

Der Blaulicht-Photorezeptor Cryptochrom 2 aus  
*Arabidopsis thaliana*: Lichtabhängige  
Phosphorylierung und Interaktionspartner in der  
Signaltransduktion

DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Markus Bernd Müller**

geboren in Lich

Marburg/Lahn 2003

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am  
24.11.2003 angenommen.

Erstgutachter Prof. Dr. Alfred Batschauer

Zweitgutachter Prof. Dr. Paul Galland

Tag der mündlichen Prüfung am 24.11.2003

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>ix</b>
Abkürzungen der Speziesnamen . . . . .	xii
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Lichtperzeption in Pflanzen . . . . .	1
1.2 Phytochrome . . . . .	2
1.3 Phototropine . . . . .	4
1.4 Cryptochrome . . . . .	5
1.4.1 Geschichte . . . . .	5
1.4.2 Vorkommen . . . . .	5
1.4.3 Biologische Funktion pflanzlicher Cryptochrome . . . . .	6
1.4.4 Expression . . . . .	7
1.4.5 Chromophore . . . . .	7
1.4.6 C-Termini pflanzlicher Cryptochrome . . . . .	9
1.4.7 Subzelluläre Lokalisation . . . . .	13
1.4.8 DNA-Bindung . . . . .	13
1.4.9 Postulierte Primärreaktion . . . . .	14
1.4.10 Protein-Protein Interaktionen . . . . .	15
<b>2 Zielsetzung</b>	<b>18</b>

<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
3.5	Chemikalien . . . . .	19
3.5.1	Antikörper . . . . .	20
3.5.2	Primer . . . . .	21
3.5.3	Plasmide . . . . .	23
3.5.4	Geräte . . . . .	24
3.6	Organismen und Anzucht . . . . .	25
3.6.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> . . . . .	25
3.6.1.1	Keimlingsanzucht für Proteinextrakte . . . . .	26
3.6.1.2	Keimlingsanzucht für mikroskopische Analysen . . . . .	26
3.6.1.3	Zellkulturanzucht . . . . .	27
3.6.2	<i>Petroselinum crispum</i> . . . . .	27
3.6.3	<i>Escherichia coli</i> . . . . .	27
3.6.4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> . . . . .	28
3.6.5	<i>Pichia pastoris</i> . . . . .	28
3.7	Molekularbiologische Methoden . . . . .	28
3.7.1	Plasmid-DNA Isolation aus <i>E. coli</i> . . . . .	28
3.7.2	Agarose-Gelelektrophorese von Plasmid-DNA . . . . .	29
3.7.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren . . . . .	29
3.7.3.1	Gelelektrophorese . . . . .	29
3.7.3.2	Spektroskopie . . . . .	30
3.7.4	Restriktionsverdau von DNA . . . . .	30
3.7.5	Reinigung von DNA Fragmenten . . . . .	31
3.7.6	Ligation . . . . .	31
3.7.7	PCR . . . . .	31
3.7.8	Transfektionsmethoden . . . . .	32

3.7.8.1	Transformation von <i>E. coli</i> . . . . .	32
3.7.8.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	32
3.7.8.2.1	Herstellung kompetenter Zellen . . . . .	33
3.7.8.2.2	Transformation . . . . .	33
3.7.8.3	Transformation von <i>P. pastoris</i> . . . . .	34
3.7.8.3.1	Herstellung kompetenter Zellen . . . . .	34
3.7.8.3.2	Transformation . . . . .	35
3.7.8.4	Transformation von <i>P. crispum</i> . . . . .	36
3.7.8.4.1	Protoplastierung . . . . .	36
3.7.8.4.2	Elektroporation . . . . .	36
3.7.8.4.3	PEG vermittelte Transformation . . . . .	37
3.7.8.5	Transformation von <i>A. thaliana</i> Zellkultur . . . . .	38
3.7.8.5.1	Protoplastierung . . . . .	38
3.7.8.5.2	Transformation . . . . .	39
3.8	Proteinchemische Methoden . . . . .	40
3.8.1	Nachweismethoden von Proteinen . . . . .	40
3.8.1.1	Proteinbestimmung nach Bradford . . . . .	40
3.8.1.2	Proteinbestimmung mit Amidoschwarz . . . . .	40
3.8.1.3	Spektroskopische Proteinbestimmung . . . . .	41
3.8.1.4	Färbung von SDS-PAGE Gelen mit Coomassie . . . . .	41
3.8.1.5	Färbung von Membranen . . . . .	41
3.8.1.6	Immunologischer Nachweis von Proteinen . . . . .	42
3.8.1.7	Nachweis mittels Enhanced-Chemiluminescence . . . . .	42
3.8.1.8	Nachweis mittels Farbreaktion . . . . .	43
3.8.2	Proteinexpression in <i>E. coli</i> . . . . .	43
3.8.3	Proteinexpression in <i>P. pastoris</i> . . . . .	44

3.8.3.1	Anzucht und Expression von Mut <sup>S</sup> - Stämmen . . . . .	45
3.8.3.2	Anzucht und Expression von Mut <sup>+</sup> - Stämmen . . . . .	45
3.8.4	Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial . . . . .	46
3.8.5	Proteinextraktion aus <i>E. coli</i> . . . . .	46
3.8.6	Proteinextraktion aus Hefe . . . . .	47
3.8.7	Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese . . . . .	47
3.8.7.1	SDS-PAGE nach Schägger und von Jagow . . . . .	47
3.8.7.2	SDS-PAGE nach Lämmli . . . . .	48
3.8.7.3	Western Transfer und Dot-Blot . . . . .	49
3.9	Proteinreinigung . . . . .	50
3.9.1	Entsalzung von Proteinlösungen . . . . .	50
3.9.2	Ammoniumsulfatpräzipitation . . . . .	50
3.9.3	Metallionen-Affinitätschromatographie . . . . .	51
3.9.4	Anionenaustauschchromatographie . . . . .	52
3.9.5	Größenausschlusschromatographie . . . . .	52
3.10	Nachweis von Protein - Protein Interaktionen . . . . .	53
3.10.1	Hefe-2-Hybrid System . . . . .	53
3.10.1.1	Herstellung einer Suspension . . . . .	54
3.10.1.2	Herstellung eines Proteinextraktes . . . . .	54
3.10.1.3	ONPG-Assay . . . . .	55
3.10.2	Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (BRET) . . . . .	56
3.10.3	Co-Immunopräzipitation . . . . .	57
3.11	Nachweis von DNA - Protein Interaktionen . . . . .	58
3.11.1	Gel - Mobilitätsassay . . . . .	58
3.11.1.1	<i>In vitro</i> -Transkription/Translation . . . . .	58
3.11.1.2	Radioaktivmarkierung der DNA . . . . .	58

3.11.1.3 Waschen und Aktivitätsbestimmung . . . . .	59
3.11.1.4 Annealing für Doppelstrangproben . . . . .	59
3.11.1.5 <i>Gel-mobility-shift-assay</i> . . . . .	59
3.11.1.6 Nichtdenaturierende Gelelektrophorese und Detektion . . . . .	60
3.12 Mikroskopische Methoden . . . . .	60
3.12.1 Epifluoreszenzmikroskopie . . . . .	60
3.12.2 Konfokale Laserscan Mikroskopie . . . . .	60
3.13 Bestrahlungsmethoden . . . . .	61
3.13.1 Breitbandbestrahlung . . . . .	61
3.13.2 Monochromatische Bestrahlung zur Schwellenwertbestimmung . . . . .	61
3.13.3 Monochromatische Bestrahlung zur Aktionsspektroskopie . . . . .	61
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>63</b>
4.14 CRY2 in Pflanzenzellen . . . . .	63
4.14.1 Subzelluläre Lokalisation von cry2 . . . . .	63
4.14.2 Lichtabhängige Phosphorylierung von cry2 . . . . .	66
4.14.3 Aktionsspektrum der Phosphorylierung . . . . .	67
4.14.4 Untersuchungen zum Abbau von cry2 . . . . .	68
4.15 Protein-Protein Interaktionen . . . . .	72
4.15.1 Interaktion von cry2 mit At2g02230 . . . . .	72
4.15.2 Interaktion von At2g02230 mit dem SCF- Komplex . . . . .	73
4.15.3 Subzelluläre Lokalisation von At2g02230 . . . . .	74
4.15.4 Transaktivierende Wirkung von cry2 in Hefe . . . . .	74
4.15.5 Interaktion von cry2 mit At5g26280 . . . . .	76
4.15.5.1 Subzelluläre Lokalisation von At5g26280 . . . . .	76
4.15.5.2 Untersuchung der Interaktion mittels BRET . . . . .	78

4.15.5.3 Untersuchung der Interaktion mittels Co- Immunopräzi- pitation . . . . .	80
4.16 Effekte der Expression von cry2 in Hefe . . . . .	82
4.16.1 Aktionsspektrum der Transaktivierung des Reporters durch cry2 . . . . .	82
4.16.2 Wachstumsinhibition von Hefezellen in Blaulicht durch cry2 . . . . .	84
4.17 Bindung von cry2 an DNA . . . . .	85
4.18 Expression von cry2 im heterologen System . . . . .	86
4.18.1 Proteinexpression in <i>E.coli</i> . . . . .	86
4.18.1.1 Expression von cry2 als 6x His- Fusion . . . . .	86
4.18.1.2 Expression von cry2 als GST- Fusion . . . . .	91
4.18.2 Expression von cry2 in <i>Pichia pastoris</i> . . . . .	92
4.18.2.1 pPICZ $\alpha$ A-CRY2 . . . . .	92
4.18.2.2 pPIC3.5K-CRY2 . . . . .	92
<b>5 Diskussion</b>	<b>95</b>
5.19 Subzelluläre Lokalisation von <i>Arabidopsis</i> - Cryptochrom 2 . . . . .	95
5.20 Abbau und Phosphorylierung von cry2 . . . . .	96
5.21 DNA-Bindung durch cry2 . . . . .	98
5.22 Interaktionspartner von cry2 . . . . .	99
5.22.1 Interaktion von cry2 mit At2g02230 . . . . .	99
5.22.2 Interaktion von cry2 mit At5g26280 . . . . .	99
5.23 Cry2-Effekte in Hefe . . . . .	101
5.24 Expression von cry2 . . . . .	103
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>104</b>
<b>8 Literaturverzeichnis</b>	<b>106</b>

*INHALTSVERZEICHNIS*

viii

**Anhang**

**xi**

A.1 Danksagung . . . . . xi

A.2 Lebenslauf . . . . . xii

A.3 Tabellen . . . . . xiii

A.4 Erklärung . . . . . xxi

# Abkürzungsverzeichnis

8-HDF	8-Hydroxy-5-deazaflavin
$\alpha$	Antikörper
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicilin
<i>aqua bidest.</i>	Bidestilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
B5	Nährmedium für die Anzucht von pflanzlichen Zellkulturen
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin, <i>bovine- serum- albumin</i>
CCT1	C-Terminus von cry1
CCT2	C-Terminus von cry2
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Ci	Curie
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer
cry	Cryptochrom
Da	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DIL	Doppel- Interferenz- Linienfilter
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinadeninmononukleotid
g	Gramm
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein, <i>Green Fluorescent Protein</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HIR	<i>high irradiance response</i>
HRP	Meerrettich- Peroxidase, <i>horseradish peroxidase</i>
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Km	Kanamycin
l	Liter
LB	Nährmedium nach Luria Bertani
LD	Langtag, <i>long day</i> (16 h hell, 8 h dunkel)
M	mol/l
min	Minute
MTHF	N <sup>5</sup> N <sup>10</sup> -Methenyl-5,6,7,8-tetrahydrofolat
NBT	3,3'-(3,3'-Dimethoxy-4-biphenylen)-bis-[2-(p-nitro-phenyl)-5-phenyl-2H]- tetrazoliumchlorid (Nitro Blue Tetrazolium)
n.d.	nicht getestet, <i>not determined</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
PAS	PER, ARNT, SIM
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
phot	Phototropin
phr	Photolyase
phy	Phytochrom
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RLUC	<i>Renilla reniformis</i> Luziferase
RNA	Ribonukleinsäure

rpm	Umdrehungen pro Minute, <i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAS	gesättigte Ammoniumsulfatlösung, <i>saturated ammonium sulfate</i>
SD	Kurztag, <i>short day</i> (8 h dunkel, 16 h hell)
SDS	Natriumdodecylsulfat, <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
ss	einzelsträngig, <i>single stranded</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS(-T)	Tris-buffered-saline(-Triton)
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethyldiamin
TnT	gekoppelte <i>in vitro</i> Transkription und Translation
Tris/HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethanhydrochlorid
U	Unit
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
Vol.	Volumen
VLFR	<i>very low fluence response</i>
w/v	Gewicht/Volumen
xg	Beschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
YFP	Gelb-fluoreszierendes Protein, <i>Yellow Fluorescent Protein</i>

## Abkürzungen der Speziesnamen

Ac	<i>Adiantum capillum-veneris</i>
Ar	<i>Armoracia rusticana</i>
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Clamy	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
d	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
g	Ziege (gout)
h	Mensch (human)
Le	<i>Lycopericon esculentum</i>
m	Maus
Os	<i>Oryza sativa</i>
Pp	<i>Physcomitrella patens</i>
r	Kaninchen (rabbit)
Sa	<i>Sinapis alba</i>
Syn	<i>Synechocystis</i> sp.
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Vc	<i>Vibrio cholerae</i>
z	Zebrafisch

# Einleitung

## 1.1 Lichtperzeption in Pflanzen

Sensorische Systeme werden benötigt, um auf wechselnde Umweltbedingungen reagieren zu können. Dass Pflanzen dabei besonders effizient reagieren müssen, ist schon aufgrund ihrer sessilen Lebensweise evident. Vor allem dem Licht muss hierbei eine große Bedeutung zugeschrieben werden, da der Energie- und Baustoffwechsel entscheidend von der Photosynthese bestimmt sind, jedoch ein Übermaß an Licht aufgrund seines Energiegehaltes auch ein Gefahrenpotential für die Pflanze darstellt. Demzufolge ist in Pflanzen nicht nur die Photosynthese selbst durch Licht reguliert, sondern auch eine Vielzahl von Entwicklungsprozessen, angefangen von der Samenkeimung, der Keimlingsentwicklung, der Steuerung des vegetativen Wachstums bis hin zum Übergang zur reproduktiven Wachstumsphase. Erste Erkenntnisse darüber gewannen schon Henfrey, (1852) und Kjellman, (1885). Nicht nur die spektrale Zusammensetzung des Lichts kann von der Pflanze erkannt und verarbeitet werden, sondern auch die Richtung, die Fluenzrate (Intensität) und die Dauer der Bestrahlung. Es hat sich gezeigt, dass diese regulatorischen Prozesse nicht allein vom photosynthetischen Apparat, sondern speziell durch sensorischen Photorezeptoren übernommen werden (Garner, 1920). Erst die Entwicklung der modernen Molekularbiologie ermöglichte die Identifizierung dieser Photorezeptoren auf molekularer Ebene. Da Pflanzen, bedingt durch die Absorptionseigenschaften des Photosynthesepigments Chlorophyll, vor allem den blauen und roten Anteil des sichtbaren Lichts nutzen können, verwundert es nicht, dass auch ein Großteil der Photorezeptorsysteme in diesem Bereich des Spektrums wirksam ist. Zu diesen Photorezeptoren gehören die Phytochrome, deren Wirkungsspektrum vor allem im Rot- und Dunkelrotbereich liegt, sowie die Cryptochrome und Phototropine, deren Flavinchromophore die Absorption von UV-A und Blaulicht ermöglichen. Zusätzlich sind auch

UV-B Photorezeptoren postuliert, deren molekulare Natur jedoch bis heute unbekannt ist.

## 1.2 Phytochrome

Phytochrome sind aufgrund ihrer frühen Entdeckung (Butler *et al.*, 1959) die am ausführlichsten untersuchte Klasse pflanzlicher Photorezeptoren. Als Phytochromantworten wurden zunächst solche definiert, die durch Bestrahlung mit rotem Licht auftraten und durch nachfolgende Bestrahlung mit dunkelrotem Licht revertierbar waren (Übersicht in: Kendrick und Kronenberg, 1994). Heute ist bekannt, dass diese Photoreversibilität nur für bestimmte Phytochromantworten gültig ist, während andere letztlich irreversibel ablaufen. Die Vielzahl bis heute beschriebener Phytochromeffekte auf die pflanzliche Entwicklung wurde in mehreren aktuellen Reviews zusammengefasst (Smith, 2000; Vierstra und Davis, 2000; Fankhauser und Staiger, 2002; Kim *et al.*, 2002; Møller *et al.*, 2002; Nagy und Schäfer, 2002; Schäfer und Bowle, 2002; Kevei und Nagy, 2003). Phytochrome sind Proteine einer Größe von ~120 kDa und liegen als Dimer vor (Edgerton und Jones, 1992) (Abb.1.1B). Ihre Wirksamkeit liegt vor allem im roten Bereich des Spektrums, bedingt durch die Absorptionseigenschaften des Chromophors Phytochromobilin (Lagarias und Rapoport, 1980), einem linearen Tetrapyrrol (Abb.1.1C). Der Chromophor wird nach der Synthese des Apoproteins autokatalytisch kovalent mit einem konservierten Cystein verbunden (Abb.1.1A). Bei Bestrahlung mit rotem Licht (600-700 nm) durchläuft das Phytochromobilin eine cis- trans Isomerisierung, die durch nachfolgende Bestrahlung mit dunkelrotem Licht (700-800 nm) revertierbar ist. Diese Isomerisierung ist jedoch auch durch blaues Licht ausgelöst, was eine klare Unterscheidung von Phytochromeffekten und den Effekten der Blaulichtphotorezeptoren erschwert. Heute sind multiple Photorezeptormutanten verfügbar, die eine getrennte Beobachtung der Funktion einzelner Photorezeptoren ermöglichen. In *Arabidopsis* sind fünf Phytochromogene vorhanden, die wiederum verschiedenen Klassen zugeordnet werden. Typ I- Phytochrome sind in ihrer aktiven Form ( $P_{fr}$ ) lichtlabil und vermitteln sogenannte VLFR (*very low fluence response*) und FR-HIR (*far-red high irradiance response*), bei denen die Menge des aktiven Photorezeptors nur durch besondere Bestrahlungsbedingungen (hohe Fluenzrate an dunkelrotem Licht über einen längeren Zeitraum bzw. sehr geringe Fluenzrate an hellrotem Licht) über einen längeren Zeitraum konstant gehalten werden kann. In

*Arabidopsis* ist nur phyA Vertreter dieser Klasse und ist unter anderem essentiell für die Deetiolierung von Keimlingen unter vorwiegend dunkelroten Bestrahlungsbedingungen, wie sie unter einem Blätterdach auftreten (Whitelam *et al.*, 1993). Die Phytochrome B bis E gehören zu dem lichtstabilen Typ II. PhyB, D und E vermitteln unter anderem den so genannten *shade avoidance response*, ein beschleunigtes Sproßwachstum, um Beschattung durch andere Pflanzen zu vermeiden. phyB spielt eine entscheidende Rolle bei der Samenkeimung, und phyC wird eine Rolle bei der Entfaltung der Primärblätter zugeschrieben (Neff *et al.*, 2000). Sowohl phyA als auch phyB dienen als Photorezeptoren für rotes Licht beim Lichteingang der Inneren Uhr, wobei phyA zusätzlich geringe Fluenzraten Blaulicht perzipiert (Somers *et al.*, 1998; Devlin und Kay, 2000). Eine wichtige Rolle im Signaltransduktionsmechanismus der Phytochrome spielt deren Verteilung zwischen Kern und Cytoplasma. Für alle Phytochrome konnte ein lichtabhängiger Kernimport gezeigt werden (Kircher *et al.*, 1999; Yamaguchi *et al.*, 1999; Kircher *et al.*, 2002). Im Zellkern kommt es zur Interaktion mit dem Transkriptionsregulator PIF3 (Ni *et al.*, 1998; 1999). Im Cytoplasma aktiviert Phytochrom GTP-bindende Proteine und beeinflusst so die *second messenger* cGMP und Calcium (Bowler *et al.*, 1994). Im C-Terminus der Phytochrome befindet sich eine Ser/Thr-Kinasedomäne (Yeh und Lagarias, 1998), zudem konnten phytochromabhängige Phosphorylierungen nachgewiesen werden (Harter *et al.*, 1994).

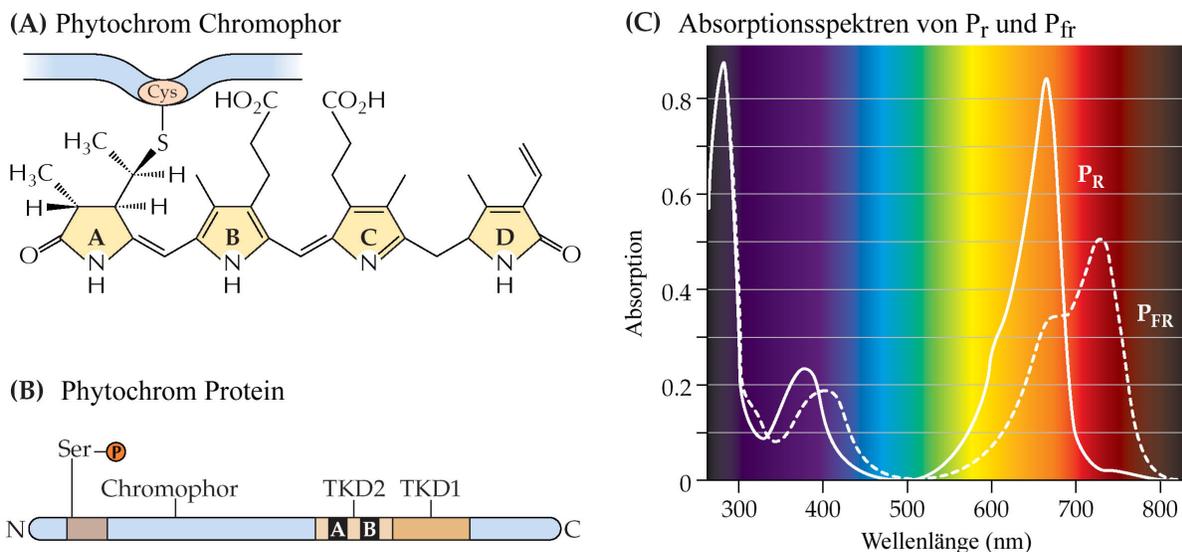


Abbildung 1.1: Übersicht zum Aufbau und der Absorption von Phytochrom. Verändert nach (Buchanan *et al.*, 2000)

### 1.3 Phototropine

Eine weitere Familie von Photorezeptoren stellen die Phototropine dar. Wie der Name schon andeutet, spielen sie eine wichtige Rolle im Phototropismus von Pflanzen, einer Wachstumsbewegung, abhängig von der Richtung des einfallenden Lichts. Phototropine tragen je zwei besondere Domänen der PAS-Familie, die bei Proteinen gefunden wurden, die auf Licht, Sauerstoff oder Spannung reagieren und daher LOV-Domänen genannt werden (*light, oxygen, voltage*) (Huala et al., 1997). An diese LOV-Domänen ist zunächst nicht-kovalent jeweils ein Molekül des Chromophors FMN gebunden. Aus diesem Grund hat deren Wirkungsspektrum Maxima im UV-A/Blaubereich. Im C-terminalen Bereich der Phototropine liegt eine Ser/Thr- Kinasedomäne. Für die beiden *Arabidopsis*-Phototropine (phot1 und phot2; frühere Bezeichnung: nph1 und npl1) konnte eine lichtabhängige Autophosphorylierung gezeigt werden (Christie et al., 1998; Sakai et al., 2001). Da sich die LOV-Domänen der Phototropine mit gebundenem Cofaktor heterolog exprimieren lassen und zudem die Kristallstruktur gelöst werden konnte (Crosson und Moffat, 2001), sind heute viele Details zum Photozyklus bekannt. Hierbei kommt es blaulichtabhängig zur Bildung eines kovalenten FMN-Cysteinyll-Adduktes, das in einer folgenden Dunkelreversion wieder zerfällt. Während dieses Prozesses kommt es zu einer Veränderung der Absorptionseigenschaften (Swartz et al., 2001). Das phot1-Vollängenprotein ist mit der Plasmamembran assoziiert (Liscum und Briggs, 1995). Neben der Rolle im Phototropismus sind Phototropine auch an der lichtabhängigen Relokalisation der Chloroplasten (Jarillo et al., 2001b; Kagawa et al., 2001) und an der blaulichtinduzierten Stomataöffnung (Kinoshita und Shimazaki, 1999) beteiligt. Daten von Folta und Spalding, (2001) zeigen, dass phot1 für eine sehr frühe, transiente Phase der Inhibition des Hypokotyllängenwachstums verantwortlich ist. Eine wichtige Rolle spielt bei diesen Prozessen vermutlich die lichtabhängige Aktivierung von Calciumkanälen durch Phototropin (Baum et al., 1999; Stoelzle et al., 2003). Besonders interessant ist die Entdeckung von phy3 aus *Adiantum capillum-veneris*, welches Domänen und Eigenschaften der Phototropine und Phytochrome in einem Protein vereinigt (Nozue et al., 1998).

## 1.4 Cryptochrome

### 1.4.1 Geschichte

Nachdem über lange Zeit der Begriff Cryptochrom ausschließlich für eine bestimmte Gruppe von Blaulichtphänomenen mit charakteristischem Aktionsspektrum (Maxima bei 320-400 nm und 400-500 nm), verwendet wurde (Gressel, 1979), die auch die Phototropine umfassten, konnte 1993 erstmalig die molekulare Natur eines dieser pflanzlichen Photorezeptoren entschlüsselt werden. Ahmad und Cashmore, (1993) konnten das Gen der schon 1980 charakterisierten *Arabidopsis*- Photomorphogenesemutante, *hy4* klonieren (Koornneef *et al.*, 1980). *hy4* zeigte im Blaulicht eine Störung in der Inhibition des Hypokotylstreckungswachstums. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von *HY4* weist über die ersten 500 Aminosäuren eine 30%ige Sequenzidentität zu einer damals schon bekannten Klasse von DNA- Reparaturenzymen auf, den bakteriellen Photolyasen, und enthält auch die konservierten Motive zur Bindung der Chromophore FAD und MTHF, einem Pterin. Jedoch hat *hy4* eine C-terminale Extension von 181 AS, die in den Photolyasen fehlt und geringe Homologie zu Tropomyosin aus der Ratte zeigt. Eine Relevanz dieser Homologie ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da die heute als funktionell wichtiges Motiv bekannte DAS-Domäne (siehe C-Termini pflanzlicher Cryptochrome) in Tropomyosin fehlt. *hy4* wurde schließlich aufgrund seiner Photorezeptorfunktion in *cry1* umbenannt (Lin *et al.*, 1995a).

### 1.4.2 Vorkommen

Bis heute sind Cryptochrome aus einer Vielzahl von Organismen bekannt. Cryptochrome Höherer Pflanzen wurden in *Arabidopsis* (Ahmad und Cashmore, 1993; Hoffman *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1996b; Brudler *et al.*, 2003; Kleine *et al.*, 2003), Senf (Batschauer, 1993), Tomate (Ninu *et al.*, 1999), Melone, Banane (Perrotta *et al.*, 2001), Reis (Takano und Hirose, 2001; Hirose und Takano, 2003) und Gerste (Perrotta *et al.*, 2001) gefunden. Bei Niederen Pflanzen sind Cryptochrome aus dem Farn *Adiantum capillus-veneris* (Kanegae und Wada, 1998; Imaizumi *et al.*, 2000), aus dem Moos *Physcomitrella patens* (Imaizumi *et al.*, 2002) und der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (Small *et al.*, 1995) beschrieben. Cryptochrome wurden auch in Bakterien wie *Synechocystis* sp. PCC6803 (Ng *et al.*, 2003), *Mesorhizobium loti* und neuerdings in *Vibrio cholerae*

(Worthington *et al.*, 2003) entdeckt. Dabei ist besonders interessant, dass kürzlich ein Cryptochrom mit grosser Ähnlichkeit zu den Isoformen aus *Synechocystis* und *Vibrio* in *Arabidopsis* beschrieben wurde (CRY-DASH bzw. AtCRY3: Brudler *et al.* 2003; Kleine *et al.* 2003). Auch in Tieren existieren Cryptochromgene, die sich durch eine Verwandtschaft zu den (6-4) Photolyasen auszeichnen. Bekannt und gut charakterisiert sind die Cryptochrome aus Mensch (Hsu *et al.*, 1996; Todo *et al.*, 1996), Maus (Kobayashi *et al.*, 1998) und *Drosophila* (Emery *et al.*, 2000) sowie aus Huhn (Yamamoto *et al.*, 2001), Wachtel (Fu *et al.*, 2002) und Zebrafisch (Kobayashi *et al.*, 2000). Allen gemeinsam ist die Homologie zu den Photolyasen, dennoch gibt es einige interessante und spezifische Unterschiede. Der Schwerpunkt wird im Folgenden auf die pflanzlichen Cryptochrome, im Besonderen auf *Arabidopsis*-CRY1 (AtCRY1 bzw. AT4g08920) und CRY2 (AtCRY2 bzw. At1g04400) gelegt.

### 1.4.3 Biologische Funktion pflanzlicher Cryptochrome

Wie schon erwähnt, hat die Mutation des *HY4*-Gens Einfluss auf die blaulichtabhängige Deetiolierung. Dies beinhaltet sowohl die Inhibition des Hypokotyllängenwachstums (Koorneef *et al.*, 1980) als auch die Öffnung des Hypokotylhakens, der das apikale Sproßmeristem beim Durchbrechen der Erdschicht schützt (Neff und Chory, 1998). Auch die Blaulicht-abhängige Expression einiger Gene, wie z.B. der Chalkonsynthese (CHS) und Chalkonisomerase (CHI), sind beeinflusst (Ahmad *et al.*, 1995; Jackson und Jenkins, 1995). Die Überexpression von AtCRY1 führt zu einer Hypersensitivität bezüglich der beschriebenen Effekte sowohl im UV-A/ Blau- als auch im Grünlicht (Lin *et al.*, 1995a; Lin *et al.*, 1996a). Auch AtCRY2 ist an diesen Prozessen beteiligt - wenn auch in geringerem Ausmaß - und redundant zur cry1 Funktion (Guo *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1998). Neuere Daten von Folta und Spalding, (2001) deuten jedoch einen additiven Effekt der Cryptochrome auf das Hypokotyllängenwachstum an. AtCRY2 Effekte sind nur bei niedrigen Fluenzraten ausgeprägt, da das cry2- Protein bei höheren Fluenzraten sehr schnell abgebaut wird (Lin *et al.*, 1998). Auch an der Messung der Tageslänge sind die *Arabidopsis*- Cryptochrome - vor allem aber cry2 - beteiligt. Als fakultative Langtagpflanze blüht *Arabidopsis* unter Langtagbedingungen deutlich früher als unter Kurztagbedingungen. In *cry2*-Mutanten (*fha1*) ist der Blühzeitpunkt im Langtag verzögert (Koorneef *et al.*, 1991; Guo *et al.*, 1998). Ebenso wie die Phytochrome sind Atcry1 und Atcry2 am Lichteingang zur Inneren Uhr beteiligt (Somers *et al.*, 1998; Devlin

und Kay, 2000). Dabei dienen sie zum einen redundant als Photorezeptoren für blaues Licht beim Stellen der Inneren Uhr, zum anderen ist cry1 für die Weiterleitung des Rot- und Blaulichtsignals von phyA notwendig (Devlin und Kay, 2000). cry1 erfüllt somit eine lichtunabhängige Funktion unterhalb von phyA. Es wurde auch eine Beteiligung der Cryptochrome am Phototropismus gezeigt (Ahmad *et al.*, 1998c).

#### 1.4.4 Expression

Für beide *Arabidopsis*- Cryptochrome konnte mit Promotor:Luciferase-Fusionen (Toth *et al.*, 2001) und Microarrays (Harmer *et al.*, 2000) gezeigt werden, dass deren mRNA-Expression einer circadianen Regulation unterliegt. Während CRY1 sein Maximum in der Mitte der Lichtphase erreicht, ist das Maximum für CRY2 zum Ende der Lichtphase hin verschoben. Beide mRNAs sind in allen Gewebetypen exprimiert, CRY1- mRNA ist jedoch vor allem in den oberirdischen Geweben zu finden, während CRY2-mRNA am stärksten in der Wurzelspitze und den Blattprimordien auftritt (Toth *et al.*, 2001). Auf Proteinebene hingegen ist der Level an cry1 nicht reguliert, während cry2 durch blaues, grünes und UV-A Licht stark herunterreguliert wird (Lin *et al.*, 1998). Dies führt zu einer ausgeprägten diurnalen Regulation der Proteinmenge im Kurztag, wohingegen dieser Effekt im Langtag kaum ausgeprägt ist (El-Din El-Assal *et al.*, 2001; Mockler *et al.*, 2003). Es wird heute davon ausgegangen, dass diese Regulation auf Proteinabbau mittels eines bislang nicht identifizierten Mechanismus beruht.

#### 1.4.5 Chromophore

Das aktuelle Wissen über die Chromophore der Cryptochrome basiert vor allem auf heterologer Expression und den Erkenntnissen über die Photolyasen, da die Reinigung der Cryptochrom- Holoproteine aus dem homologen System aufgrund der geringen Proteinmenge ein sehr schwieriges und aufwendiges Unterfangen ist (siehe: Özgür und Sancar, 2003). Die Bindemotive für die Chromophore liegen im N-terminalen, zu den Photolyasen homologen Bereich. Der katalytische Kofaktor der Photolyasen ist immer ein nicht- kovalent gebundenes FAD (Eker *et al.*, 1981). Alle bisher charakterisierten Cryptochrome tragen ebenfalls FAD (Lin *et al.*, 1995b; Malhotra *et al.*, 1995; Brudler *et al.*, 2003; Özgür und Sancar, 2003). Der Adeninrest ist zumindest bei den Photolyasen für die Bindung essentiell, da sich weder FMN noch Riboflavin für eine Rekonstitution

des Apoproteins eignen (Payne *et al.*, 1990). Neben der katalytischen Funktion ist FAD auch für die Bindung der Photolyasen an geschädigte DNA notwendig (Übersichtsartikel: Sancar, 2003). Als zweiter Chromophor tritt bei den Photolyasen entweder Methyltetrahydrofolat (MTHF) oder 8-Hydroxy-7,8-didemethyl-5-deazariboflavin (8-HDF) auf. Dieser zweite Chromophor ist jedoch nicht für die Katalyse notwendig, sondern dient als Lichtsammelpigment, das die Quantenausbeute je nach eingestrahelter Wellenlänge um das 10-100fache erhöht (Sancar, 1994). Sowohl MTHF als auch 8-HDF sind nur sehr locker und oberflächennah an das Protein gebunden und gehen während der Aufreinigung oft verloren. Kürzlich wurde die Struktur des *Synechocystis*-Cryptochroms aufgeklärt (Brudler *et al.*, 2003). Die folgenden Angaben zur Chromophorbindung beruhen auf diesen Daten. Fünf konservierte Argininreste (Arg240, Arg293, Arg356, Arg358 und Arg410) in der Umgebung der FAD-Bindestelle bilden eine positive Oberflächenladung, die in Photolyasen zur DNA-Bindung beitragen und ähnliche Eigenschaften für das Cryptochrom nahe legen. Die an der Bindung von FAD beteiligten Aminosäurereste weichen jedoch leicht ab. So fehlen bei SynCRY zwei Tryptophanreste (Trp271 und Trp338), die bei *E.coli*-PHR Wasserstoffbrücken zu den Sauerstoffen des FAD-Phosphatrestes aufbauen. Dafür kommen Wasserstoffbrücken von Asn395 zum NH<sub>2</sub>-Rest und dem Ring-Stickstoff der Adenin-Base des FAD hinzu. Aminosäurealignments zeigen, dass bei den pflanzlichen Cryptochromen Mischformen der an der Bindung beteiligten Aminosäuren auftreten. Von 12 Aminosäureresten, die zur 8-HDF-Bindung bei *Anacystis nidulans* PHR beitragen (Tamada *et al.*, 1997), sind nur 5 Reste in SynCRY und AtCRY3 konserviert. Von sieben an der Bindung von MTHF beteiligten Aminosäureresten in *E.coli*-PHR (Park *et al.*, 1995) ist nur einer in SynCRY und AtCRY3 erhalten. Dies könnte auf einen fehlenden oder abweichenden zweiten Chromophor bei SynCRY und AtCRY3 hindeuten. Experimentell nachgewiesen wurden bisher MTHF und FAD als Kofaktoren für rekombinant exprimiertes Atcry1 und Senf-cry2 (Lin *et al.*, 1995b; Malhotra *et al.*, 1995). Özgür und Sancar, (2003) kamen mit homolog überexprimiertem und gereinigtem cry2 aus menschlichen Zellen zu dem gleichen Ergebnis. FAD kommt in drei Redoxzuständen vor. In den meisten aufgereinigten Proteinen liegt FAD in der oxidierten Form vor ( $FADH_2$ ). Diese Form erscheint intensiv gelb. In der aktiven Form der Photolyasen hingegen ist FAD in der farblosen, reduzierten Form ( $FAD$ ) enthalten. Rekombinantes cry1 aus *Vibrio* enthält FAD in der reduzierten Form (Worthington *et al.*, 2003). Für manche Blaulichteffekte hingegen wird die radikalische Zwischenstufe, das Semichinon  $FADH^\bullet$ , als aktive Form postuliert, das eine deutlich längerwellige

Absorption bis in den Grünbereich hinein zeigt (Galland und Tölle, 2003). Diese Form würde auch die beobachtete Sensitivität der AtCRY1 überexprimierenden Pflanzen in diesem Wellenlängenbereich erklären (Lin *et al.*, 1995a; Ahmad *et al.*, 1998a). Bislang verfügbare Aktionsspektren lassen mangels ausreichender Auflösung keinen eindeutigen Schluss auf die aktive Form des Photorezeptors zu (Ahmad *et al.*, 2002). Ob es zwischen der vollständig reduzierten Form und der Semichinonform eine Photoreversibilität - vergleichbar zu den Phytochromen - gibt, wird momentan intensiv untersucht.

### 1.4.6 C-Termini pflanzlicher Cryptochrome

Das Hauptunterscheidungsmerkmal der Cryptochrome ist ihre C-terminale Extension, für die es keine Entsprechung bei den Photolyasen gibt. Bei allen Cryptochromen sind diese Extensionen wenig konserviert. Es lässt sich jedoch eine aus drei Motiven zusammengesetzte funktionelle Einheit, die DAS- Domäne, definieren (DQXVP-acidic-STAES), die bei den pflanzlichen Cryptochromen stark konserviert ist. Für das DQXVP-Motiv aus AtCRY1 konnte durch eine P549L- Mutation gezeigt werden, dass es für dessen Funktion entscheidend ist (Ahmad *et al.*, 1995). Das STAES- Motiv wird als wahrscheinliche Phosphorylierungsstelle angesehen (Ahmad *et al.*, 1998b; Lin, 2002; Shalitin *et al.*, 2002). Des Weiteren sind in den C-Termini von AtCRY2, sowie AcCRY3 und AcCRY4 Kernlokalisierungssignale zu finden, die für die Lokalisation hinreichend und notwendig sind (Guo *et al.*, 1999; Kleiner *et al.*, 1999; Imaizumi *et al.*, 2000). Jedoch finden sich nicht in allen kernlokalisierten Cryptochromen auch dezidierte Signalsequenzen (siehe Abb. 1.2). Weitere Hinweise für die funktionelle Bedeutung der C-Termini lieferten Überexpressionsstudien von Fusionen der AtCRY1- und AtCRY2- C-Termini mit  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) (Yang *et al.*, 2000), die zu einer konstitutiven Ausprägung von Cryptochromeeffekten führen (konstitutive Photomorphogenese, COP). Wang *et al.*, (2001) und Yang *et al.*, (2001) konnten mit *yeast- two- hybrid*- Experimenten und Co-Immunopräzipitationen zeigen, dass die C-Termini von AtCRY1 und AtCRY2 mit COP1, einem Repressor der Photomorphogenese, interagieren. Die C-Termini der Cryptochrome aus *Drosophila* und Mensch sind hingegen nicht in der Lage, einen COP- Phänotyp in *Arabidopsis* hervorzurufen (Yang *et al.*, 2000). Passend zu diesen Befunden sind auch die Daten von Shalitin *et al.*, (2002), die zeigen, dass der C-Terminus von AtCRY2 konstitutiv phosphoryliert vorliegt, wohingegen das Volllängenprotein lichtabhängig phosphoryliert wird. Ahmad *et al.*, (1998b) konnten zeigen, dass die C-terminalen

Punktmutationen hy4-9 (P549L) und hy4-22 (E559L) sowie die Deletion des STAES-Motives zu einer deutlich verringerten *in vitro*- Phosphorylierung durch phyA führten. Jarillo *et al.*, (2001a) demonstrierten, dass der C-Terminus von AtCRY1 für die Bindung an eine Komponente der circadianen Uhr (ADO1/ZTL/LKP1) verantwortlich ist. Auch bei den tierischen Cryptochromen spielt der C-Terminus eine wichtige Rolle bei Protein-Protein Interaktionen. So vermittelt der C-Terminus von dCRY die lichtabhängige Interaktion mit den Komponenten PER und TIM der Inneren Uhr von *Drosophila* (Rosato *et al.*, 2001) So wichtig die Rolle des C-Terminus auch sein mag, so gibt es dennoch einige Cryptochrome, die keine C-terminale Extension besitzen. Dazu gehören das Cryptochrom aus *Sinapis alba*, AcCRY5, AtCRY3 und die bakteriellen Cryptochrome. Über die Funktion und Signaltransduktion dieser Proteine ist bis heute wenig bekannt. Ebenso wenig verstanden ist die Rolle des mit 380 Aminosäuren besonders langen C-Terminus im Cryptochrom aus *Chlamydomonas*.

