAD-N5 proximale Position, *rot* homologe Positionen zu CryP R311 und Q380. Punkte und Sterne markieren den Konservierungsgrad der jeweiligen Position. Die Proteine sind entsprechend der Eintragungen der GenBank- oder UniProt-Datenbank angegeben. Cm *Cyanidioschyzon merolae*, Dr *Danio rerio*, Eh *Emiliana huxleyi*, Fc *Fragilariopsis cylindrus*, Gt *Guillardia theta*, Mc *Micromonas commoda*, Ni *Nitzschia inconspicua*, Pd *Platynereis dumerilii*, Tp *Thalassiosira pseudonana*, Tr *Takifugu rubripes*.

Tab. A3: Auswirkungen auf die *in vitro* und *in vivo* FAD-Redoxchemie durch Substitutionen in der kanonischen Trp-Triade in verschiedenen CPF-Proteinen. In den blau angegebene Referenzen wird die Trp-Triade als nicht essentiell, in den grün angegebenen Referenzen als essentiell für die *in vivo* Funktionen betrachtet. Fortführung auf folgender Seite.

Austausch	<i>in vitro</i>		<i>in vivo</i>		Referenz
	Photoreduktion	Funktion	Photoreduktion	Funktion	
Proximales Trp					
DpCRYI W402F	Destabilisierung		ja	Ja (Degradation)	(Song et al. 2007; Öztürk et al. 2008)
DmCRY W420F/A	eingeschränkt			Nein (Degradation, Konformation, TIM-Bindung)	(Lin et al. 2018)
AtCRY2 W397A	nein		ja	eingeschränkt (Degradation)	(Li et al. 2011); (Engelhard et al. 2014)
AtCRY1 W400A/F	eingeschränkt		ja	Ja (Hypokotyl, Transkription, Anthocyane)	(El-Esawi et al. 2015; Gao et al. 2015)
	nein	Nein (Phospho)		Nein (KO-Phaenotyp)	(Zeugner et al. 2005)
CraCRY W399F	eingeschränkt				(Nohr et al. 2016)
AgtCPDIII W384F	eingeschränkt				(Scheerer et al. 2015)
Mediales Trp					
DpCRYI W359F	Destabilisierung				(Song et al. 2007)
DmCRY W397F/A			ja	Ja (Degradation, Konformation, JET-Bindung)	(Öztürk et al. 2008; Hoang et al. 2008b)
	eingeschränkt			Nein (Degradation, Konformation; TIM-Bindung)	(Lin et al. 2018)
AtCRY1 W400F			ja		(Hoang et al. 2008a)
AtCRY2 W374A	nein		ja	eingeschränkt (Degradation)	(Li et al. 2011; Engelhard et al. 2014)
AtCRY1 W377A/F	eingeschränkt			Ja (Hypokotyl, Transkription, Anthocyane)	(Gao et al. 2015)
CraCRY W376F	eingeschränkt				(Nohr et al. 2016)
AgtCPDIII W361F	eingeschränkt				(Scheerer et al. 2015)

Tab. A3: Fortführung.

Austausch	<i>in vitro</i>		<i>in vivo</i>		Referenz
	Photoreduktion	Funktion	Photoreduktion	Funktion	
Distales Trp					
EcCPDI W306F	nein	nein		Ja (Katalyse)	(Li et al. 1991; Kavakli und Sancar 2004)
DpCRYI W328F	nein			Ja (Degradation)	(Song et al. 2007; Öztürk et al. 2008)
DmCRY W342F/A	nein		ja	Ja (Degradation)	(Hoang et al. 2008b; Öztürk et al. 2008)
	eingeschränkt			Nein (Degradation, Konformation, TIM-Bindung)	(Lin et al. 2018)
AtCRY2 W321A	eingeschränkt		ja	eingeschränkt (Degradation)	(Li et al. 2011; Engelhard et al. 2014)
AtCRY1 W324A/F	eingeschränkt	Nein (Konformation)	ja	Ja (Hypokotyl, Transkription, Anthocyane)	(Kondoh et al. 2011; El-Esawi et al. 2015; Gao et al. 2015)
	nein	Nein (Phospho)		Nein (KO-Phaentyp)	(Zeugner et al. 2005)
CraCRY W322F	nein				(Nohr et al. 2016)
AtCRY3 W356F	nein				(Moldt et al. 2009)
AgtCPDIII W308F	eingeschränkt				(Scheerer et al. 2015)