Organismus	Gen	Swiss-Prot/ TrEMBL	Länge (AS)	Kernlokalisierung		C-Terminus (AS) <sup>1</sup>	C-terminale Motive		Targeting- signal	Zitat
				Licht (blau)	Dunkel		DQXVP	STAES		
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtCRY1	Q43125	681	(-)	+	200	+	+	-	(Ahmad und Cashmore, 1993)
	AtCRY2	Q96524	612	+	(+)	134	+	+	Kern	(Hoffman et al., 1996; Lin et al., 1996b)
	AtCRY3	Q84KJ5	526	(+) <sup>2</sup>	(+) <sup>2</sup>	-	-	-	Mito / Plastide	(Brudler et al., 2003; Kleine et al., 2003)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	LeCRY1a	Q9XHD8	679	n.d.	n.d.	210	+	+	-	(Perrotta et al., 2000)
	LeCRY1b	Q93V50	583	n.d.	n.d.	109	+	-	-	(Perrotta et al., 2001)
	LeCRY2	Q9LDJ5	635	n.d.	n.d.	160	+	+	-	(Perrotta et al., 2000)
<i>Sorghum bicolor</i>	CRY2	Q8H6B3	691	n.d.	n.d.	204	+	SEASS	-	(Xie et al., 2002)
<i>Oryza sativa (japonica cultivar)</i>	OsCRY1a	Q948J6	710	n.d.	n.d.	220	+	SEASS	-	(Takano und Hirose, 2001)
	OsCRY1b	Q948J4	700	n.d.	n.d.	211	+	SEASS	-	(Takano und Hirose, 2001)
	OsCRY2	Q852P4	651	n.d.	n.d.	173	+	SSSAE	Kern <sup>3</sup>	(Hirose und Takano, 2003)
<i>Sinapis alba</i>	SaPHR	P40115	501	n.d.	n.d.	24	-	-	-	(Batschauer, 1993)
<i>Armoracia rusticana</i>	ArCRY2	Q84L84	617	n.d.	n.d.	139	+	+	Kern	(Saitou et al., 2002)
<i>Adiantum capillum- veneris</i>	AcCRY1	O82786	637	-	-	164	+	-	-	(Kanegae und Wada, 1998)
	AcCRY2	O82769	679	-	-	200	+	+	-	(Kanegae und Wada, 1998)
	AcCRY3	O82779	718	-	+	242	+	PMTESSS	Kern	(Imazumi et al., 2000)
	AcCRY4	Q9S7R6	699	+	+	224	+	+	Kern	(Imazumi et al., 2000)
	AcCRY5	Q9S794	487	-	-	10	-	-	-	(Imazumi et al., 2000)
<i>Physcomitrella patens</i>	PpCRY1a	Q9SXG9	727	+	n.d.	250	+	+	Kern	(Imazumi et al., 2002)
	PpCRY1b	Q948Q6	727	+	n.d.	250	+	+	Kern	(Imazumi et al., 2002)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	CPH1	Q42696	1008	n.d.	n.d.	380	-	-	Kern <sup>4</sup>	(Small et al., 1995)

Abbildung 1.2: Pflanzliche Cryptochrome (nur Vollängensequenzen).

<sup>1</sup> Als Ende für den N-Terminus ist das in der Photolyase/Cryptochrom Familie gut konservierte Motiv V-X-[L,I,V]-[A,G,D]-A-A-[R,K] gewählt worden.

<sup>2</sup> In Epidermiszellen (keine Plastiden vorhanden) auch im Zellkern.

<sup>3</sup> Es werden keine NLS-Motive vorhergesagt, jedoch ist eine Homologie zur putativen NLS von AcCRY3 und AcCRY4 auffällig.

<sup>4</sup> Das Programm PSORT gibt nur eine geringe Wahrscheinlichkeit für eine Kernlokalisation an.

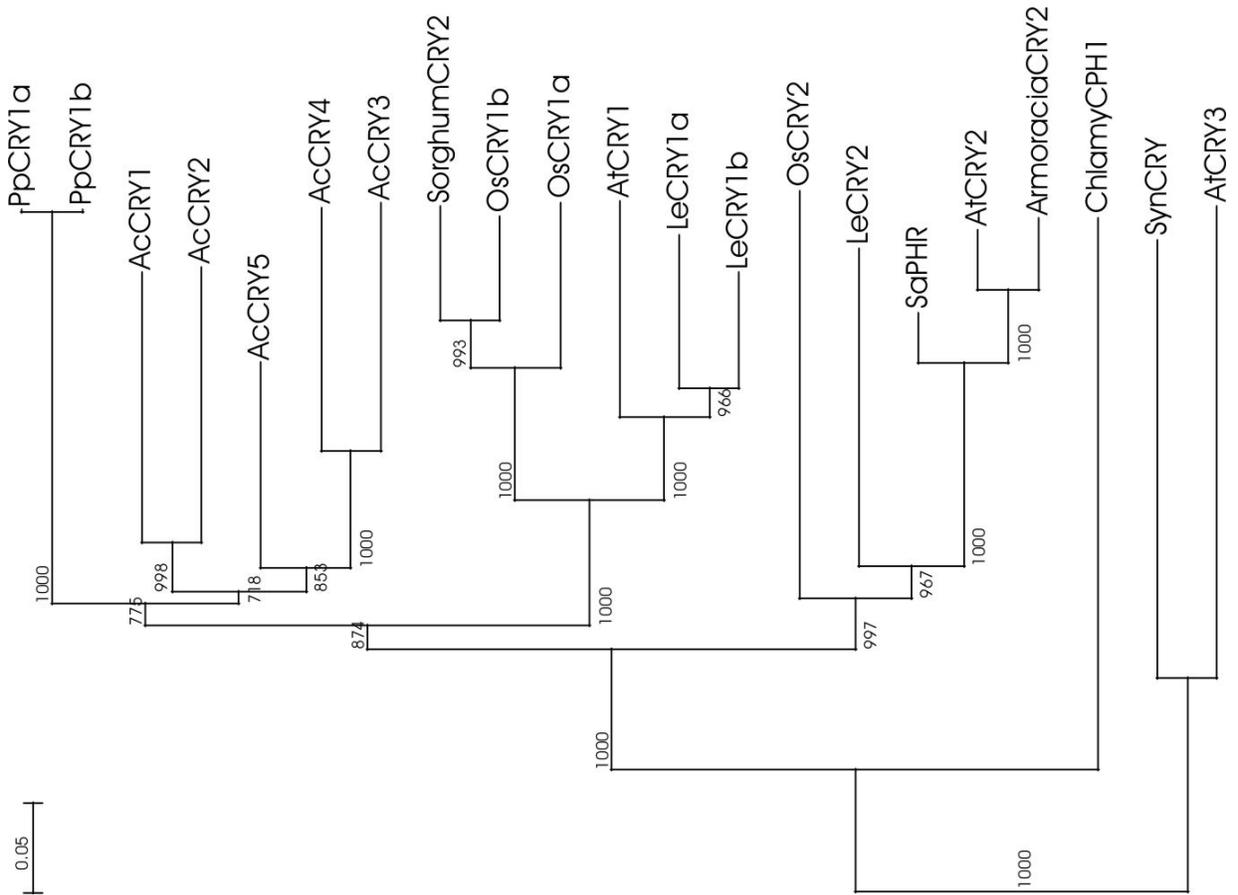


Abbildung 1.3: Phylogenetischer Stammbaum der pflanzlichen Cryprochrome, erzeugt in ClustalX mit der Bootstrap-Methode (Thompson *et al.*, 1997). Die Zahlen an den Verzweigungen geben die Häufigkeit dieser Gruppierung an (1000 entspricht 100%).

### 1.4.7 Subzelluläre Lokalisation

Untersuchungen an Phytochromen haben gezeigt, dass deren subzelluläre Lokalisation eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion spielt (Neff *et al.*, 2000; Nagy *et al.*, 2001). Dies scheint auch bei den Cryptochromen zuzutreffen. So ist *Adiantum-cry3* im Dunkeln ausschließlich kernlokalisiert, findet sich jedoch nach Blaubestrahlung auch im Cytoplasma (Imaizumi *et al.*, 2000). Ähnlich verhält es sich mit *Arabidopsis-cry1*. Eine GFP-Fusion des Volllängenproteins findet sich im Zellkern (Cashmore *et al.*, 1999), die Fusion der C-terminalen Aminosäuren 490-681 mit  $\beta$ -Glucuronidase (CCT1-GUS) jedoch transloziert im Blaulicht ins Cytoplasma (Yang *et al.*, 2000). Dort scheint es mit Membranfraktionen assoziiert zu sein (Ahmad *et al.*, 1998c). Dieser Befund erscheint zunächst ungewöhnlich, da CCT1-GUS nicht die Chromophore trägt. Dies deutet somit auf die Beteiligung eines weiteren Photorezeptors hin. Eine interessante Beobachtung ist in diesem Zusammenhang, dass Atcry1 keine definierte Kernlokalisationssequenz (NLS) enthält. Anders verhält es sich mit Atcry2 und *Adiantum-cry4*. Hier sind NLS-ähnliche Motive im C-Terminus zu finden. Die Kernlokalisierung scheint bei Beiden lichtunabhängig und konstitutiv zu sein (Guo *et al.*, 1999; Kleiner *et al.*, 1999; Imaizumi *et al.*, 2000). Auch innerhalb des Zellkerns finden lichtabhängige Veränderungen der Lokalisation statt. AtCRY2- GFP- Fusionen sind in Dunkelheit homogen im Zellkern verteilt und konzentrieren sich nach Lichteinstrahlung zu so genannten 'speckles', in denen auch phyB enthalten ist (Mas *et al.*, 2000). Eine CCT2-GFP Fusion ist zwar in Interphasekernen homogen verteilt, assoziiert jedoch während der Zellteilung mit den Chromosomen (Cutler *et al.*, 2000). Das erst kürzlich charakterisierte *Arabidopsis-cry3* (Brudler *et al.*, 2003; Kleine *et al.*, 2003) besitzt statt eines verlängerten C-Terminus eine N-terminale Extension. Diese Extension fungiert als bifunktionale Targetingsequenz für Plastiden und Mitochondrien (Kleine *et al.*, 2003). cry1 aus Maus lokalisiert ebenfalls in Mitochondrien (Kobayashi *et al.*, 1998), was jedoch nach neueren Erkenntnissen zweifelhaft erscheint (Akira Yasui, persönliche Mitteilung).

### 1.4.8 DNA-Bindung

Wie schon in Kapitel 1.4.5 erwähnt, ist die Bindetasche des FAD sowie der Chromophor selbst an der Substratbindung der Photolyasen beteiligt. Allerdings bindet auch das Apoenzym DNA mit niedriger Affinität (Malhotra *et al.*, 1992). Dabei wird angenom-

men, dass unter anderem eine positive Oberflächenladung in einer Vertiefung gegenüber der Flavinbindestelle eine wichtige Rolle spielt. Die Kristallstruktur von SynCRY und Aminosäure- Alignments der pflanzlichen Cryptochrome haben gezeigt, dass die Fähigkeit zur DNA- Bindung auch bei den Cryptochromen vorhanden sein könnte. Für *Synechocystis*- cry und *Arabidopsis*- cry3 konnte dies auch experimentell gezeigt werden (Brudler *et al.*, 2003; Kleine *et al.*, 2003). Das erst kürzlich charakterisierte cry1 aus *Vibrio cholerae* bindet an RNA (Worthington *et al.*, 2003). DNA-Bindung wurde auch für cry1 aus Maus und cry2 aus Mensch gezeigt (Kobayashi *et al.*, 1998; Özgür und Sancar, 2003).

#### 1.4.9 Postulierte Primärreaktion

Vom Reparaturmechanismus der *E. coli*- Photolyase ist bekannt, dass ein Elektron vom angeregten FADH<sub>2</sub> auf das Cyclobutanpyrimidindimer (CPD) der DNA übertragen wird (Li *et al.*, 1991). Dieses Elektron stammt ursprünglich vom Tryptophanrest 306 und wird während der Photoaktivierung über zwei weitere Reste (Trp382 und Trp359) auf das Semichinon übertragen (Aubert *et al.*, 2000; Byrdin *et al.*, 2003). In *Anacystis nidulans* ist ein weiterer Tyrosinrest am Elektronentransfer beteiligt (Aubert *et al.*, 1999). Da die drei Tryptophanreste auch in den *Arabidopsis*- Cryptochromen vorhanden sind, ist ein intramolekularer Elektronentransfer anzunehmen. Dieser konnte auch kürzlich an rekombinantem *Arabidopsis*- cry1, das aus Insektenzellen gereinigt wurde, gezeigt werden (Giovani *et al.*, 2003). Dabei wurde auch die Beteiligung eines Tyrosinrestes entdeckt. Zwar ist das vermutlich in *Anacystis* beteiligte Tyr468 (Popovic *et al.*, 2002) nicht in *Arabidopsis*- cry1 konserviert, aber es stehen mehrere andere Tyrosin-Reste für diese Funktion zur Verfügung. Bislang ist jedoch weder ein Elektronenakzeptor für FADH<sub>2</sub>, noch ein physiologischer Elektronendonator gefunden worden. Es wird eine Konformationsänderung des Proteins als Folge des Elektronentransfers postuliert, die zu einer Exponierung bzw. Aktivierung des C-Terminus führt (Yang *et al.*, 2000). Für *Arabidopsis*- cry2 wurde gezeigt, dass es, vermutlich als Folge dieser Primärreaktion, zu einer schnellen, lichtabhängigen Phosphorylierung des Proteins kommt (Shalitin *et al.*, 2002). Die kürzlich publizierte Fähigkeit von rekombinantem cry1 aus *Arabidopsis* zur Autophosphorylierung (Bouly *et al.*, 2003) stützt die These, dass Phosphorylierungen einen frühen Prozess in der Cryptochrom-Signaltransduktion darstellen.

### 1.4.10 Protein-Protein Interaktionen

Allein das Wissen über die Primärreaktion des Photorezeptors reicht nicht aus, um das komplexe Netzwerk der Signalweiterleitung zu beschreiben. Zwar ist es durchaus vorstellbar, dass der Rezeptor direkten Einfluss auf die Transkription Blaulicht-regulierter Gene hat, was jedoch wenig Raum für regulatorische Mechanismen lässt. Die Suche nach direkten Interaktionspartnern der Cryptochrome hat bislang zu folgenden Ergebnissen geführt. Die *Arabidopsis*-Cryptochrome können die kernlokalisierte E3-Ubiquitin-Ligase COP1 binden und damit vermutlich den Abbau des Transkriptionsfaktors HY5 unterdrücken (Wang *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001). Hierbei besteht auch eine Kopplung mit der Signalkette der Phytochrome, da diese in ihrer photoaktivierten Form die Expression von HY5 fördern. Auf diese Weise führt sowohl blaues, als auch rotes Licht zu einer Akkumulation dieses Proteins. HY5 bindet an die G-Boxen lichtregulierter Promotoren und stimuliert deren Transkription (Oyama *et al.*, 1997; Chattopadhyay *et al.*, 1998). Für beide *Arabidopsis*-Cryptochrome konnte zudem eine *in vitro*-Interaktion mit phyA gezeigt werden. Die Cryptochrome dienen dabei als Substrat für die Kinaseaktivität des Phytochroms (Ahmad *et al.*, 1998b). Ein weiterer, direkter Interaktionspartner von Atcry2 ist phyB. Diese Interaktion hat Einfluss auf die Periodenlänge der circadianen Expression des CAB-Promotors und die Regulation des Blühzeitpunktes (Mas *et al.*, 2000). Auch eine Komponente der Inneren Uhr in *Arabidopsis*, ADAGIO1 bzw. ZEITLUPE, zeigt direkte physikalische Interaktion mit cry1 sowie mit phyB (Jarillo *et al.*, 2001a). Die Kopplungen der Photorezeptorsysteme finden jedoch nicht nur direkt über Protein-Protein-Wechselwirkungen statt, sondern umfassen ein komplexes regulatorisches Netzwerk (Abb. 1.4).

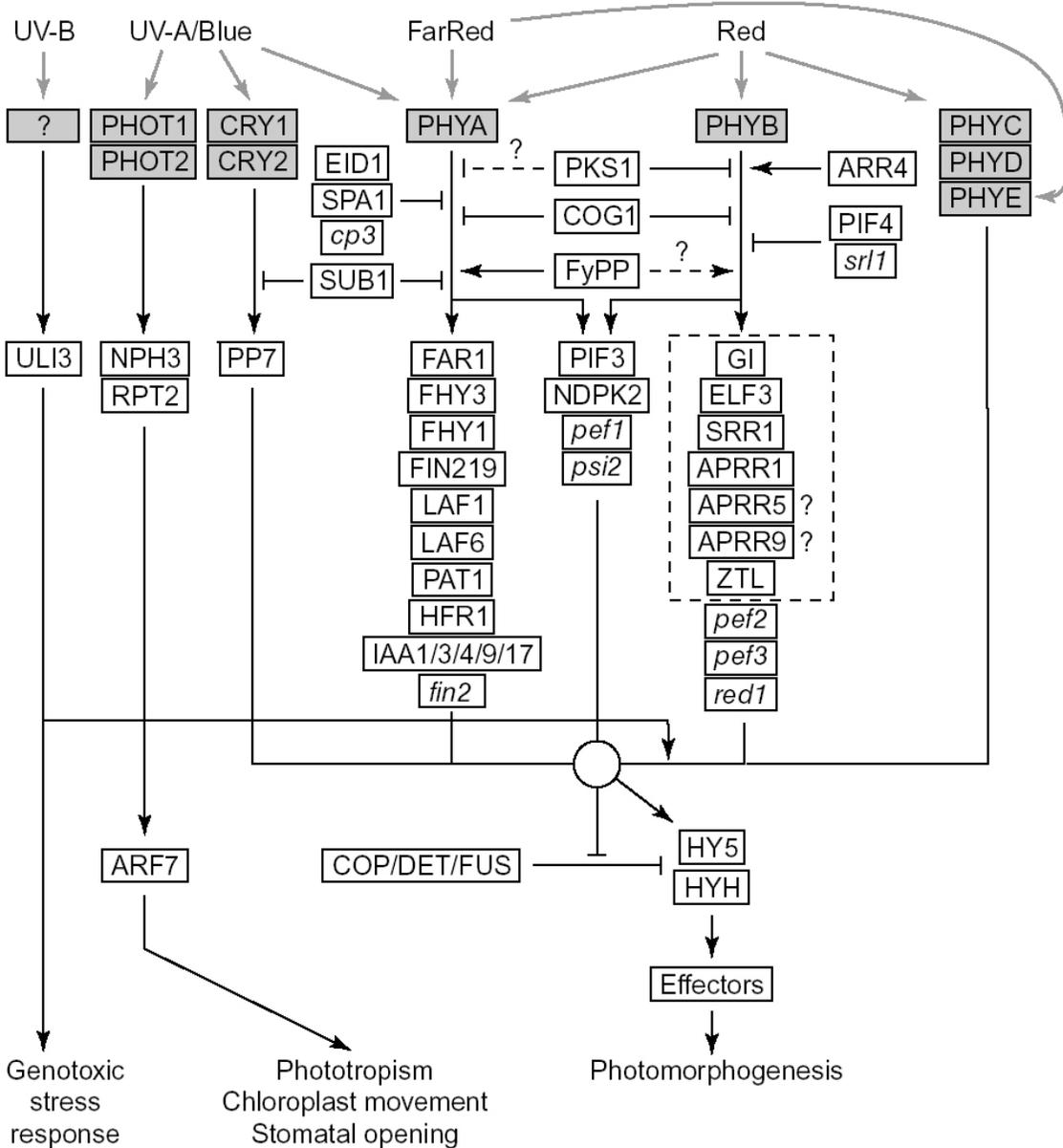


Abbildung 1.4: Netzwerk der pflanzlichen Lichtsignaltransduktion, aus (Gyula *et al.*, 2003). Bereits klonierte Gene sind in Großbuchstaben dargestellt. Auf genetischer Ebene identifizierte, aber noch nicht klonierte Gene sind klein und kursiv. Photorezeptoren sind grau hinterlegt. Weitere Details sind der Original-Veröffentlichung zu entnehmen.

Im Folgenden muss daher auch auf die Rolle von SUB1 (*short under blue 1*) eingegangen werden, das zwar keine direkte Interaktion mit Cryptochrom oder Phytochrom zeigt, aber in deren Signalweg eingreift. SUB1 ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Protein, dessen Mutation eine Hypersensitivität im blauen und dunkelroten Licht bezüglich des Hypokotyllängenwachstums bewirkt. Auch findet sich eine verstärkte Akkumulation von HY5 in *sub1*- Mutanten (Guo *et al.*, 2001). Ein weiterer, die Signalketten von Cryptochromen und Phytochromen verbindender Faktor ist HFR1, ein putativer Transkriptionsfaktor vom bHLH- Typ (basisches Helix-Loop-Helix Protein) (Duek und Fankhauser, 2003). HFR1 ist ein positiver Regulator in den Signalketten von *cry1* und *phyA* bezüglich der Deetiolierung. Mit der kernlokalisierten Protein- Phosphatase 7 (PP7) aus *Arabidopsis* wurde kürzlich eine weitere mögliche Komponente der Cryptochrom-Signaltransduktion gefunden. PP7 greift als positiver Regulator in durch Cryptochrom vermittelte Antworten ein (Møller *et al.*, 2003). Neben dem Zusammenspiel von Cryptochrom und Phytochrom bestehen auch Verbindungen zu den Phototropinen. Wie schon erwähnt, zeigten Ahmad *et al.*, (1998c) eine Beteiligung der Cryptochrome am Phototropismus. Dabei fiel auf, dass eine lichtabhängige Phosphorylierung eines membranassoziierten Proteins von  $\sim 120$  kDa Größe in einer *cry1/cry2*- Doppelmutante nicht mehr auftritt. Bei diesem Protein kann es sich um Phototropin handeln, da diese Phosphorylierung in der *phot1*- Mutante ebenfalls nicht mehr stattfindet (Liscum und Briggs, 1995). Diese Daten stehen jedoch partiell im Widerspruch zu unveröffentlichten Daten von Olney, Christie und Briggs (zitiert in Christie *et al.*, 1998). Zudem sind sowohl Cryptochrome als auch Phototropin 1 an einer Blaulicht-induzierten Membrandepolarisation und Öffnung von Anionenkanälen beteiligt (Folta und Spalding, 2001).

# Zielsetzung

Zwar ist bekannt, dass die Cryptochrome Höherer Pflanzen an einer Vielzahl von lichtgesteuerten Prozessen eine wichtige Rolle spielen, jedoch ist über die Mechanismen der Signalaufnahme und Weiterleitung wenig bekannt. Von besonderem Interesse sind dabei die Primärreaktion des Photorezeptors und der darauf folgende, erste Schritt in der Signalübertragung. Für die Untersuchung von letzterem bietet sich als Modell *Arabidopsis*- Cryptochrom 2 an, da der lichtabhängige Abbau und die posttranslationale Modifikationen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion zu spielen scheinen und in der eigenen Arbeitsgruppe vorhandene Materialien und Techniken eine Untersuchung dieser Ereignisse ermöglichen. Zudem sind die durch *yeast- two- hybrid* Experimente entdeckten, Interaktionspartner von cry2, At5g26280 und At2g02230, bezüglich ihrer Funktion und Lokalisation noch nicht charakterisiert worden, und eine Bestätigung der Interaktion im homologen System steht noch aus. Die für diese Untersuchungen benötigten Techniken der transienten Transformation von Pflanzenzellen mit Reporterfusionen, sowie Messungen von Interaktionen mittels Biolumineszenz- Resonanz-Energietransfer und Co- Immunopräzipitation sollen etabliert und optimiert werden. Ausgehend von der Tatsache, dass keine Informationen zur Struktur und nur wenige zur Primärreaktion von Cryptochromen Höherer Pflanzen vorliegen, soll zudem versucht werden, *Arabidopsis*- cry2 heterolog zu exprimieren und zu reinigen, um diese weitergehenden Analysen zu ermöglichen.

# Material und Methoden

## 3.5 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben sind alle verwendeten Chemikalien vom Reinheitsgrad ‚zur Analyse‘ (p.a.) und wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Applichem (Darmstadt) und Serva (Heidelberg) bezogen.

### 3.5.1 Antikörper

Antikörper	Antigen	Art <sup>1</sup>	Quelle <sup>2</sup>	Qualität	Bezugsquelle
$\alpha$ CRY2 (501-612)	rekombinantes AtCRY2(501-612), aus <i>E.coli</i> denaturierend gereinigt	p	r	affinitätsgereinigt über Protein-A-Agarose	(Kleiner <i>et al.</i> , 1999)
$\alpha$ CRY2	GST-AtCRY2, rekombinant aus <i>E.coli</i> , nativ	p	r	affinitätsgereinigt gegen CRY2-GST	(El-Din El-Assal <i>et al.</i> , 2001)
$\alpha$ CRY1	keine Daten, vermutlich gegen C-Terminus	p	r	affinitätsgereinigt gegen cry1	(Ahmad <i>et al.</i> , 1998a)
$\alpha$ GFP	keine Daten	p	r	Antiserum	Tim Kunkel, Freiburg
$\alpha$ GFP	rekombinantes GST-GFP aus <i>E.coli</i> , nativ gereinigt	p	g	affinitätsgereinigt gegen GST-GFP	Rockland USA (600-101-215)
$\alpha$ GFP (GFP-20)	siehe Referenz	m	m	Asciten fluid	Sigma-Aldrich (G6539)
$\alpha$ PHYA	keine Daten	p	r	keine Daten	Klaus Harter, Freiburg
$\alpha$ H2A/B	siehe Referenz	m	m	siehe Referenz	(Mazzolini <i>et al.</i> , 1989)
$\alpha$ GST	rekombinantes GST von <i>S.japonicum</i> , aus <i>E.coli</i>	p	r	Antiserum	Sigma-Aldrich (G7781)
$\alpha$ GAL4-AD	Aktivierungsdomäne Gal4 aus <i>S.cerevisiae</i>	m	m	gereinigt	BD Biosciences, Heidelberg
$\alpha$ GAL4-BD	DNA-Bindungsdomäne Gal4 aus <i>S.cerevisiae</i>	m	m	gereinigt	BD Biosciences, Heidelberg
$\alpha$ Ubiquitin	Haemocyanin-Ubiquitin Konjugat	p	r	keine Daten	Affinity, Mamhead, U.K. (UG9510)
$\alpha$ -mouse IgG	HRP-Konjugat Maus IgG, gesamtes Molekül	p	g	affinitätsgereinigt	Sigma-Aldrich (A-4416)
$\alpha$ -rabbit IgG	HRP-Konjugat Kaninchen IgG, gesamtes Molekül	p	g	affinitätsgereinigt	Sigma-Aldrich (A-6154)

<sup>1</sup> p = polyklonal; m = monoklonal

<sup>2</sup> r = Kaninchen; m = Maus; g = Ziege

### 3.5.2 Primer

cry2(3-612) für pPIC3.5K und pGEX6P1 (EcoRI/NotI):

#3(07.01.00) UP: 5'-CGTCTC GAATTC GCCACCATGGAGAAAAAGACTATAGTT-3'

BsmBI EcoRI Kozak

#4(07.01.00) DOWN: 5'-GCGGCCGC TCA TTTGCAACCATTTTTTCC-3'

NotII Stop

cry2 für pAVA-N (NcoI):

#3(09.01.01) UP: 5'-CGTCTCCCATGG AAAAAAGACTATAGTTTGGTTT-3'

BsmBI BsmBI

#3(04.05.01) DOWN: 5'-CGTCTC CCATGG TCATTTGCAACCATTTTTTCC-3'

BsmBI NcoI

cry2 für pAVA-C (BglII):

#1(10.07.00) UP: 5'-CGTCTC AGATCT ATGAAGATGGACAAAAAGACTAT-3'

BsmBI BglII

#2(10.07.00) DOWN: 5'-CGTCTC AGATCT TCATTTGCAACCATTTTTTCC-3'

BsmBI BglII

cry2 für pGADT7 (EcoRI/BamHI):

#6(08.11.01) UP: 5'-CGTCTC GAATTC ATGAAGATGGACAAAAAGACT-3'

BsmBI EcoRI

#7(08.11.01) DOWN: 5'-CGTCTC GGATCC TCATTTGCAACCATTTTTTCCCAA-3'

BsmBI BamHI

cry2 für pGBKT7 (NdeI/SalI):

#7(20.01.98) UP: 5'-ACT CATATG AAGATGGACAAAAAGACTATAGTTTGG-3'

NdeI

#2(20.01.98) DOWN: 5'-CAG GTCGAC TTGGCAAACATTTTTTCCCAAACCTTGT-3'

SalI

At5g26280 für pAVA-N (NcoI):

#1(10.11.99) UP: 5'-CCATGG GATCCTCTCTCTGTCTATATAAATGTAC-3'

NcoI

#1(05.06.00) DOWN: 5'-CCATGG CGGAGACGATGTTGGT-3'

NcoI

At5g26280 für pAVA-C (BglII):

#5(01.11.02) UP: 5'-ACCTGC TCG AGATCT ATGTCTCTCTGTCTATATAA-3'

BspMI BglII

#6(01.11.02) DOWN: 5'-ACCTGC TCG AGATCT TTAAGCGGAGACGATGTTGGT-3'

BspMI BglII

△19At5g26280 für pAVA-N (NcoI):

#1(13.06.01) UP: 5'-CCATGG ATAATCAAAAATGGAGTAT-3'

NcoI

#1(05.06.00) DOWN: 5'-CCATGG CGGAGACGATGTTGGT-3'

NcoI

At2g02230 für pAVA-N und pGBKT7 (NcoI):

#1(20.12.99) UP: 5'-CCATGG GATCCGAACAAATTCACGGCGGCGAT-3'

NcoI

#2(20.12.99) DOWN: 5'-GTCGA CCATGG CGTTGCTTCTTTCAGGCCTGAT-3'

NcoI

Sonde für Gel- Mobilitätsassay:

#5(22.10.99):

5'-GCGGCCGCATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATGAATTCGCGAAGCTT-3'

#6(22.10.99) komplementär:

5'-AAGCTTATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATCCACCGCGGTGG-3'

Kompetitor für Gel-Mobilitätsassay:

#1(22.10.99):

5'-GTCGACTCTAGACTCGAGGCGGCCGCCACCGCGGTGGGAGCTCAGATCTG-3'

#2(22.10.99) komplementär:

5'-GTCGACAGATCTGAGCTCCCACCGCGGTGGGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGTCG-3'

### 3.5.3 Plasmide

Konstrukt	Schnittstellen	Besonderheiten
pPIC3.5K-CRY2(3-612)	EcoRI-NotI	keine <i>tags</i>
pGEX6P1-CRY2(3-612)	EcoRI-NotI	N-terminale GST-Fusion
pQE17-CRY2	<i>n.d.</i>	C-terminaler His- <i>tag</i>
pGADT7-CRY2	BamHI-EcoRI	Gal4- Aktivierungsdomäne, HA-Epitop, T7-Promotor
pGBKT7-CRY2	NdeI-Sall	Gal4- DNA- Bindedomäne, Myc-Epitop, T7-Promoter
pGBKT7-#45	NcoI	Gal4- DNA- Bindedomäne, Myc-Epitop, T7-Promoter
pGADT7-ASK1/2	(Dieterle <i>et al.</i> , 2001)	Gal4- Aktivierungsdomäne, HA-Epitop, T7-Promotor
pAVA-xy-Reporter	NcoI	Reporter (GFP/YFP/RLUC) C-terminal
pAVA-Reporter-xy	BglII	Reporter (GFP/YFP/RLUC) N-terminal

### 3.5.4 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Firma
Diaprojektor	Prado Universal 31047	Leitz, Wetzlar
Folienschweißgerät	Vacupak	Krupps
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer	RCT basic	IKA-Werke, Staufen
PCR-Cycler	GeneAmp PCR System 9600	Perkin Elmer
pH-Meter	Microprozessor pH/ION Meter pMX 2000	Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Weilheim
Photometer	UV-1202 UV-VIS Spectrophotometer	Shimadzu
	UV-2401 PC UV-VIS Recording Spectrophotometer	Shimadzu
Blotapparatur	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München
Quantum-Radiometer	P-9201	Gigahertz Optik, Buchheim
	LI-185 B Quantum/ Radiometer/ Photometer	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
Schüttler	innova 4230 Refrigerated Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA
	G24 Environmental Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA
	Multitron Version 2	Infors AG, Einsbach
Spannungs / Stromquelle	Power 300 Electrophoresis Power Supply	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Sterilbank	Auro H 130	Ehret Labor- und Pharmatechnik, Emmendingen
Tischschüttler	Typ 300 S	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Ultraschallgerät		MSE (Measuring & Scientific Equipment)
Wärmeschrank	B 6060	Kendro, Langenselbold
Wasserbad	Typ 1003	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Zellmühle	MM 200	Retsch, Haan
Zentrifugen	Biofuge pico	Kendro, Langenselbold
	Labofuge 400 R	Kendro, Langenselbold
	J2-21 Centrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld
	Centricon T-1080	Kontron Instruments

## 3.6 Organismen und Anzucht

### 3.6.1 *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis thaliana* (auch Ackerschmalwand) wurde zuerst im 16. Jahrhundert von Johannes Thal im Harz beschrieben. Sie gehört zur Familie der Brassicaceae (Kreuzblütengewächse) und ist damit eine Verwandte von Raps, Kohl und Rettich. Ihre natürliche Verbreitung erstreckt sich maßgeblich über West- Eurasien und Ost- Afrika, wurde jedoch vom Menschen auch nach Japan und Amerika, in geringerem Maße auch nach Australien, Neuseeland und Chile gebracht. *A. thaliana* ist einjährig, selbstbestäubend und wächst bevorzugt auf sauren Böden im offenen Gelände. Als fakultative Langtagpflanze beträgt die Generationszeit unter Langtagbedingungen nur 6 Wochen, was zusammen mit der einfachen Handhabung einen Vorteil für die Arbeit im Labor darstellt. Weitere Gründe für die Etablierung von *A. thaliana* als Modellorganismus sind die effiziente Samenproduktion in Kombination mit guter Transformierbarkeit. Diese kann durch direkten DNA- Transfer in Protoplasten geschehen (Damm *et al.*, 1989), aber auch durch über Agrobakterien vermittelte Transformation (Übersicht: Gelvin, 2003). Diese Fakten und eine Vielzahl von Mutationslinien, die durch Integration von T-DNA und andere Mutagenisierungsverfahren erzeugt und in Datenbanken erfasst wurden (z.B. <http://atidb.cshl.org/>), machten *A. thaliana* zum wichtigsten Modellorganismus für höhere Pflanzen. Dazu beigetragen hat sicherlich auch das auf 5 Chromosomen verteilte, mit 128 Mb sehr kleine Kerngenom, das im Jahr 2000 vollständig entschlüsselt wurde (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000).

Bezeichnung	Beschreibung	Quelle
Ler	Wildtyp, Ökotyp LANDSBERG ERECTA	keine Angaben
<i>HY4</i>	<i>CRY1</i> -Mutante	Koornneef <i>et al.</i> , 1980
<i>fha1</i>	<i>CRY2</i> -Mutante	Koornneef <i>et al.</i> , 1991
EDI-NIL	<i>CRY2</i> Cvi-Allel im <i>Ler</i> -Hintergrund	El-Din El-Assal <i>et al.</i> , 2001
<i>PHOT1</i>	Phototropin1-Mutante	Liscum und Briggs, 1995
<i>PHOT1/PHOT2</i>	Phototropin1/2-Doppelmutante	Sakai <i>et al.</i> , 2001

### 3.6.1.1 Keimlingsanzucht für Proteinextrakte

Zur Gewinnung von Proteinextrakten aus *Arabidopsis*- Keimlingen wurde das Saatgut auf feuchtem Papier ausgesät. Dazu wurde ein Stapel aus einer Lage 8x8 cm großem Blotting-Papier MN 218 B (Macherey & Nagel) und 4 Lagen 2048 A (Schleicher & Schüll, Dassel) zunächst mit *aqua bidest.* 15 min getränkt, das überschüssige Wasser dekantiert und durch Leitungswasser ersetzt. Diese Stapel wurden mit der dicken Lage nach oben in Gerdadosen gelegt und das Saatgut gleichmäßig darüber verteilt. Anschließend folgte eine Stratifizierung der Samen für 2 Tage bei 4-8°C. Je nach Anforderung des Experimentes wurden die Dosen entweder direkt in die jeweiligen Anzuchtbedingungen überführt, oder für die Dunkelanzucht zunächst 4 h mit Weißlicht zur Keiminduktion bestrahlt. Die Anzuchttemperatur betrug 22°C, bestrahlt wurde mit weißen Leuchtstoffröhren (3x Philips TLD 36W/950, 2x Osram L36W/31) bei einer Fluenzrate von  $\sim 50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Für die Simulation eine Langtages (long day = LD) wurde 16 h bestrahlt, gefolgt von 8 h Dunkelheit, für Kurztagsbedingungen (short day = SD) wurde 8 h bestrahlt, gefolgt von 16 h Dunkelheit.

### 3.6.1.2 Keimlingsanzucht für mikroskopische Analysen

Zu diesem Zweck wurden die Samen zunächst mit Na-Hypochlorid sterilisiert. Dazu wurden ca. 20 Samen mit 1 ml 70% Ethanol versetzt, gut durchmischt und 2 min inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und durch 1 ml 10% Na-Hypochlorid mit 0.1% Triton X-100 ersetzt. Nach weiteren 15 min Inkubation mit gelegentlichem schütteln wurde der Überstand erneut abgenommen und die Samen dreimal mit je 1 ml sterilem Wasser gewaschen. Anschließend wurde die Samen in 1 ml 0.15% Phyto-Agar resuspendiert. Diese Suspension wurde nun auf 1%ige Phyto- Agar- Platten mit 1/2 MS- Medium und 1% Saccharose aufgetragen und dabei die Samen nach Möglichkeit vereinzelt. Es folgte eine Stratifizierung für 2 Tage im Dunkeln und die weitere Anzucht unter den jeweiligen Versuchsbedingungen.

### 3.6.1.3 Zellkulturanzucht

Puffer und Reagenzien	
<i>Arabidopsis</i> Zellkulturmedium (heterotroph)	MS-Medium ohne Vitamine (Duchefa) mit 30 g/l Saccharose, 1 mg/l 2,4-D, 4fach konzentrierte B5 Vitamine (4 ml/l der 1000x Stammlösung), pH 5.8 mit KOH einstellen, 15 min autoklavieren
B5 Vitamine (1000x)	1 mg/ml Nicotinsäure, 1 mg/ml Pyridoxin-HCl, 10 mg/ml Thiamin-HCl, 100 mg/ml Myo-Inositol

In dieser Arbeit wurde eine heterotrophe Zellkultur aus Wurzelgewebe (Mathur und Koncz, 1998) verwendet. Die Anzucht erfolgte im Dunkeln bei 22°C und 150 rpm (Multitron, Infors). Zur Subkultivierung wurden alle 7 Tage 15 ml der Kultur steril in 35 ml frisches Medium überimpft.

### 3.6.2 *Petroselinum crispum*

Puffer und Reagenzien	
Zellkulturmedium Petersilie (heterotroph)	B5-Medium mit Vitaminen (Duchefa) mit 20 g/l Saccharose, 1 mg/l 2,4-D, pH 5.5 mit KOH einstellen, 15 min autoklavieren

Für *in vivo*- Lokalisationsstudien wurde eine heterotrophe Zellkultur aus Wurzelgewebe verwendet. Die Subkultivierung erfolgte alle 7 Tage durch Überimpfen von 10 ml Kultur in 40 ml frisches Medium. Die Anzucht erfolgte dunkel bei 25°C und 150 rpm.

### 3.6.3 *Escherichia coli*

Puffer und Reagenzien	
LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton (BD Biosciences), 5 g/l Hefeextrakt (BD Biosciences), 5 g/l NaCl, für Agarplatten zusätzlich 1.5% Bacto-Agar (BD Biosciences)

*E. coli* wurde standardmäßig in LB- Medium bei 37°C angezogen. Flüssigmedium wurde dabei mit 200 rpm geschüttelt. Zur Proteinexpression wurde die Temperatur variiert. Die Stammhaltung erfolgte in 50% Glycerinsuspension aus einer Übernachtskultur bei -70°C. Zur Erhaltung von Plasmiden wurden dem Medium Antibiotika zugesetzt.

### 3.6.4 *Saccharomyces cerevisiae*

Puffer und Reagenzien	
YPD-Medium	20 g/l Bacto-Pepton (BD Biosciences), 10 g/l Hefeextrakt (BD Biosciences), 2% Glucose, für Agarplatten zusätzlich 2% Bacto-Agar (BD Biosciences)

Die Anzucht von *S. cerevisiae* erfolgte auf YPD- Medium. Platten mit 2% Agar wurden bei 30°C bis zum Erscheinen von ca. 2 mm großen Kolonien inkubiert, Flüssigmedium zusätzlich bei 250-300 rpm geschüttelt. Plasmide wurde durch die Verwendung von Aminosäure- Mangelmedien stabilisiert. Für die Stammhaltung wurde 1 ml aus einer Übernachtskultur abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde im gleichen Volumen 50% Glycerin resuspendiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

### 3.6.5 *Pichia pastoris*

Stamm	Genotyp	Quelle
GS115	<i>his4</i>	Invitrogen, Karlsruhe
X-33	Wildtyp	Invitrogen, Karlsruhe

*P. pastoris* wurde auf YPD- Medium bei 28°C angezogen. Zur Expression wurden Minimalmedien verwendet (siehe Transformation von *P. pastoris*). In Flüssigkultur, besonders während der Expression von Proteinen, wurde auf eine gute Durchlüftung der Kulturen geachtet. Dazu wurden Schikanekolben bei 250 rpm verwendet. Zur Stammhaltung wurden wie für *S.cerevisiae*, Glycerin- Gefrierkulturen angesetzt.

## 3.7 Molekularbiologische Methoden

### 3.7.1 Plasmid-DNA Isolation aus *E. coli*

Plasmide wurden für Sequenzierungen mit dem 'QIAprep Spin Miniprep Kit' (Qiagen, Hilden) nach dem mitgelieferten Protokoll präpariert. Größere Plasmidmengen für die Protoplastentransformation wurden mit dem entsprechenden Maxi- Kit gewonnen.

### 3.7.2 Agarose-Gelelektrophorese von Plasmid-DNA

Puffer und Reagenzien	
Agarose	Agarose NEEO, Roth, Karlsruhe
1x TBE	89 mM Tris/Cl; 89 mM Borsäure; 2.5 mM EDTA; pH 8.3
5x Probenpuffer	50 % Glycerin; 50 % 10 x TBE; 0.2 mg/ml Bromphenolblau
Ethidiumbromidlösung	10 mg/ml in <i>aqua bidest.</i>

Die analytische und präparative Auftrennung von Nukleinsäureproben erfolgte durch Gelelektrophorese in 0.8%igen, nichtdenaturierenden Agarosegelen (Sambrook *et al.*, 1989). 1.28 g Agarose wurde dazu in 160 ml 1x TBE-Puffer durch Aufkochen in einem Mikrowellengerät gelöst und nach Abkühlen auf ca. 60°C mit 16  $\mu$ l Ethidiumbromidlösung versetzt. Ethidiumbromid interkaliert in DNA bzw. RNA und ermöglicht die Detektion der Nukleinsäuren unter UV-Licht durch seine orangerote Fluoreszenz. Präparative Gele hatten die Größe 160 mm x 127 mm x 8 mm, analytische Minigele eine Größe von 60 mm x 50 mm x 8 mm. Die Elektrophorese erfolgte in horizontalen Apparaturen mit 1x TBE als Laufpuffer bei einer Spannung von 120 V, bzw. 50 oder 100 V bei Minigelten. Die Laufzeit richtete sich nach der Größe des Gels (30-90 min). Vor der Auftrennung wurden die Proben mit 1/5-Vol. Probenpuffer versetzt. Die Detektion und Dokumentation erfolgte auf einem UV- Transilluminator mit Hilfe eines Videodokumentationssystems.

### 3.7.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

#### 3.7.3.1 Gelelektrophorese

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA erfolgte durch den Vergleich der Fluoreszenz der einzelnen Banden des DNA-Markers mit der der Probe. In analytischen, 0.8 %igen Agarosegelen wurde die DNA unter nicht-denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 3.7.2). Zur Konzentrationsbestimmung wurden 500 ng (50 ng/ $\mu$ l)  $\lambda$ -DNA/Eco47I-Marker (MBI Fermentas, St.Leon-Rot) verwendet. Von den aufzutragenden DNA- Proben wurden 1-10  $\mu$ l mit sterilem Wasser auf 10  $\mu$ l aufgefüllt und mit 1/5 Vol. 5x Probenpuffer versetzt. Da die Konzentration der Markerlösung sowie die Länge des gesamten  $\lambda$ -Genoms und seiner einzelnen Fragmente bekannt

sind, lässt sich die Leuchtstärke der Proben mit der Menge der darin enthaltenen DNA durch einen einfachen Vergleich mit den Markerbanden korrelieren.

### 3.7.3.2 Spektroskopie

Reinheit und Konzentration von nukleinsäurehaltigen Proben können durch Messung der Absorption bei 260 bzw. 280 nm in Quarz- oder UV- durchlässigen Plastikkuvetten (UVette, Eppendorff, Hamburg) bestimmt werden. Für RNA- haltige Proben gilt der Richtwert von  $OD_{260} = 1 \approx 40 \mu\text{g}/\text{ml}$ , für DNA  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Durch einen Vergleich der Absorption bei 260 nm und 280 nm erhält man Aussagen über die Reinheit der Probe (Proteinverunreinigungen). Eine Probe mit dem  $OD_{260}/OD_{280}$ -Verhältnis von 1.8-2 gilt als reine Nukleinsäurelösung.

### 3.7.4 Restriktionsverdau von DNA

Zur Gewinnung kleinerer Mengen von DNA Fragmenten, z.B. für analytische Zwecke, wurden 1-5  $\mu\text{l}$  der zu untersuchenden DNA mit 5-10 U der jeweiligen Restriktionsendonuklease(n) sowie einem passenden 10x Puffer (1/10 des Endvolumens) versetzt und auf 10  $\mu\text{l}$  mit aqua bidest. aufgefüllt. Dabei wurde berücksichtigt, dass das Volumen der Enzymlösung 1/10 des Gesamtvolumens nicht überschritt und bei einem Verdau mit mehreren Enzymen alle mit dem verwendeten Puffer kompatibel waren. Es folgte eine 1-2stündige Inkubation bei 37°C bzw. 55°C. Anschließend wurde die Probe direkt für die Agarose- Gelelektrophorese vorbereitet. Größere Ansätze, wie z.B. präparative Aufreinigungen für spätere Ligationen, wurden nach dem gleichen Prinzip angesetzt, jedoch mit verringerter Enzymmenge und Inkubation über Nacht. Um den Verdau von Fragmenten zu ermöglichen, in deren Sequenz die gewünschte Restriktionsschnittstelle mehrfach vorkommt, wurden die Enzyme BsmBI und BspMI verwendet, deren Erkennungssequenz außerhalb der eigentlichen Schnittstelle liegt. Auf diese Weise konnten überhängende Enden von bestimmten Schnittstellen erzeugt werden, ohne das entsprechende Enzym selbst einsetzen zu müssen.

### 3.7.5 Reinigung von DNA Fragmenten

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten im Anschluss an eine Agarose- Gelelektrophorese erfolgte mittels des 'QIAEX II Gel Extracion Kit' (Qiagen, Hilden), streng nach dem mitgelieferten Protokoll. Dazu wurden zunächst die entsprechenden Banden unter schwachem UV- Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in vorgewogene Reaktionsgefäße überführt. Nach erneutem Wiegen wurden die benötigte Puffer bzw. Matrixmenge festgelegt und die weiteren Schritte gemäß des Protokolls durchgeführt.

### 3.7.6 Ligation

Für die Ligation von DNA- Fragmenten mit überhängenden Enden (*sticky- ends*) wurden in der Regel 100 ng Vektor- DNA mit einem bis zu 3fachen molaren Überschuss an Fragment- DNA versetzt und mit 5 Weiss- Units T4- DNA- Ligase in entsprechendem Puffer 1-2 h bei 22°C oder über Nacht bei 16°C inkubiert und dieses Gemisch anschließend zur Transformation eingesetzt. Bei glatten DNA- Enden (*blunt- ends*) wurden deutlich höhere DNA- Mengen und bis zu 30 U T4- Ligase verwendet. Ligationen von PCR-Produkten mit überhängenden Adenosinresten, z. B. Ligationen in pGEM-T (Promega, Mannheim) wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 3.7.7 PCR

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden Standard- PCR Ansätze verwendet, bei denen Zyklenzahl und Annealingtemperatur durch das Template und die Schmelztemperatur der Primer bestimmt wurde. PCR wurde immer dann angewandt, wenn neue Restriktionsschnittstellen in DNA- Fragmente eingeführt werden mussten. Die entstandenen PCR- Produkte wurden in Klonierungsvektoren ligiert und zur Kontrolle ansequenziert. Ein typischer PCR- Ansatz ist im Folgenden dargestellt:

Template-DNA	5 ng
Vent-DNA-Polymerase	0.5 U
MgSO <sub>4</sub>	2 mM
dNTP	je 100 $\mu$ M
Primer	je 1 $\mu$ M
Gesamtvolumen	50 $\mu$ l

### 3.7.8 Transfektionsmethoden

#### 3.7.8.1 Transformation von *E. coli*

Pro Transformation wurde ein Reaktionsgefäß mit kompetenten Zellen (100  $\mu$ l) auf Eis aufgetaut, 2-5  $\mu$ l vorgekühlte Plasmidlösung zugegeben (Ligationsansatz oder Plasmidpräparation) und durch Schnippen gegen das Gefäß durchmischt. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock von 42°C für genau 90 s, gestoppt durch weitere 2 min Inkubation auf Eis. Zugabe von 1 ml antibiotikafreiem LB- Medium und einstündige Inkubation bei 37°C führten zur Regeneration der Zellen und Entwicklung der plasmidvermittelten Antibiotikaresistenz. Anschließend wurden je 10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l und der Rest des Ansatzes auf antibiotikahaltigen LB- Agarplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

#### 3.7.8.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Puffer und Reagenzien	
YPD-Medium	20 g/l Bacto-Pepton (BD Biosciences), 10 g/l Hefeextrakt (BD Biosciences), 2% Glucose, für Agarplatten zusätzlich 2% Bacto-Agar (BD Biosciences)
TE-Puffer	10 mM Tris/Cl, 1 mM EDTA, pH 7.5, hergestellt aus 10x Stammlösung
TE/LiAc-Puffer	10 mM Tris/Cl, 1 mM EDTA, 100 mM Lithiumacetat, pH 7.5, hergestellt aus 10x TE und 10x LiAc
PEG/TE/LiAc	40% PEG 4000, 10 mM Tris/Cl, 1 mM EDTA, 100 mM Lithiumacetat, pH 7.5, hergestellt aus 10x TE, 10x LiAc und 50% PEG 4000
Carrier-DNA	10 mg/ml Herings Testes DNA, ultraschallbehandelt (Sambrook <i>et al.</i> , 1989), unmittelbar vor Gebrauch 20 min aufgekocht und sofort auf Eis heruntergekühlt.
SD-Medium	6.7 g/l Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren (BD Biosciences), 2% Glucose, für SD -Trp: 0.74 g/l -Trp DO Supplement (BD Biosciences), für SD -Leu/-Trp: 0.64 g/l -Leu/-Trp DO Supplement, für SD -Leu: 0.69 g/l -Leu DO Supplement, pH 5.8 mit KOH eingestellt, für Platten: 2% Agar, 20 min autoklavieren.

**3.7.8.2.1 Herstellung kompetenter Zellen** Die Transformation des Hefestamms Y190 erfolgte nach den Angaben der Firma BD Biosciences für das 'Matchmaker-II' *yeast- two- hybrid*- System. Dazu wurde zunächst 1 ml YPD- Flüssigmedium mit einigen Kolonien von einer möglichst frischen YPD- Agarplatte beimpft und für 30 s stark gevortext. Die Suspension wurde nun in 50 ml YPD- Medium überführt. Um eine ausreichende Belüftung zu gewährleisten, wurden immer Kolben mit großem Fassungsvermögen und - wenn möglich - mit Schikanen benutzt. Diese Kultur wurde 16-18 h bei 250 rpm und 30°C inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 300 ml YPD- Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0.2-0.3 eingestellt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.4-0.6 weiterkultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch 1minütige Zentrifugation bei 1000 xg und RT pelletiert, mit 30 ml TE-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und schließlich in 1.5 ml frisch angesetztem TE/LiAc- Puffer resuspendiert.

**3.7.8.2.2 Transformation** Hierzu wurden je 100 ng Plasmid-DNA bei Einzeltransformationen und je 300 ng bei Doppeltransformationen mit 100 µg Carrier- DNA und 100 µl kompetenten Zellen gut vermischt. Nach Zugabe von je 600 µl PEG/ TE/ LiAc- Lösung wurden die Transformationsansätze für 30 min bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden je 70 µl DMSO zugegeben und vorsichtig durch Invertieren des Gefäßes vermischt. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 15 min und die sofortige Abkühlung für 1-2 min auf Eis. Die Zellen wurden durch kurzes Anzentrifugieren pelletiert und in 500 µl TE-Puffer resuspendiert. 75-100 µl dieser Suspension wurden auf entsprechenden Aminosäure- Mangelmedien (SD- Agarmedium mit DO- Supplement) ausplattiert und für 3-4 Tage bei 30°C inkubiert bis ca. 2 mm große Kolonien sichtbar wurden.

### 3.7.8.3 Transformation von *P. pastoris*

Puffer und Reagenzien	
YPDS+Zeo-Medium	2% Bacto-Pepton (BD Biosciences); 1% Hefeextrakt (BD Biosciences); 2% Glucose; 1 M Sorbitol; pH 6.5; für Agarplatten zusätzlich 2% Bacto-Agar (BD Biosciences), 20 min autoklavieren, auf 60°C abkühlen lassen und 100 µg/ml Zeocin (Invitrogen) zugeben
MD-Medium	1.34% Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren (BD Biosciences), 2% Glucose, für Platten: 1.5% Bacto-Agar, 20 min autoklavieren, auf 60°C abkühlen lassen und 4x 10 <sup>-5</sup> % Biotin zugeben (aus 500x Stammlösung)
MM-Medium	1.34% Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren (BD Biosciences), für Platten: 1.5% Bacto-Agar, 20 min autoklavieren, auf 60°C abkühlen lassen und 0.5% Methanol, sowie 4x10 <sup>-5</sup> % Biotin zugeben (aus 500x Stammlösung)
YPD-G418-Medium	YPD-Agarmedium wie üblich autoklavieren, auf 60°C abkühlen lassen und G418 aus einer 100 mg/ml Stammlösung bis zu gewünschter Konzentration zugeben, dann Platten gießen.

**3.7.8.3.1 Herstellung kompetenter Zellen** Die Transformation von *Pichia pastoris* erfolgte nach den Angaben der Firma Invitrogen für das EasySelect<sup>TM</sup> *Pichia- Expression- Kit* mittels Elektroporation. Dazu wurden zunächst 5 ml YPD- Medium mit dem verwendeten Stamm inokuliert und über Nacht bei 30°C und 250-300 rpm inkubiert. Mit 0.1-0.5 ml dieser Vorkultur wurden 500 ml frisches YPD-Medium inokuliert und erneut über Nacht bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1.3-1.5 kultiviert. Die Zellen wurden nun bei 1500 xg und 4°C für 5 min pelletiert und mit zunächst 500 ml, dann 250 ml eiskaltem, sterilem Wasser gewaschen. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 20 ml eiskaltem 1 M Sorbitol und schließlich wurde das Pellet mit eiskaltem 1 M Sorbitol auf ein Volumen von 1.5 ml gebracht.

**3.7.8.3.2 Transformation** Die zu transformierenden Plasmide wurden zunächst nach Angaben von Invitrogen mit *SacI* linearisiert, gereinigt und auf eine Konzentration von  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  mit sterilem *aqua bidest.* eingestellt.  $80 \mu\text{l}$  kompetente Zellen wurden mit  $5\text{--}10 \mu\text{l}$  linearisierter DNA vermischt, in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette mit  $0.2 \text{ cm}$  Spalt gegeben und dort für  $5 \text{ min}$  auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte mit einem BioRad GenePulser bei  $1500 \text{ V}$ ,  $25 \mu\text{F}$  und  $200 \Omega$ . Sofort anschließend wurde  $1 \text{ ml}$  eiskaltes  $1 \text{ M}$  Sorbitol zugegeben und diese Suspension in einem  $15 \text{ ml}$  Falcon- Gefäß für  $1\text{--}2 \text{ h}$  bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert.  $50\text{--}200 \mu\text{l}$  dieser Suspension wurden auf den entsprechenden Selektivmedien (MD- Medium für pPIC3.5K, YPDS/Zeo für pPICZ $\alpha$ A) ausplattiert und für  $3\text{--}4 \text{ Tage}$  bei  $30^\circ\text{C}$  kultiviert bis sich  $1\text{--}2 \text{ mm}$  große Kolonien formten. Da es sich bei dieser Methode um eine genomische Integration mittels homologer Rekombination in das AOX1- Gen handelte, musste zunächst getestet werden, ob das AOX1 Gen noch funktionsfähig geblieben und so eine Nutzung von Methanol als Kohlenstoffquelle möglich ist ( $\text{Mut}^+$ - Phänotyp), oder ob das Gen durch die Integration unterbrochen wurde ( $\text{Mut}^S$ - Phänotyp). Dazu wurden die Primärtransformanten sowohl auf MD- Medium, als auch auf MM- Medium ausgestrichen. Wuchsen die Kolonien nur auf MD- Medium rasch heran, handelte es sich um  $\text{Mut}^S$ - Zellen, wuchsen sie auf beiden Platte ähnlich schnell, dann handelte es sich um  $\text{Mut}^+$ - Zellen. Der Phänotyp muss jedoch über Kontrollstämme, die auf den gleichen Platten aufgetragen werden, abgesichert werden. Das Plasmid pPIC3.5K vermittelt über eine Kanamycin- Resistenzkassette Toleranz gegenüber dem Antibiotikum G418. Diese Toleranz steigt in etwa linear mit der Anzahl der Integrationen dieser Kassette ins Hefegenom. Daher konnte mit Hilfe einer aufsteigenden Antibiotikumkonzentration die Zahl der Kopien grob bestimmt werden. Dazu wurden die Primärtransformanten mit  $1\text{--}2 \text{ ml}$  sterilem Wasser von der Platte geschwemmt, in einem Falcon- Gefäß gesammelt und deren  $\text{OD}_{600}$  bestimmt. Die Suspension wurde anschließend mit sterilem Wasser auf  $10^6 \text{ Zellen/ml}$  eingestellt. Dabei wurde für eine  $\text{OD}_{600} = 1$  eine Zellzahl von  $5 \times 10^7/\text{ml}$  zugrunde gelegt. Jeweils  $100 \mu\text{l}$  ( $10^5 \text{ Zellen}$ ) wurden auf YPD-Platten mit  $0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 1.75, 2, 3$  und  $4 \text{ mg/ml}$  G418 ausplattiert und für  $2\text{--}3 \text{ Tage}$  bei  $30^\circ\text{C}$  kultiviert. Kolonien mit einer Toleranz von  $1.75\text{--}3 \text{ mg/ml}$  wurden für die Expression verwendet.

### 3.7.8.4 Transformation von *P. crispum*

Puffer und Reagenzien	
Enzymlösung	1.7% (w/v) Cellulase Onozuka R-10 (Serva), 0.2% (w/v) Macerozym R-10 (Serva), in 0.24 M CaCl <sub>2</sub> , pH 5.6-5.8 (KOH), sterilfiltriert
Elektroporationslösung	0.5 M Saccharose, 10 mM Tris/Hepes, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 7.2, sterilfiltriert
B5 <sup>+</sup>	B5-Medium mit Vitaminen, 2.4-D und zusätzlich 0.4 M Saccharose, sterilfiltriert
PEG-Lösung	25% PEG 6000, 0.1 M Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 0.45 M Mannitol, pH 9 (KOH), sterilfiltriert, immer frisch ansetzen
Stopp-Lösung	0.275 M Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , pH 6, autoklaviert

**3.7.8.4.1 Protoplastierung** Je nach Anzahl der durchgeführten Transformationen wurden 1-2 Kolben einer 5-6 Tage alten Zellkultur verwendet. Der Inhalt eines Kolbens wurde in ein 50 ml Falcon- Gefäß überführt. Diese und alle folgenden Arbeiten wurden mir sterilisierten Gefäßen und Lösungen unter einer Sterilbank bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Zellen wurden 5 min bei 780 xg in einem *swing-out* Rotor pelletiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Das Pellet wurde in 30 ml 0.24 M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Je 3 ml dieser Zellsuspension, sowie 3 ml Enzymlösung und 6 ml 0.24 M CaCl<sub>2</sub> wurden in Petrischalen gefüllt und über Nacht dunkel inkubiert. Vor der Weiterverarbeitung wurden am Boden der Petrischalen haftende Zellen durch 20minütiges Schwenken bei 40-45 rpm gelöst. Der Inhalt von bis zu 4 Schalen wurde vorsichtig in ein 50 ml Falcongefäß überführt und bei 440 xg pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 25 ml 0.24 M CaCl<sub>2</sub> gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde sofort, je nach Transformationsmethode unterschiedlich, weiterverarbeitet.

**3.7.8.4.2 Elektroporation** Das Pellet wurde in 12 ml Elektroporationsmedium aufgenommen und 7 min bei 95 xg zentrifugiert. Die auf der Oberfläche flottierenden Protoplasten wurden mit einer abgeschnittenen 1 ml Pipettenspitze abgenommen und in einem frischen Gefäß gesammelt. Die Protoplasten wurden nun mit Elektroporationsmedium auf die gewünschte Konzentration verdünnt (optimal sind 10<sup>7</sup> Protoplasten/ml). Je Transformationsansatz wurden 800 µl der Protoplastensuspension mit 50 µg Plasmid-

DNA (maximal 200  $\mu$ l) versetzt, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und in eine Elektroporationsküvette mit 0.4 cm Spalt gefüllt. Die Elektroporation erfolgte mit einem Biorad Gene Pulser mit Capacity-Extender bei 320 V Ladespannung und einer Kapazität von 125  $\mu$ F. Die Pulsdauer sollte bei 6-9 ms liegen. Nach dem Puls wurden sofort 800  $\mu$ l B5<sup>+</sup>- Medium zugegeben, schließlich auf 12 ml aufgefüllt und in Petrischalen überführt. Zur Regeneration und Produktion des Transgens wurden die Zellen mindestens 24 h bei RT inkubiert.

**3.7.8.4.3 PEG vermittelte Transformation** Anstatt mit Elektroporationsmedium wurden die Zellen hier mit 12 ml B5<sup>+</sup>- Medium versetzt und ebenfalls 7 min bei 95 xg zum Flottieren gebracht. Die Protoplasten wurden vorsichtig abgenommen, gesammelt und mit B5<sup>+</sup>- Medium verdünnt (auch hier gilt eine Zellzahl von 10<sup>7</sup> Zellen/ml als ideal). Für einen Transformationsansatz wurden 200  $\mu$ l PEG- Lösung mit 50  $\mu$ g DNA vermischt, anschließend 200  $\mu$ l der Protoplastensuspension zugegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Die Transformation wurde durch langsame Zugabe von 5 ml Stopp- Lösung (über einen Zeitraum von mehreren Minuten) gestoppt. Es folgte eine Zentrifugation für 7 min bei 95 xg. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, das Pellet in 12 ml B5<sup>+</sup>- Medium resuspendiert und in Petrischalen überführt.

### 3.7.8.5 Transformation von *A. thaliana* Zellkultur

Puffer und Reagenzien	
Enzymlösung	1% (w/v) Cellulase Onozuka R-10 (Serva), 0.25% (w/v) Macerozym R-10 (Serva), in 8 M CaCl <sub>2</sub> , 0.5 M Mannitol, pH 5.5-5.8 (KOH), sterilfiltriert
W5-Lösung	150 mM NaCl, 125 mM CaCl <sub>2</sub> , 5 mM KCl, 5 mM Glucose, pH 5.8 (KOH), sterilfiltriert
MgMa-Lösung	15 mM MgCl <sub>2</sub> , 0.5 M Mannitol, 5 mM MES, pH 5.6 (KOH), sterilfiltriert
PEG-Lösung	0.1 M Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 0.4 M Mannitol in geringer Menge <i>aqua bidest.</i> gelöst, 40% PEG 4000 zugegeben, pH auf 7-10 eingestellt, sterilfiltriert
Carrier-DNA	10 mg/ml Herings-Testes-DNA, ultraschallbehandelt, unmittelbar vor Gebrauch 20 min aufgeköcht und sofort auf Eis heruntergekühlt
B5 <sup>+</sup> -Medium	B5-Medium mit Vitaminen, 2.4-D und zusätzlich 0.4 M Saccharose, sterilfiltriert

**3.7.8.5.1 Protoplastierung** Der Inhalt eines Kolbens mit 4 Tage alter Zellkultur wurde bei 75 xg in einem *swing-out* Rotor 5 min pelletiert und in 30 ml Enzymlösung resuspendiert. Je 12 ml der Suspension wurden in Petrischalen gefüllt und diese mit Parafilm verschlossen über Nacht bei 40 rpm und 24°C dunkel inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2-3 Schalen vorsichtig mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein 50 ml Falcon- Gefäß überführt und 5 min bei 75 xg pelletiert. Im Fall von schlechter Sedimentation wurde mit W5- Lösung verdünnt und bei bis zu 100 xg erneut zentrifugiert. Jedes Pellet wurde mit 10 ml W5- Lösung resuspendiert, erneut zentrifugiert und wieder in 10 ml W5-Lösung resuspendiert. Die Suspension wurde für mindestens 30 min auf Eis gekühlt zentrifugiert und mit MgMa- Lösung auf die gewünschte Menge aufgefüllt. Eine Zellzahl von  $1.6-2 \times 10^7$  /ml gilt als optimal.

**3.7.8.5.2 Transformation** Für einen einfachen Transformationsansatz wurden zunächst 20-50  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA und 50  $\mu\text{g}$  Carrier-DNA in einem sterilen, 14 ml fassenden Kulturröhrchen mit Rundboden vermischt und 300  $\mu\text{l}$  Protoplastensuspension zugegeben. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Suspension mit 300  $\mu\text{l}$  PEG-Lösung vorsichtig vermischt und für weitere 30 min bei RT inkubiert. Zum Abstoppen der Transformation wurden über einen Zeitraum von 10 min 4x 2 ml W5-Lösung zugegeben und jeweils vorsichtig vermischt. Nach Zentrifugation bei 75 xg für 5 min wurde das Pellet mit 4.5 ml 0.5 M Mannitol + 500  $\mu\text{l}$  W5- Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 12 ml B5<sup>+</sup>- Medium aufgenommen und in Petrischalen gefüllt. Diese wurden mit Parafilm verschlossen und bis zur weiteren Analyse mindestens 24 h dunkel bei 24°C ruhig gelagert. Für Immunpräzipitationen wurden 4fache Ansätze verwendet, die jedoch ebenfalls in 12 ml B5<sup>+</sup>- Medium aufgenommen wurden.

## 3.8 Proteinchemische Methoden

### 3.8.1 Nachweismethoden von Proteinen

#### 3.8.1.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bradford- Stammlösung (*Protein Assay Dye Reagent Concentrate*, Biorad, Bad So- den) wurde 1:5 mit *aqua bidest.* verdünnt. Von dieser Lösung wurden 950  $\mu\text{l}$  zu 50  $\mu\text{l}$  der zu messenden Proteinprobe gegeben. Nach 10 min wurde die Extinktion bei 595 nm gegen eine Referenzprobe ohne Protein (das Probenvolumen wurde durch 50  $\mu\text{l}$  *aqua bidest.* ersetzt) in einem Zweistrahlphotometer (UVPC 2403, Shimadzu-Europa, Duis- burg) gemessen. Vor jeder Messung wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration der zu messenden Probe eine Eichkurve mit definierten Konzentrationen (2-10  $\mu\text{g}$  pro 50  $\mu\text{l}$ ) an Rinderserum- Albumin (BSA) aufgenommen.

#### 3.8.1.2 Proteinbestimmung mit Amidoschwarz

Puffer und Reagenzien	
Amidoschwarzlösung	90% Methanol, 10% Essigsäure, Amidoschwarz 10B (Roth) bis zu einer $\text{OD}_{615} = 10$
Waschlösung	90% Methanol, 10% Essigsäure
Proteinstandard	10 mg/ml BSA für die Molekularbiologie

Zur Bestimmung des Proteingehaltes SDS- haltiger Proben (Proben, die bereits in Probenpuffer aufgenommen wurden) wurde eine modifizierte Amidoschwarz- Methode (Chapdelaine *et al.*, 2001) verwendet. Dazu wurde die Proteinlösung (mind. 1  $\mu\text{g}$  Prote- in) mit *aqua bidest.* auf 200  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und mit 800  $\mu\text{l}$  Amidoschwarzlösung versetzt. Mit einer 12minütigen Zentrifugation bei 13000 xg (RT) wird das präzipitierte Protein pelletiert und überschüssige Färbelösung durch Vortexen mit 1 ml Waschlösung ent- fernt. Anschließend wurde erneut 12 min zentrifugiert, das Pellet getrocknet und in 1 ml 0.2 M NaOH resuspendiert. Die Messung erfolgte photometrisch bei 615 nm gegen eine ebenso behandelte, proteinfreie Referenz. Der Proteingehalt wurde durch Vergleich mit einer Eichkurve aus BSA abgeschätzt.

### 3.8.1.3 Spektroskopische Proteinbestimmung

Zur Abschätzung der Proteinkonzentration eignet sich die Messung der Absorption von Proteinlösungen gegen einen Blindwert (nur Puffer) bei 280 nm in Küvetten aus Quarzglas, wobei eine  $OD_{280} = 1$  ca. 1 mg Protein/ml entspricht. Präzisere Werte können mit dieser Methode nur für Lösungen mit nur einem Protein, dessen Absorptionskoeffizient bekannt ist, erzielt werden.

### 3.8.1.4 Färbung von SDS-PAGE Gelen mit Coomassie

Puffer und Reagenzien	
Färbelösung	25% Isopropanol, 10% Essigsäure, 0.05% Coomassie-R250
Entfärber	10% Essigsäure

Zur Anfärbung von Proteinen in SDS- PAGE Gelen wurden die Gele 10 min in *aqua bidest.* gewaschen und anschließend 1 h in Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurde mit Entfärber solange gewaschen, bis der Gelhintergrund vollständig entfärbt war. Die Lösung musste dazu mehrfach gewechselt werden. Die Gele wurden anschließend in *aqua bidest.* gewässert, zwischen zwei Lagen Zellglas in einen Rahmen eingespannt und über Nacht getrocknet.

### 3.8.1.5 Färbung von Membranen

Puffer und Reagenzien	
Ponceau S-Lösung	0.1% (w/v) Ponceau S (Sigma) in 1% Essigsäure
Fast-Green-Lösung	0.1% (w/v) Fast-Green FCF (Merck) in 1% Essigsäure

Zur Visualisierung von Proteinen nach dem Transfer auf eine Membran, wurde die noch unbehandelte Membran 1 min in einer Ponceau S Lösung geschwenkt und anschließend mit *aqua bidest.* kurz abgespült, bis der Hintergrund weitgehend entfärbt war. Die so gefärbten Banden konnten abfotografiert oder eingescannt werden. Durch weiteres Waschen mit *aqua bidest.* wurde die Membran schließlich vollständig entfärbt und konnte weiter verarbeitet werden. Alternativ wurden Membranen mit Fast- Green- FCF reversibel angefärbt. Dazu wurde die Membran 5 min in Fast- Green- Lösung geschwenkt und mit *aqua bidest.* der Hintergrund entfärbt. Zur endgültigen Entfärbung wurde 0.2 M NaOH verwendet. Beide Methoden haben sich jedoch als ungeeignet zur Anfärbung

von PVDF- Membranen von Machery & Nagel herausgestellt, sind aber kompatibel mit Nitrocellulose.

### 3.8.1.6 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Puffer und Reagenzien	
TBS-T	20 mM Tris/Cl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.1% (v/v) Tween20
Blockinglösung	TBS-T mit 7% Milchpulver (Hirschler)
Primärer Antikörper	1:2000 in TBS-T mit 0.02% Na-Azid
Sekundärer Antikörper	1:10000 in TBS-T

Nach dem Transfer auf PVDF- bzw. Nitrocellulosemembran wurde die Membran für 1 h in Blockpuffer geschwenkt. Alternativ wurde diese Inkubation auch über Nacht bei 4°C durchgeführt, ansonsten erfolgten alle Schritte bei Raumtemperatur. Überschüssiges Milchpulver wurde kurz mit TBS-T abgespült, bevor der primäre Antikörper zugegeben wurde. Die Antikörperlösung verblieb unter leichtem Schwenken für 1 h auf der Membran. Unspezifisch gebundener Antikörper wurde durch 3maliges Waschen mit TBS-T für jeweils 10 min entfernt. Es folgte eine weitere 1stündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der abhängig von der Nachweismethode entweder an Meerrettichperoxidase (ECL) oder Alkalische- Phosphatase gekoppelt war. Vor der Detektion wurde erneut 3x 10 min mit TBS-T gewaschen.

### 3.8.1.7 Nachweis mittels Enhanced-Chemiluminescence

Puffer und Reagenzien	
Lösung A	9.15 $\mu$ l H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%) auf 15 ml <i>aqua bidest.</i>
Lösung B	300 $\mu$ l einer 250 mM Luminol-Stammlösung in DMSO, 133.5 $\mu$ l einer 90 mM p-Cumarsäure-Stammlösung in DMSO, mit 200 mM Tris/Cl pH 8.5 auf 15 ml auffüllen

Zunächst wurde die Membran kurz in 0.5 M Tris/Cl, pH 7.5 gewaschen, um störendes Tween 20 zu entfernen. Währenddessen wurden Lösung A und B gemischt und durch einen 0.45  $\mu$ m Sterilfilter gegeben. Die Membran wurde auf einer Lage Whatman- Papier kurz abgetropft und nun für 1 min in die Detektionslösung gegeben. Wenn die Lösung die Membran nicht ganz abdeckte, wurde leicht geschwenkt. Anschließend wurde

die Membran in Klarsichtfolie eingeschweißt und damit ein ECL- Hyperfilm (Amersham) bis zu 15 min exponiert. Die Entwicklung des Films erfolgte mit Kodak- GMX- Lösungen (Sigma) nach Angaben des Herstellers.

### 3.8.1.8 Nachweis mittels Farbreaktion

Puffer und Reagenzien	
Entwicklerlösung	100 mM Tris, pH 9.7; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl <sub>2</sub>
Färbelösung	33 $\mu$ l 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat-toluidinsalz (BCIP)-Stammlösung (5% in Dimethylformamid) und 44 $\mu$ l Nitro-Blue-Tetrazolium (NBT)-Stammlösung (7.5% in 70% Dimethylformamid) in 10 ml Entwicklerlösung

Zur Äquilibration wurde die Membran 1.5 min in Entwicklerlösung geschwenkt und diese dann durch Färbelösung ersetzt. Die Entwicklung wurde nach dem Erscheinen der Banden (1-5 min) durch Waschen mit angesäuertem Wasser (Essigsäure) gestoppt. Die Membran konnte getrocknet und vor Licht und Luft geschützt aufbewahrt werden.

### 3.8.2 Proteinexpression in *E. coli*

Puffer und Reagenzien	
LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton (BD Biosciences), 5 g/l Hefeextrakt (Roth), 5 g/l NaCl, für Platten mit 15 g/l Bacto-Agar (BD Biosciences), autoklaviert
Ampicillin	100 mg/ml Stammlösung in <i>aqua bidest.</i> , sterilfiltriert, Endkonzentration: 100 $\mu$ g/ml
Kanamycin	Kanamycin 50 mg/ml Stammlösung in <i>aqua bidest.</i> , sterilfiltriert, Endkonzentration 25 $\mu$ g/ml
IPTG	1 M IPTG in <i>aqua bidest.</i> , sterilfiltriert
Waschpuffer	50 mM Tris/Cl, pH 7.5, 300 mM NaCl

Die Proteinexpression in *Escherichia coli* erfolgte immer über IPTG- induzierbare Promotoren, jedoch mit verschiedenen Systemen. Das pQE-System von Qiagen (Hilden) beruht auf dem von der *E. coli* eigenen RNA-Polymerase erkannten T5-Promotor, der die Expression des Transgens im Zusammenspiel mit einem *lac*- Operator steuert. Um

die Transkription in nicht- induziertem Zustand effektiv zu blockieren, wird mit erhöhtem *lac*- Repressor Spiegel in der Zelle durch Co- Expression des Plasmids pREP4 gearbeitet. Das pET- System von Novagen nutzt einen *lac*- reprimierbaren T7 Promotor, der nur durch T7- RNA- Polymerase erkannt werden kann. Die T7- RNA- Polymerase wird in dem Expressionsstamm chromosomal auf dem lysogenen Phagen  $\lambda$ DE3 codiert und IPTG- abhängig induziert. Als drittes System wurde das Plasmid pGEX-6P (Amersham) verwendet, das ebenfalls über das *lac*- Repressorsystem gesteuert wird, jedoch in jedem beliebigen Expressionsstamm verwendet werden kann. Alle Systeme wurden nach dem gleichen Schema mit variablen Expressionsbedingungen getestet. Dafür wurde zunächst über Nacht eine Starterkultur mit Antibiotika- haltigem LB- Medium und möglichst frisch transformierten *E.coli*- Zellen angesetzt. Diese wurde bei 30 bzw. 37°C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden mit dieser Kultur 500 ml LB- Medium mit den entsprechenden Antibiotika etwa 1:40 inokuliert und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.5 weiterkultiviert. Nun erfolge die Zugabe von 0.15-1 mM IPTG und eine weitere Kultivierung über 4 h. Die Zellen wurden schließlich bei 7000 xg und 4°C für 10 min zentrifugiert, das Medium verworfen und das Pellet mit 5 ml Waschpuffer je 250 ml Medium resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand wieder verworfen und das Pellet bei -70°C eingefroren.

### 3.8.3 Proteinexpression in *P. pastoris*

Puffer und Reagenzien	
YPD-Medium	2% Bacto-Pepton (BD Biosciences), 1% Hefeextrakt (BD Biosciences), 2% Glucose, für Platten mit 2% Bacto-Agar (BD Biosciences), 20 min autoklaviert
MGY-Medium	1.34% Yeast-Nitrogen-Base ohne Aminosäuren (BD Biosciences), 20 min autoklavieren, abkühlen lassen und 1% Glycerin sowie $4 \times 10^{-5}$ % Biotin zugeben
MM-Medium	1.34% Yeast-Nitrogen-Base ohne Aminosäuren (BD Biosciences), 20 min autoklavieren, abkühlen lassen und 0.5% Methanol sowie $4 \times 10^{-5}$ % Biotin zugeben
Waschpuffer	50 mM Tris/Cl, pH 7.5, 300 mM NaCl

### 3.8.3.1 Anzucht und Expression von Mut<sup>S</sup>- Stämmen

Dieses Protokoll gilt für Mut<sup>S</sup>- Stämme, die Methanol nicht als Kohlenstoffquelle nutzen können, hat sich aber auch für Mut<sup>+</sup>- Stämme bewährt. Zur Proteinexpression wurde zunächst der entsprechende Expressionstamm auf YPD-Platten 2-3 Tage bei 30°C bis zu einem Koloniedurchmesser von ca. 2 mm kultiviert. 4-5 dieser Kolonien wurden in 500 µl MGY durch Vortexen gründlich resuspendiert und damit 200 ml MGY-Medium inokuliert. Da ausreichende Belüftung ein entscheidender Parameter bei der Anzucht von *Pichia pastoris* ist, wurden dafür 1 l-Kolben mit Schikanen verwendet. Es folgte eine 24stündige Inkubation bei 28-30°C und 250-300 rpm zur Produktion von Biomasse. Nach steriler Ernte durch Zentrifugation bei RT für 7 min bei 3000 xg wurde das Pellet in 1/4 des Ausgangsvolumens MM-Medium resuspendiert. Es folgte eine weitere Kultivierung für 48 h zur Proteinproduktion. Nach 24 h wurden 0.5% des Volumens Methanol zugegeben. Die Ernte erfolgte durch 10 min Zentrifugation bei 4°C und 3000 xg. Das Pellet wurde mit Waschpuffer gewaschen und bei -70°C bis zum Aufbruch gelagert.

### 3.8.3.2 Anzucht und Expression von Mut<sup>+</sup>- Stämmen

Bei der Proteinexpression in Mut<sup>+</sup>- Stämmen kann zu Beginn mit deutlich weniger Biomasse gearbeitet werden, da es auch in methanolhaltigem Medium zu weiterem Wachstum der Zellen kommt. Ein 250 ml-Schikanekolben mit 25 ml MGY-Medium wurde mit einer möglichst frischen Kolonie des Expressionsstamms oder 50 µl einer 5 ml Übernachtskultur inokuliert. Nach Kultivierung über Nacht bei 28-30°C und 250-300 rpm wurde steril durch Zentrifugation bei 3000 xg und RT für 7 min geerntet. Das Pellet wurde in 200 ml MM-Medium resuspendiert und für weitere 48 h in einem 1 l-Schikanekolben bei 28-30°C und 300 rpm inkubiert. Ernte und Lagerung erfolgte wie bei Mut<sup>S</sup>- Stämmen.

### 3.8.4 Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial

Puffer und Reagenzien	
Aufbruchpuffer	100 mM Tris/Cl, pH 7.5; 50 mM NaCl; 5 mM DTT; 1 mM Benzamidin; 0.5 mM PMSF; je 10 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin; 5 mM E-64; je nach weiteren Anwendungen wurde die Zusammensetzung leicht modifiziert.
5x SDS-Probenpuffer	0.225 M Tris/Cl, pH 6.8; 50% Glycerin; 5% SDS; 0.05% Bromphenolblau; 0.25 M DTT

Zur Proteinextraktion aus Keimlingen und Zellkulturen wurden das Material in gefrorenem Zustand mit Aufbruchpuffer versetzt und in einer Schwingbechermühle (Retsch MM200) mit zwei Stahlkugeln 5 min bei 30 Hz aufgebrochen. Becher, Kugeln und Pflanzenmaterial wurden zuvor in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Material aus Zellkulturen wurde zusammen mit den Trägerfiltern zermörsert. Der Proteinrohextrakt wurde durch 30minütige Zentrifugation bei 16000 xg gewonnen. Die Überstände wurden je nach weiterer Anwendung direkt mit Probenpuffer versetzt oder bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Alle Schritte wurden in rotem Sicherheitslicht durchgeführt.

### 3.8.5 Proteinextraktion aus *E. coli*

Puffer und Reagenzien	
Lysispuffer	50 mM Na-Phosphat pH 7.5, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, 10 mM $\beta$ -Mercaptoethanol, 1 mg/ml Lysozym (Amersham)

Gefrorene Zellpellets wurden mit Lysispuffer versetzt und gründlich resuspendiert. Die Suspension wurde 1 h auf Eis leicht geschüttelt und die Zellen schließlich mit 10 Ultraschallzyklen à 30 s, gefolgt von 30 s Kühlung, aufgebrochen. Die Lysate wurden 1 h bei 40000 xg und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert und der Überstand direkt zur Proteinreinigung verwendet. Die Pellets wurden zur Kontrolle der Aufbruchrate und Proteinlöslichkeit in 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert, 10 min aufgekocht und erneut zentrifugiert. Der Proteingehalt des Überstands wurde mit der Amidoschwarzmethode bestimmt.

### 3.8.6 Proteinextraktion aus Hefe

Puffer und Reagenzien	
Lysispuffer	50 mM Na-Phosphat, pH 7.4; 1 mM PMSF; 1 mM EDTA; 5% Glycerin. (PMSF wurde erst unmittelbar vor dem Aufbruch zugegeben)
Glasperlen	∅ 0.25-0.5 mm (Roth), säuregewaschen

Gefrorene Zellpellets wurden in 1 Volumen Lysispuffer resuspendiert und mit 1 Vol. Glasperlen (0.5 mm, säuregewaschen) versetzt. Der Aufbruch erfolgte durch 10maliges Vortexen für je 1 min, gefolgt von 1 min Abkühlung auf Eis. Die Glasperlen wurden über eine Fritte abgetrennt und das Lysat für 1 h mit 40000 xg bei 4°C zentrifugiert.

### 3.8.7 Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese

#### 3.8.7.1 SDS-PAGE nach Schägger und von Jagow

Puffer und Reagenzien	
Trenngel	6% Acrylamid; 0.32% Bisacrylamid; 910 mM Tris/Cl, pH 8.45; 0.1% SDS; 10.5% Glycerin
Sammelgel	3.5% Acrylamid; 0.18% Bisacrylamid; 545 mM Tris/Cl, pH 8.45; 0.054% SDS
Polymerisationsstarter	10% Ammoniumperoxodisulfat; TEMED (Roth)
Kathodenpuffer	0.1 M Tris; 0.1 M Tricin; 0.1% SDS; pH 8.25 (nicht einstellen!)
Anodenpuffer	0.2 M Tris, pH 8.9

Zur Analyse von Gesamtproteinextrakten aus *Arabidopsis* wurde das kontinuierliche Gelsystem nach Schägger und von Jagow, (1987) verwendet. Die Maße des Trenngels waren 18.4 x 13 x 0.1 cm, das Sammelgel war 18.4 x 4.9 x 0.1 cm groß. Es wurden Kämme mit 15 Taschen verwendet, in die maximal je 200 µl Probe geladen werden konnten. Die Gele wurden unmittelbar vor der Elektrophorese aus Stammlösungen nach folgendem Schema hergestellt:

Stammlösung	Trenngel (6%)	Sammelgel (3.5%)
30% Acrylamid	8 ml	1179.5 $\mu$ l
2% Bisacrylamid	6.315 ml	931 $\mu$ l
3 M Tris/Cl, pH 8.45	12.14 ml	1835 $\mu$ l
50% Glycerin	8.385 ml	-
<i>Aqua bidest.</i>	4.535 ml	5.965 ml
10% SDS	400 $\mu$ l	55 $\mu$ l
10% APS	180.7 $\mu$ l	117.5 $\mu$ l
TEMED	45.2 $\mu$ l	29.4 $\mu$ l

Die Auftrennung erfolgte über Nacht bei konstanter Stromstärke von 2.9 mA/h Laufzeit.