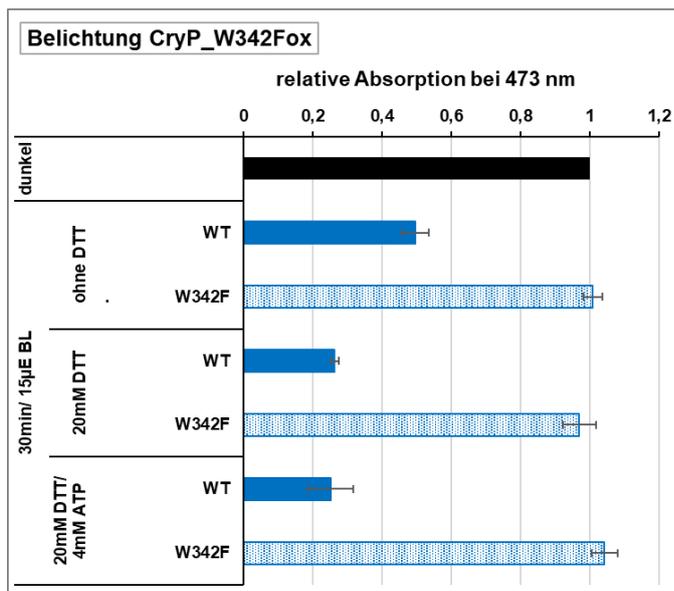


Abb. A14: Lichtabhängige FAD-Reduktion in CryP_W342Fox. Nach chemischer Oxidation mit $K_3[Fe(CN)_6]$ folgte eine BL-Belichtung (λ_{max} 465 nm, $15 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) von CryPox und CryP_W342Fox für 30 min ohne oder nach Zugabe von 20 mM DTT und 4 mM ATP. Die Messwerte der unbelichteten Proben wurden relativ zur Absorption bei 473 nm auf 1 normiert. Zum Vergleich der Stärke der Photoreduktion unter den einzelnen Belichtungsbedingungen wurden die relativen Absorptionswerte bei 473 nm als Maß für die vorhandene Menge FADox dargestellt. Die Messwerte stellen Mittelwerte und daraus abgeleitete Standardabweichungen aus jeweils drei technischen Replikaten dar.