### 3.8.7.2 SDS-PAGE nach Lämmli

Puffer und Reagenzien	
Trenngel	10% Acrylamid; 0.265% Bisacrylamid; 375 mM Tris/Cl, pH 8.8; 0.1% SDS
Sammelgel	3.5% Acrylamid; 0.13% Bisacrylamid; 125 mM Tris/Cl, pH 6.8; 0.2% SDS
Polymerisationsstarter	10% Ammoniumperoxodisulfat; TEMED (Roth)
Elektrophoresepuffer	3.028 g Tris, 14.4 g Glycin, 1 g SDS auf 1 l mit <i>aqua bidest.</i> auffüllen (pH nicht einstellen!)

Für die Analyse von Proteinüberexpressionen und Reinigungen wurden kleine, analytische SDS-PAGE Gele nach Lämmli verwendet. Die Trenngele hatten eine Größe von 80 x 50 x 0.75 mm. Die Gele wurden aus folgenden Stammlösungen zusammengesetzt (die Angaben beziehen sich auf je 2 Gele):

Stammlösung	Trenngel (10%)	Sammelgel (5%)
20% Acrylamid und 0.53% Bisacrylamid	5 ml	1.25 ml
1.5 M Tris/Cl, pH 8.8	2.5 ml	-
0.5 M Tris/Cl, pH 6.8	-	1.25 ml
<i>Aqua bidest.</i>	2.5 ml	2.45 ml
10% SDS	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
10% APS	40 $\mu$ l	37.5 $\mu$ l
TEMED	6 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l

Die Auftrennung erfolgte bei 20-30 mA je Gel (max. 200 V) bis der Probenpuffer herauslief (ca. 1 h).

### 3.8.7.3 Western Transfer und Dot-Blot

Puffer und Reagenzien	
BSN-Transferpuffer	48 mM Tris/Cl, 39 mM Glycin, 0.0375% SDS, 20% Methanol
Membran	Porablot PVDF oder Porablot NCP (Nitrocellulose), Macherey & Nagel
Blotting-Papier	MN 218 B (Macherey & Nagel)

Zum Transfer von Proteinen auf Membranoberflächen wurden die Proteingele nach erfolgter Elektrophorese zunächst 15 min (kleine Gele) bzw. 1 h (große Gele) in Transferpuffer unter leichtem Schwenken äquilibriert. Die verwendeten Membranen wurden ebenfalls 5 min in Transferpuffer geschwenkt. PVDF- Membran musste jedoch zuvor 5-10 s in 100% Methanol aktiviert werden, um die Oberfläche benetzbar zu machen. Anschließend wurde ein Stapel aus 6 Lagen Blotting- Papier in Transferpuffer getränkt und Luftblasen entfernt. Darauf wurde die Membran und anschließend das Gel gelegt und diese wieder mit 6 Lagen getränktem Papier abgedeckt. Dieses Sandwich wurde nun in einer Semi-Dry Blotting Apparatur (Biorad) zwischen zwei Elektroden eingespannt und die Proteine für 1-2 h bei konstant 21 V auf die Membran übertragen. Anschließend konnte die Membran zur Überprüfung des Transfers mit Ponceau S angefärbt, oder direkt in Blockinglösung überführt werden (siehe Kap. 3.8.1.6). In einer alternativen Methode, für den Fall, dass keine vorherige Auftrennung benötigt wurde, konnten 1-2  $\mu$ l der Proteinlösung direkt auf die Membran getropft werden. Nach dem Trocknen der Membran wurde der immunologische Nachweis durchgeführt.

## 3.9 Proteinreinigung

### 3.9.1 Entsalzung von Proteinlösungen

Zum Umpuffern von Proteinlösungen und zur Entfernung von niedermolekularen Substanzen wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Für die Gelfiltration wurden zunächst geeichte Säulen mit Sephadex G-25 (PD-10, Amersham) mit 25 ml des gewünschten Puffers äquilibriert und anschließend 2.5 ml der Proteinlösung auf die Säule gegeben. Mit 3.5 ml des Puffers wurde das Protein wieder von der Säule eluiert. Niedermolekulare Bestandteile verblieben auf der Säule und wurden durch anschließendes Waschen wieder entfernt. In einer alternativen Methode wurde die Proteinlösung mit Membrankonzentratoren (Centriprep, Amicon) mehrfach ankonzentriert und mit dem gewünschten Puffer wieder verdünnt. Die niedermolekularen Bestandteile können die Membran passieren, während Proteine zurückgehalten werden.

### 3.9.2 Ammoniumsulfatpräzipitation

Puffer und Reagenzien	
buffered SAS	76.7 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 100 ml 10 mM Tris/Cl, pH 7.5 lösen (erwärmen), abkühlen lassen und pH auf 7.5 einstellen (Ammoniak), filtrieren und lagern bei 4°C.

Zur selektiven Anreicherung von Proteinen aus Gesamtextrakten wurden diese einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterzogen. Dazu wurde der Proteinextrakt auf Eis und unter ständigem Rühren langsam mit einer gepufferten, gesättigten Ammoniumsulfatlösung (SAS) versetzt und mindestens 4 h auf Eis inkubiert. Die Konzentration wurde in diesem ersten Schritt so gewählt, dass das Zielprotein gerade noch in Lösung blieb. Die schon präzipitierten Proteine wurden durch Zentrifugation bei 40000 xg, 4°C entfernt und der Überstand weiter mit SAS versetzt bis das Zielprotein ausfiel. Alternativ wurde dieser Schritt ausgelassen, da nicht jedes Protein nach der Präzipitation wieder in Lösung zu bringen ist. Das Zielprotein wurde wie zuvor durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dann für die weitere Verarbeitung in einem geeigneten Puffer über mehrere Stunden resuspendiert und anschließend entsalzt (siehe Kap. 3.9.1), um Reste des Ammoniumsulfats zu entfernen.

### 3.9.3 Metallionen-Affinitätschromatographie

Puffer und Reagenzien	
Waschpuffer	50 mM Na-Phosphat, pH 7.5; 300 mM NaCl; 10% Glycerin; 10 mM $\beta$ -Mercaptoethanol; 10 mM Imidazol
Elutionspuffer	50 mM Na-Phosphat, pH 7.5; 50 mM NaCl; 10% Glycerin; 10 mM $\beta$ -Mercaptoethanol; 250 mM Imidazol
Lagerungspuffer	50 mM Tris/Cl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 30% Glycerin, 1 mM DTT, 1 mM EDTA

Die hier verwendete Metallionen- Affinitätschromatographie basiert auf der Fähigkeit von Histidin, bivalente Kationen wie Nickel oder Cobalt zu komplexieren. Dazu wird das Protein mit einem 6fachen Histidintag exprimiert und über eine Nickel- Affinitätsmatrix aufgereinigt. Die Nickelionen sind dabei über Nitrilotriacetat an einer Agarosematrix komplexiert und können über zwei freie Valenzen den 6xHis- Tag binden. Als Eluent wurde Imidazol verwendet, das als Analogon zu Histidin den Tag wieder verdrängen kann. Geeignete Proteinextrakte wurden zunächst mit dem Säulenmaterial versetzt, wobei sich die Menge nach dem zu erwartenden Proteingehalt richtete. 1 ml Ni-NTA- Agarose kann unter optimalen Bedingungen 5-10 mg Protein binden. Der Zusatz von 10 mM Imidazol zu dem Proteinextrakt sollte unspezifische Bindung an die Matrix verhindern. Diese Suspension wurde für 1 h unter leichtem Schwenken auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Säulenmaterial durch Zentrifugation bei 1000 rpm und 4°C für 1 min pelletiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde vor dem Auftragen auf die Säule noch zweimal mit je 10 ml des Waschpuffers von Resten des Überstands befreit. In 5 ml Waschpuffer resuspendiert wurde das Säulenmaterial schließlich auf die Säule gegeben und mit weiteren 10 ml Puffer nachgewaschen. Die Elution erfolgte mit 2 Säulenvolumen des Elutionspuffers. Anschließend wurde das Eluat auf Lagerungspuffer umpuffert und ankonzentriert.

### **3.9.4 Anionenaustauschchromatographie**

Für die weitergehende Aufreinigung von cry2 wurde die Anionenaustauschersäule MonoQ HR 5/10 (Amersham) verwendet, da aufgrund der Aminosäurezusammensetzung von einem sauren Protein ( $pI \sim 5.69$ ) ausgegangen werden muss. Als Puffersystem wurde 50 mM Tris/Cl, pH 7.5 mit 1 mM DTT, 1 mM EDTA und 5% Glycerin gewählt, eluiert wurde mit einem auf 1 M ansteigenden NaCl-Gradienten.

### **3.9.5 Größenausschlusschromatographie**

Für die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe wurde eine Superdex G200 Säule HR10/30 (Amersham) verwendet. Um Rückschlüsse auf das Molekulargewicht der gereinigten Proteine ziehen zu können, wurde die Säule zunächst mit Markerproteinen (Biorad) unter den gleichen Versuchsbedingungen wie der spätere Lauf geeicht.

## 3.10 Nachweis von Protein - Protein Interaktionen

### 3.10.1 Hefe-2-Hybrid System

Puffer und Reagenzien	
SD-Medium	6.7 g/l Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren (BD Biosciences); 2% Glucose, für SD -Trp: 0.74 g/l -Trp DO Supplement (BD Biosciences); für SD -Leu/-Trp: 0.64 g/l -Leu/-Trp DO Supplement; für SD -Leu: 0.69 g/l -Leu DO Supplement; pH 5.8 mit KOH eingestellt; für Platten: 2% Bacto-Agar (BD Biosciences), 20 min autoklaviert
YPD-Medium	1% Hefeextrakt (BD Biosciences); 2% Bacto-Pepton (BD Biosciences); 2% Glucose, pH 6.5; für Agarplatten: 2% Bacto-Agar; 20 min autoklaviert
Z-Puffer (+ $\beta$ -ME/PMSF)	60 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 10 mM KCl; 1 mM $\text{MgCl}_2$ , pH 7 (+ 0.27% $\beta$ -Mercaptoethanol oder 1 mM PMSF)
Substratlösung	4 mg/ml o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (ONPG) in Z-Puffer (benötigt einige Zeit zum Lösen)
Stopplösung	1 M $\text{Na}_2\text{CO}_3$

Das hier verwendete Matchmaker- System (BD Biosciences) zum Nachweis von Protein-Protein- Interaktionen basiert auf der Wiederherstellung der Funktionalität des Transkriptionsfaktors Gal4 und der dadurch vermittelten Reporterexpression. Die Funktionalität dieses Transkriptionsfaktors setzt sich aus einer Domäne für die DNA- Bindung und einer Domäne für die Aktivierung der RNA- Polymerase zusammen. Diese beiden Domänen werden auf getrennten Plasmiden codiert und als Fusion mit den zu untersuchenden Proteinen exprimiert. Erst wenn beide Funktionseinheiten über die Interaktion der fusionierten Proteine in räumliche Nähe gebracht werden, kann es zur Transkription des Reportergens kommen. Die Enzymaktivität dieser  $\beta$ -Galaktosidase kann quantitativ ausgewertet und damit auch Rückschluss auf die Stärke der Protein- Protein- Interaktion gezogen werden. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden des quantitativen Assays verwendet.

### 3.10.1.1 Herstellung einer Suspension

Die erste, etwas aufwendigere Methode, eignete sich vor allem für die Messung von lichtunabhängigen Interaktionen. Dazu wurde zunächst je eine 5 ml Übernachtskultur von mehreren Primärtransformanten in einem entsprechenden SD- Medium angesetzt und über Nacht bei 30°C und 250 rpm inkubiert. Mit 700  $\mu$ l dieser Kultur wurden 2.8 ml YPD- Medium inokuliert und 5 h bei 30°C und 250 rpm inkubiert. Nun wurde von allen Proben die optische Dichte bestimmt. Dazu wurden die Proben 1:20 mit *aqua bidest.* verdünnt und bei 600 nm im Spektralphotometer gemessen. Je 2 ml der Kultur wurden bei 16000 xg 30 s pelletiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde mit 1.5 ml Z- Puffer resuspendiert und gründlich gevortext, danach wurde erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde schließlich in 100  $\mu$ l Z- Puffer aufgenommen. Diese Suspension wurde zur Permeabilisierung der Zellen nun in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend auf 37°C für 1 min in einem Heizblock aufgetaut. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Die so behandelte Suspension konnte nun für den anschließenden Assay eingesetzt werden.

### 3.10.1.2 Herstellung eines Proteinextraktes

Für lichtabhängige Interaktionsmessungen wurde jedoch ein anderes Verfahren verwendet. Dazu wurde je eine 2-3 mm große Kolonie eines Primärtransformanten in 400  $\mu$ l *aqua bidest.* resuspendiert und gründlich gevortext. 30  $\mu$ l einer 1:100 Verdünnung dieser Suspension wurden auf einem entsprechenden SD- Medium ausplattiert und bei 30°C unter den entsprechenden Lichtbedingungen angezogen, bis die Kolonien eine Größe von ca. 2 mm erreichten. Die Kolonien wurden nun mit 2x 700  $\mu$ l Z- Puffer von der Platte geschwemmt und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden 30 s bei 16000 xg pelletiert und mit je 700  $\mu$ l Z- Puffer gewaschen. Für den Zellaufbruch wurden die Pellets in je 300  $\mu$ l Z- Puffer mit 1 mM PMSF resuspendiert und mit dem gleichen Volumen Glasperlen versetzt. Der Aufbruch erfolgte durch 6 Zyklen à 30 s Vortexen und anschließendem Abkühlen für 30 s auf Eis. Nach 20 min Zentrifugation bei 16000 xg und 4°C wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und der Proteingehalt bestimmt. Für den Assay wurden je 100  $\mu$ l verwendet. Da die so gewonnenen Extrakte eine durch die *ade2*- Mutation hervorgerufene, relativ starke Eigenfärbung aufwiesen, wurden im nachfolgenden Assay immer Duplikate ohne Substratzugabe als Leerwert mitgemessen.

### 3.10.1.3 ONPG-Assay

Zur Messung der relativen  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität wurden zunächst 700  $\mu\text{l}$  Z- Puffer mit  $\beta$ -ME zu jeder Probe und mehreren Referenzgefäßen mit je 100  $\mu\text{l}$  Z- Puffer gegeben. Nun wurden je 400  $\mu\text{l}$  der Substratlösung zugegeben und die Zeitmessung gestartet. Die Proben wurden nun bei 30°C bis zum Erscheinen einer Gelbfärbung inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 400  $\mu\text{l}$  1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  gestoppt. Für jeden Stoppzeitpunkt wurde auch ein Referenzgefäß entnommen und ebenfalls gestoppt, da das Substrat einer Selbsthydrolyse unterliegt. Für die Messung von schwachen Interaktionen wurde die Inkubation bis zu 24 h fortgesetzt. Nach dem Stoppen wurden die Gefäße 10 min bei 16000 xg zentrifugiert und die Absorption des Überstands bei 420 nm gemessen. Die relativen Einheiten, nur vergleichbar innerhalb eines Experimentes, werden nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Miller Units} = X \cdot \frac{(A_{420} - A_{420\text{Leerwert}})}{(t \cdot V \cdot c)}$$

wobei  $t$  = Reaktionszeit,  $V$  = Konzentrationsfaktor (gilt nur für Suspensionsmessung und ist hier immer 20) und  $c$  = entweder  $\text{OD}_{600}$  der Suspension oder Proteingehalt des Extraktes ist. Der Faktor  $X$  ist für verschiedene Experimente variabel und sorgt für eine bessere Darstellbarkeit der Ergebnisse.

### 3.10.2 Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (BRET)

Puffer und Reagenzien	
B5 <sup>+</sup> -Medium	B5-Medium mit Vitaminen (Duchefa), 2.4-D und zusätzlich 0.4 M Saccharose, sterilfiltriert
Coelenterazin	250 $\mu$ M Stammlösung in abs. Ethanol

Für den Nachweis von Protein- Protein- Interaktionen *'in planta'* wurde das auf Resonanz- Energie- Transfer oder auch Förster- Transfer beruhende BRET- System (Xu *et al.* 1999) verwendet. Dazu wird jeweils einer der putativen Interaktionspartner mit dem Donormolekül *Renilla*- Luciferase (RLUC), der Andere mit dem Akzeptormolekül *Enhanced- Yellow- Fluorescent- Protein* (EYFP), einer GFP- Variante, fusioniert und *Arabidopsis*- Protoplasten mit beiden Konstrukten co- transformiert. Durch Zugabe des RLUC- Substrats Coelenterazin kommt es zu einer blauen Biolumineszenz mit einem Emissionsmaximum von 475 nm. Im Falle einer Protein- Protein- Interaktion und der damit verbundenen räumlichen Nähe von <100 Å von Donor und Akzeptormolekül, kann es zu einem strahlungslosen Übergang der Energie auf das Akzeptormolekül kommen. Dabei verschiebt sich das Verhältnis der ausgestrahlten Photonen hin zur gelb- grünen Fluoreszenz des Akzeptors (527 nm). Die Messungen wurden an transient- transformierten Protoplasten durchgeführt, die nach 24stündiger Regenerationszeit zunächst 5 min bei 70 xg pelletiert und in 1 ml frischem B5<sup>+</sup>- Medium resuspendiert wurden. 500  $\mu$ l dieser Suspension wurden mit 1  $\mu$ M Coelenterazin aus einer 250  $\mu$ M ethanolanischen Stammlösung versetzt und 15 min bei RT inkubiert. Direkt vor jeder Messung wurden die Proben zur besseren Belüftung aufgeschüttelt und die Photonen über einen Zeitraum von 10 s an einem TD-20/20-Luminometer mit LightSwitch-Modul (Turner Bio-Systems, Sunnyvale, USA) gezählt. Dabei wurde je viermal abwechselnd durch den blauen und den gelben Filter gezählt. Die so erhaltenen Werte wurden gemittelt und der Gelb/Blau- Quotient gebildet. Als Vergleichsstandards dienten eine RLUC-YFP- Fusion (Positivkontrolle), sowie eine Doppeltransformation der unfusionierten Proteine (Negativkontrolle).

### 3.10.3 Co-Immunopräzipitation

Puffer und Reagenzien	
Aufbruchpuffer	100 mM Tris, pH 7.5; 50 mM NaCl; (5 mM DTT); 1 mM Benzamidin; 0.5 mM PMSF; je 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin; 5 mM E-64; 0.1-0.5% Triton X-100, in manchen Experimenten 1 mM EDTA
Protein-G-Agarose (Roche)	50% (v/v) in Aufbruchpuffer

Als weitere Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen im homologen *Arabidopsis*- System wurde die Immunpräzipitation verwendet. Dazu wurde je ein vierfacher Ansatz von transient transformierten *Arabidopsis*- Protoplasten in Aufbruchpuffer lysiert und je 500  $\mu\text{l}$  mit 1-2.5  $\mu\text{g}$  Antikörper versetzt und 1.5 h am Rotiergerät bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  einer 50%igen Protein-G-Agarose- Aufbruchpuffer Suspension wurde für weitere 3 h inkubiert. Nach 1 min Zentrifugation bei 16000 xg wurde der Überstand entfernt und mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt. Das Protein-G-Pellet wurde dreimal mit je 500  $\mu\text{l}$  Aufbruchpuffer gewaschen und schließlich mit 50  $\mu\text{l}$  1.5x SDS Probenpuffer bei 95°C 10 min eluiert. Sowohl Pellets, als auch Überstände wurden anschließend auf einem SDS- PAGE Gel nach Schägger (SDS- PAGE nach Schägger und von Jagow) aufgetrennt und mittels Western-Blot und immunologischem Nachweis analysiert.

## 3.11 Nachweis von DNA - Protein Interaktionen

### 3.11.1 Gel - Mobilitätsassay

Puffer und Reagenzien	
5x Gelshift-Puffer	250 mM Tris/HCl, pH 7.5; 250 mM NaCl; 25% Glycerin; 0.5 mM EDTA; 5 mM DTT
Nichdenaturierendes 5% Polyacrylamidgel	10 ml 30% Polyacrylamid, 4 ml 2% Bisacrylamid, 1.5 ml 10x TBE, 750 $\mu$ l 10% APS, mit <i>aqua bidest.</i> auf 60 ml, 60 $\mu$ l TEMED, 1 h auspolymerisieren lassen
Gelshift-Marker	1x Gelshift-Puffer, 0.04% Bromphenolblau, 0.04% Xylencyanol

#### 3.11.1.1 *In vitro*-Transkription/Translation

Die *in vitro*- Transkription und Translation von Proteinen wurde mit dem gekoppelten Retikulozyten Transkriptions/Translations-System (TnT System, Promega) in der Anwesenheit von unmarkiertem Methionin nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurde nur Plasmid- DNA verwendet, die vorher über eine Säule eines Kits zur DNA- Isolation gereinigt wurde (z. B. *QIAquick<sup>TM</sup> PCR Purification Kit*, Qiagen, Hilden). Die *in vitro*- Transkription/Translation wurde in Anwesenheit von 0.3  $\mu$ M FAD durchgeführt.

#### 3.11.1.2 Radioaktivmarkierung der DNA

20 pmol eines 57 bp-Oligonukleotides (#5(22.10.99) wurden mit  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ ATP (spezifische Aktivität: 5000 Ci/mmol, 10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l; Hartmann Analytic, Braunschweig) und T4-Polynukleotidkinase (MBI-Fermentas, St.Leon-Rot) nach Anweisung des Herstellers radioaktiv markiert:

H <sub>2</sub> O	1.5 $\mu$ l
Oligo #5(22.10.99) (2 pmol/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l
10x Reaktionspuffer A	2.5 $\mu$ l
$^{32}\text{P}$ - $\gamma$ ATP	10 $\mu$ l
T4 Polynukleotidkinase (10 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert und durch Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  0.5 M EDTA abgestoppt. Danach wurden 75  $\mu\text{l}$  TE (pH 7.5) zugegeben und 1  $\mu\text{l}$  für die Einbaubestimmung eingesetzt.

### 3.11.1.3 Waschen und Aktivitätsbestimmung

Zum obigen Ansatz wurden 10  $\mu\text{l}$  4 M NaCl und 300  $\mu\text{l}$  100% Ethanol gegeben, 30 min bei -20°C inkubiert und 20 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 300  $\mu\text{l}$  80% EtOH gewaschen und wie oben zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet nach Trocknung in 100  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O resuspendiert und die Aktivität bestimmt.

### 3.11.1.4 Annealing für Doppelstrangproben

Aus dem radioaktiv markierten Oligonukleotid, einem nicht- radioaktiv markierten Oligonukleotid gleicher Sequenz (spezifischer Kompetitor) und einem weiteren Oligonukleotid nicht verwandter Sequenz (#1(22.10.99); unspezifischer Kompetitor) wurden durch *annealing* mit Oligonukleotiden komplementärer Sequenzen (#5(22.10.99) für #6(22.10.99) und #2(22.10.99) für #1(22.10.99)) doppelsträngige (ds) Oligonukleotide erzeugt. Dafür wurden die jeweils komplementären Oligonukleotide gemischt, im Wasserbad auf 90°C erhitzt und langsam auf RT abgekühlt.

### 3.11.1.5 Gel-mobility-shift-assay

Zunächst wurde ein *shift*- Mix aus ds-Sonde und 5x Gelshift- Puffer hergestellt:

H <sub>2</sub> O	13.5 $\mu\text{l}$
ds <sup>32</sup> P- $\gamma$ ATP-Sonde	1.5 $\mu\text{l}$ (84000 cpm pro Ansatz)
5x Gelshift-Puffer	75 $\mu\text{l}$

Für die *gel-mobility-shift-assays* wurden TnT- Reaktionen (Kap. 2.2.4.19) mit dem Vektor pGBKT7/ CRY2 'TnT CRY2' bzw. pGBKT7 'TnT unprogrammiert' als *template* eingesetzt, die einzelnen Komponenten in 25  $\mu\text{l}$ - Ansätzen zusammenpipettiert und für 30 min bei RT inkubiert.

### 3.11.1.6 Nichtdenaturierende Gelelektrophorese und Detektion

Je 20  $\mu$ l der Gelshift- Ansätze und in einer separaten Tasche 20  $\mu$ l Gelshift-Marker wurden auf ein nichtdenaturierendes 5% Polyacrylamidgel (19 x 19 x 1.5 cm; 1 h Vorlauf bei 170 V) aufgetragen und die Elektrophorese in 0.25x TBE bei 170-200 V durchgeführt bis das Bromphenolblau 3/4 der Trennstrecke erreicht hatte. Nach dem Gellauf wurde das Gel mit in Wasser eingeweicherter Einmachfolie bedeckt und für mindestens eine Stunde bei 80°C Vakuum- getrocknet (gel-slab-drier GSD-4; 36 V; Wasserstrahlpumpe). Das getrocknete Gel wurde zwischen einem *intensifying-screen* bei -70°C ü. N. auf einem Röntgenfilm exponiert.

## 3.12 Mikroskopische Methoden

### 3.12.1 Epifluoreszenzmikroskopie

Verwendet wurde ein Leitz Ortholux II Mikroskop mit Ploempak und einer 150 W Xenon Bogenlampe. Protoplasten und andere Zellen wurden stets in dem entsprechenden Anzuchtmedium mikroskopiert. Für die Anregung der GFP Varianten und des Chlorophylls wurde der Filtersatz A (Leica) verwendet. Die verwendeten Objektive waren FI 10/0.45, 40 /1.30 sowie 63/1.30 für Ölimmersion.

### 3.12.2 Konfokale Laserscan Mikroskopie

Die Anwendung der konfokalen Laserscan- Mikroskopie ermöglicht die Gewinnung von Bildinformationen, die ausschließlich der Fokusebene entstammen und gestattet es daher, optische Schnitte eines lebenden Präparates anzufertigen, die eine dreidimensionale Rekonstruktion des Objektes ermöglichen. Zudem ist eine genauere Lokalisation des Signals möglich als mit der herkömmlichen Epifluoreszenzmikroskopie. Das hier genutzte System Leica TCS SP2 verwendet einen Ar/Kr- Laser zur Fluoreszenzexcitation bei den Wellenlängen 457, 488 und 514 nm. Die Fluoreszenzemission wird von drei, über Monochromatoren angesteuerten, Photomultipliern spektral detektiert. Des Weiteren kann über einen weiteren Photomultiplier ein Durchlichtbild mit Interferenzkontrast aufgezeichnet werden.

## 3.13 Bestrahlungsmethoden

### 3.13.1 Breitbandbestrahlung

Zur Bestrahlung von pflanzlichem Material mit farbigem Licht wurden Leuchtstoffröhren mit Plexiglasfiltern verwendet.

Lichtfeld	$\lambda_{\max}$	HW	Leuchtstoffröhren	Plexiglasfilter
Blaufeld	436 nm	43 nm	Philips TL 40W/18	PG 627/3 (Röhm und Haas)
Hellrotfeld	656 nm	<i>n.d.</i>	Philips TL 40W/15	keine

Die Quantenflussdichte lag dabei zwischen 30 und 60  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

### 3.13.2 Monochromatische Bestrahlung zur Schwellenwertbestimmung

Zur Bestimmung von Schwellenwerten bei der Aktionsspektroskopie wurde eine 1000 W Xenon-Bogenlampe als Lichtquelle eingesetzt. Der Infrarotanteil der Lampe wurde zunächst über ein wassergekühltes, 0.5 cm dickes KG1 (Kaltglas, Schott, Mainz) herausgefiltert, bevor über Doppel- Interferenz- Linienfilter (DIL, Schott, Mainz) nahezu monochromatisches Licht erzeugt wurde (HW <15 nm). Dieses Licht wurde in einer so genannten Threshold-Box über eine Reihe von halbdurchlässigen Spiegeln in schwarze Kammern geleitet und somit ein System mit 12 Positionen abfallender Quantenflussdichte geschaffen. Die tatsächliche Quantenflussdichte wurde für jeden einzelnen Filter neu ausgemessen. Dazu wurde zunächst mit einer wellenlängengeeichten Photozelle die Energie in Watt/cm<sup>2</sup> gemessen und anschließend in die Quantenflussdichte umgerechnet.

### 3.13.3 Monochromatische Bestrahlung zur Aktionsspektroskopie

Alternativ zur Schwellenwertbestimmung wurden vereinfachte Aktionsspektren durch Bestrahlung von Proben mit quantengleichem Licht unterschiedlicher Wellenlänge aufgezeichnet. Dazu wurden DIL- Filter in den Strahlengang von Diaprojektoren eingesetzt

und deren Licht über einen Spiegel auf die Probe projiziert. Vorteil dieser Technik gegenüber der Schwellenwertbestimmung ist die Möglichkeit, gleichzeitig eine große Zahl von Wellenlängen bei nur geringer Probenzahl zu testen. Nachteilig ist, dass Proben in der Lichtsättigung, sowie unterhalb des Schwellenwertes nicht erfasst werden können und damit die Auflösung des Aktionsspektrums begrenzt ist. Auch hier wurde zunächst die Energie des Lichts gemessen und schließlich auf die Quantenflussdichte der jeweiligen Wellenlänge umgerechnet.

# Ergebnisse

## 4.14 CRY2 in Pflanzenzellen

### 4.14.1 Subzelluläre Lokalisation von cry2

Die subzelluläre Lokalisation von cry2 ist zuvor schon mit Hilfe von Reporter- Proteinen wie GUS (Guo *et al.*, 1999) und GFP (Kleiner *et al.*, 1999) untersucht worden. Dabei zeigte sich eine konstitutive Kernlokalisierung. Jedoch wurde in beiden Arbeiten eine mögliche schnelle Lokalisationsänderung nicht ausreichend berücksichtigt. Aus diesem Grund wurde die Vollängensequenz von Cryptochrom 2 mit GFP unter Kontrolle eines doppelten 35S- Promotors aus dem Blumenkohl- Mosaik- Virus fusioniert und in Petersilieprotoplasten transformiert. Nach 24stündiger Regeneration der Protoplasten im Dunkeln, wurde die Verteilung am Mikroskop untersucht. Spezielle Aufmerksamkeit wurde dabei der Bildung der sogenannten 'speckles' und der Stabilität des Signals gewidmet. Abb. 4.5 zeigt das GFP-Signal während einer 30minütigen Bestrahlung an transformierten Petersilieprotoplasten. Deutlich ist die Bildung der 'speckles' zu erkennen, die nur unter Blaubestrahlung, nicht aber im Rotlicht stattfindet. Dabei war zu beobachten, dass in der Anfangsphase die 'speckles' innerhalb des Kerns beweglich sind, jedoch mit zunehmender Größe nach ca. 20 min eine statische Position einnehmen. Die Abnahme des Fluoreszenzsignals korreliert nicht mit Abbaukinetiken des unfusionierten Proteins wie im Western- Blot ermittelt, da sich das Fluoreszenzsignal über mehrere Stunden verfolgen lässt, wohingegen sich bereits nach 30 min kaum CRY2 im Western- Blot nachweisen lässt (vgl. Abb. 4.11). Allerdings konnte die Fluenzrate für die mikroskopische Bestrahlung nicht ermittelt werden, zudem ist die Sensitivität der beiden Methoden nur schwer im Vergleich abzuschätzen. Vorläufige Daten mit einer Luziferasefusion von cry2 lassen jedoch zusätzlich auf eine erhöhte Stabilität von cry2- Fusionsproteinen

schließen. Ein überraschend neues Bild ergab sich durch Co- Transformation von Voll-  
längen CRY2-GFP und At5g26280-YFP in Petersilieprotoplasten. At5g26280 war zuvor  
in einem *yeast- two- hybrid- screen* als Interaktionspartner von *cry2* identifiziert worden  
(siehe 4.15.5). Transformierte Zellen wiesen zu Beginn der Bestrahlung zunächst nur  
ein Fluoreszenzsignal außerhalb der Zellen auf, das die gleiche Verteilung aufwies wie  
At5g26280-YFP (Abb. 4.6), wenn dieses allein in die Zellen transformiert wurde. Bereits  
1 min Bestrahlung am Fluoreszenzmikroskop führte zu einem Auftauchen des CRY2-  
GFP Signals im Zellkern (gelber Pfeil, Abb. 4.6). Aufgrund der Geschwindigkeit dieses  
Prozesses gelangen diese Aufnahmen allerdings nur in seltenen Fällen.

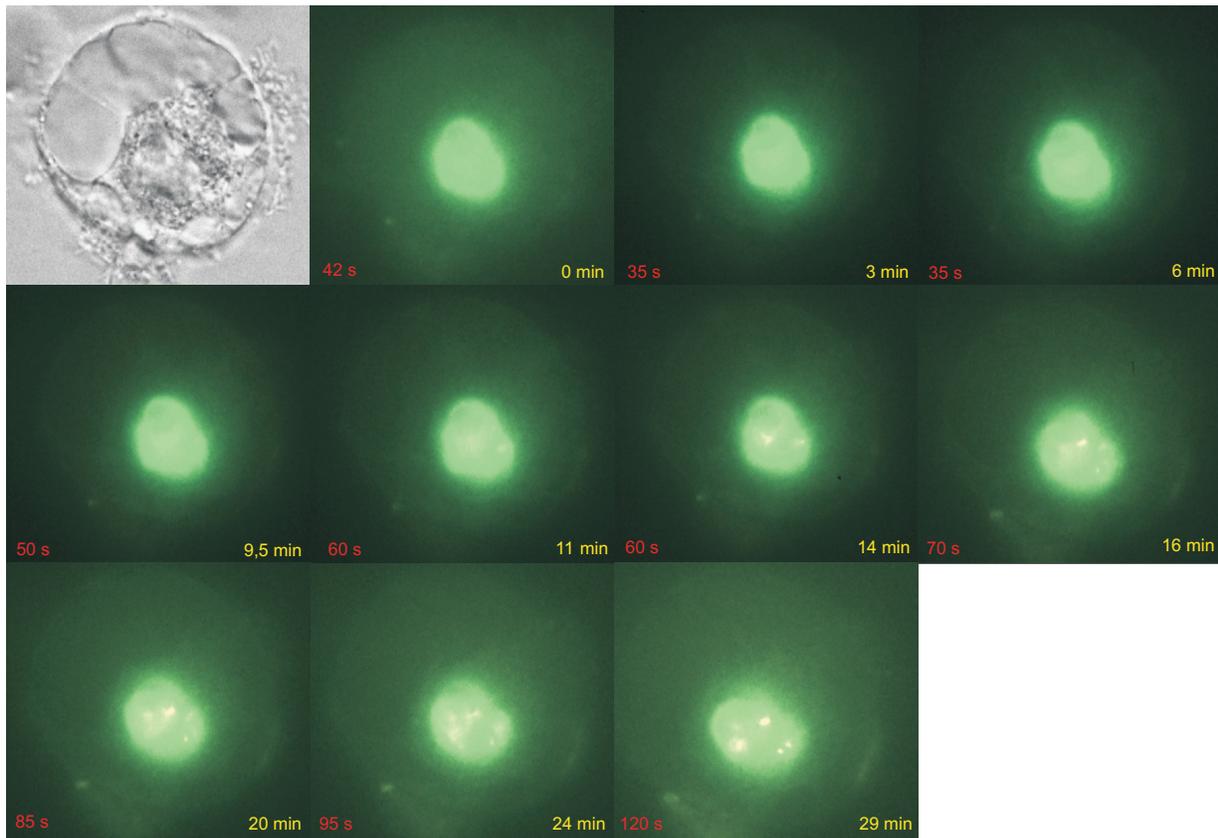


Abbildung 4.5: Bestrahlungsreihe eines Petersilie-Protoplasten, der transient mit pMAV4-CRY2(1-612) transformiert wurde. Objektiv: 40x/1.3, Fluoreszenz Anregung mit Filtersatz A, Zeit ab Beginn der Belichtung in gelben Ziffern, Belichtungszeit der Kamera in roten Ziffern.



Abbildung 4.6: Lichtabhängige Effekte auf die Lokalisation von cry2-GFP. Petersilieprotoplasten wurden mit At5g26280-YFP und CRY2-GFP kotransformiert und im Dunkeln für 24 h inkubiert. Die Epifluoreszenzaufnahmen (Anregung mit Filtersatz M) wurden auf Video aufgezeichnet. Die Pfeile markieren die Position des Kerns.

#### 4.14.2 Lichtabhängige Phosphorylierung von cry2

Bei Verwendung des Schagger-Gelsystems und anschließender immunologischer Detektion von CRY2 konnte nach Bestrahlung von *Arabidopsis* Zellkulturen mit blauem Licht eine Bande mit verringerter Mobilität detektiert werden (Abb. 4.7). Um die Ursache dieser Veränderung zu untersuchen, wurden Proteinextrakte (lösliche Fraktion) bestrahlter Proben mit  $\lambda$ -Protein-Phosphatase (New England Biolabs) behandelt. Als Folge dieser Behandlung konnten die Migrationseigenschaften von CRY2 aus dunkel gehaltenen Zellen wiederhergestellt werden (Abb. 4.8). Weniger deutlich tritt dieser Effekt auch bei CRY1 auf (Abb. 4.7 und 4.8).

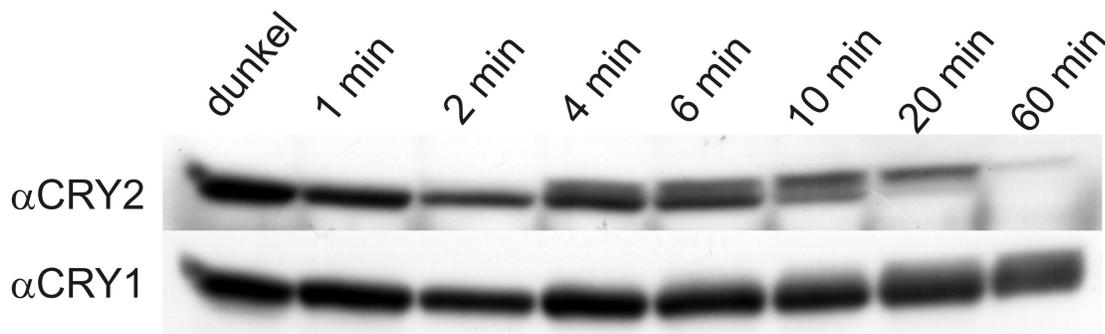


Abbildung 4.7: Kinetik der posttranslationalen Modifikation der *Arabidopsis*-Cryptochrome. Bestrahlung mit  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Breitband-Blaulicht. Immunologische Analyse der löslichen Proteinfraction mit  $\alpha\text{cry2}(501-612)$  und  $\alpha\text{cry1}$ .

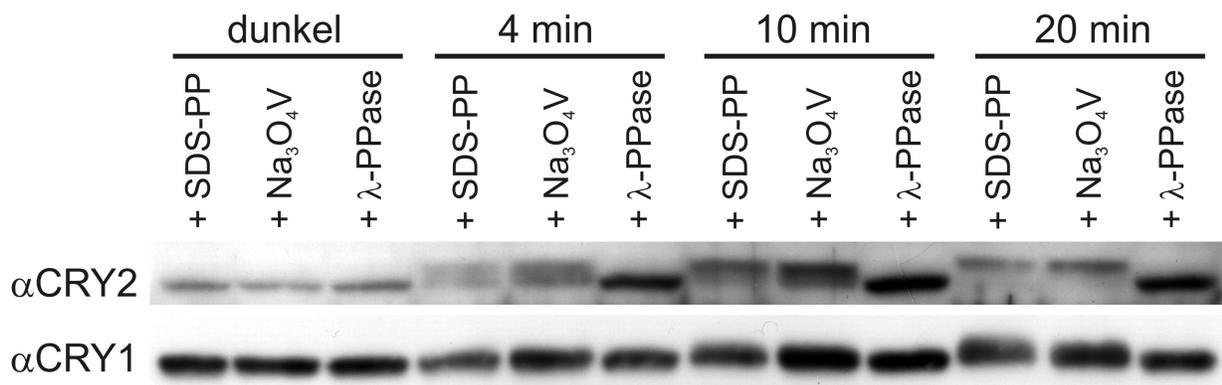


Abbildung 4.8: Western-Blot von Blau-bestrahlter *Arabidopsis* Zellkultur. Die Proteinextrakte wurden mit 400 U  $\lambda$ -Protein Phosphatase für 30 min bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert (+ $\lambda$ -PPase). Zur Kontrolle wurden die Extrakte zuvor entweder mit SDS-Probenpuffer aufgekocht (+ SDS-PP) oder mit 10 mM Natrium-ortho-Vanadat versetzt, um die Phosphataseaktivität zu inhibieren.

### 4.14.3 Aktionsspektrum der Phosphorylierung

Da erste Vorversuche (Abb. 4.9) gezeigt haben, dass sich die durch Phosphorylierung hervorgerufene Mobilitätsveränderung Blaulich- abhängig und nicht Phytochrom- kontrolliert ist (Shalitin *et al.*, 2002), sollte ein Aktionsspektrum nähere Daten über die Natur des an diesem Prozess beteiligten Photorezeptors liefern. Dazu wurden je 5 ml einer dunkel angezogenen Zellkultur auf Zellulosefilter (Pall) gesaugt und mit 500  $\mu\text{l}$  Medium befeuchtet. Nach 30 min Belichtung wurden die Filter in Alufolie verpackt und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Im Western- Blot (Daten siehe Anhang Abb. A.37) wurde für jede eingestrahlte Wellenlänge der Schwellenwert für das Erscheinen der Phosphorylierung ermittelt. Dazu wurde der Mittelwert aus der Fluenzrate, bei der gerade eine Phosphorylierung ausgelöst wurde und der nächst-niedrigeren Fluenzrate gebildet. Die Kehrwerte aus diesen errechneten Fluenzraten wurden gegen die Wellenlängen aufgetragen. Das resultierende Aktionsspektrum ist in Abb. 4.10 im Vergleich zum Absorptionsspektrum der *Arabidopsis*- CPD- Photolyase, einem FAD- haltigen Flavoprotein, dargestellt.

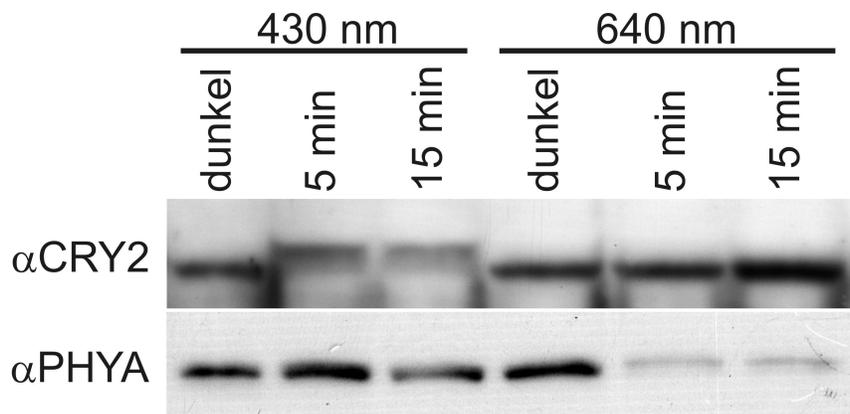


Abbildung 4.9: Wellenlängenspezifität des Abbaus und der Phosphorylierung von CRY2. Bestrahlung mit  $\sim 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  monochromatischem Licht. Immunologische Analyse der löslichen Proteinfraction.

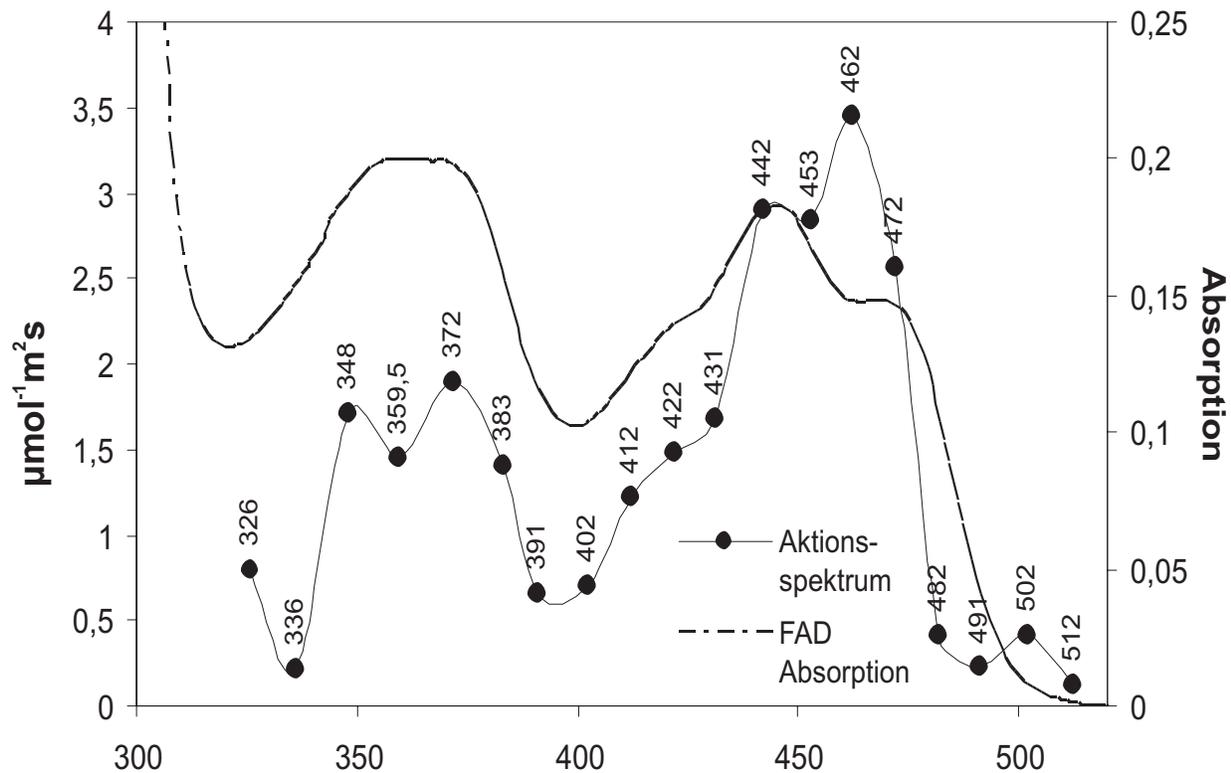
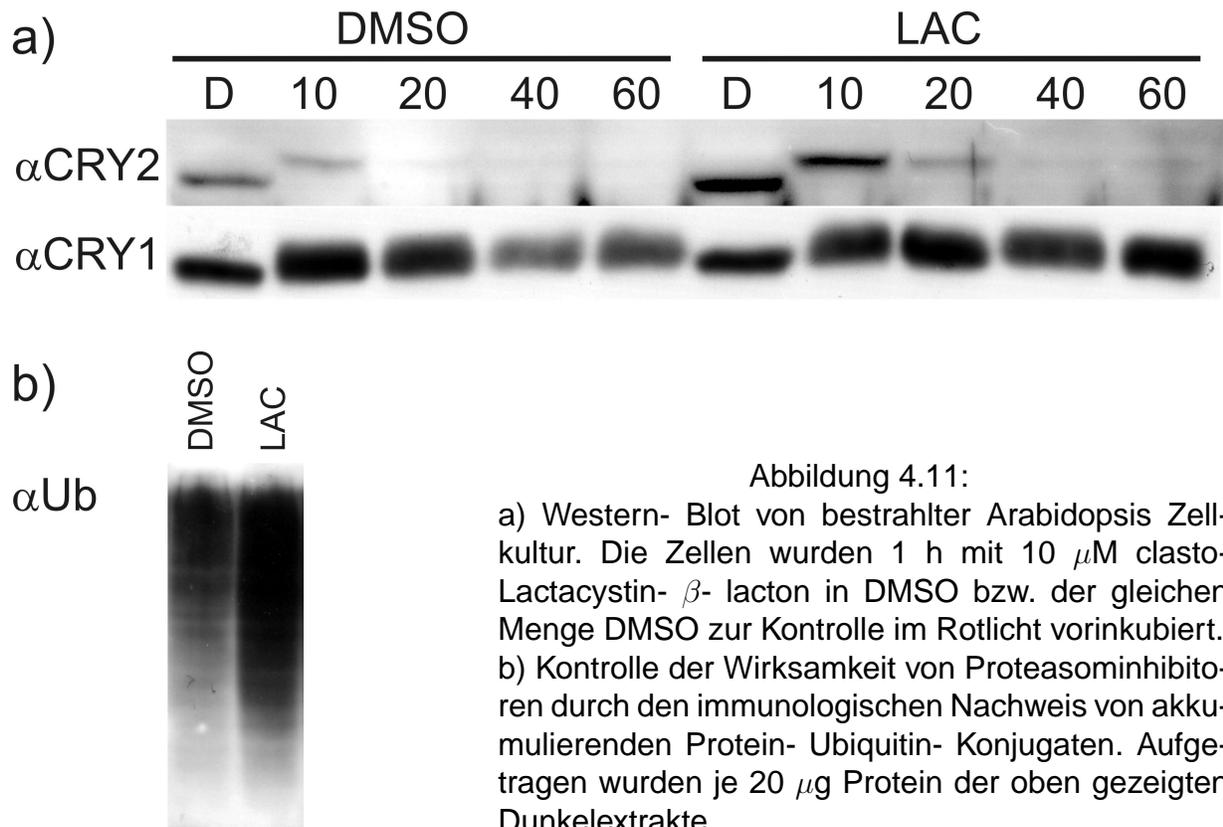


Abbildung 4.10: Aktionsspektrum der cry2 Phosphorylierung in Arabidopsis Zellkultur. Aufgetragen wurde der Kehrwert des Mittelwerts aus der ersten wirksamen Fluenzrate (phosphorylierte Form sichtbar) und der letzten unwirksamen Fluenzrate (Mobilität wie Dunkelprobe) gegen die eingestrahlte Wellenlänge (Bestrahlungsdauer: 30 min). (Daten siehe Anhang Tab. A.1)

#### 4.14.4 Untersuchungen zum Abbau von cry2

Da mit der Phosphorylierung auch ein Abbau von CRY2 einhergeht, sollten Experimente mit Inhibitoren gegen proteasomalen Abbau und Kinaseinhibitoren zur Aufklärung des Abbauweges und einer möglichen Bedeutung der Phosphorylierung beim Abbau beitragen. Dazu wurden dunkel angezogene Zellkulturen mit inhibitorhaltigem Medium versetzt und zunächst 1 h im roten Sicherheitslicht vorinkubiert. Zur Kontrolle diente ein Aliquot der gleichen Zellkultur, die mit einer entsprechenden Menge DMSO, dem Lösungsmittel der Inhibitoren, versetzt wurde. Nach der Bestrahlung mit Breitband-Blau-licht wurden zu jedem Zeitpunkt jeweils 4-5 ml der Suspension entnommen, die Zellen auf Zellulosefilter gesaugt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. cry2 wurde in den Proteinextrakten immunologisch nachgewiesen (Abb. 4.11a). Zur Kontrolle der

Wirksamkeit des Proteasominhibitors wurden die Extrakte auf die Akkumulation von Protein- Ubiquitin- Konjugaten mittels eines Ubiquitin- Antikörpers hin überprüft (Abb. 4.11b). Ein deutlicher Einfluss von clasto- Lactacystin-  $\beta$ - lacton und anderer Inhibitoren (MG132, Staurosporin) auf den Abbau von cry2 konnte nicht gezeigt werden. Allerdings konnte reproduzierbar eine höhere cry2- Ausgangskonzentration in Proben beobachtet werden, die mit Proteasominhibitoren behandelt wurden. Der Blaulicht-abhängige Abbau war davon jedoch unbeeinflusst.



Zur Erleichterung der Inhibitorapplikation, und um nicht- zellgängige Inhibitoren verwenden zu können, wurde untersucht, ob die verringerte Mobilität in der SDS- PAGE auch durch Bestrahlung von Proteinextrakten zu erzielen ist. Dazu wurden die Zellen von dunkel gehaltener Zellkultur wie zuvor beschrieben (Kap. 3.8.4) aufgebrochen, ein löslicher Überstand hergestellt und mit 1 mM ATP/MgCl<sub>2</sub> versetzt. Nach Zugabe der Inhibitoren bzw. DMSO zur Kontrolle, wurden die Extrakte mit 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Blaulicht bestrahlt, zu den angegebenen Zeitpunkten ein Aliquot entnommen und mit SDS- Probenpuffer sofort aufgekocht. Die immunologische Analyse zeigt ein vollständiges Fehlen der durch die Phosphorylierung verursachten Mobilitätsveränderung und einen verringerten, sowie lichtunabhängigen Abbau von CRY2 (Abb. 4.12).

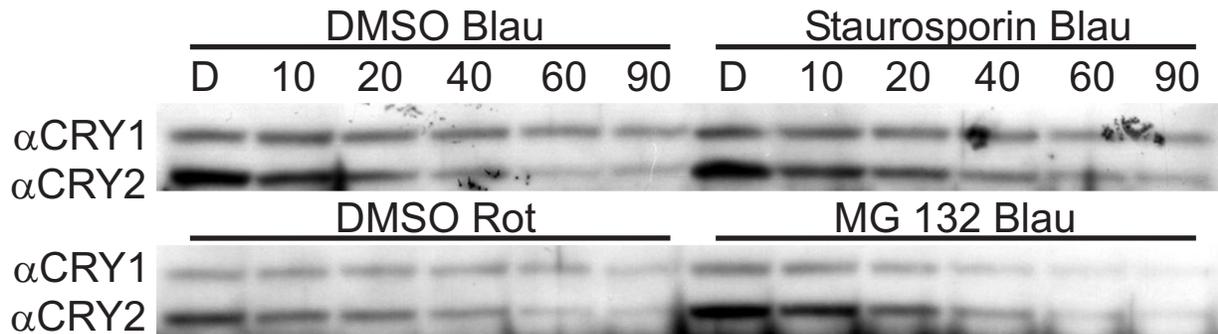


Abbildung 4.12: Abbau von cry2 *in vitro*. Gesamtproteinextrakte (lösliche Fraktion) einer dunkel angezogenen Zellkultur wurden für die angegebenen Zeiten bestrahlt und die Reaktion durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und anschließendem Aufkochen gestoppt. Der Blot wurde mit einem Gemisch aus  $\alpha\text{CRY1}$  und  $\alpha\text{CRY2}$  Antikörpern inkubiert.

Für das CRY2- Allel aus dem Ökotyp CAP VERDE ISLANDS (Cvi) wurde eine gesteigerte Stabilität des Proteins gezeigt (El-Din El-Assal *et al.*, 2001). In der gleichen Arbeit wurde auch eine im Vergleich zum Wildtyp unterschiedliche Regulation der Proteinmenge in Abhängigkeit von der Tageslänge gezeigt. Im Kurztag angezogene Cvi- Pflanzen zeigten deutliche Unterschiede in der Proteinmenge zwischen Tag- und Nachtphase, während im Langtag gewachsene Cvi- Pflanzen eine erhöhte Stabilität von cry2 aufwiesen. Um zu zeigen, ob dieses Phänomen mit der Phosphorylierung von CRY2 korreliert, wurden Keimlinge mit dem Cvi- CRY2- Allel im LANDSBERG ERECTA Hintergrund (EDINIL: *early daylength insensitive - near isogenic line*) und des Wildtyps (Ler) unter den entsprechenden Bedingungen (siehe El-Din El-Assal *et al.*, 2001) angezogen und am Ende der letzten Lichtphase einer Blaulichtbestrahlung unterzogen (50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Die Auswertung erfolgte wie bereits in den Kapiteln 3.8.4 und 3.8.7.3 beschrieben. Dabei konnte die Aussage von El-Din El-Assal *et al.*, (2001) nur teilweise bestätigt werden (Abb. 4.13). Die reduzierte diurnale Regulation im Langtag kann einer deutlich verringerten Proteinmenge am Ende der Nachtphase zugeschrieben werden. Ausführlichere Daten wurden von Mockler *et al.*, (2003) erhoben. Auch eine erhöhte Stabilität des CRY2- Allels in Cvi konnte nicht bestätigt werden. Zudem zeigt sich bei der Analyse von Proteinextrakten aus Keimlingen, anstelle von Zellkulturextrakten, keine lichtabhängige Mobilitätsänderung im Gel.

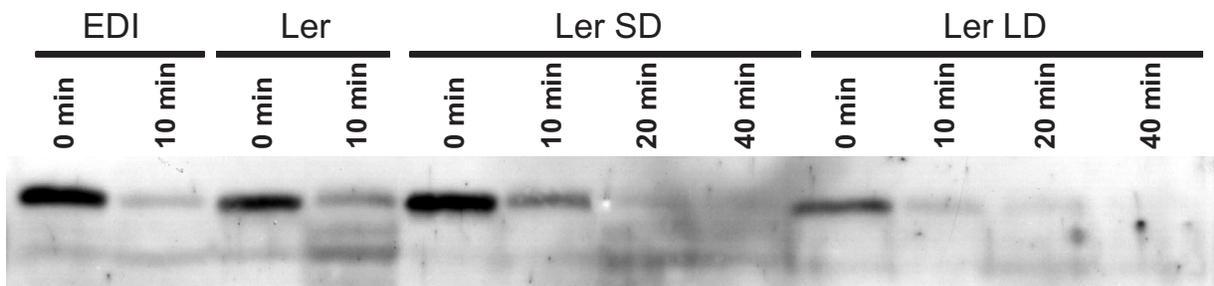


Abbildung 4.13: Western-Blot von bestrahlten *Arabidopsis* Keimlingen. Die Pflanzen wurden auf Filterpapier für 7 Tage bei entsprechender Tageslänge angezogen und am Ende der letzten Dunkelphase mit  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Blaulicht bestrahlt. EDI, Ler und Ler (SD) wurden im Kurztag angezogen (8 h,  $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Weisslicht, 16 h dunkel), Ler (LD) wurde im Langtag (16 h,  $55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Weißlicht, 8 h dunkel) angezogen. Der Nachweis von cry2 erfolgte immunologisch mit  $\Delta\text{cry2}(501-612)$

## 4.15 Protein-Protein Interaktionen

### 4.15.1 Interaktion von cry2 mit At2g02230

Ein *yeast- two- hybrid* (Y2H) Screen nach neuen Interaktionspartnern von CRY2 wurde von Oliver Kleiner in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Dieser Screen führte zur Identifizierung einiger lichtabhängig- interagierender Proteine, die im Folgenden näher untersucht wurden. Der Y2H- Klon #45 (At2g02230) zeigte eine schwache Interaktion mit cry2 im Blaulicht. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von 317 Aminosäureresten wurde in der MIPS- Datenbank des *Arabidopsis*- Genomprojekts (<http://mips.gsf.de/>) als putatives Phloem- spezifisches Lectin annotiert. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 34.7 kDa und besitzt keine Transmembrandomänen. Zudem trägt das Protein eine F-Box und eine saure Domäne im C-Terminus und ist damit ein putativer Bestandteil eines E3- Ubiquitin- Ligasekomplexes vom SCF- Typ. F-Box Proteine vermitteln die Substratspezifität dieser Komplexe. Daher schien Klon #45 eine mögliche Komponente des Abbauweges von CRY2 zu sein.

#### 4.15.2 Interaktion von At2g02230 mit dem SCF- Komplex

Weitere Bestandteile von SCF-Komplexen und direkte Interaktionspartner der F-Box Proteine sind die pflanzlichen Homologen des Hefeproteins Skp1p, genannt ASK. Da die Interaktion eines Proteins mit Mitgliedern der ASK- Familie als deutlicher Hinweis auf dessen Funktion in SCF- Komplexen gewertet werden kann, wurde überprüft, ob At2g02230 mit ASK interagiert. Dazu wurden Vektoren des 'Matchmaker III'- Systems (BD Biosciences) mit der kodierenden Sequenz von ASK1 und ASK2 im Leseraster mit der Gal4- Aktivierungsdomäne (pGADT7-ASK1 und pGADT7-ASK2, Dieterle *et al.*, 2001) zusammen mit der Vollängen cDNA von At2g02230 in Fusion mit der Gal4- DNA-Bindungsdomäne (pGBKT7-#45) in Hefen vom Stamm Y190 transformiert und gemäß dem Protokoll von BD Biosciences ein quantitativer ONPG- Flüssigassay durchgeführt. Zur Kontrolle der Expression wurden Western- Blots mit Antikörpern gegen das auf dem Vektor pGBKT7 kodierte Myc- Epitop und die Gal4- Aktivierungsdomäne durchgeführt. Die erzielten Daten zeigten eine klare Interaktion von At2g02230 mit ASK2 und eine schwächere Interaktion mit ASK1 (Abb. 4.14). Die immunologische Analyse zeigte, dass vermutlich der geringe Expressionslevel von ASK1 für die verminderte Reporteraktivität verantwortlich ist.

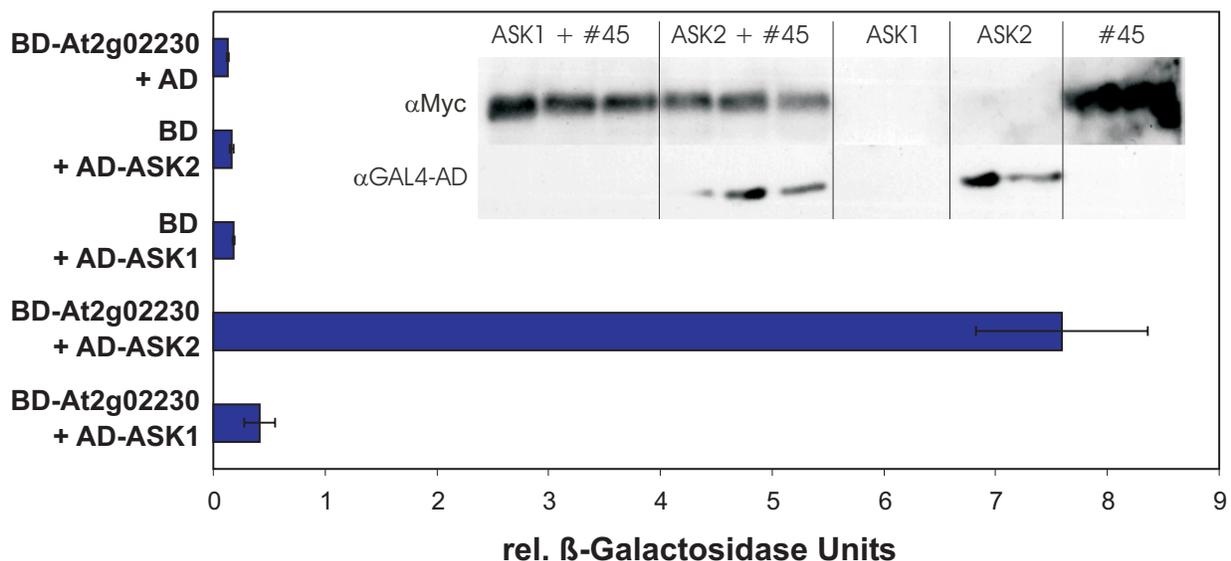


Abbildung 4.14: Interaktion zwischen At2g02230 (hier: #45) und ASK1 bzw. ASK2 im Hefesystem. Die Messung erfolgte nach 5stündiger Expression durch ONPG-Flüssigassay. Der Western-Blot diente zur Kontrolle der Expression.

### 4.15.3 Subzelluläre Lokalisation von At2g02230

Mit Hilfe der Fusion von At2g02230 mit dem fluoreszierenden Protein YFP unter Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors wurde die Lokalisation des Proteins in Petersiliezellen untersucht. Konfokale Analysen zeigten eine homogene Verteilung in der gesamten Zelle, inklusive des Zellkerns, jedoch abgesehen von der Vakuole und dem Nukleolus (Abb. 4.15). Diese Lokalisation entsprach einem Protein ohne gerichtetes Transportsignal, klein genug, um passiv in den Kern zu diffundieren.

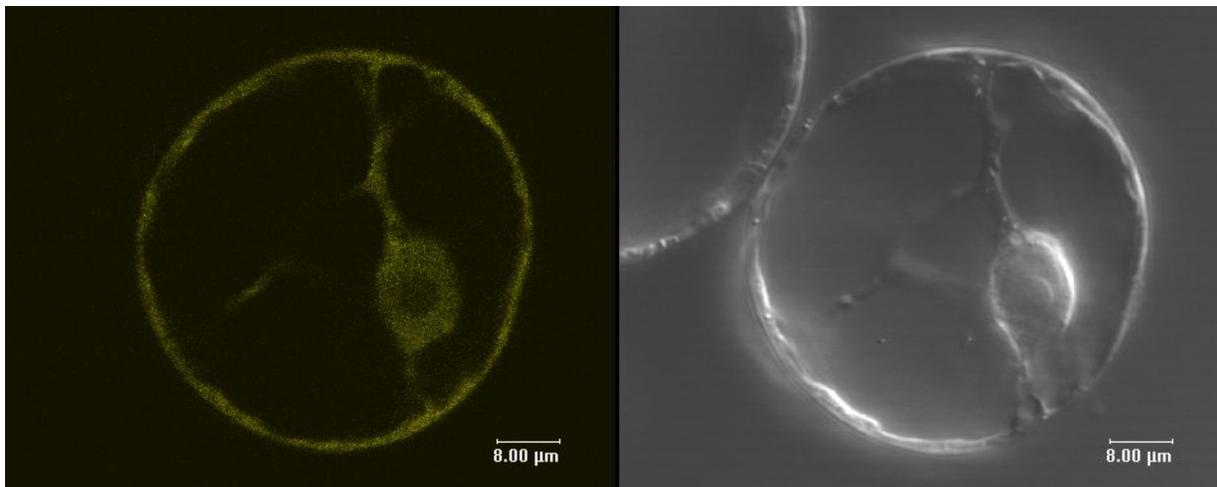


Abbildung 4.15: Lokalisation von At2g02230-YFP. Anregung bei 514 nm, Anregungsstrahlenteiler: DD 458/514, Detektionsfenster: 540-625 nm, Objektiv: HCX PL APO 40.0x1.25 OIL UV. Links: YFP-Fluoreszenz; rechts: Durchlichtbild.

### 4.15.4 Transaktivierende Wirkung von cry2 in Hefe

Zur Kontrolle der o. g. Befunde des Y2H- Screens wurde das Experiment mittels des quantitativen ONPG- Assays wiederholt. Dazu wurden das aus dem Screen resultierende Plasmid pACT/#45 des 'Matchmaker II'- Systems (BD Biosciences), und pAS2-1/CRY2 in den Hefestamm Y190 transformiert und gemäß des Protokolls von BD Biosciences die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität bestimmt. Die Zellen wurden für 5 h mit  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Blau- bzw. Rotlicht als Kontrolle bestrahlt. Das Ergebnis zeigte, dass die erhöhte Aktivität im Blaulicht allein durch die Expression der Gal4- DNA- Binde-domäne in Fusion mit CRY2 hervorgerufen wurde (Abb. 4.16). Die Anwesenheit von At2g02230 war dazu nicht erforderlich. Der Versuch, cry2 als Fusion mit der Gal4-

Aktivierungsdomäne zu verwenden, um diese Transaktivierung zu vermeiden, schlug fehl, da mit AD-cry2 transformierte Hefen im blauen Licht nicht lebensfähig sind (siehe Kap. 4.16.2). Folglich musste aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass At2g02230 vermutlich kein Interaktionspartner von CRY2 ist.

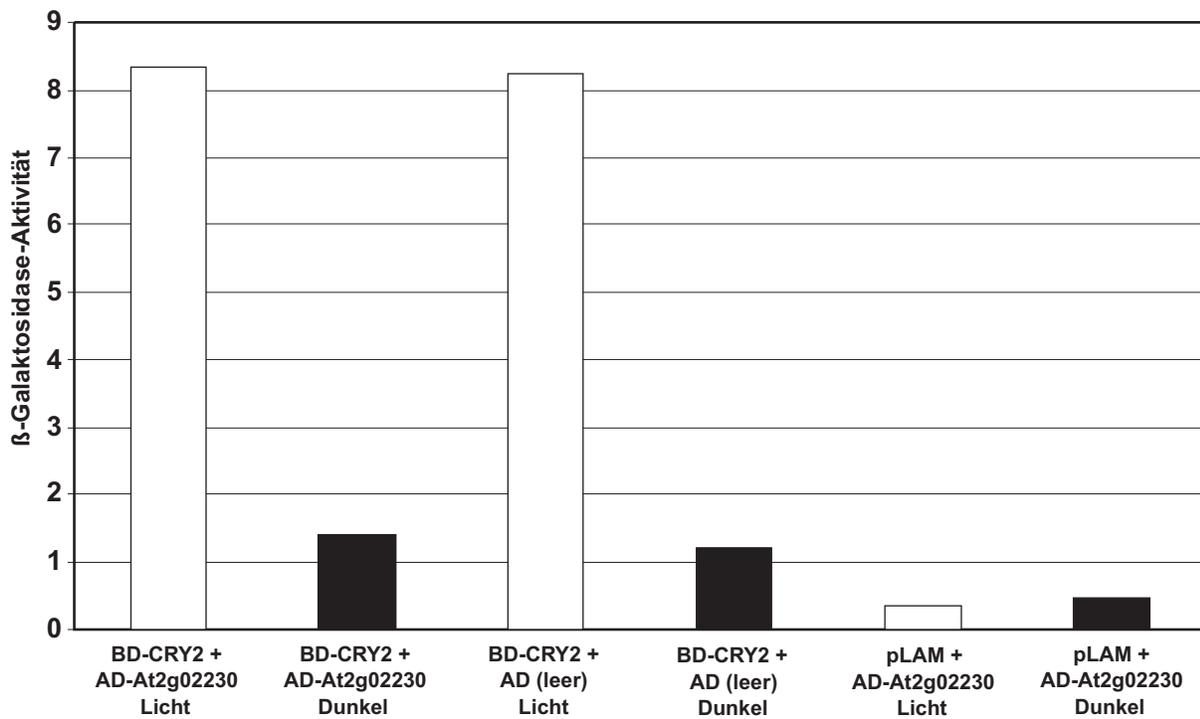


Abbildung 4.16: Lichtabhängige Transaktivierung durch BD-CRY2, Interaktion mit Y2H-Klon #45 (At2g02230). Negativkontrolle mit humanem Lamin C (pLAM).

#### 4.15.5 Interaktion von cry2 mit At5g26280

Ein weiterer Klon der aus dem Y2H- Screen hervorging wurde von Oliver Kleiner (Kleiner, 2001) näher charakterisiert. Das Gen ist in der MIPS Datenbank unter der Bezeichnung At5g26280 aufgeführt und kodiert für ein 349 Aminosäurereste umfassendes Protein. Da sich jedoch im gleichen Leseraster 57 Basen stromaufwärts ein weiteres mögliches Startcodon befindet, wird die annotierte Version hier als  $\Delta 19$ At5g26280 aufgeführt, während der MIPS-Code für die um 19 Aminosäuren längere Version benutzt wird. Das Protein wird als unbekanntes Protein annotiert, enthält jedoch zwei MATH-Domänen (Prosite- Eintrag: Pf00917), die in sekretierten Metalloproteasen (Meprin A) und den ebenfalls sekretierten, an der Signaltransduktion bei Säugern beteiligten TRAF-Proteinen, vorkommen. Die  $\Delta 19$  Version wird von TargetP (siehe Abb. 5.36) als sekretiertes Protein vorhergesagt, während die Vollängenversion vermutlich eine Transmembrandomäne am N-Terminus besitzt. In dieser Arbeit wurde die subzelluläre Lokalisation des Proteins untersucht und versucht, die Interaktion mit CRY2 im homologen System zu bestätigen.

##### 4.15.5.1 Subzelluläre Lokalisation von At5g26280

Wie zuvor für At2g02230 wurde die kodierende Sequenz von At5g26280 als Fusion mit YFP unter Kontrolle eines doppelten 35S- Promotors transient in Petersilieprotoplasten exprimiert und die Lokalisation des Fusionsproteins konfokal analysiert. Das Fluoreszenzsignal erschien dabei als körnige Struktur, die an sich gegenüberliegenden Seiten des Zellkerns oder auch nur auf einer Seite auftraten (Abb. 4.17). Innerhalb des Kerns konnte kein Signal detektiert werden.

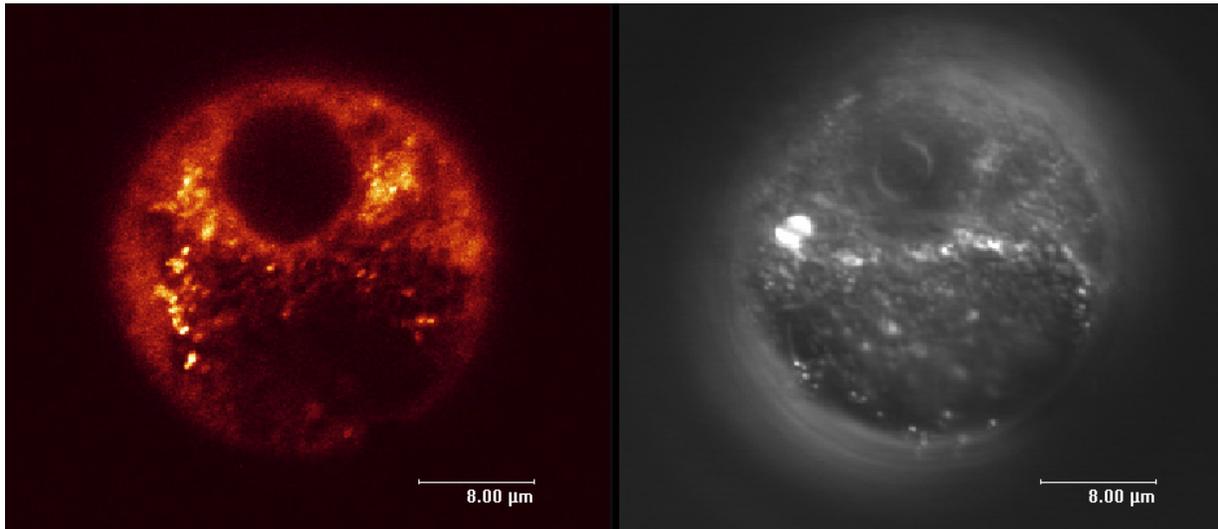


Abbildung 4.17: Lokalisation von At5g26280-YFP in Petersilie-Protoplasten. Anregung bei 514 nm, Anregungs-Strahlenteiler: DD 458/514, Detektionsfenster: 530-650 nm, Objektiv: HCX PL APO 63.0x1.32 OIL UV (Datensatz: ROC1\_22-03-01). Links: Fluoreszenzsignal, rechts: Durchlichtaufnahme.

Abb. 4.18 zeigt die Lokalisation der  $\Delta 19$  Version von At5g26280 mit deutlich weniger Körnung des Signals, einer diffuseren Verteilung und schwacher Fluoreszenz innerhalb des Zellkerns.

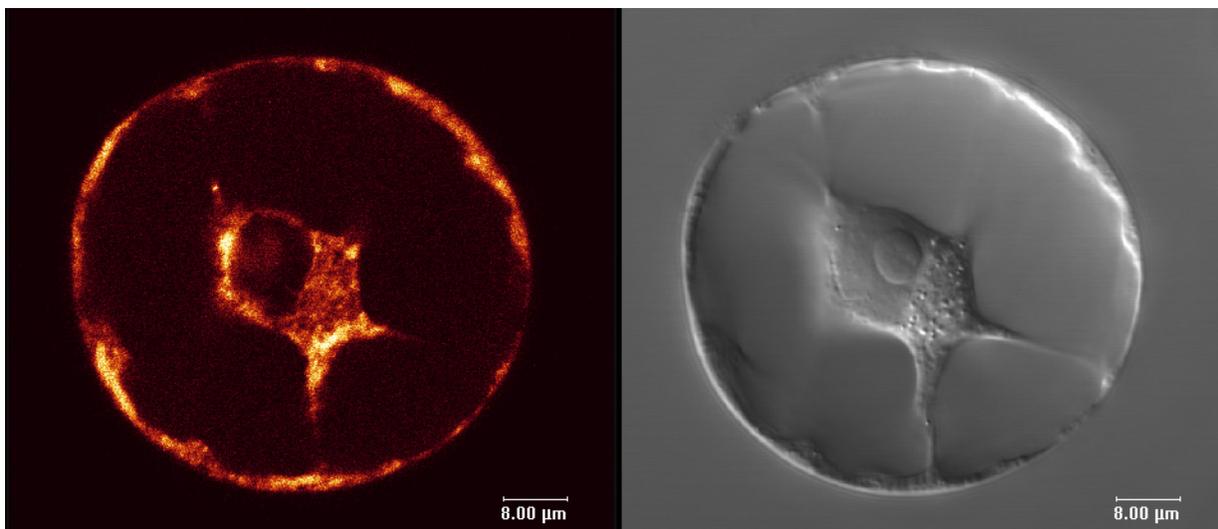


Abbildung 4.18: Lokalisation von  $\Delta 19$ At5g26280-YFP in Petersilie Protoplasten. Anregung bei 488 nm, Anregungs-Strahlenteiler: TD 488/543/633, Detektionsfenster: 538-619 nm, Objektiv: HCX PL APO 40.0x1.25 OIL UV (Datensatz: ROC1\_20-369\_2) . Links: Fluoreszenzsignal, rechts: Durchlichtaufnahme.

#### 4.15.5.2 Untersuchung der Interaktion mittels BRET

Eine lichtabhängige Interaktion von At5g26280 und Cryptochrom 2 konnte bisher nur in Hefezellen gezeigt werden (Kleiner, 2001). Die folgenden Experimente sollten zeigen, ob eine Interaktion der Proteine in *Arabidopsis*- Zellen ebenfalls nachweisbar ist. Der 'Biolumineszenz Resonanz Energie Transfer' (BRET) stellt eine gute Methode dar, um Protein- Protein- Interaktionen in der lebenden Zelle mit minimalen Eingriffen von außen zu messen. Dazu wurden die zu testenden Proteine N- und C- terminal mit den Reporterproteinen Luziferase und YFP fusioniert, damit Förster- Distanzen zwischen den Reportern, weitgehend unabhängig von der Ausrichtung der Interaktion, zustande kommen können (Abb. 4.19).

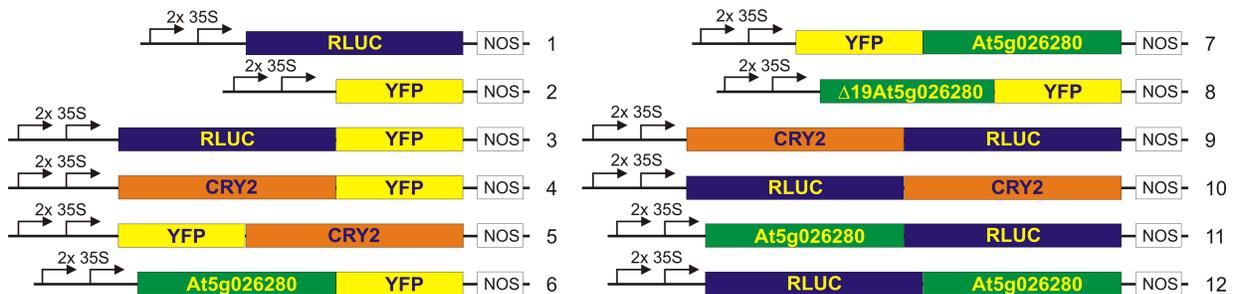


Abbildung 4.19: Konstrukte für die transiente Expression in Pflanzenzellen zur Messung von Protein-Protein Interaktionen mittels BRET, alle basierend auf den pAVA-Vektoren von Albrecht von Arnim.

Da aus den Daten mit Hefezellen eine Interaktion von cry2 mit At5g26280 in Dunkelheit zu erwarten war, wurden die transformierten Protoplasten über Nacht im Dunkeln gehalten und auch für die Messungen nur im roten Sicherheitslicht gehandhabt. Die Expression der YFP- Konstrukte konnte am Fluoreszenzmikroskop überprüft werden, die der RLUC- Konstrukte wurde über die Luziferaseaktivität kontrolliert. Abb. 4.20 zeigt die Daten eines typischen Experimentes. Dabei wird die Emission des YFP (Y) ins Verhältnis zur Emission der Luziferase (B) gesetzt. Nach Angaben von Albrecht von Arnim (persönliche Mitteilung) kann ein Y/B-Verhältnis von 0,8 als eindeutiger Hinweis für spezifische Interaktion gewertet werden. Die Fusion RLUC-YFP stellt die Positivkontrolle dar.

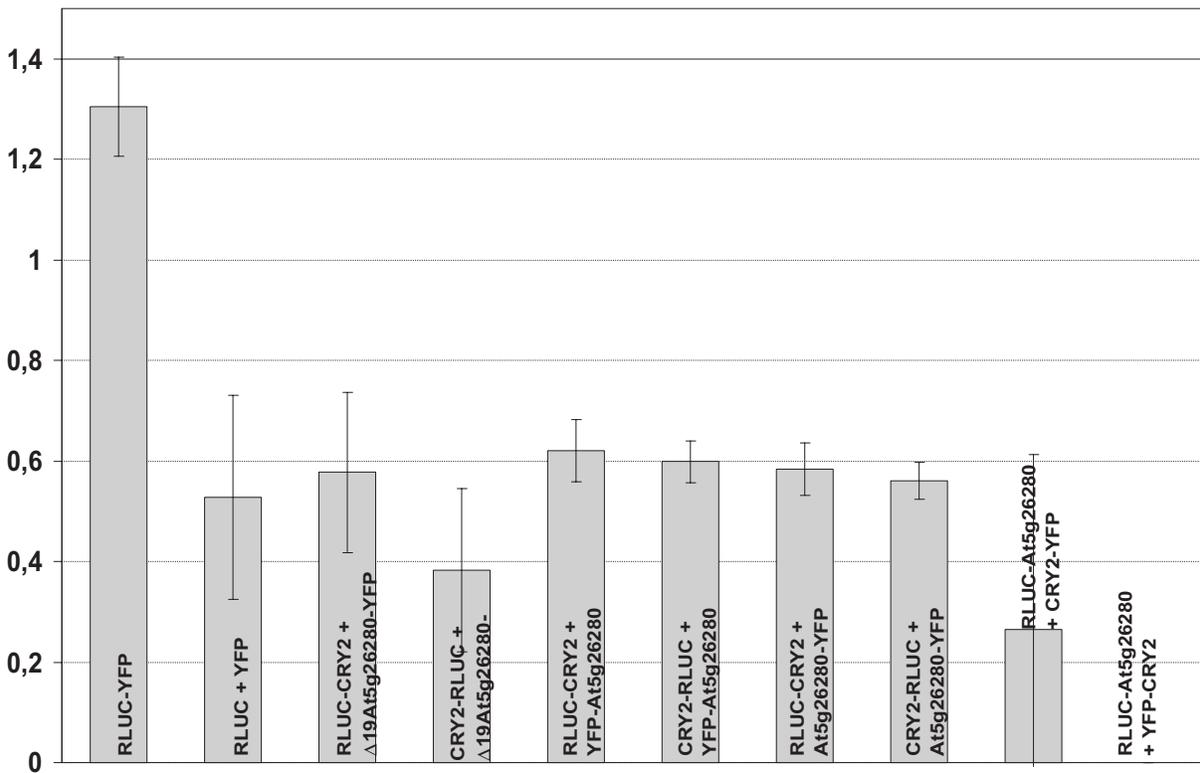


Abbildung 4.20: Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (BRET) Assay zum Nachweis einer möglichen Interaktion von cry2 und At5g26280 *in planta*. Mittelwerte des Y/B-Verhältnisses aus je 4 Messungen.

Das in Abb. 4.20 dargestellte Ergebnis deutet nicht auf eine Interaktion von cry2 mit At5g26280 *in planta*. Die Expression der At5g26280 Konstrukte war jedoch deutlich schwächer als die der CRY2 Konstrukte. Da bei Überschuss des Donors (RLUC) die abgestrahlten Photonen auch bei erfolgter Interaktion vom Akzeptor nicht in ausreichendem Maß aufgenommen werden können, wurde in einem weiteren Experiment durch Einsatz geringerer Plasmidmengen die Donormenge reguliert. Bei physikalischer Interaktion müsste so mit abnehmender Donorkonzentration ein Anstieg des Y/B-Verhältnisses erwartet werden (Abb. 4.21).