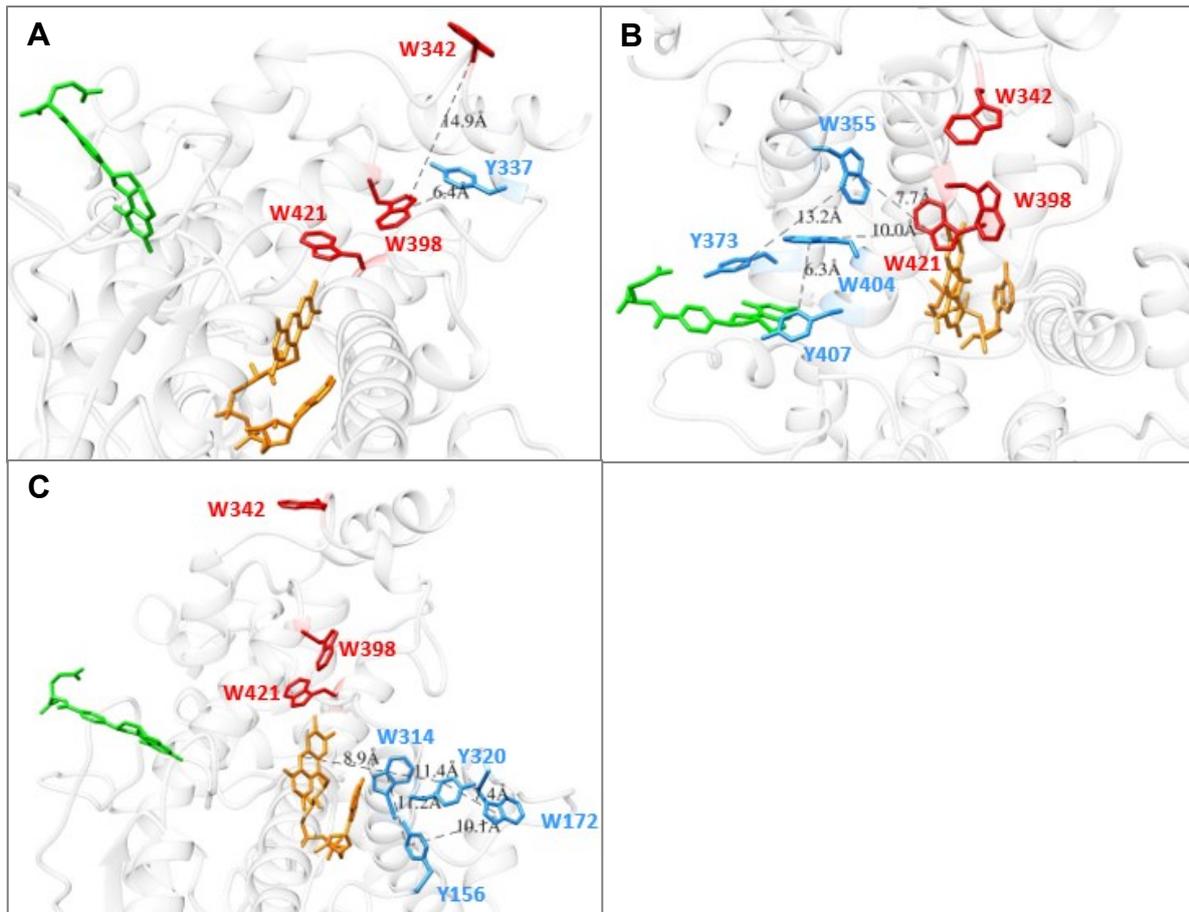


Abb. A13: Potentielle alternative aromatische Triaden in CryP. Die potentielle CryP-Tertiärstruktur wurde auf Basis der Strukturdaten der *A. tumefaciens* CPDIII-Photolyase (4U63; Scheerer et al. 2015) mittels des PHYRE2 *Protein Homology/ analogy Recognition Engine* Servers errechnet und mithilfe von UCSF Chimera visualisiert. Die AS der kanonischen der Trp-Triade (rot) durchspannen das Protein vom FAD bis zur Oberfläche. **(A)** Alternativer Reduktionsweg FAD-W421-W398-Y337. **(B)** Alternativer Reduktionsweg FAD-W421-W355/W404-Y373/Y407. **(C)** Alternativer Reduktionsweg FAD-W314-Y156/Y320-W172. Die Abstände zwischen den einzelnen Trp und FAD sind angegeben. Orange FAD; grün MTHF.

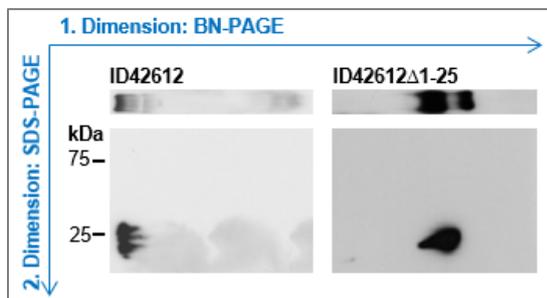


Abb. A14: 2D-PAGE zum Löslichkeitsverhalten von ID42612 und ID42612Δ1-25. Für den CryP-Interaktionspartner ID42612 wird eine N-terminale Transmembranhelix vorhergesagt, die die Löslichkeit von ID42612 in Detergenzien erklären kann. Diese wurde durch Deletion der N-terminalen 25 Aminosäuren in ID42612Δ1-25 entfernt. Je 200 ng rekombinant aufgereinigtes ID42612 bzw. ID42612Δ1-25 wurden ohne Zugabe von Detergenzien in einer 4-10 %igen BN-PAGE aufgetrennt. Es folgte eine 10 %ige SDS-PAGE in zweiter Dimension. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte der immunologische Nachweis mit einem Histidin-Antikörper. Während ID42612 am oberen Rand des BN-Gels festgehalten wurde, konnte ID42612Δ1-25 aufgrund einer besseren Wasserlöslichkeit in das Gel einlaufen.