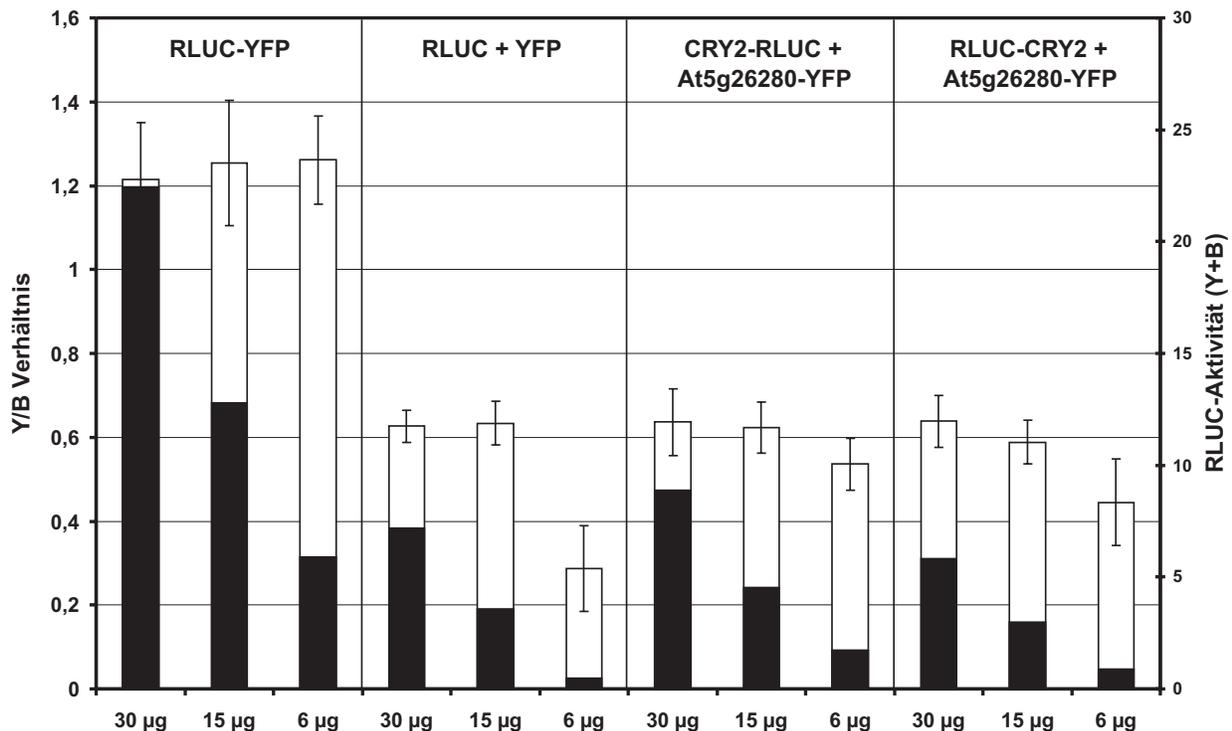


Abbildung 4.21: BRET Verhältnis in Abhängigkeit von der eingesetzten Donor- Plasmidmenge. Weiß: Y/B als Maß für Interaktion, schwarz: Y+B für die Gesamtaktivität

Diese Daten zeigten, dass die Luziferaseaktivität in einem linearen Zusammenhang mit der eingesetzten Plasmidkonzentration steht (schwarze Balken). Da das Y/B- Verhältnis (weiße Balken) jedoch eher abnahm, fand vermutlich kein Energietransfer aufgrund von spezifischer Protein- Protein- Interaktion statt.

#### 4.15.5.3 Untersuchung der Interaktion mittels Co- Immunopräzipitation

Einen weiteren Ansatz zur Analyse von Protein- Protein- Interaktionen stellt die Co-Immunopräzipitation (coIP) dar. Da leider kein Antikörper gegen At5g26280 verfügbar war, mussten Fusionsproteine in Pflanzenzellen exprimiert werden. Auf Grund der einfachen Detektierbarkeit haben wir uns für Varianten des Grün- Fluoreszierenden-Proteins (GFP) entschieden. Die farblich unterschiedlichen Formen (GFP, CFP und YFP), werden von den meisten verfügbaren Antikörpern gleichermaßen erkannt. Für die Präzipitation wurden *Arabidopsis*- Protoplasten aus der Wurzelzellkultur transient mit den zuvor beschriebenen Konstrukten (Abb. 4.19) transformiert und im Dunkeln gehalten. Nach Herstellung der Proteinextrakte (bis 1% Triton X-100 zur Solubilisierung der Membranen)

wurde CRY2 mittels  $\alpha$ CRY2(501-612) präzipitiert. Das Eluat wurde mit  $\alpha$ GFP- Antikörpern auf die Anwesenheit von At5g26280- Fusionen hin untersucht. Abb. 4.22 zeigt die erhaltenen Daten. Dabei erschien im Eluat eine Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht der YFP-At5g26280 Fusion von ca. 67 kDa. Diese Fusion zeigt in *Arabidopsis* ein anderes Verteilungsbild als die beiden C-terminalen Fusionen. Das Signal ist homogen verteilt und findet sich auch im Zellkern wieder (vgl. Kap. 4.15.5.1). Auffällig ist jedoch die geringe Signalstärke der beiden Volllängenkonstrukte. Diese Daten sind auch durch die mikroskopische Kontrolle der Protoplasten bestätigt.

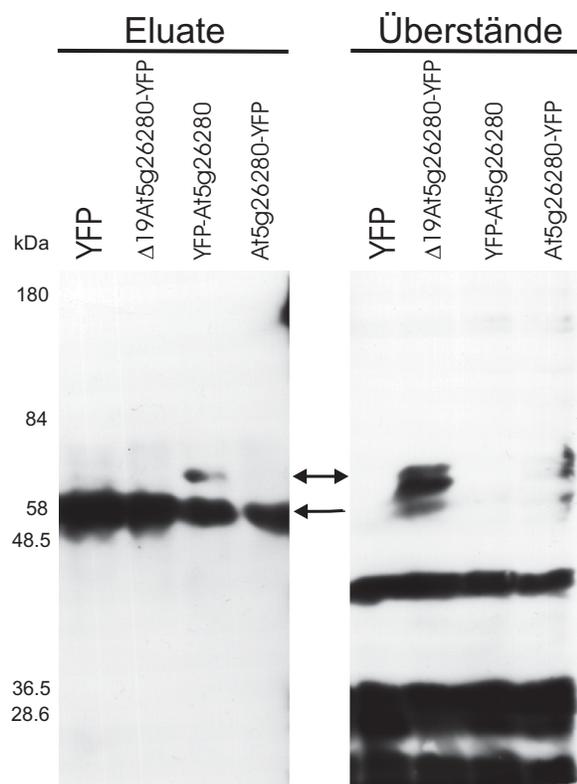


Abbildung 4.22:  
Co-Immunopräzipitation zum Nachweis der Interaktion zwischen CRY2 und At5g26280. Die Präzipitation erfolgte mit  $\alpha$ CRY2(501-612) aus Kaninchen, der Nachweis mit  $\alpha$ GFP aus Ziege. Eluate: durch Aufkochen der Protein-G-Agarose Pellets mit SDS-Probenpuffer abgelöstes Protein, Überstände: Proteinextrakte nach der Abtrennung der Protein-G-Agarose.

## 4.16 Effekte der Expression von cry2 in Hefe

Die Y2H- Versuche zur Interaktion von CRY2 mit At2g02230 haben gezeigt, dass *Arabidopsis*-CRY2 in Hefe ohne die Anwesenheit weiterer pflanzlicher Proteine lichtabhängige Reaktionen hervorruft. Nicht nur die bereits beschriebene Transaktivierung, sondern auch ein vermindertes Wachstum der Hefezellen im Blaulicht bei Expression von CRY2 als Fusion mit der Gal4-Aktivierungsdomäne konnte dabei beobachtet werden. Daher lag es nahe, diese Effekte genauer zu untersuchen.

### 4.16.1 Aktionsspektrum der Transaktivierung des Reporters durch cry2

Wie schon für das Aktionsspektrum der cry2- Phosphorylierung, wurden auch für die Transaktivierung *fluence-response* Kurven aufgenommen. Dazu wurden die Hefen mit den Plasmiden pGBKT7/CRY2 und dem leeren pGADT7 co- transformiert. Die Vorgehensweise ist in Kap. 3.7.8.2 beschrieben. Die Bestrahlung erfolgte in einer Threshold-Box bei 30°C, bis die Kolonien einen Durchmesser von  $\sim 2$  mm erreicht hatten. Abb. 4.23 zeigt für zwei Wellenlängen exemplarisch eine Schwellenwertbestimmung.

Da die Bestrahlung sehr zeitaufwendig ist, wurde ein Aktionsspektrum bei photonengleicher Bestrahlung mit verschiedenen Wellenlängen aufgenommen (siehe Kap. 3.13.3). Die gemessenen  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten wurden gegen die Wellenlänge aufgetragen (Abb. 4.24). Dabei wurde ein scharfer Peak bei 431 nm detektiert. Die Aktivierung des Reporters konnte im UV- Bereich jedoch nicht eindeutig bestimmt werden, da in diesem Spektralbereich die geforderte Fluenzrate von  $3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  mit der verfügbaren Ausstattung nicht erreicht werden konnte. Durch einen Fehler beim Messen der Fluenzraten wurden die eingestrahlenen Fluenzen zunächst falsch berechnet und oberhalb von 500 nm bis zu  $8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  eingestrahlt, was jedoch keinen Einfluss auf das Ergebnis hatte.

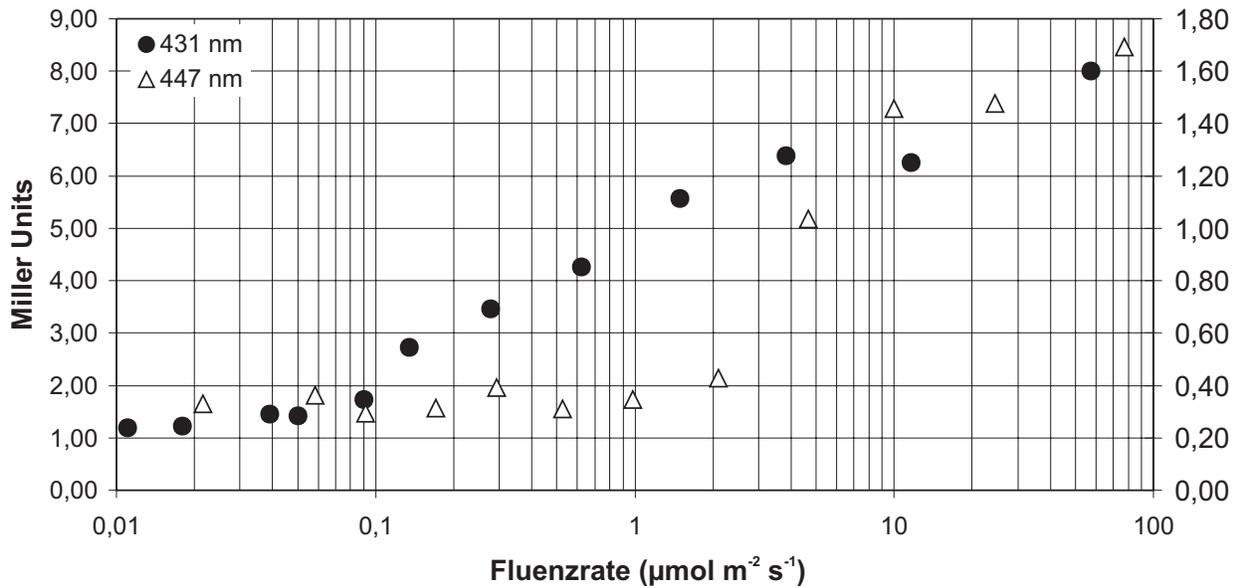


Abbildung 4.23: Schwellenwertbestimmung der Transaktivierung durch BD-cry2. Bestrahlung mit unterschiedlichen Intensitäten über 48 h bei 30°C. Lichtquelle: 1000 W Xenon-Bogenlampe, gefiltert durch wassergekühltes KG 1 (5 mm) und DIL 431 nm (●) bzw. DIL 447 nm (△).

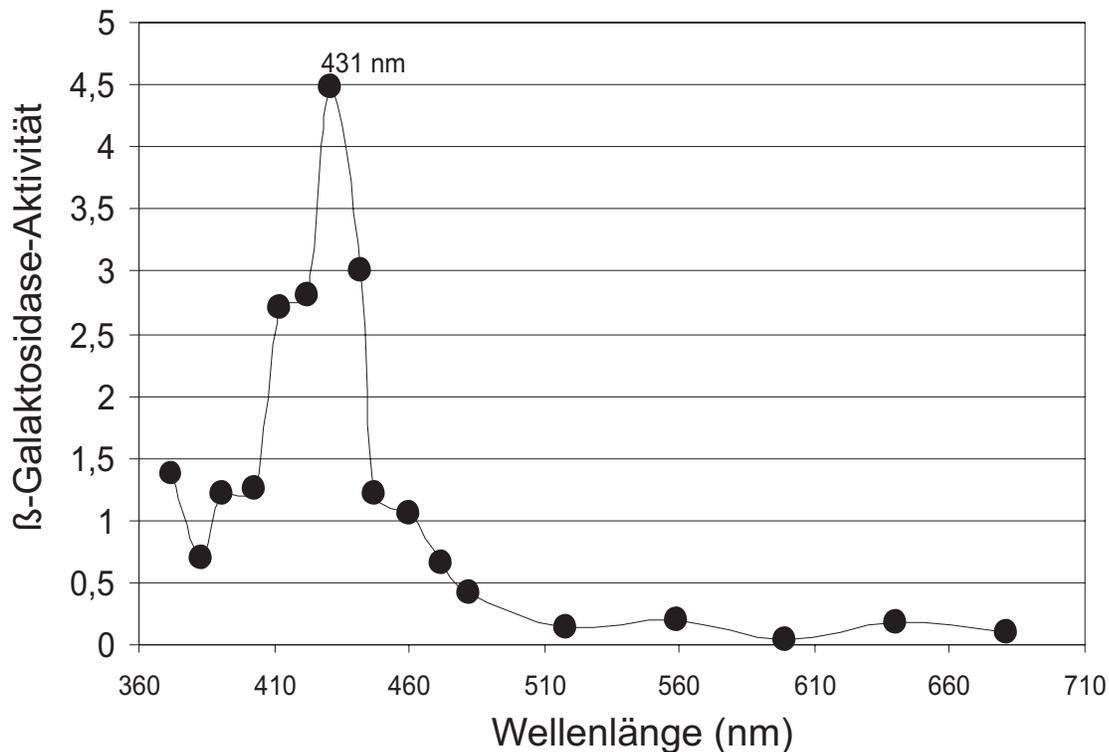


Abbildung 4.24: Wellenlängenabhängigkeit der Transaktivierung des Reportergens durch BD-cry2 in Hefe. Bestrahlung mit  $\sim 3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  über 48 h.

#### 4.16.2 Wachstumsinhibition von Hefezellen in Blaulicht durch cry2

Ein weiterer Effekt der AtCRY2- Expression in Hefe ist in folgendem Experiment gezeigt. Der Hefestamm Y190 wurde dazu mit den Konstrukten pGADT7/CRY2 und pGBKT7/CRY2 jeweils in Kombination mit den korrespondierenden Plasmiden ohne Insertion co-transformiert und unter Bestrahlung mit  $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Blau- bzw. Rotlicht drei Tage bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert. Die mit pGADT7/CRY2 transformierten Hefen zeigten unter diesen Bedingungen keinerlei Wachstum im Blaulicht, während das Wachstum im Rotlicht und im Dunkeln normal war (Abb. 4.25). Bei Lichtintensitäten von  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  kam es bei allen Ansätzen zu vermindertem Wachstum im Blaulicht, was vermutlich auf die bereits beschriebenen Lichteffekte auf das Hefewachstum zurückzuführen ist (Ulaszewski *et al.*, 1979).

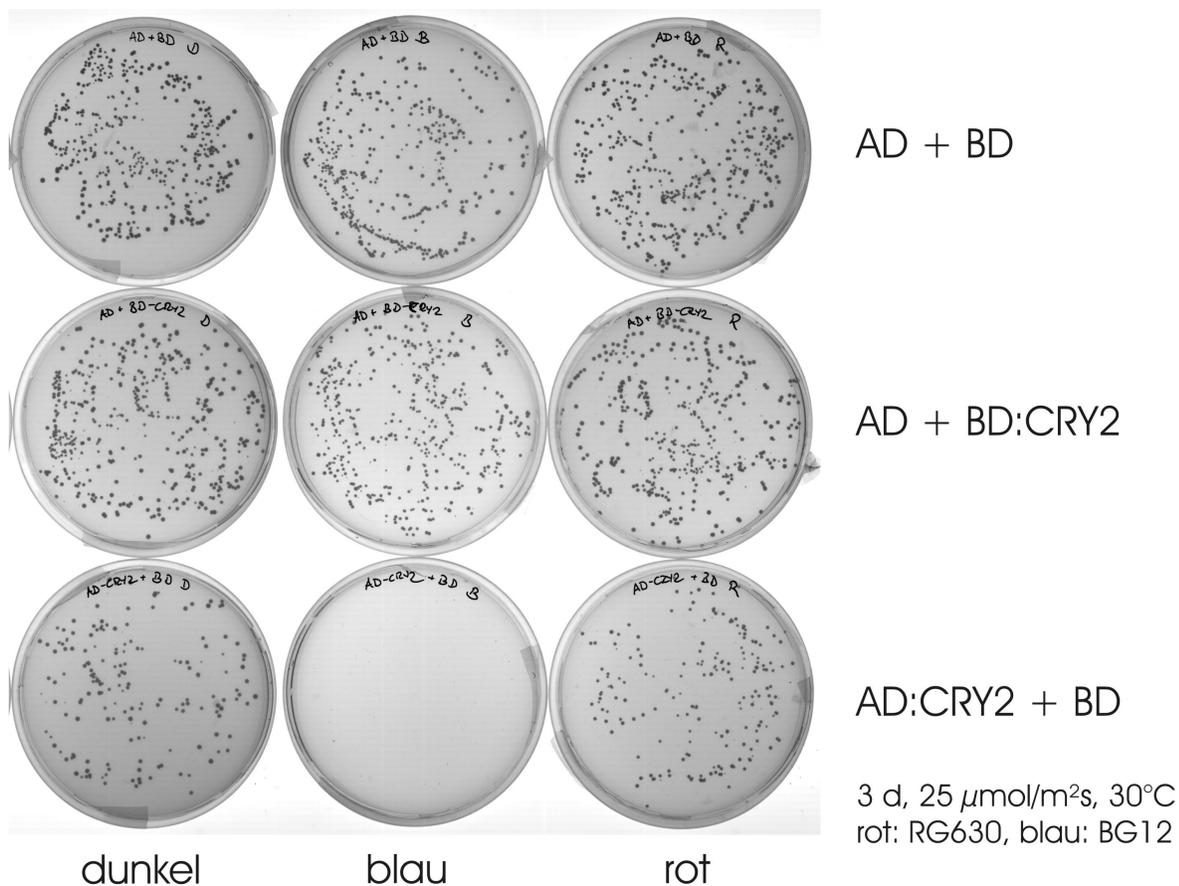


Abbildung 4.25: Effekt von AD-CRY2 im Blaulicht. Alle Platten wurden mit der gleichen Zellzahl beimpft und unter den beschriebenen Lichtbedingungen kultiviert.

## 4.17 Bindung von cry2 an DNA

Die oben dargestellten Daten, sowie Ergebnisse mit anderen Cryptochromen (vgl. 1.4.8) haben die Vermutung aufkommen lassen, Atcry2 könne DNA-Bindungseigenschaften besitzen. Zur Überprüfung dieser These wurde ein Gelshiftassay mit *in vitro*-transkribiertem und -translatiertem cry2 durchgeführt. Dazu wurde der T7-Promotor in dem Konstrukt pGBKT7/CRY2 genutzt, der zwischen den codierenden Regionen für die Gal4-DNA-Bindedomäne und cry2 liegt und zur Expression von unfusioniertem cry2 genutzt werden kann. Als Negativkontrolle wurde der *insert*-freie Originalvektor pGBKT7 für die TnT-Reaktion eingesetzt. Abb. 4.26 zeigt, dass TnT-exprimiertes cry2 an die eingesetzte DNA-Sonde bindet. Um die Spezifität der DNA-Bindung zu zeigen, wurde die Bindung mit nicht-markierten Oligonukleotiden kompetiert. Dabei wurde sowohl einzelsträngige (ss), als auch doppelsträngige (ds) DNA des gleichen Oligos (spez.), sowie eines unterschiedlichen Oligos (unsp.) verwendet. Die Sonde kann durch Zugabe von einzelsträngiger und doppelsträngiger DNA verdrängt werden. Die Bindung erscheint nicht sequenzspezifisch, da der unspezifische Kompetitor den gleichen Effekt erzielt.

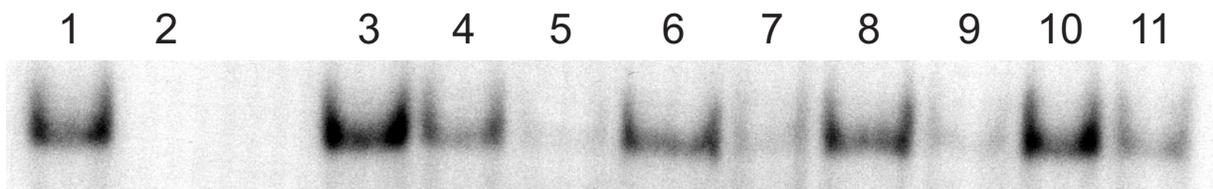


Abbildung 4.26: Autoradiographie eines nativen Polyacrylamidgels zum Nachweis einer DNA-Bindung durch cry2. Alle Proben wurden mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten Sonde versetzt. 1: TnT-cry2, 2: Originalvektor, 3: ohne Kompetitor, 4: +0.1 pmol/ $\mu\text{l}$  Kompetitor ds spez., 5: +1 pmol/ $\mu\text{l}$  Kompetitor ds spez., 6: +0.1 pmol/ $\mu\text{l}$  Kompetitor ds unsp., 7: +1 pmol/ $\mu\text{l}$  Kompetitor ds unsp., 8: +0.1 pmol/ $\mu\text{l}$  Kompetitor ss spez., 9: +1 pmol/ $\mu\text{l}$  Kompetitor ss spez., 10: +0.1 pmol/ $\mu\text{l}$  Kompetitor ss unsp., 11: +1 pmol/ $\mu\text{l}$  Kompetitor ss unsp..

## 4.18 Expression von cry2 im heterologen System

Da bislang noch keine Kristallstruktur eines Cryptochroms mit dem charakteristischen C-Terminus bekannt ist, sollte versucht werden, durch heterologe Expression genügend Protein ausreichender Reinheit für eine Kristallisation oder spektroskopische Analysen zu erhalten.

### 4.18.1 Proteinexpression in *E.coli*

Aus vorangegangenen Experimenten der Expression von Cryptochrom 2 mit Poly-Histidin-Tag in *E. coli* war bekannt, dass nur geringe Mengen lösliches Protein gewonnen werden konnten. Dennoch wurden weitere Anzucht- und Reinigungsbedingungen getestet, um *E. coli*-exprimiertes cry2 zu gewinnen.

#### 4.18.1.1 Expression von cry2 als 6x His- Fusion

Das Konstrukt pQE17/CRY2 entstammt der Arbeit von Oliver Kleiner in der eigenen Arbeitsgruppe und wurde in dieser Arbeit unter verschiedenen Bedingungen auf Expression getestet. Bestmögliche Ergebnisse wurden dabei mit der Anzucht bei 30°C in LB-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.5, der Induktion mit 0.15 mM IPTG und folgender Expression für 4 h erhalten. Die Aufreinigung des nativen Proteins mittels Metallionen-Affinitätschromatographie erfolgte unter Standardbedingungen (siehe Kap. 3.9.3). Die Zugabe von 2% Triton X-100 zur besseren Solubilisierung oder die Verwendung einer Co<sup>2+</sup>- Affinitätsmatrix brachten eine verbesserte Ausbeute, jedoch auch stärkere Verunreinigungen (Abb. 4.27). Besonders dominant zeigte sich eine Verunreinigung bei ca. 60 kDa in allen Präparationen.

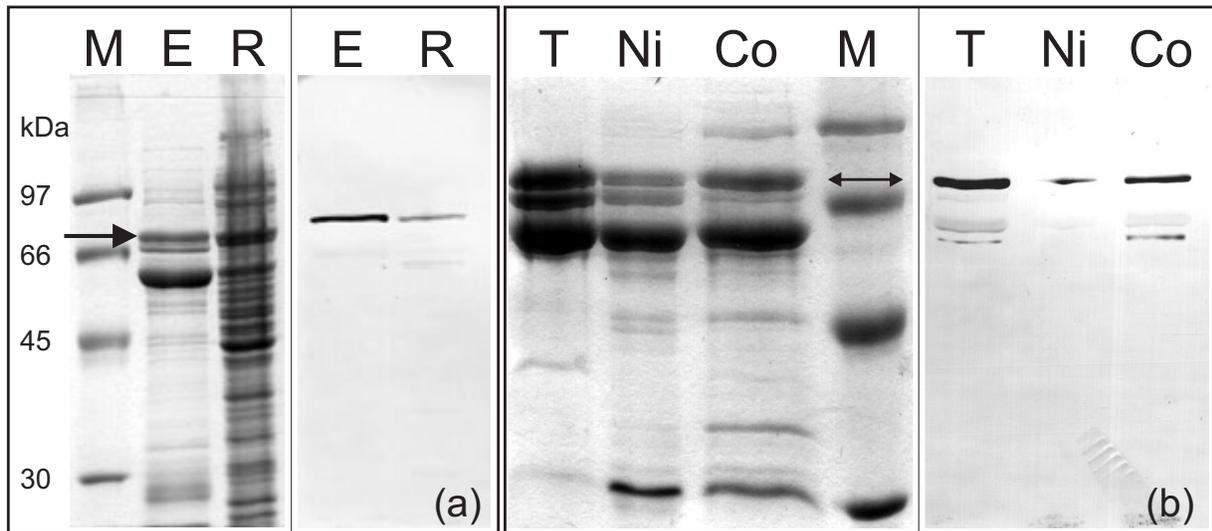


Abbildung 4.27: Expression und Aufreinigung von in *E. coli* exprimiertem cry2-6x HIS. a) Standardaufreinigung. b) Veränderte Aufreinigungsbedingungen. M: LMW-Marker, E: Eluat von der Nickel-Säule, R: Zellrohextrakt, T: Nickel-Eluat nach Solubilisierung mit 2% Triton, Ni: Nickel-Eluat, Co: Cobalt-Eluat. Die Pfeile markieren die cry2-Bande. Jeweils links: Coomassie-Färbung, jeweils rechts: Western-Blot mit  $\alpha$ cry2(501-612).

Vielversprechender waren zunächst die Ergebnisse bei Verwendung des *E. coli*- Stammes Origami<sup>TM</sup> (Novagen), dessen Thioredoxin- Reduktase (trxB) und Glutathion- Reduktase (gor) mutiert wurden, um die Bildung von Disulfidbrücken zu erleichtern. Die Aufreinigung unter wenig stringenten Bedingungen (kein Imidazol im Waschpuffer) führten zu gelben Eluaten, deren Absorptionsspektren denen von oxidiertem FAD ähnelten (Abb. 4.28). Da die Coomassie- Färbung keine deutlich angereicherte Bande von passender Größe zeigte, wurde unter stringenteren Bedingungen gereinigt, was zum Verschwinden der Gelbfärbung und zu Proteinmustern vergleichbar zu denen aus M15-Zellen führte.

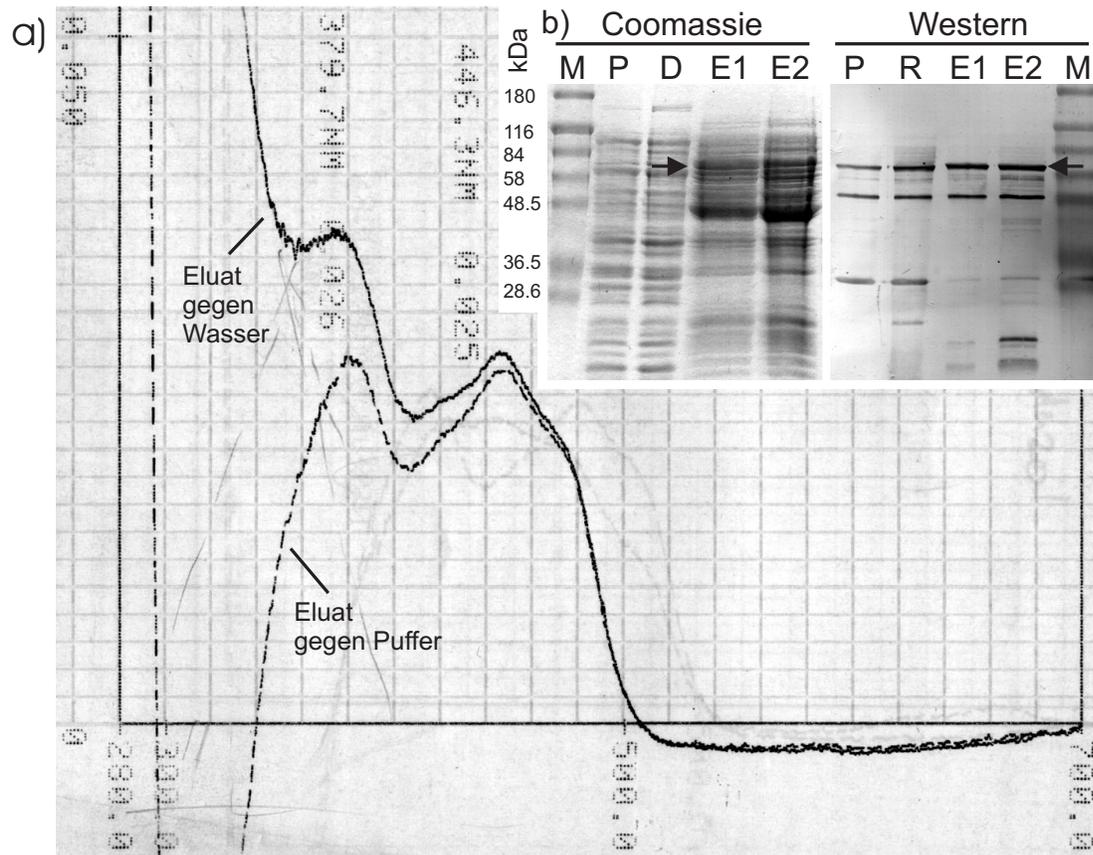


Abbildung 4.28: cry2-His Aufreinigung aus Origami-Zellen. a) UV/VIS-Spektren: Eluat gegen Wasser (durchgezogene Linie), Eluat gegen Elutionspuffer (gestrichelte Linie). b) SDS-PAGE und Western-Blot. M: Marker 7B, P: unlösliche Fraktion, R: lösliche Fraktion, D: ungebundene Fraktion, E: Eluate.

Zur weiteren Aufreinigung wurde das Nickel- Eluat aus Standardexpressionen über eine MonoQ- Anionenaustauschersäule aufgetrennt. Abb. 4.29 zeigt einen exemplarischen Lauf und die Auswertung über SDS- PAGE und Western- Blot. Gegenüber dem Eluat aus Abb. 4.27a) ist keine nennenswerte Anreicherung erfolgt. Zudem streute das cry2- Signal über mehrere Fraktionen, was zu Verlusten führte.

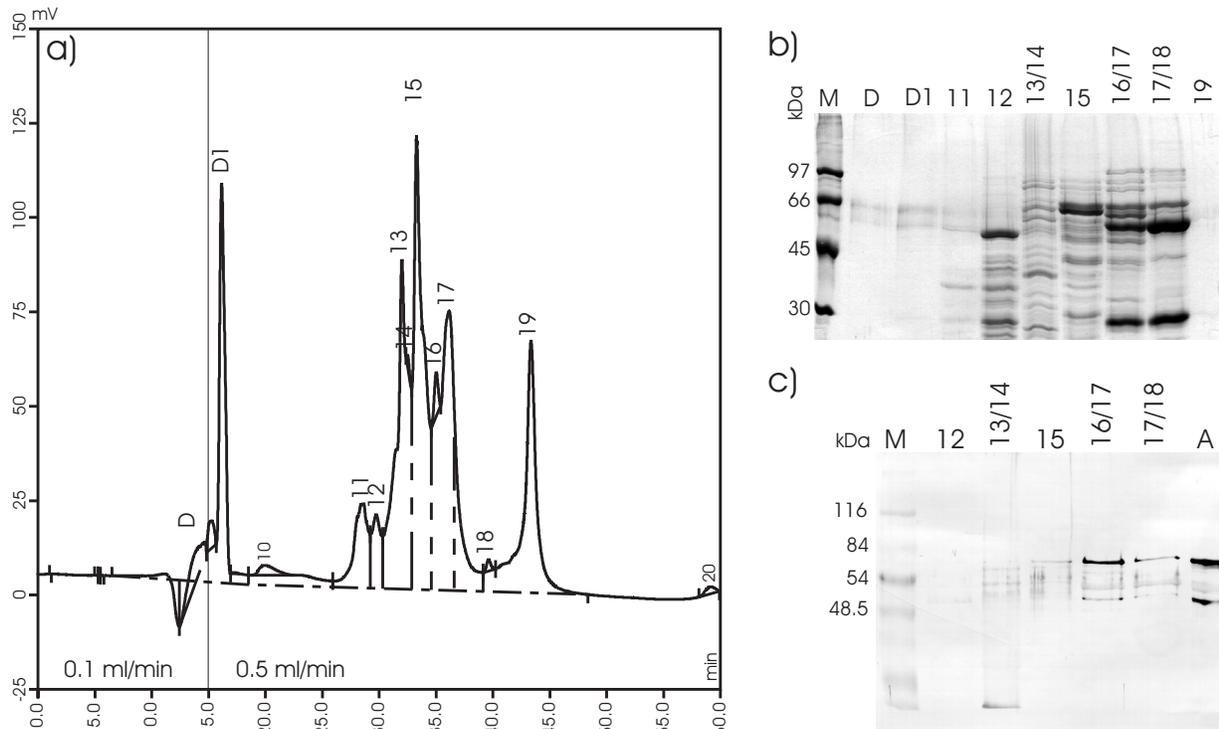


Abbildung 4.29: Ionenaustauschchromatographie von in *E. coli* exprimiertem cry2. a) Chromatogramm MonoQ HR 5/10 (Amersham), Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 5% Glycerin, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, Puffer B: wie A mit 1 M NaCl, Flussrate (Auftrag): 0.1 ml/min, 5% B, Flussrate (Elution): 0.5 ml/min, linearer Gradient auf 100% B in 30 min, aufgetragene Proteinmenge: ~1.8 mg; b) Coomassiefärbung, ca. 5 µg Protein je Spur; c) Western-Blot mit  $\alpha$ cry2(501-612). M: Marker, D: Durchlauf, A: Auftrag, die Ziffern entsprechen den jeweiligen Fraktionen.

Da die oben beschriebene kontaminierende Bande bei ~60 kDa weiterhin in den cry2-haltigen Fraktionen dominierte, wurde im Folgenden eine Gelfiltrationsmatrix verwendet, um die Kontamination zu entfernen. Die analytische Superdex G-200 Säule wurde dazu zunächst unter Versuchsbedingungen mit Markerproteinen geeicht, um Rückschlüsse auf das Molekulargewicht ziehen zu können. Anschließend wurden 140  $\mu\text{g}$  eines Nickel-Eluates auf die Säule gegeben, die einzelnen Peaks getrennt gesammelt und im Western-Blot auf die Anwesenheit von cry2 hin untersucht. Die Färbung der Membran mittels FastGreen zeigte nur in Peak 3 und 4 eine Bande mit passender Mobilität an. Der Western-Blot hingegen zeigte cry2 in Peak 1 und 2, die einem Molekulargewicht von >670 kDa entsprechen (Abb. 4.30). Es musste also davon ausgegangen werden, dass cry2 unter diesen Bedingungen in großen Aggregaten vorliegt.

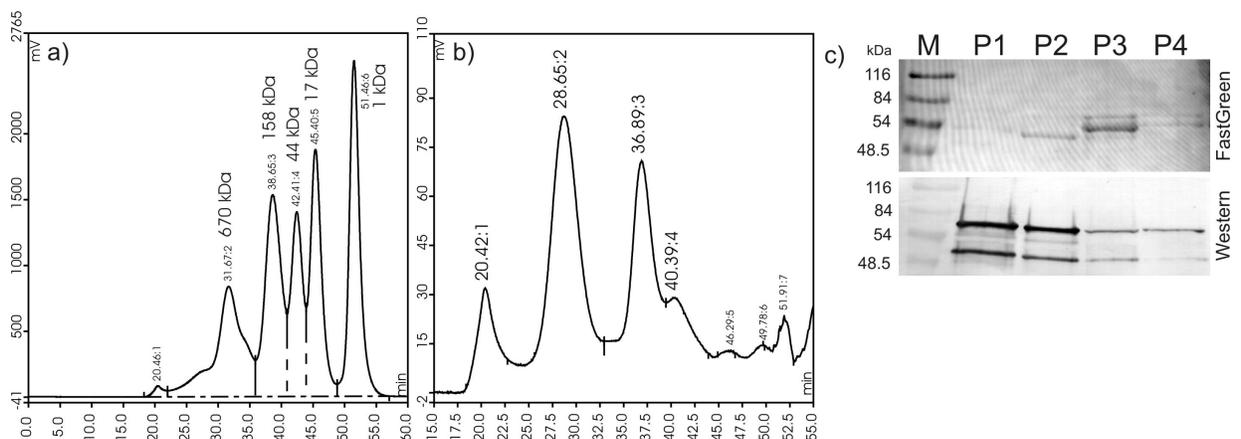


Abbildung 4.30: Auftrennung von in *E.coli* exprimiertem cry2 über Gelfiltration. Verwendete Säule: Superdex 200 HR 10/30 (Amersham), Puffer: 20 mM Na-Phosphat, pH 7, Flussrate: 0.4 ml/min, Gesamtproteinmenge: 140  $\mu\text{g}$ . a) Eichung mit Markerproteinen von Biorad, b) Chromatogramm der cry2 Auftrennung, c) Western-Analyse: M: Marker 7b, P1-4 entsprechen den ebenso bezifferten Peaks in b)

#### 4.18.1.2 Expression von cry2 als GST- Fusion

Alle bisher dargestellten Reinigungsversuche wurden unter nativen Bedingungen durchgeführt. Der überwiegende Teil des produzierten cry2 fand sich dabei in der unlöslichen Fraktion. Da jedoch Rückfaltungsversuche mit denaturierend aufgereinigtem cry2 bereits gescheitert waren (Daten von Oliver Kleiner), wurde dieser Ansatz hier nicht weiter verfolgt. Um die Ausbeute an löslichem cry2 zu verbessern, wurde die kodierende Sequenz von cry2(3-612) C-terminal mit GST fusioniert (GST-CRY2). Die Expression erfolgte in Origami-Zellen unter den schon beschriebenen Bedingungen (Kap. 3.8.2). Zwar war die Ausbeute an löslichem Protein nicht stärker als beim pQE17- Konstrukt, aber die Eluate waren deutlich weniger kontaminiert (Abb. 4.31).

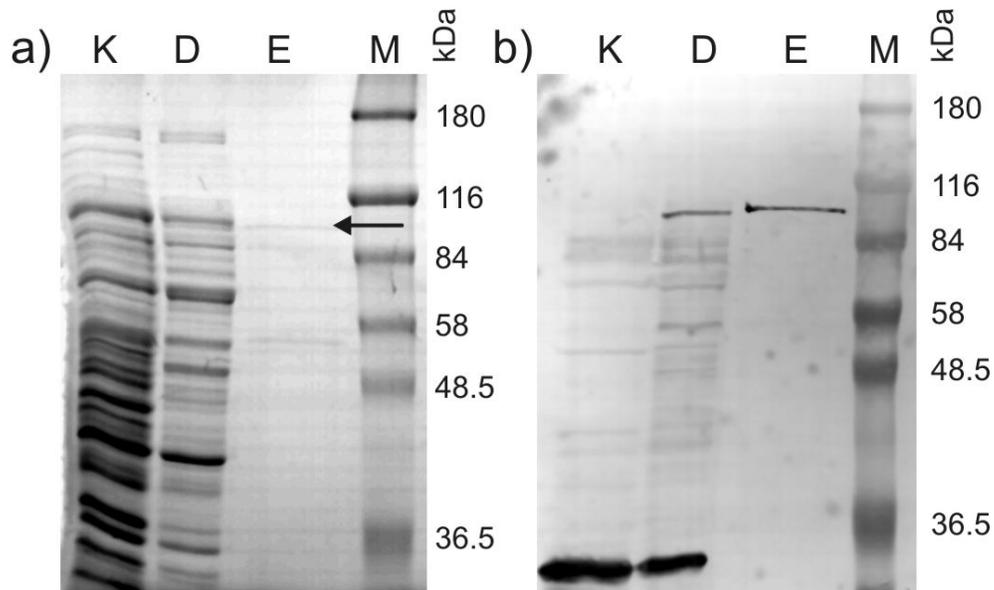


Abbildung 4.31: Aufreinigung von GST-cry2 über Glutathion-Sepharose (Amersham). a) Coomassie-Färbung, b) Western-Blot mit CRY2(501-612). K: Kontrollextrakt aus Origamizellen, D: Ungebundene Fraktion, E: Eluat, M: Marker 7B. Der Pfeil deutet auf die kaum erkennbare Bande von GST-cry2.

## 4.18.2 Expression von cry2 in *Pichia pastoris*

### 4.18.2.1 pPICZ $\alpha$ A-CRY2

Die Hefe *Pichia pastoris* ist bekannt als Expressionssystem mit großen Ausbeuten an löslichem Protein und den Vorteilen posttranslationaler Modifikationen eukaryontischer Zellen. Daher wurde dieses System als Alternative zur Expression in *E. coli* etabliert. Der Vektor pPICZ $\alpha$  bietet neben einer 6x His- Fusion die Möglichkeit zur Sekretion des rekombinanten Proteins ins Medium. Dazu wird das Protein in Frame mit dem Signalpeptid des  $\alpha$ -Faktors aus Hefe kloniert. Diese Fusion mit CRY2 führte, vermutlich aufgrund der fehlenden Gelegenheit zum Einbau des FAD- Kofaktors, ausschließlich zur Akkumulation von unlöslichem Protein in den Hefezellen (Daten nicht gezeigt).

### 4.18.2.2 pPIC3.5K-CRY2

Dieses Plasmid wurde zur Expression von cry2 verwendet, wobei das Protein nicht sekretiert wurde. Da sich aus den vorangegangenen Experimenten abzeichnete, dass His-Fusionen von cry2 nur sehr schlecht an die Nickel- Matrix binden und diese geladene Gruppe hinderlich für die nachfolgende Kristallisation sein kann, wurde ein Konstrukt ohne zusätzlichen 'tag' hergestellt, dessen exprimiertes Protein mittels klassischer Chromatographiemethoden aufgereinigt werden sollte. Nach Induktion mit 0.5% Methanol trat im Coomassie- gefärbten Gel eine Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht von  $\sim 70$  kDa auf. Auch im Western- Blot konnten zwei Banden detektiert werden, von denen die größere mit derjenigen im Coomassie- Gel übereinstimmt (Abb. 4.32).

Die Proteinextrakte zeigten eine intensiv- gelbe Färbung, die auf die Anwesenheit von Flavin zurückgeführt werden könnte. Die Extrakte wurden zur Anreicherung von cry2 einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterzogen. Dabei zeigte sich, dass cry2 bei einer Ammoniumsulfatsättigung von 40% quantitativ ausfiel. In den resuspendierten Pellets zeigte sich im Coomassie- gefärbten Gel auch die induzierte Bande, jedoch erst bei 60% Sättigung (Abb. 4.33). Daraus wurde geschlossen, dass es sich bei der induzierten Bande nicht um cry2, sondern vermutlich um das Flavoprotein Alkoholoxidase 1 (AOX1) handelt, welches in Mut<sup>+</sup>- Stämmen von *Pichia pastoris* ebenfalls durch Methanol induziert wird. In allen untersuchten Pellets konnte cry2 detektiert werden, was auf eine generelle Tendenz von cry2 zur Aggregation und Präzipitation unter den verwendeten Aufreinigungsbedingungen schließen läßt.

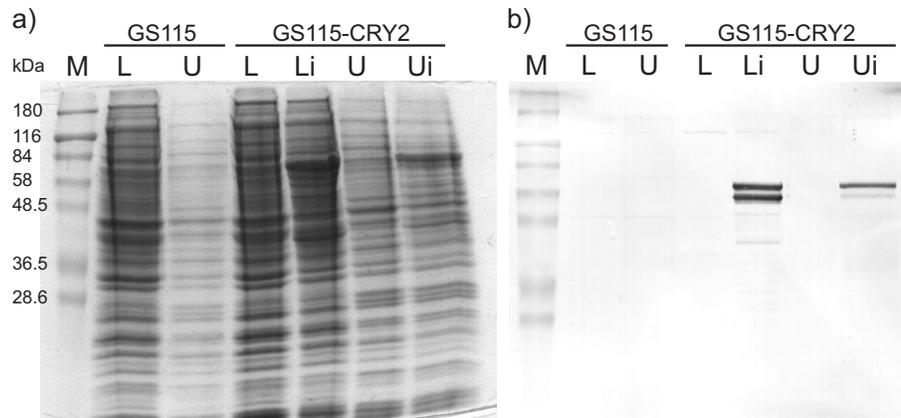


Abbildung 4.32: Expression von cry2 in *Pichia pastoris* GS115. Aufgetragen sind lösliche (L) und unlösliche (U) Proteinextrakte von transformierten (GS115-CRY2) und nicht-transformierten (GS115) Hefestämmen. Li bzw. Ui bezeichnet die entsprechenden Proteinfractionen nach Induktion mit 0.5% Methanol und 48 h Expression. a) Coomassie-Färbung, b) Western-Blot mit  $\alpha$ CRY2.

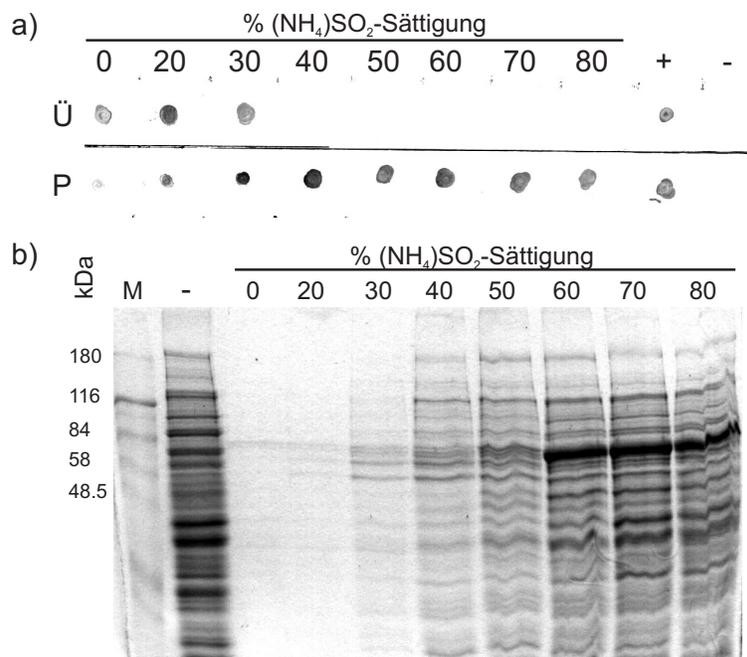


Abbildung 4.33: Ammoniumsulfatfällung von *Pichia* Extrakten. a) Dot-Blot mit  $\alpha$ CRY2(501-612), Ü: Überstände, P: Ammoniumsulfatpellets, +: induzierter Rohextrakt, -: nicht-induzierter Rohextrakt. b) Coomassie-Färbung von Ammoniumsulfatpellets.

Die gleichen Beobachtungen konnten bei dem Versuch einer Reinigung mittels Anionenaustauschchromatographie über Q-Sepharose (Amersham) gemacht werden. In allen untersuchten Fraktionen fand sich cry2 wieder. Zudem konnte auch durch Silberfärbung keine Bande mit dem Signal im Western-Blot korreliert werden (siehe Abb.4.34). Da keines der verwendeten Säulenmaterialien ausreichende Trenneigenschaften aufwies, die Ausbeute geringer als zunächst vermutet war und das Protein unter den verwendeten Bedingungen nicht stabil gehalten werden konnte, wurde die weitere Arbeit mit diesem System nicht fortgeführt.

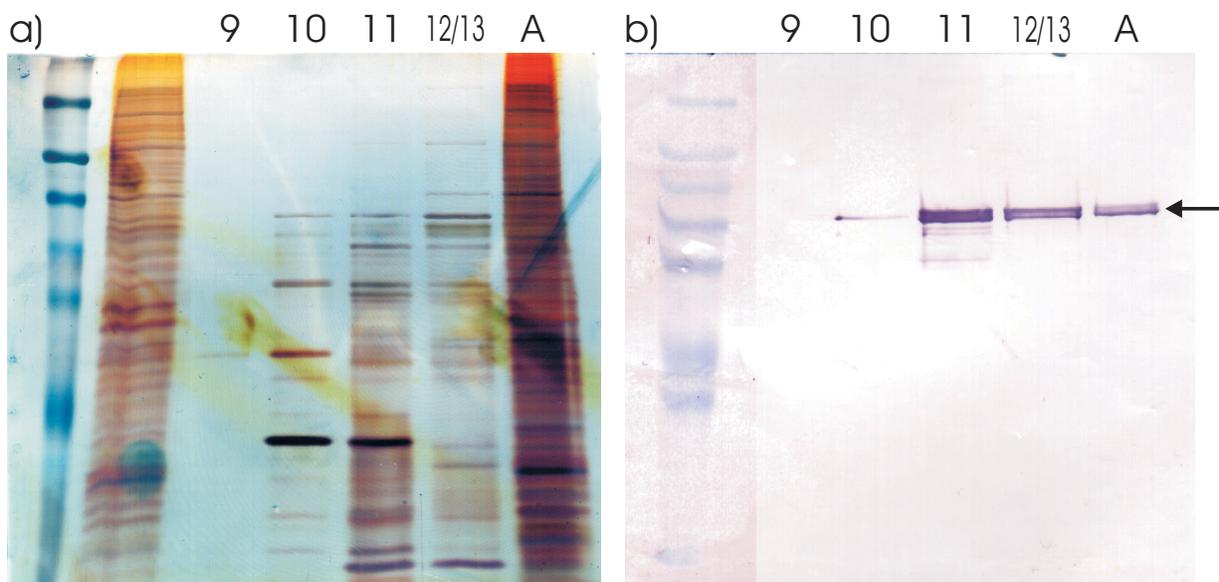


Abbildung 4.34: FPLC-Reinigung von cry2 aus *Pichia pastoris* über Q-Sepharose. a) Silberfärbung einzelner Fraktionen, b) Western-Blot der gleichen Fraktionen. A: Rohextrakt.

# Diskussion

## 5.19 Subzelluläre Lokalisation von *Arabidopsis*- Cryptochrom 2

Cry2 wird als konstitutiv- kernlokalisiertes Protein angesehen. Dies konnte in zwei Publikationen (Guo *et al.*, 1999; Kleiner *et al.*, 1999) eindeutig gezeigt werden. Es gibt jedoch Cryptochrom 2 vermittelte Effekte, die auf einen cytoplasmatischen Pool an cry2 hindeuten. So zeigten (Folta und Spalding, 2001) eine Beteiligung von cry2 an einer schnellen Membrandepolarisation innerhalb von 60 Sekunden nach Blaulichtbestrahlung. Die Kinetik dieses Prozesses macht eine Signalweiterleitung aus dem Kern heraus unwahrscheinlich. Auch die Beteiligung von cry1 an der Membrandepolarisation gibt in diesem Zusammenhang Rätsel auf, da zwar ein lichtabhängiger Export von des C-Terminus von CRY1 fusioniert mit GUS aus dem Kern heraus gezeigt werden konnte (Yang *et al.*, 2000), ein cytoplasmatischer Pool jedoch nicht beobachtet wurde. Die Beobachtung einer lichtabhängigen Translokation des GFP-Signals in mit cry2-GFP und At5g26280-YFP, dem im *yeast- two- hybrid- screen* identifizierten Interaktionspartner von cry2, co- transformierten Petersilieprotoplasten (4.6) könnte ein Hinweis auf einen cytoplasmatischen Pool von cry2 sein. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass dieses Experiment nur selten reproduziert werden konnte. Grund dafür war die hohe Geschwindigkeit des Prozesses und niedrige Transformationsraten. Ob die Co- Expression von At5g26280-YFP ursächlich für den Verbleib von cry2 im Cytoplasma ist, konnte aus den gleichen Gründen nicht gezeigt werden. Gestützt wird die These eines cytoplasmatischen cry2- Pools durch die Immunlokalisation von cry2 in *Arabidopsis*- Keimlingen, die mit cry2-GFP unter der Kontrolle eines 35S- Promotors transformiert wurden (Tim Kunkel, unveröffentlichte Daten). Mittels eines Anti-GFP-Antikörpers konnte cry2-GFP in Schnitten aus etiolierten Kotyledonen außerhalb des Kerns in der Zellperipherie de-

tektiert werden. Eine weitere, lichtabhängige Veränderung in der Lokalisation von cry2 stellt die Bildung von subnukleären 'speckles' dar, wie schon von Mas *et al.*, (2000) gezeigt. Dieser Befund konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Vorläufige Ergebnisse mit FRAP (*fluorescence- recovery after photobleaching*, Daten nicht gezeigt) zeigten eine hohe Mobilität von homogen verteiltem cry2-GFP (kaum bleichbar) und eine Immobilisierung in den 'speckles' (schnelles Bleichen). Der C-Terminus von cry2 alleine ist nicht in der Lage, 'speckles' zu bilden, ebenso die Fusion von GFP mit N- Terminus von Vollängen- cry2 (GFP-cry2, Daten nicht gezeigt). Da diese 'speckle'-Bildung auch bei Phytochromen und COP1 (Wang *et al.*, 2001) vorkommt und cry2 mit phyB in den gleichen 'speckles' co- lokalisiert (Mas *et al.*, 2000), kann davon ausgegangen werden, dass deren Bildung eng mit der lichtabhängigen Funktion von cry2 verknüpft ist und dieser Prozess durch den N-Terminus vermittelt wird. Interessant wäre in diesem Zusammenhang zu wissen, ob die im Nachfolgenden dargestellte Phosphorylierung Voraussetzung für die 'speckle'- Bildung ist, über deren Bedeutung und Funktion bis heute nicht viel bekannt ist. In tierischen Zellen befinden sich Spliceosomen in den 'nuclear-speckles', jedoch auch Transkriptions- und Translationsfaktoren, sowie Proteine für den RNA- Export (Lamond und Earnshaw, 1998; Mintz und Spector, 2000).

## 5.20 Abbau und Phosphorylierung von cry2

Die hier durchgeführten Western- Analysen haben gezeigt, dass mit dem Abbau von cry2 eine posttranslationale Modifikation einher- bzw. vorausgeht, die zu einer reduzierten Mobilität in der SDS- PAGE führt. Diese Modifikation konnte als Phosphorylierung identifiziert werden. Zu dem gleichen Ergebnis kamen auch Shalitin *et al.*, (2002). Offen blieb jedoch, ob diese Phosphorylierung durch cry2 oder einen weiteren Photorezeptor gesteuert wird. Durch die Untersuchung von Phytochrommutanten (Shalitin *et al.*, 2002) und Kontrollen im Rotlicht konnte Phytochrom als Photorezeptor ausgeschlossen werden. Das hier gezeigte Aktionsspektrum der Phosphorylierung (4.10) lässt auf einen Flavin- haltigen Photorezeptor schließen, der an der Phosphorylierung von cry2 beteiligt ist. Ein Hinweis auf einen zweiten, lichtsammelnden Chromophor, wie er für die Cryptochrome postuliert werden muss, fehlt. Die Feinstruktur dieses Aktionsspektrums ähnelt dem Aktionsspektrum des Phototropismus und lässt somit eine Beteiligung von Phototropin als möglich erscheinen. Zudem ist in zellfreien Extrakten keine lichtab-

hängige Mobilitätsänderung mehr zu beobachten, was dagegen spricht, dass die hier beobachtete Phosphorylierung von cry2 ausschließlich durch eine Autophosphorylierung verursacht ist, wie sie für rekombinantes cry1 beschrieben wurde (Bouly *et al.*, 2003). Dennoch konnte Armin Djamei, (2003) cry2 aus *Arabidopsis*-Extrakten mittels immobilisiertem ATP anreichern, was für eine ATP-Bindung durch cry2 spricht. Da *in vitro*-phosphoryliertes cry1 keine Mobilitätsänderung im Gel zeigt, diese jedoch bei den hier gezeigten *in vivo*-Versuchen auch für cry1 zu beobachten war, kann man zwei unabhängige Phosphorylierungsereignisse postulieren. Zum Einen eine lichtabhängige Autophosphorylierung, zum Anderen eine weitergehende, die Mobilitätsveränderung verursachende Phosphorylierung, die entweder durch lichtunabhängige Kinasen aufgrund einer Konformationsänderung des aktivierten cry2, oder durch eine Blaulicht-aktivierte Kinase wie z.B. Phototropin hervorgerufen wird. Ob Phototropin tatsächlich die Kinase für die Mobilitäts-verändernde Phosphorylierung von cry2 darstellt, sollte durch die Untersuchung der *phot1/phot2*-Doppelmutante geklärt werden. Leider konnte bei der Verwendung von Keimlingen anstelle einer Zellkultur, die für *phot1/phot2* nicht verfügbar war, auch im Wildtyp keine blaulichtabhängige Veränderung der Mobilität festgestellt werden (siehe Kap. 4.14.4, Abb. 4.13). Ein direkter Zusammenhang zwischen Phosphorylierung und Abbau von cry2 konnte bisher nicht bewiesen werden, da der hier verwendete Kinaseinhibitor Staurosporin die Phosphorylierung nicht unterdrücken konnte. Auch durch die Untersuchung des stabileren cry2-Allels aus dem Ökotyp CAP VERDE ISLANDS (*cvi*) konnte keine Korrelation von Abbau und Phosphorylierung hergeleitet werden, da die von El-Din El-Assal *et al.*, (2001) beschriebene erhöhte Stabilität in den eigenen Versuchen nicht nachvollziehbar war (siehe Kap. 4.14.4). Aus den gleichen Gründen scheiterte der Ansatz, die von denselben Autoren gezeigte größere Stabilität von cry2 unter Langtagbedingungen zu nutzen, um eine Korrelation zwischen beiden Phänomenen herzustellen. Vielmehr kann aus den vorliegenden Daten geschlossen werden, dass die im Langtag verringerte Akkumulation von cry2 durch die kürzere Nachtphase zu geringeren Differenzen im Proteinlevel zwischen Tag und Nacht führt. Die Stabilität von cry2 ist durch die Photoperiode jedoch nicht beeinflusst. Mockler *et al.*, (2003) haben dies im Detail näher untersucht.

Die Verwendung von Proteasominhibitoren sollte zur Klärung des Abbauweges von cry2 beitragen, da proteasomaler Abbau durch seine stringente Regulation über die Ubiquitinierung der Zielproteine als wahrscheinlichster Abbauweg angenommen werden musste. Diese These wurde zudem gestützt durch die Entdeckung eines mit cry2 interagie-

renden F-Box- Proteins (Kap. 4.15.1). Sowohl MG132, als auch clasto- Lactacystin-  $\beta$ -lacton zeigten jedoch keine Wirksamkeit lichtabhängigen Abbau von cry2. Da über die Akkumulation ubiquitiniertes Proteine aber die generelle Wirksamkeit der Inhibitoren als wahrscheinlich angenommen werden muss, ist ein proteasomaler Abbau von cry2 sehr fraglich. In einem kürzlich erschienenen Review- Artikel wurden jedoch unpublizierte Daten erwähnt, die die Wirksamkeit eines nicht genannten Proteasominhibitors auf den Abbau von cry2 beschreiben (Lin und Shalitin, 2003). Die hier gezeigten Daten lassen einen Einfluss von Proteasominhibitoren auf den lichtunabhängigen Turnover von cry2 zu, da die cry2-Konzentration in den dunkel-gehaltenen Proben mit Inhibitorbehandlung meist größer war als in den unbehandelten Kontrollen. Der Abbau nach Blaulichtbestrahlung erfolgte aber bei beiden Proben gleich (siehe: Abb. 4.13). Notwendig sind zukünftige *pulse- chase* Experimente zur Bestimmung der Lebensdauer von cry2 im Dunkeln und im Licht.

## 5.21 DNA-Bindung durch cry2

Mittels *gel-mobility-shift-assay* konnte gezeigt werden, dass TnT- exprimiertes cry2 an einzel- und doppelsträngige DNA binden kann. Cry2 wurde dabei in Anwesenheit von FAD synthetisiert. Ob dieser Cofaktor jedoch auch eingebaut wurde, ist nicht bekannt, da die geringe Menge an Protein keine spektroskopischen Analysen zulassen. Da von Photolyasen bekannt ist, dass FAD zur spezifischen Bindung des Schadens (Payne *et al.*, 1990), jedoch nicht zur Bindung ungeschädigter DNA erforderlich ist (Malhotra *et al.*, 1992), erscheint dies auch nur von geringer Bedeutung, zumal das hier durchgeführte Experiment den Einfluss von Licht auf die DNA- Bindung nicht adressiert hat. In weiteren Experimenten mit cry2- Holoprotein, das bisher nicht in ausreichender Reinheit zur Verfügung stand, muss daher noch geklärt werden, ob es eine Licht- bzw. Substratspezifität in der DNA- Bindung gibt.

## 5.22 Interaktionspartner von cry2

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, sind bisher nur wenige Komponenten der Signaltransduktion der Cryptochrome bekannt. Unter diesen sind bislang keine, die als regulatorische Faktoren für den Abbau und die Lokalisation von cry2 gelten könnten. Aus einem *yeast- two- hybrid- screen* von Oliver Kleiner nach Interaktionspartnern von cry2 sind zwei bislang funktionell nicht charakterisierte Proteine hervorgegangen, die in dieser Arbeit näher untersucht wurden.

### 5.22.1 Interaktion von cry2 mit At2g02230

Klon #45 ist in der MIPS-Datenbank als At2g02230 annotiert und besitzt eine F-Box. Hier konnte gezeigt werden, dass At2g02230 mit den Skp1-Homologen aus *Arabidopsis* - ASK1 und ASK2 - interagiert. Aus diesem Grund kann At2g02230 als Bestandteil eines SCF-Komplexes klassifiziert werden. In Petersilieprotoplasten konnte mit einer At2g02230-GFP- Fusion gezeigt werden, dass das Protein homogen in Cytoplasma und Zellkern verteilt vorliegt. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass die von Oliver Kleiner beschriebene, erhöhte  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität, die bei Expression von cry2 und At2g02230 in Hefezellen im Licht zu beobachten ist, auf eine Blaulicht-abhängige Transaktivierung des Reporters durch BD-cry2 zurückzuführen war und nicht auf spezifischer Interaktion der beiden Proteine beruht. Auch mittels BRET konnte keine Interaktion von cry2 mit At2g02230 gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Diese Daten haben zusammen mit der Unwirksamkeit von Proteasominhibitoren dazu geführt, dass ein proteasomaler Abbau von cry2 als unwahrscheinlich gelten kann.

### 5.22.2 Interaktion von cry2 mit At5g26280

At5g26280 (Klon #27) ist bereits näher in der Arbeit von Oliver Kleiner, (2001) charakterisiert worden. Physiologische Daten von At5g26280- überexprimierenden Pflanzen deuten an, dass dieses Protein ein negativer Regulator in der Signaltransduktion von cry2 ist. In dieser Arbeit wurde die Lokalisation des Volllängenproteins und einer am N-Terminus um 19 Aminosäuren deletierten Version untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus zu einer membranassoziierten Lokalisation außerhalb des

Zellkerns führt. Dies könnte auf einen Membrananker hindeuten (Abb. 5.35), schließt aber auch eine mögliche Sekretion des Proteins nicht aus (Abb. 5.36), obwohl dies in den eigenen Versuchen nicht beobachtet wurde. Allerdings könnte die Fusion mit YFP in diesem Fall auch störend für die korrekte Lokalisation sein. Für eine Sekretion spricht die Homologie zu Proteinen mit MATH- Domänen, die in Säugern sekretiert werden. Diese Homologie zu sekretierten Metalloproteasen könnte im Zusammenhang mit dem bislang unbekanntem Abbauweg von cry2 interessant sein.

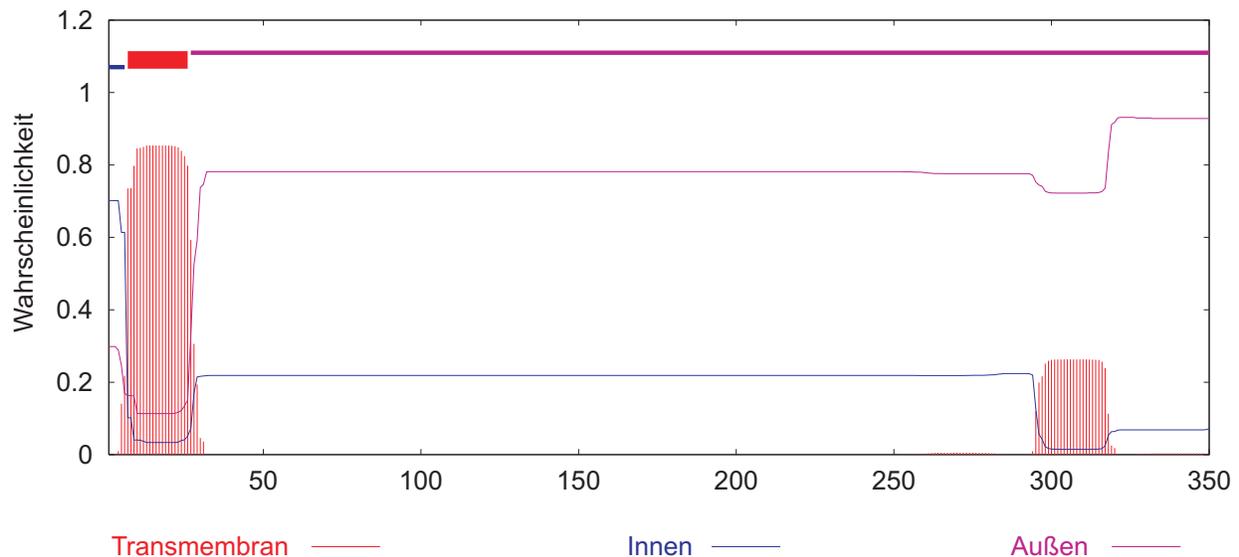


Abbildung 5.35: Ausgabe des TMHMM- Programms (Krogh *et al.*, 2001) zur Vorhersage von Transmembran- Domänen bei  $\Delta 19$ At5g26280. Für das Vollängenprotein At5g26280 wird eine Transmembranspanne für die Aminosäuren 25-47 vorhergesagt.

Name	Länge	cTP	mTP	SP	andere	Loc.	RC
$\Delta 19$ At5g26280	350 AS	0.017	0.016	0.963	0.053	S	1
At5g26280	369 AS	0.131	0.253	0.118	0.298	-	5

Abbildung 5.36: Ausgabe des TARGETP- Programms zur Vorhersage der subzellulären Lokalisation von Proteinen (Emanuelsson *et al.*, 2000). Für  $\Delta 19$ At5g26280 wird mit großer Wahrscheinlichkeit eine Sekretion vorhergesagt (SP), während das Vollängenprotein nur unklare Werte liefert.

Letztlich muss noch über 5'- RACE- PCR oder N-terminale Sequenzierung von At5g26280 der tatsächliche N-Terminus aufgeklärt werden, um Aufschluß über die tat-

sächliche Lokalisation des Proteins und weitere Hinweise auf seine Funktion zu erhalten. Da eine Interaktion von At5g02680 mit cry2 bisher nur in Hefe gezeigt wurde, sollte die Interaktion in dieser Arbeit mittels Co- Immunopräzipitation und BRET- Assay in *Arabidopsis* bestätigt werden. Der BRET- Assay brachte keine Daten die auf eine Interaktion schließen lassen. Alle Messwerte lagen im Bereich für nicht-interagierende Proteine. Aufgrund der hohen sterischen Anforderungen an die Fusionsproteine (die Reporterproteine müssen eng genug beieinanderliegen, um die Energie übertragen zu können), bedeuten negative Ergebnisse jedoch nicht zwangsläufig eine Abwesenheit von Interaktion. Ebenso vorstellbar ist eine Anregung des Cryptochroms durch die Emission von Blaulicht durch die Luziferase. Die möglichen Folgen wären zum Einen die Auflösung der Interaktion, zum Anderen ein *quenchen* der Blau- Emission ohne Fluoreszenzabgabe, was damit zu verfälschten Messwerten führen würde. Durch Co- Immunopräzipitation konnte in einem Fall eine Interaktion von cry2 mit YFP-At5g26280 gezeigt werden. Stetiges Hindernis in diesen Experimenten war jedoch die zu geringe Expression der At5g26280- Fusionen in *Arabidopsis*- Zellen, die sich auch schon in den BRET-Assays gezeigt hat. Da die gleichen Konstrukte in Petersilie jedoch gut exprimierbar waren, könnte eine mögliche Sekretion des Proteins ebenfalls als Ursache für eine scheinbar geringe Expression in Betracht gezogen werden, die mikroskopischen Daten lieferten dafür jedoch keine Anhaltspunkte. Desweiteren haben Kreuzreaktionen der Anti-GFP-Antikörper die Identifikation der Banden erschwert. Aus diesem Grund konnte das hier gezeigte Ergebnis bisher nicht reproduziert werden. Es bleibt also weiterhin offen, ob und wie cry2 mit At5g26280 in *Arabidopsis* interagiert. Die eindeutige Lichtabhängigkeit und Stärke der Interaktion in Hefe (die Interaktion wird durch blaues Licht aufgehoben) lässt die Interaktion in Hefe spezifisch erscheinen.

## 5.23 Cry2-Effekte in Hefe

Die nähere Untersuchung der lichtabhängigen Transaktivierung durch die Fusion von cry2 mit der DNA- Bindedomäne von Gal4 hat gezeigt, dass Licht einer Wellenlänge von 431 nm besonders effektiv ist. Da jedoch dieses Aktionsspektrum nicht gut mit denen der bis heute charakterisierten Blaulichtphotorezeptoren übereinstimmt, kann über die Ursache für diesen Unterschied nur spekuliert werden. Da bei dem verwendeten Versuchsaufbau mit Dauerbestrahlung gearbeitet wurde, kann von einer Art Hochinten-

sitätsreaktion, vergleichbar mit der HIR bei phyA gesprochen werden. Die Schärfe des Peaks könnte auf die Einstellung eines Gleichgewichts zweier Formen von cry2 zurückzuführen sein. So führt bei Phytochrom A die Dauerbestrahlung mit dunkelrotem Licht zu einem Effekt, da nur so eine ausreichende Menge an  $P_{fr}$  über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten werden kann. Einen ähnlichen Mechanismus könnte man auch für cry2 postulieren, zumal cry2, ähnlich wie phyA, im aktiven Zustand abgebaut wird. Dies würde jedoch photochrome Eigenschaften und eine sehr effiziente Inaktivierung von cry2 auch in Hefe voraussetzen. Zur Zeit existieren jedoch keine ausreichenden Daten, die auf einen lichtabhängigen Abbauprozess von cry2 in Hefe schließen lassen. Andererseits muss die Inaktivierung von cry2 nicht notwendigerweise über den Abbau des Proteins reguliert sein.

Auch für den Mechanismus der durch cry2 verursachten Transaktivierung in Hefe kann bislang nur spekuliert werden. Eine Möglichkeit wäre, dass das über die fusionierte DNA- Bindedomäne zur UAS- Kasette des Reporters im Hefestamm Y190 dirigierte cry2 dort nach Lichtabsorption über die Exponierung seines C-Terminus die Transkription aktivieren kann. Da dieser Effekt in Hefe zwar signifikant, aber im Vergleich zu den Aktivitäten bei Protein- Protein- Interaktion sehr gering ist, muss eine Relevanz der lichtabhängigen Transaktivierung durch cry2 für das pflanzliche System noch gezeigt werden. Die mangelnde Überlebensfähigkeit der AD-cry2 exprimierenden Hefen im Blaulicht kann durch die oben beschriebenen Befunde nicht erklärt werden. Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist *in vitro*-transkribiertes und -translatiertes cry2 in der Lage, an DNA zu binden. Der C-Terminus von cry2 (512-612) bindet an Metaphasechromosomen (Cutler et al., 2000). Von den Photolyasen ist bekannt, dass sie unspezifisch DNA binden und bis zur Erkennung eines Schadens daran entlang gleiten (van Noort *et al.*, 1999). Vorausgesetzt, dass die DNA- Bindung im Falle der Cryptochrome lichtabhängig geschieht worauf die lichtabhängige 'speckle'- Bildung hindeutet könnte es zu einer genomweiten Transkriptionsaktivierung durch die fusionierte Aktivierungsdomäne kommen, was schließlich zum Tod der Hefen führt. Diese These soll zukünftig durch DNA-Microarray- Analysen genauer untersucht werden. Zusammengenommen würden beide beobachteten Effekte darauf hindeuten, dass cry2 als Blaulichtabhängigen Transkriptionsaktivator fungiert. Ein Beweis dieser Eigenschaften steht jedoch noch aus. Zudem muss noch untersucht werden, ob die beschriebene Phosphorylierung von cry2 mit diesen Prozessen in Zusammenhang steht.

## 5.24 Expression von cry2

Das Ziel, genügend cry2 für spektroskopische Analysen oder gar Kristallisation zu reinigen, wurde nicht erreicht. Verschiedenste Bedingungen und unterschiedliche Expressionssysteme wurde in dieser Arbeit getestet. In *E.coli* konnte nicht genügend lösliches Protein erzeugt werden, dessen Affinität als 6x His- tag- Protein zur Nickel-Matrix zudem äußerst gering war. Die geringe Stabilität des Proteins ermöglichte auch keine weitere Aufreinigung, da die Verluste zu groß waren. Auch in *Pichia pastoris* konnten nur geringe Mengen des löslichen Proteins erzeugt werden, die für weitere Aufreinigungsverfahren unzugänglich waren. Strukturmodelle von cry2 haben eine verhältnismäßig hydrophobe Oberfläche der PHR- Domäne aufgewiesen, was eine verstärkte Aggregation des Proteins erklären würde (Lin und Shalitin, 2003). Erste Versuche mit dem Baculovirus-System für Insektenzellen (Daten nicht gezeigt) haben jedoch gezeigt, dass hier eine Möglichkeit zur Aufreinigung größerer Mengen besteht. Geringere Mengen könnten als GST-cry2 Fusion in *E.coli* gewonnen werden. Die Experimente zur Interaktion von cry2 und At5g26280 haben zudem gezeigt, dass cry2-GFP Fusionen in transient transformierten *Arabidopsis*- Zellen sehr stark exprimieren, so dass das Fusionsprotein sogar mit der wenig sensitiven Ponceau-Färbung auf Membranen detektiert werden konnte. Somit gäbe die Expression der cry2-GFP- Fusion in pflanzlichen Zellen die Möglichkeit zur Gewinnung von Material für eine nähere Untersuchung der Phosphorylierung mittels Massenspektroskopie.

# Zusammenfassung

Obwohl über die physiologische Bedeutung der pflanzlichen Cryptochrome bereits viel bekannt ist, und deren nahe Verwandte, die Photolyasen auch molekular sehr detailliert, einschließlich der Struktur auf atomarer Ebene, charakterisiert sind, sind die Mechanismen der Signalweiterleitung bei den Cryptochromen bis heute nur wenig erforscht. Dem Ziel folgend, diese molekularen Prozesse aufzuklären, wurde in dieser Arbeit *Arabidopsis*- Cryptochrom 2 untersucht. Es wurde dabei die lichtabhängige Phosphorylierung von cry2 entdeckt und näher untersucht. Das Aktionspektrum dieser Phosphorylierung ähnelt dabei stark einem Flavinspektrum. Versuche, die für diesen Prozess verantwortliche Kinase zu identifizieren, konnten nicht abgeschlossen werden. Eine Autophosphorylierungsaktivität wurde in Kooperation mit Margaret Ahmad (Paris) für cry1 gefunden, ist für cry2 bislang aber nicht gezeigt.

In Hefe heterolog exprimiertes cry2 zeigt lichtabhängige Effekte, die auf mögliche Eigenschaften von cry2 als Transkriptionsaktivator schließen lassen. Zudem konnte eine DNA- Bindung für *in vitro*- transkribiertes und -translatiertes cry2 gezeigt werden. Untersuchungen zum Abbauweg von cry2 konnten unsere These eines proteasomalen Abbau von cry2 nicht bestätigen. Die subzelluläre Lokalisation zweier putativer Interaktionspartner von cry2 - At5g26280 und At2g02230 - wurde über konfokale Laserscan-Mikroskopie untersucht. At2g2230 konnte zudem als funktionelles F-Box Protein identifiziert werden.

# Literaturverzeichnis

**Ahmad, M. und Cashmore, A. R.** (1993). "HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor." NATURE **366**(6451): 162-6.

**Ahmad, M., Lin, C. T. und Cashmore, A. R.** (1995). "Mutations Throughout an *Arabidopsis* Blue-Light Photoreceptor Impair Blue-Light-Responsive Anthocyanin Accumulation and Inhibition of Hypocotyl Elongation." PLANT JOURNAL **8**(5): 653-658.

**Ahmad, M., Jarillo, J. A. und Cashmore, A. R.** (1998a). "Chimeric proteins between cry1 and cry2 *Arabidopsis* blue light photoreceptors indicate overlapping functions and varying protein stability." PLANT CELL **10**(2): 197-207.

**Ahmad, M., Jarillo, J. A., Smirnova, O. und Cashmore, A. R.** (1998b). "The CRY1 blue light photoreceptor of *Arabidopsis* interacts with phytochrome A in vitro." MOL CELL **1**(7): 939-48.

**Ahmad, M., Jarillo, J. A., Smirnova, O. und Cashmore, A. R.** (1998c). "Cryptochrome blue-light photoreceptors of *Arabidopsis* implicated in phototropism." NATURE **392**(6677): 720-723.

**Ahmad, M., Grancher, N., Heil, M., Black, R. C., Giovani, B., Galland, P. und Lardemer, D.** (2002). "Action Spectrum for Cryptochrome-Dependent Hypocotyl Growth Inhibition in *Arabidopsis*." PLANT PHYSIOL **129**(2): 774-785.

**Aubert, C., Mathis, P., Eker, A. P. und Brettel, K.** (1999). "Intraprotein electron transfer between tyrosine and tryptophan in DNA photolyase from *Anacystis nidulans*." PROC NATL ACAD SCI U S A **96**(10): 5423-7.

**Aubert, C., Vos, M. H., Mathis, P., Eker, A. P. und Brettel, K.** (2000). "Intraprotein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase." NATURE **405**(6786): 586-90.

**Batschauer, A.** (1993). "A plant gene for photolyase: an enzyme catalyzing the repair of UV-light-induced DNA damage." PLANT J **4**(4): 705-9.

- Baum, G., Long, J. C., Jenkins, G. I. und Trewavas, A. J.** (1999). "Stimulation of the blue light phototropic receptor NPH1 causes a transient increase in cytosolic  $Ca^{2+}$ ." *PROC NATL ACAD SCI U S A* **96**(23): 13554-9.
- Bouly, J. P., Giovani, B., Djamei, A., Mueller, M., Zeugner, A., Dudkin, E. A., Batschauer, A. und Ahmad, M.** (2003). "Novel ATP-binding and autophosphorylation activity associated with *Arabidopsis* and human cryptochrome-1." *EUR J BIOCHEM* **270**(14): 2921-8.
- Bowler, C., Neuhaus, G., Yamagata, H. und Chua, N. H.** (1994). "Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction." *CELL* **77**(1): 73-81.
- Brudler, R., Hitomi, K., Daiyasu, H., Toh, H., Kucho, K., Ishiura, M., Kanehisa, M., Roberts, V. A., Todo, T., Tainer, J. A. und Getzoff, E. D.** (2003). "Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution." *MOL CELL* **11**(1): 59-67.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W. und Jones, R. L.** (2000). "Biochemistry & molecular biology of plants." Rockville, Md., American Society of Plant Physiologists.
- Butler, W. L., Norris, K. H., Siegelman, H. W. und Hendricks, S. B.** (1959). "Detection, Assay, and Preliminary Purification of the Pigment Controlling Photoresponsive Development of Plants." *PROC NATL ACAD SCI USA* **45**(12): 1703-1708.
- Byrdin, M., Eker, A. P., Vos, M. H. und Brettel, K.** (2003). "Dissection of the triple tryptophan electron transfer chain in *Escherichia coli* DNA photolyase: Trp382 is the primary donor in photoactivation." *PROC NATL ACAD SCI USA* **100**(15): 8276-8681.
- Cashmore, A. R., Jarillo, J. A., Wu, Y.-J. und Liu, D.** (1999). "Cryptochromes: Blue Light Receptors for Plants and Animals." *SCIENCE* **284**(5415): 760-765.
- Chapdelaine, P., Vignola, K. und Fortier, M. A.** (2001). "Protein estimation directly from SDS-PAGE loading buffer for standardization of samples from cell lysates or tissue homogenates before Western blot analysis." *BIOTECHNIQUES* **31**(3): 478, 480, 482.
- Chattopadhyay, S., Ang, L. H., Puente, P., Deng, X. W. und Wei, N.** (1998). "*Arabidopsis* bZIP protein HY5 directly interacts with light-responsive promoters in mediating light control of gene expression." *PLANT CELL* **10**(5): 673-83.
- Christie, J. M., Reymond, P., Powell, G. K., Bernasconi, P., Raibekas, A. A., Liscum, E. und Briggs, W. R.** (1998). "*Arabidopsis* NPH1: A Flavoprotein with the Properties of a Photoreceptor for Phototropism." *SCIENCE* **282**(5394): 1698-1701.

- Crosson, S. und Moffat, K.** (2001). "Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: insights into light-mediated signal transduction." *PROC NATL ACAD SCI U S A* **98**(6): 2995-3000.
- Cutler, S. R., Ehrhardt, D. W., Griffiths, J. S. und Somerville, C. R.** (2000). "Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at a high frequency." *PROC NATL ACAD SCI USA* **97**(7): 3718-23.
- Damm, B., Schmidt, R. und Willmitzer, L.** (1989). "Efficient transformation of *Arabidopsis thaliana* using direct gene transfer to protoplasts." *MOL GEN GENET* **217**(1): 6-12.
- Devlin, P. F. und Kay, S. A.** (2000). "Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity." *PLANT CELL* **12**(12): 2499-2510.
- Dieterle, M., Zhou, Y. C., Schäfer, E., Funk, M. und Kretsch, T.** (2001). "EID1, an F-box protein involved in phytochrome A-specific light signaling." *GENES DEV* **15**(8): 939-44.
- Djamei, A.** (2003). "Charakterisierung der Phosphorylierung und des Abbaus des Blaulichtrezeptors CRY2 aus *Arabidopsis thaliana*" Diplomarbeit, FB Biologie, Philipps Universität, Marburg
- Duek, P. D. und Fankhauser, C.** (2003). "HFR1, a putative bHLH transcription factor, mediates both phytochrome A and cryptochrome signalling." *PLANT J* **34**(6): 827-36.
- Edgerton, M. D. und Jones, A. M.** (1992). "Localization of protein-protein interactions between subunits of phytochrome." *PLANT CELL* **4**(2): 161-71.
- Eker, A. P., Dekker, R. H. und Berends, W.** (1981). "Photoreactivating enzyme from *Streptomyces griseus*-IV. On the nature of the chromophoric cofactor in *Streptomyces griseus* photoreactivating enzyme." *PHOTOCHEM PHOTOBIOLOG* **33**(1): 65-72.
- El-Din El-Assal, S., Alonso-Blanco, C., Peeters, A. J., Raz, V. und Koornneef, M.** (2001). "A QTL for flowering time in *Arabidopsis* reveals a novel allele of CRY2." *NAT GENET* **29**(4): 435-40.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. und von Heijne, G.** (2000). "Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence." *J MOL BIOL* **300**(4): 1005-16.
- Emery, P., Stanewsky, R., Hall, J. C. und Rosbash, M.** (2000). "A unique circadian-rhythm photoreceptor." *NATURE* **404**(6777): 456-7.

- Fankhauser, C. und Staiger, D.** (2002). "Photoreceptors in *Arabidopsis thaliana*: light perception, signal transduction and entrainment of the endogenous clock." *PLANTA* **216**(1): 1-16.
- Flick, J. S. und Johnston, M.** (1990). "Two systems of glucose repression of the GAL1 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*." *MOL CELL BIOL* **10**(9): 4757-69.
- Folta, K. M. und Spalding, E. P.** (2001). "Unexpected roles for cryptochrome 2 and phototropin revealed by high-resolution analysis of blue light-mediated hypocotyl growth inhibition." *PLANT J* **26**(5): 471-8.
- Fu, Z., Inaba, M., Noguchi, T. und Kato, H.** (2002). "Molecular cloning and circadian regulation of cryptochrome genes in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*)." *J BIOL RHYTHMS* **17**(1): 14-27.
- Galland, P. und Tölle, N.** (2003). "Light-induced fluorescence changes in *Phycomyces*: evidence for blue light-receptor associated flavo-semiquinones." *PLANTA* Published ahead of print.
- Garner, W. W.** (1920). "Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants." Washington.
- Gelvin, S. B.** (2003). "*Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool." *MICROBIOL MOL BIOL REV* **67**(1): 16-37, table of contents.
- Giovani, B., Byrdin, M., Ahmad, M. und Brettel, K.** (2003). "Light-induced electron transfer in a cryptochrome blue-light photoreceptor." *NAT STRUCT BIOL* **10**: 489 - 490.
- Gressel, J.** (1979). "Blue Light Photoreception." *PHOTOCHEM PHOTOBIOLOG* **30**: 749-754.
- Guo, H., Duong, H., Ma, N. und Lin, C.** (1999). "The *Arabidopsis* blue light receptor cryptochrome 2 is a nuclear protein regulated by a blue light-dependent post-transcriptional mechanism." *PLANT J* **19**(3): 279-87.
- Guo, H., Mockler, T., Duong, H. und Lin, C.** (2001). "SUB1, an *Arabidopsis* Ca<sup>2+</sup>-binding protein involved in cryptochrome and phytochrome coaction." *SCIENCE* **291**(5503): 487-90.
- Guo, H. W., Yang, W. Y., Mockler, T. C. und Lin, C. T.** (1998). "Regulations of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors." *SCIENCE* **279**(5355): 1360-1363.
- Gyula, P., Schäfer, E. und Nagy, F.** (2003). "Light perception and signalling in higher plants." *CURR OPIN PLANT BIOL* **6**(5): 446-452.

- Harmer, S. L., Hogenesch, J. B., Straume, M., Chang, H. S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J. A. und Kay, S. A.** (2000). "Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock." *SCIENCE* **290**(5499): 2110-3.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. und Elledge, S. J.** (1993). "The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases." *CELL* **75**(4): 805-16.
- Harter, K., Frohnmeyer, H., Kircher, S., Kunkel, T., Mühlbauer, S. und Schäfer, E.** (1994). "Light induces rapid changes of the phosphorylation pattern in the cytosol of evacuated parsley protoplasts." *PROC NATL ACAD SCI U S A* **91**(11): 5038-42.
- Henfrey, A.** (1852). "The vegetation of Europe, its conditions and causes." London,, J. van Voorst.
- Hirose, F. und Takano, M.** (2003). "Rice Cryptochrome2 gene." **AB103094**
- Hoffman, P. D., Batschauer, A. und Hays, J. B.** (1996). "PHH1, a novel gene from *Arabidopsis thaliana* that encodes a protein similar to plant blue-light photoreceptors and microbial photolyases." *MOL GEN GENET* **253**(1-2): 259-265.
- Hsu, D. S., Zhao, X., Zhao, S., Kazantsev, A., Wang, R. P., Todo, T., Wei, Y. F. und Sancar, A.** (1996). "Putative human blue-light photoreceptors hCRY1 and hCRY2 are flavoproteins." *BIOCHEMISTRY* **35**(44): 13871-7.
- Huala, E., Oeller, P. W., Liscum, E., Han, I.-S., Larsen, E. und Briggs, W. R.** (1997). "*Arabidopsis* NPH1: a protein kinase with a putative redox- sensing domain." *SCIENCE* **278**: 2120-2130.
- Imaizumi, T., Kanegae, T. und Wada, M.** (2000). "Cryptochrome nucleocytoplasmic distribution and gene expression are regulated by light quality in the fern *Adiantum capillus-veneris*." *PLANT CELL* **12**(1): 81-96.
- Imaizumi, T., Kadota, A., Hasebe, M. und Wada, M.** (2002). "Cryptochrome light signals control development to suppress auxin sensitivity in the moss *Physcomitrella patens*." *PLANT CELL* **14**(2): 373-86.
- Jackson, J. A. und Jenkins, G. I.** (1995). "Extension-growth responses and expression of flavonoid biosynthesis genes in the *Arabidopsis* hy4 mutant." *PLANTA* **197**(2): 233-9.
- Jarillo, J. A., Capel, J., Tang, R. H., Yang, H. Q., Alonso, J. M., Ecker, J. R. und Cashmore, A. R.** (2001a). "An *Arabidopsis* circadian clock component interacts with both CRY1 and phyB." *NATURE* **410**(6827): 487-90.

- Jarillo, J. A., Gabrys, H., Capel, J., Alonso, J. M., Ecker, J. R. und Cashmore, A. R.** (2001b). "Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light." *NATURE* **410**: 952-954.
- Kagawa, T., Sakai, T., Suetsugu, N., Oikawa, K., Ishiguro, S., Kato, T., Tabata, S., Okada, K. und Wada, M.** (2001). "*Arabidopsis* NPL1: A Phototropin Homolog Controlling the Chloroplast High-Light Avoidance Response." *SCIENCE* **291**(5511): 2138-2141.
- Kanegae, T. und Wada, M.** (1998). "Isolation and characterization of homologues of plant blue-light photoreceptor (cryptochrome) genes from the fern *Adiantum capillus-veneris*." *MOL GEN GENET* **259**(4): 345-53.
- Kendrick, R. E. und Kronenberg, G. H. M.** (1994). "Photomorphogenesis in plants." Dordrecht ; Boston, Kluwer Academic.
- Kevei, E. und Nagy, F.** (2003). "Phytochrome controlled signalling cascades in higher plants." *PHYSIOL PLANT* **117**(3): 305-313.
- Kim, J. I., Kozhukh, G. V. und Song, P. S.** (2002). "Phytochrome-mediated signal transduction pathways in plants." *BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN* **298**(4): 457-63.
- Kinoshita, T. und Shimazaki, K.** (1999). "Blue light activates the plasma membrane H(+)-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells." *EMBO J* **18**(20): 5548-58.
- Kircher, S., Kozma-Bognar, L., Kim, L., Adam, E., Harter, K., Schäfer, E. und Nagy, F.** (1999). "Light quality-dependent nuclear import of the plant photoreceptors phytochrome A and B." *PLANT CELL* **11**(8): 1445-56.
- Kircher, S., Gil, P., Kozma-Bognar, L., Fejes, E., Speth, V., Husselstein-Müller, T., Bauer, D., Adam, E., Schäfer, E. und Nagy, F.** (2002). "Nucleocytoplasmic Partitioning of the Plant Photoreceptors Phytochrome A, B, C, D, and E Is Regulated Differentially by Light and Exhibits a Diurnal Rhythm." *PLANT CELL* **14**(7): 1541-1555.
- Kjellman, F. R.** (1885). "Aus dem Leben der Polarpflanzen." Studien und Forschungen. Veranlasst von meinen Reisen im hohen Norden. N. A.E. Leipzig: 443-521.
- Kleine, T., Lockhart, P. und Batschauer, A.** (2003). "An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles." *PLANT J* **35**(1): 93-103.
- Kleiner, O., Kircher, S., Harter, K. und Batschauer, A.** (1999). "Nuclear localization of the *Arabidopsis* blue light receptor cryptochrome 2." *PLANT J* **19**(3): 289-96.

- Kleiner, O.** (2001). "Die DNA Photolyase/Cryptochrom Familie aus *Arabidopsis thaliana*: Lichtperzeption und Signaltransduktion" Dissertation, FB Biologie, Philipps Universität, Marburg
- Kobayashi, K., Kanno, S., Smit, B., van der Horst, G. T., Takao, M. und Yasui, A.** (1998). "Characterization of photolyase/blue-light receptor homologs in mouse and human cells." NUCLEIC ACIDS RES **26**(22): 5086-92.
- Kobayashi, Y., Ishikawa, T., Hirayama, J., Daiyasu, H., Kanai, S., Toh, H., Fukuda, I., Tsujimura, T., Terada, N., Kamei, Y., Yuba, S., Iwai, S. und Todo, T.** (2000). "Molecular analysis of zebrafish photolyase/cryptochrome family: two types of cryptochromes present in zebrafish." GENES CELLS **5**(9): 725-738.
- Koornneef, M., Rolff, E. und Spruit, C. J. P.** (1980). "Genetic control of light-induced hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh." Z PFLANZENPHYSIOL **100**: 147-160.
- Koornneef, M., Hanhart, C. J. und van der Veen, J. H.** (1991). "A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*." MOL GEN GENET **229**(1): 57-66.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. und Sonnhammer, E. L.** (2001). "Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes." J MOL BIOL **305**(3): 567-80.
- Lagarias, J. C. und Rapoport, H.** (1980). "Chromopeptides from phytochrome. The structure and linkage of the Pr form of the phytochrome chromophore." J AM CHEM SOC **102**(14): 4821-4828.
- Lamond, A. I. und Earnshaw, W. C.** (1998). "Structure and function in the nucleus." SCIENCE **280**: 547-553.
- Li, Y. F., Heelis, P. F. und Sancar, A.** (1991). "Active site of DNA photolyase: tryptophan-306 is the intrinsic hydrogen atom donor essential for flavin radical photoreduction and DNA repair *in vitro*." BIOCHEMISTRY **30**(25): 6322-9.
- Lin, C., Ahmad, M., Gordon, D. und Cashmore, A. R.** (1995a). "Expression of an Arabidopsis Cryptochrome Gene in Transgenic Tobacco Results in Hypersensitivity to Blue, UV-A, and Green Light." PROC NATL ACAD SCI U S A **92**(18): 8423-8427.

- Lin, C., Robertson, D. E., Ahmad, M., Raibekas, A. A., Jorns, M. S., Dutton, P. L. und Cashmore, A. R.** (1995b). "Association of flavin adenine dinucleotide with the *Arabidopsis* blue light receptor CRY1." *SCIENCE* **269**(5226): 968-70.
- Lin, C., Ahmad, M. und Cashmore, A. R.** (1996a). "*Arabidopsis* cryptochrome 1 is a soluble protein mediating blue light-dependent regulation of plant growth and development." *PLANT JOURNAL* **10**(5): 893-902.
- Lin, C., Ahmad, M., Chan, J. und Cashmore, A. R.** (1996b). "CRY2: A second member of the *Arabidopsis* cryptochrome gene family (accession No. U43397) (PGR 96-001)." *PLANT PHYSIOLOGY* **110**: 1047-1046.
- Lin, C., Yang, H. Y., Guo, H. W., Mockler, T., Chen, J. und Cashmore, A. R.** (1998). "Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2." *PROC NATL ACAD SCI U S A* **95**(5): 2686-2690.
- Lin, C.** (2002). "Blue Light Receptors and Signal Transduction." *PLANT CELL* **14**(90001): S207-225.
- Lin, C. und Shalitin, D.** (2003). "Cryptochrome Structure and Signal Transduction." *ANNU REV PLANT BIOL* **54**: 469-496.
- Liscum, E. und Briggs, W. R.** (1995). "Mutations in the NPH1 locus of *Arabidopsis* disrupt the perception of phototropic stimuli." *PLANT CELL* **7**(4): 473-85.
- Malhotra, K., Baer, M., Li, Y. F., Sancar, G. B. und Sancar, A.** (1992). "Identification of chromophore binding domains of yeast DNA photolyase." *J BIOL CHEM* **267**(5): 2909-14.
- Malhotra, K., Kim, S. T., Batschauer, A., Dawut, L. und Sancar, A.** (1995). "Putative blue-light photoreceptors from *Arabidopsis thaliana* and *Sinapis alba* with a high degree of sequence homology to DNA photolyase contain the two photolyase cofactors but lack DNA repair activity." *BIOCHEMISTRY* **34**(20): 6892-9.
- Mas, P., Devlin, P. F., Panda, S. und Kay, S. A.** (2000). "Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2." *NATURE* **408**(6809): 207-11.
- Mathur, J. und Koncz, C.** (1998). "Establishment and maintenance of cell suspension cultures." *METHODS MOL BIOL* **82**: 27-30.
- Mazzolini, L., Vaeck, M. und van Montagu, M.** (1989). "Conserved epitopes on plant H1 histones recognized by monoclonal antibodies." *EUR J BIOCHEM* **178**(3): 779-87.

- Mintz, P. J. und Spector, D. L.** (2000). "Compartmentalization of RNA processing factors within nuclear speckles." *J STRUCT BIOL* **129**: 241-251.
- Mockler, T., Yang, H., Yu, X., Parikh, D., Cheng, Y.-c., Dolan, S. und Lin, C.** (2003). "Regulation of photoperiodic flowering by *Arabidopsis* photoreceptors." *PROC NATL ACAD SCI U S A* **100**(4): 2140-2145.
- Møller, S. G., Ingles, P. J. und Whitelam, G. C.** (2002). "The cell biology of phytochrome signalling." *NEW PHYTOLOGIST* **154**(3): 553-590.
- Møller, S. G., Kim, Y.-S., Kunkel, T. und Chua, N.-H.** (2003). "PP7 Is a Positive Regulator of Blue Light Signaling in *Arabidopsis*." *PLANT CELL* **15**(5): 1111-1119.
- Nagy, F., Kircher, S. und Schäfer, E.** (2001). "Intracellular trafficking of photoreceptors during light-induced signal transduction in plants." *J CELL SCI* **114**(Pt 3): 475-80.
- Nagy, F. und Schäfer, E.** (2002). "Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants." *ANNU REV PLANT BIOL* **53**: 329-55.
- Neff, M. M. und Chory, J.** (1998). "Genetic interactions between phytochrome A, phytochrome B, and cryptochrome 1 during *Arabidopsis* development." *PLANT PHYSIOL* **118**(1): 27-35.
- Neff, M. M., Fankhauser, C. und Chory, J.** (2000). "Light: an indicator of time and place." *GENES DEV* **14**(3): 257-71.
- Ng, W. O., Grossman, A. R. und Bhaya, D.** (2003). "Multiple light inputs control phototaxis in *Synechocystis* sp. strain PCC6803." *J BACTERIOL* **185**(5): 1599-607.
- Ni, M., Tepperman, J. M. und Quail, P. H.** (1998). "PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein." *CELL* **95**(5): 657-67.
- Ni, M., Tepperman, J. M. und Quail, P. H.** (1999). "Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light." *NATURE* **400**(6746): 781-4.
- Ninu, L., Ahmad, M., Miarelli, C., Cashmore, A. R. und Giuliano, G.** (1999). "Cryptochrome 1 controls tomato development in response to blue light." *PLANT J* **18**(5): 551-556.

- Nozue, K., Kanegae, T., Imaizumi, T., Fukuda, S., Okamoto, H., Yeh, K. C., Lagarias, J. C. und Wada, M.** (1998). "A phytochrome from the fern *Adiantum* with features of the putative photoreceptor NPH1." *PROC NATL ACAD SCI U S A* **95**(26): 15826-30.
- Oyama, T., Shimura, Y. und Okada, K.** (1997). "The *Arabidopsis* HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl." *GENES DEV* **11**(22): 2983-95.
- Özgür, S. und Sancar, A.** (2003). "Purification and properties of human blue-light photoreceptor cryptochrome 2." *BIOCHEMISTRY* **42**(10): 2926-32.
- Park, H. W., Kim, S.-T., Sancar, A. und Deisenhofer, J.** (1995). "Crystal structure of DNA photolyase from *Escherichia coli*." *SCIENCE* **268**: 1866-1872.
- Payne, G., Wills, M., Walsh, C. und Sancar, A.** (1990). "Reconstitution of *Escherichia coli* photolyase with flavins and flavin analogues." *BIOCHEMISTRY* **29**(24): 5706-11.
- Perrotta, G., Ninu, L., Flamma, F., Weller, J. L., Kendrick, R. E., Nebuloso, E. und Giuliano, G.** (2000). "Tomato contains homologues of Arabidopsis cryptochromes 1 and 2." *PLANT MOL BIOL* **42**(5): 765-73.
- Perrotta, G., Yahoubyan, G., Nebuloso, E., Renzi, L. und Giuliano, G.** (2001). "Tomato and barley contain duplicated copies of cryptochrome 1." *PLANT CELL AND ENVIRONMENT* **24**(9): 991-997.
- Popovic, D. M., Zmiric, A., Zaric, S. D. und Knapp, E. W.** (2002). "Energetics of radical transfer in DNA photolyase." *J AM CHEM SOC* **124**(14): 3775-82.
- Rosato, E., Codd, V., Mazzotta, G., Piccin, A., Zordan, M., Costa, R. und Kyriacou, C. P.** (2001). "Light-dependent interaction between *Drosophila* CRY and the clock protein PER mediated by the carboxy terminus of CRY." *CURR BIOL* **11**(12): 909-17.
- Saitou, T., Tajima, K. und Kamada, H.** (2002). "Isolation of cDNAs for cryptochrome 2 in horseradish." **BAC67179**
- Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T. E., Christie, J. M., Briggs, W. R., Wada, M. und Okada, K.** (2001). "*Arabidopsis* nph1 and npl1: Blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation." *PROC NATL ACAD SCI USA* **98**(12): 6969-6974.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T.** (1989). "Molecular cloning : a laboratory manual." Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.

- Sancar, A.** (1994). "Structure and function of DNA photolyase." *BIOCHEMISTRY* **33**(1): 2-9.
- Sancar, A.** (2003). "Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors." *CHEM REV* **103**(6): 2203-38.
- Schäfer, E. und Bowle, C.** (2002). "Phytochrome-mediated photoperception and signal transduction in higher plants." *EMBO REP* **3**(11): 1042-8.
- Schägger, H. und von Jagow, G.** (1987). "Tricine- sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." *ANAL BIOCHEM* **166**(2): 368-79.
- Shalitin, D., Yang, H., Mockler, T. C., Maymon, M., Guo, H., Whitelam, G. C. und Lin, C.** (2002). "Regulation of *Arabidopsis* cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation." *NATURE* **417**(6890): 763-7.
- Small, G. D., Min, B. und Lefebvre, P. A.** (1995). "Characterization of a *Chlamydomonas reinhardtii* gene encoding a protein of the DNA photolyase/blue light photoreceptor family." *PLANT MOL BIOL* **28**(3): 443-54.
- Smith, H.** (2000). "Phytochromes - The enigma solved?" *SEMINARS IN CELL & DEVELOPMENTAL BIOLOGY* **11**(6): 445-447.
- Somers, D. E., Devlin, P. F. und Kay, S. A.** (1998). "Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock." *SCIENCE* **282**(5393): 1488-90.
- Stoelzle, S., Kagawa, T., Wada, M., Hedrich, R. und Dietrich, P.** (2003). "Blue light activates calcium-permeable channels in *Arabidopsis* mesophyll cells via the phototropin signaling pathway." *PROC NATL ACAD SCI U S A* **100**(3): 1456-1461.
- Swartz, T. E., Corchnoy, S. B., Christie, J. M., Lewis, J. W., Szundi, I., Briggs, W. R. und Bogomolni, R. A.** (2001). "The Photocycle of a Flavin-binding Domain of the Blue Light Photoreceptor Phototropin." *J BIOL CHEM* **276**(39): 36493-36500.
- Takano, M. und Hirose, F.** (2001). "Cryptochrome 1 gene of *Oryza sativa*." **AB073546**
- Tamada, T., Kitadokoro, K., Higuchi, Y., Inaka, K., Yasui, A., de Ruiter, P., Eker, A. P. und Miki, K.** (1997). "Crystal structure of DNA photolyase from *Anacystis nidulans*." *NAT STRUCT BIOL* **4**: 887-891.
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000). "Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*." *NATURE* **408**(6814): 796-815.

**Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. und Higgins, D. G.** (1997). "The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools." *NUCLEIC ACIDS RES* **25**(24): 4876-82.

**Todo, T., Ryo, H., Yamamoto, K., Toh, H., Inui, T., Ayaki, H., Nomura, T. und Ikenaga, M.** (1996). "Similarity among the *Drosophila* (6-4)photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase- blue- light photoreceptor family." *SCIENCE* **272**(5258): 109-12.

**Toth, R., Kevei, E., Hall, A., Millar, A. J., Nagy, F. und Kozma-Bognar, L.** (2001). "Circadian clock-regulated expression of phytochrome and cryptochrome genes in *Arabidopsis*." *PLANT PHYSIOLOGY* **127**(4): 1607-1616.

**Ulaszewski, S., Mamouneas, T., Shen, W. K., Rosenthal, P. J., Woodward, J. R., Cirillo, V. P. und Edmunds, L. N., Jr.** (1979). "Light effects in yeast: evidence for participation of cytochromes in photoinhibition of growth and transport in *Saccharomyces cerevisiae* cultured at low temperatures." *J BACTERIOL* **138**(2): 523-9.

**van Noort, J., Orsini, F., Eker, A., Wyman, C., de Grooth, B. und Greve, J.** (1999). "DNA bending by photolyase in specific and non-specific complexes studied by atomic force microscopy." *Nucleic Acids Res* **27**(19): 3875-80.

**Vierstra, R. D. und Davis, S. J.** (2000). "Bacteriophytochromes: new tools for understanding phytochrome signal transduction." *SEMINARS IN CELL & DEVELOPMENTAL BIOLOGY* **11**(6): 511-521.

**Wang, H., Ma, L. G., Li, J. M., Zhao, H. Y. und Deng, X. W.** (2001). "Direct interaction of *Arabidopsis* cryptochromes with COP1 in light control development." *SCIENCE* **294**(5540): 154-8.

**Whitelam, G. C., Johnson, E., Peng, J., Carol, P., Anderson, M. L., Cowl, J. S. und Harberd, N. P.** (1993). "Phytochrome A null mutants of *Arabidopsis* display a wild-type phenotype in white light." *PLANT CELL* **5**(7): 757-68.

**Worthington, E. N., Kavakli, I. H., Berrocal-Tito, G., Bondo, B. E. und Sancar, A.** (2003). "Purification and characterization of three members of the photolyase/ cryptochrome family blue- light photoreceptors from *Vibrio cholerae*." *J BIOL CHEM* Published ahead of print.

**Xie, X., Chen, Z. und Wang, X.** (2002). "Cryptochrome 2 apoprotein [*Sorghum bicolor*]." **AAN37909**

- Xu, Y., Piston, D.W. und Johnson, C. H.** (1999). "A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins." *PROC NATL ACAD SCI USA* **96**(1): 151-156
- Yamaguchi, R., Nakamura, M., Mochizuki, N., Kay, S. A. und Nagatani, A.** (1999). "Light-dependent translocation of a phytochrome B-GFP fusion protein to the nucleus in transgenic *Arabidopsis*." *J CELL BIOL* **145**(3): 437-45.
- Yamamoto, K., Okano, T. und Fukada, Y.** (2001). "Chicken pineal Cry genes: light-dependent up-regulation of cCry1 and cCry2 transcripts." *NEUROSCI LETT* **313**(1-2): 13-6.
- Yang, H. Q., Wu, Y. J., Tang, R. H., Liu, D. M., Liu, Y. und Cashmore, A. R.** (2000). "The C termini of *Arabidopsis* cryptochromes mediate a constitutive light response." *CELL* **103**(5): 815-827.
- Yang, H. Q., Tang, R. H. und Cashmore, A. R.** (2001). "The signaling mechanism of *Arabidopsis* CRY1 involves direct interaction with COP1." *Plant CELL* **13**(12): 2573-2587.
- Yeh, K. C. und Lagarias, J. C.** (1998). "Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry." *PROC NATL ACAD SCI USA* **95**(23): 13976-81.

## Anhang

### A.1 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Alfred Batschauer herzlich für die Gelegenheit danken, dieses interessante und herausfordernde Thema in seinen Laboren und unter seiner Betreuung bearbeiten zu dürfen. Auch bedanken möchte ich mich für seine stetige Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft, sowie die kontinuierliche Finanzierung.

Ich danke Prof. Dr. Paul Galland und all seinen Mitarbeitern für die Gelegenheit die Bestrahlungsversuche in ihren Laboren durchführen zu können.

Dr. Margaret Ahmad, Paris möchte ich für die Gelegenheit danken, die Techniken zur Anzucht von Insektenzellen in ihrem Labor kennenzulernen. Hier ist auch Dr. Jean-Pierre Bouly ein ganz herzliches Danke zu sagen, dass er mich in dieser Woche so freundlich bei sich aufgenommen hat.

Ebenfalls sehr herzlich danken möchte ich Dr. Franz Grolig, für seine immerwährende Gesprächs- und Hilfsbereitschaft, die Einführung in die konfokale Mikroskopie und besonders sein freundliches Wesen, das mich oft wieder aufgebaut hat.

Meinem Freund und Banknachbarn Dr. Oliver Kleiner gilt ein ganz besonderes Dankeschön für das harmonische Miteinander im Labor und dass ich von ihm viel lernen durfte.

Ganz besonderer Dank gilt Oxana Panajotow und Agnes Debelius, die mich während meiner Arbeit durch ihre engagierte technische Assistenz stetig unterstützt und entlastet haben.

Bei Dr. Tatjana Kleine möchte ich mich für das kritische Lesen des Manuskripts bedanken, und dass sie einfach für mich da ist.

Ich danke allen Mitglieder der Arbeitsgruppe Batschauer, ganz besonders PD Dr. Dieter Dörnemann, für die angenehme und entspannte Arbeitsatmosphäre.

Bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Graduiertenkolleg 'Proteinfunktion auf atomarer Ebene' bedanke ich mich für die Finanzierung.

## A.2 Lebenslauf

Name: Markus Bernd Müller  
Adresse: Kämpfrasen 34  
35037 Marburg

Geburtstag: 1. Juli 1974  
Geburtsort: Lich  
Nationalität: Deutsch  
Familienstand: ledig

### Schulbildung:

09/80–06/93 4 Jahre Vor- und Grundschule, 6 Jahre Gesamtschule, 3 Jahre Gymnasium, Abitur mit 1.7 an der Goetheschule, Wetzlar.

### Zivildienst:

07/93–10/94 Arbeit als Laborhelfer im Universitätsklinikum, Giessen. Eigenständige Durchführung von immunologischen Assays.

### Akademische Ausbildung:

10/94–04/99 Studium der Biologie an der Philipps Universität Marburg mit den Schwerpunkten Botanik, Mikrobiologie, Biochemie und Pharmakologie.

04/99 Erwerb des Diploms in Biologie mit der Note 1.125 an der Philipps Universität Marburg.

Diplomarbeit: Überexpression von Glutamate-1-Semialdehyde-2,1-Aminomutase aus *Scenedesmus obliquus* in *E. coli* und deren enzymchemische Charakterisierung.

04/99–10/99 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Labor von PD Dr. Dörnemann, Philipps Universität Marburg, Arbeiten an der Reinigung und Charakterisierung von Glutamate-Semialdehyde-Aminomutase.

10/99–09/02 Doktorandenstipendium des Graduiertenkollegs 'Proteinfunktion auf atomarer Ebene' (Deutsche Forschungsgemeinschaft): "Untersuchungen zur Struktur und Funktion des pflanzlichen Blaulicht-Photorezeptors Cryptochrome 2" am Fachbereich Biologie der Philipps Universität Marburg, Doktorvater: Prof. Dr. Alfred Batschauer.

10/02–heute Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Gruppe von Prof. Batschauer.

### A.3 Tabellen

wavelength (nm)	high ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )	low ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )	average	1/average
326	1,978	0,529	1,253	0,798
336	8,187	1,279	4,733	0,211
348	0,807	0,365	0,586	1,706
359,5	0,967	0,412	0,690	1,450
372	0,690	0,370	0,530	1,887
383	0,920	0,508	0,714	1,400
391	1,987	1,038	1,513	0,661
402	1,890	0,980	1,435	0,697
412	1,059	0,588	0,824	1,214
422	0,986	0,362	0,674	1,484
431	0,769	0,421	0,595	1,681
442	0,483	0,208	0,345	2,896
453	0,445	0,259	0,352	2,841
462	0,330	0,250	0,290	3,448
472	0,441	0,337	0,389	2,569
482	2,490	2,400	2,445	0,409
491	5,588	2,997	4,293	0,233
502	3,300	1,500	2,400	0,417
512	11,080	4,690	7,885	0,127

Tabelle A.1: Fluenzraten zum Aktionsspektrum der Phosphorylierung von cry2.

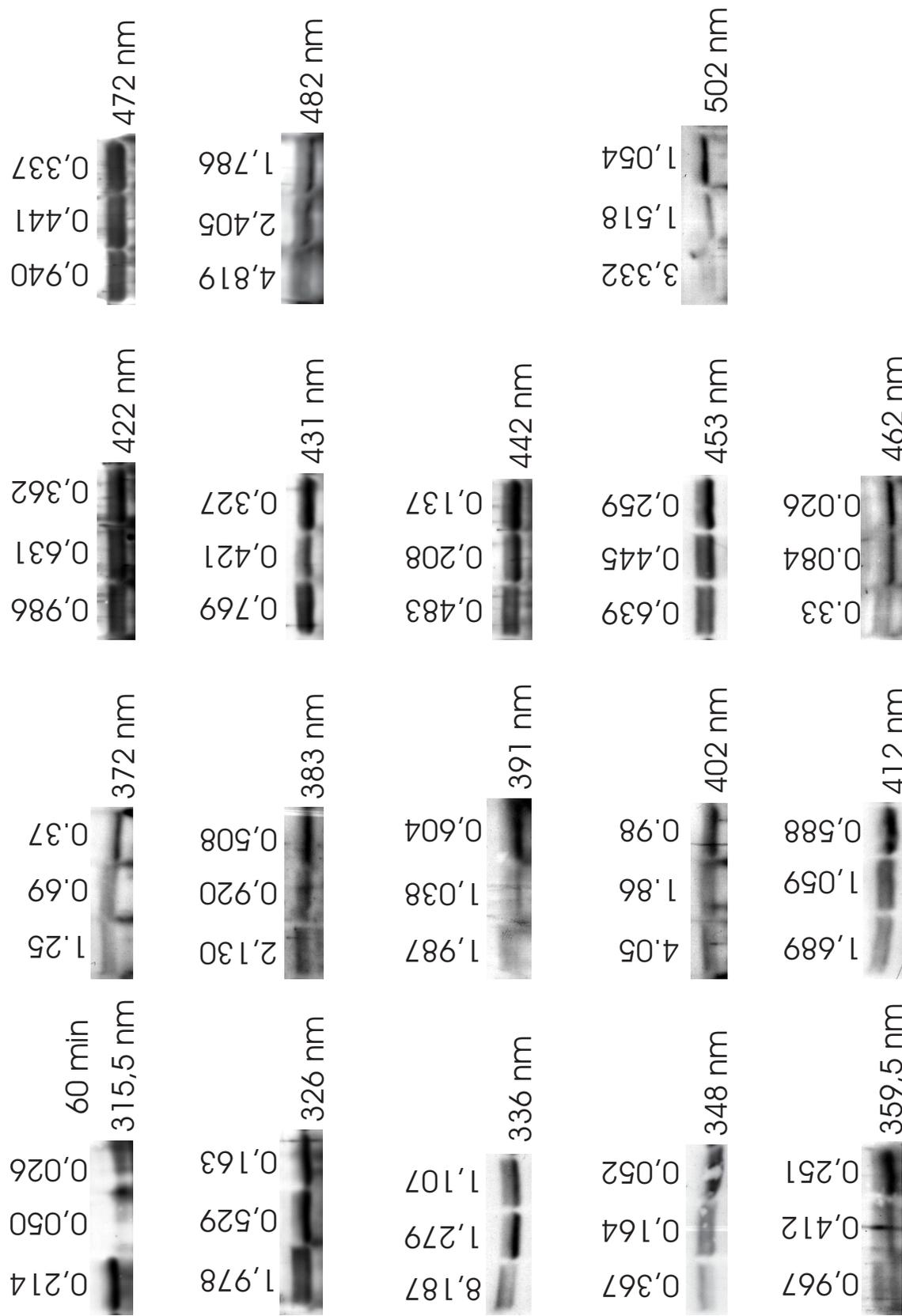


Abbildung A.37: Western- Blot Daten zum Aktionsspektrum der Phosphorylierung von cry2

Probe	Nr.	OD <sub>600</sub>	Zeit bis Stop (min)	OD <sub>420</sub>	Miller Units	mittlere Units	Standardabw.
pGBKT7 / #45 + pGADT7 / ASK1	1	0,201	958	0,201	0,52	0,42	0,14
	2	0,213	958	0,195	0,48		
	3	0,204	958	0,197	0,50		
	4	0,223	958	0,187	0,44		
	5	0,203	958	0,057	0,15		
	6	0,209	958	0,164	0,41		
pGBKT7 / #45 + pGADT7 / ASK2	1	0,221	24	0,076	7,20	7,59	0,77
	2	0,232	24	0,093	8,39		
	3	0,224	24	0,085	7,91		
	4	0,230	24	0,077	6,96		
	5	0,239	24	0,097	8,46		
	6	0,217	24	0,069	6,63		
pGBKT7 / leer + pGADT7 / ASK1	1	0,236	962	0,085	0,19	0,18	0,01
	2	0,239	962	0,080	0,18		
	3	0,234	962	0,083	0,18		
	4	0,237	962	0,073	0,16		
	5	0,251	962	0,090	0,19		
	6	0,235	962	0,083	0,18		
pGBKT7 / leer + pGADT7 / ASK2	1	0,228	962	0,074	0,17	0,17	0,02
	2	0,224	962	0,074	0,17		
	3	0,225	962	0,072	0,17		
	4	0,234	962	0,060	0,13		
	5	0,244	962	0,082	0,17		
	6	0,247	962	0,088	0,18		
pGBKT7 / #45 + pGADT7 / leer	1	0,241	962	0,059	0,13	0,13	0,01
	2	0,221	962	0,056	0,13		
	3	0,231	962	0,053	0,12		
	4	0,220	962	0,054	0,13		
	5	0,251	962	0,071	0,15		
	6	0,212	962	0,054	0,13		
positiv Kontrolle	1	0,109	1	0,016	74,70		
	2	0,227	1	0,547	1202,82		
	3	0,125	18	0,127	28,29		

Tabelle A.2: *Yeast-two-hybrid* Daten zur Interaktion von At2g02230 mit ASK1 und ASK2.

Probe	Nr.	$\mu\text{g}$ Protein	Zeit (min)	OD <sub>420</sub>	Miller Units
pAS2-1 / CRY2 + pACT / #45 Licht	1	100	100	0,083	8,330
pAS2-1 / CRY2 + pACT / #45 Dunkel	2	100	1026	0,1443	1,406
pAS2-1 / CRY2 + pACT Licht	3	100	100	0,082	8,240
pAS2-1 / CRY2 + pACT Dunkel	4	100	1026	0,1243	1,212
pLAM + pACT / #45 Licht	5	100	1026	0,0376	0,366
pLAM + pACT / #45 Dunkel	6	100	1026	0,049	0,478
pos. Kontrolle Licht	7	10	100	0,3773	377,300
pos. Kontrolle Dunkel	8	10	100	0,2356	235,600

Tabelle A.3: *Yeast-two-hybrid* Daten zur Interaktion von At2g02230 mit cry2.

No.	Sample	Blue(A)				Mean Blue	SD	Yellow(B)				Mean Yellow	SD	Ratio
		A1	A2	A3	A4			B1	B2	B3	B4			
1	YFP-RLUC	1,796	1,354	1,278	1,25	1,4195	0,25482	2,102	1,83	1,744	1,731	1,85175	0,17252	1,305
2	RLUC + YFP	0,97	0,497	0,518	0,571	0,639	0,22285	0,31	0,262	0,417	0,359	0,337	0,06643	0,527
3	RLUC-CRY2 + CIF1(-19)-YFP	1,261	0,896	1,101	0,994	1,063	0,15631	0,558	0,728	0,572	0,597	0,61375	0,07786	0,577
4	CRY2-RLUC + CIF1(-19)-YFP	0,406	0,306	0,481	0,582	0,44375	0,11676	0,072	0,108	0,276	0,222	0,1695	0,09555	0,382
5	RLUC-CRY2 + YFP-CIF1	2,248	1,748	1,831	1,753	1,895	0,23838	1,209	1,181	1,154	1,16	1,176	0,02486	0,621
6	CRY2-RLUC + YFP-CIF1	2,49	1,88	1,709	1,539	1,9045	0,41442	1,437	1,101	0,995	1,025	1,1395	0,20329	0,598
7	RLUC-CRY2 + CIF1-YFP	2,143	1,611	1,463	1,518	1,68375	0,3122	1,126	0,924	0,937	0,949	0,984	0,09522	0,584
8	CRY2-RLUC + CIF1-YFP	2,297	1,63	1,335	1,426	1,672	0,43454	1,26	0,922	0,82	0,753	0,93875	0,22516	0,561
9	RLUC-CIF1 + CRY2-YFP	0,084	0,013	0,089	0,074	0,065	0,03522	0,009	0,009	0,003	0,048	0,01725	0,02069	0,265
10	RLUC-CIF1 + YFP-CRY2	0	0	0	0	0	0	0,029	0,019	0,025	0,036	0,02725	0,00714	#####

Abbildung A.38: BRET- Daten zur Interaktion von At5g26280 mit cry2. Da es im Verlauf der Messungen zu einem Abfall in der Luziferaseaktivität und daher zu hohen Standardabweichungen (SD) kommt, wurde das Y/B-Verhältnis nur aus direkt aufeinanderfolgenden Messungen (B1/A1 bzw. B2/A2 etc.) gebildet und der Mittelwert der daraus resultierenden Einzelverhältnisse gebildet, was zu deutlich konsistenteren Messwerten führt.

No.	Sample	Blue(A)				Mean Blue	SD	Yellow(B)				Mean Yellow	SD	Ratio
		A1	A2	A3	A4			B1	B2	B3	B4			
0	Background	0,251	0	0	0,222	0,11825	0,13706	0,247	0	0	0,06175	0,1235	0,522	
1	RLUC-YFP 30µg	13,6	9,665	8,865	8,801	10,2328	2,27899	13,83	11,91	11,53	12,195	1,10543	1,192	
2	RLUC-YFP 15µg	8,292	5,279	4,733	4,768	5,768	1,70107	8,567	6,795	6,382	7,039	1,03587	1,22	
3	RLUC-YFP 6µg	3,411	2,518	2,318	2,229	2,619	0,54165	3,793	3,284	2,956	3,262	0,3817	1,246	
4	RLUC + YFP 30µg	5,62	4,142	4,043	3,932	4,43425	0,79514	3,204	2,694	2,55	2,7545	0,30636	0,621	
5	RLUC + YFP 15µg	2,982	2,067	1,847	1,888	2,196	0,53264	1,658	1,364	1,227	1,371	0,20137	0,624	
6	RLUC + YFP 6µg	0,511	0,345	0,29	0,315	0,36525	0,09973	0,209	0,057	0,075	0,11	0,06821	0,301	
7	cry2-RLUC + At5g26280-YFP 30µg	7,527	5,147	4,68	4,522	5,469	1,39742	3,938	3,319	3,138	3,39725	0,36835	0,621	
8	cry2-RLUC + At5g26280-YFP 15µg	3,781	2,538	2,395	2,491	2,80125	0,65587	2,022	1,623	1,559	1,71775	0,20762	0,613	
9	cry2-RLUC + At5g26280-YFP 6µg	1,508	1,056	1,034	0,943	1,13525	0,25327	0,741	0,574	0,506	0,60175	0,09929	0,53	
10	RLUC-cry2 + At5g26280-YFP 30µg	4,721	3,333	3,095	3,157	3,5765	0,76963	2,585	2,201	2,128	2,2465	0,23176	0,628	
11	RLUC-cry2 + At5g26280-YFP 15µg	2,376	1,797	1,658	1,685	1,879	0,33675	1,251	1,046	0,985	1,095	0,11379	0,583	
12	RLUC-cry2 + At5g26280-YFP 6µg	0,81	0,593	0,517	0,54	0,615	0,13384	0,286	0,22	0,249	0,26625	0,03975	0,433	

Abbildung A.39: BRET- Daten zur Interaktion von At5g26280 mit cry2. Titration des Donors durch Variieren der Plasmidmenge. Da es im Verlauf der Messungen zu einem Abfall in der Luziferaseaktivität und daher zu hohen Standardabweichungen (SD) kommt, wurde das Y/B-Verhältnis nur aus direkt aufeinanderfolgenden Messungen (B1/A1 bzw. B2/A2 etc.) gebildet und der Mittelwert der daraus resultierenden Einzelverhältnisse gebildet, was zu deutlich konsistenteren Messwerten führt.

Probe	Proteinkonz. ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	OD <sub>420</sub> ONPG	OD <sub>420</sub> leer	Differenz	Protein im Assay ( $\mu\text{g}$ )	Zeit (min)	Fluenzrate ( $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )	Units
447 nm								
1	1,605	0,3224	0,013	0,3094	160,47	1140	77,080	1,69
2	1,454	0,2493	0,0045	0,2448	145,40	1140	24,440	1,48
3	1,454	0,2475	0,0062	0,2413	145,40	1140	9,964	1,46
4	1,516	0,1853	0,0066	0,1787	151,61	1140	4,662	1,03
5	1,605	0,08	0,0017	0,0783	160,47	1140	2,106	0,43
6	1,410	0,0571	0,0012	0,0559	140,97	1140	0,978	0,35
7	1,614	0,0612	0,0041	0,0571	161,36	1140	0,526	0,31
8	1,454	0,0733	0,0083	0,065	145,40	1140	0,293	0,39
9	1,578	0,0628	0,0062	0,0566	157,81	1140	0,171	0,31
10	1,419	0,0541	0,0064	0,0477	141,86	1140	0,091	0,29
11	1,064	0,0447	0,0007	0,044	106,39	1140	0,058	0,36
12	1,330	0,0576	0,0074	0,0502	132,99	1140	0,022	0,33
431 nm								
1	0,397	0,2657	0,0159	0,2498	30	1040	57,44	8,01
2	0,439	0,2201	0,0251	0,195	30	1040	11,6	6,25
3	0,462	0,2229	0,0236	0,1993	30	1040	3,84	6,39
4	0,379	0,1977	0,0237	0,174	30	1040	1,49	5,58
5	0,517	0,1563	0,0234	0,1329	30	1040	0,62	4,26
6	0,452	0,128	0,0201	0,1079	30	1040	0,278	3,46
7	0,605	0,102	0,017	0,085	30	1040	0,135	2,72
8	0,485	0,0685	0,0147	0,0538	30	1040	0,09	1,72
9	0,568	0,0602	0,0161	0,0441	30	1040	0,05	1,41
10	0,600	0,0664	0,0208	0,0456	30	1040	0,039	1,46
11	0,508	0,0548	0,0165	0,0383	30	1040	0,018	1,23
12	0,600	0,0525	0,0154	0,0371	30	1040	0,011	1,19

Abbildung A.40: Yeast-two hybrid Messungen zur Bestimmung des Schwellenwertes der Transaktivierung durch cry2 in Hefe.

Wellenlänge (nm)	Fluenzrate ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )	Protein ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	OD <sub>420</sub> leer	OD <sub>420</sub> ONPG	Differenz	Zeit (min)	Units
403	2,84	0,86	0,002	0,157	0,155	1059	1,26
412	2,61	1,12	0,007	0,263	0,257	1059	2,71
422	3,13	1,07	0,027	0,307	0,280	1059	2,82
431	3,28	1,28	0,032	0,404	0,372	1059	4,49
442	3,44	1,19	0,010	0,279	0,269	1059	3,01
447	3,59	0,99	0,009	0,138	0,129	1059	1,21
460	3,75	0,77	0,015	0,162	0,147	1059	1,06
472	3,92	0,71	0,008	0,105	0,098	1059	0,65
482	4,2	0,62	0,003	0,074	0,071	1059	0,42
518	4,81	0,72	0,000	0,021	0,021	1059	0,14
559	5,56	0,72	0,000	0,030	0,030	1059	0,21
599	6,4	0,58	0,003	0,010	0,007	1059	0,04
640	7,27	0,64	0,004	0,034	0,030	1059	0,18
681	8,2	0,70	0,000	0,014	0,014	1059	0,09

Tabelle A.4: *Yeast- two-hybrid* Daten zum Aktionsspektrum der Transaktivierung durch cry2 in Hefe.

## A.4 Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Thema: “**Der Blaulicht-Photorezeptor Cryptochrom 2 aus *Arabidopsis thaliana*: Lichtabhängige Phosphorylierung und Interaktionspartner in der Signaltransduktion**” selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

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

Marburg, 24. November 2003