

**Photolyase/Cryptochrom-Homologe aus
Synechocystis sp. PCC 6803 und *Arabidopsis thaliana*:
Funktion, Lokalisation und biochemische Eigenschaften**

DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Tatjana Kleine

aus Korbach

Marburg/Lahn 2003

**Photolyase/Cryptochrom-Homologe aus
Synechocystis sp. PCC 6803 und *Arabidopsis thaliana*:
Funktion, Lokalisation und biochemische Eigenschaften**

DISSERTATION

zur

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

dem

Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Tatjana Kleine

aus Korbach

Marburg/Lahn 2003

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 01.07.2003
angenommen.

Erstgutachter Prof. Dr. A. Batschauer

Zweitgutachter Prof. Dr. U. Maier

Tag der mündlichen Prüfung am 11.07.2003.

Die in dieser Dissertation beschriebenen Ergebnisse werden in folgender Originalpublikation veröffentlicht:

Kleine, T., Lockhart, P. und Batschauer, A. (2003) An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles. *Plant J.*, akzeptiert.

I. Inhaltsverzeichnis

I.	INHALTSVERZEICHNIS	I
II.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1	EINLEITUNG	1
1.1	ROTLICHTREZEPTOREN – DIE PHYTOCHROME	1
1.1.1	Vorkommen, Chromophor, Expression und Lokalisation der Phytochrome	2
1.1.2	Domänen-Aufbau der Phytochrome	3
1.1.3	Bakterielle Phytochrome und deren Funktion	5
1.2	DNA-REPARATURENZYME – DIE PHOTOLYASEN	7
1.2.1	Die CPD-Photolyasen	8
1.2.1.1	Kofaktoren der CPD-Photolyasen	8
1.2.1.2	Das Apoenzym	9
1.2.1.3	Reaktionsmechanismus der CPD-Photolyasen	9
1.2.1.4	Photolyase-Kristallstrukturen und Substraterkennung	11
1.2.2	Die (6-4)-Photolyasen	12
1.3	UV-A/BLAULICHTREZEPTOREN	13
1.3.1	Cryptochrome	13
1.3.1.1	Vorkommen der Cryptochrome	13
1.3.1.2	Das Protein und die Chromophore	14
1.3.1.3	Cryptochrom-Expression	15
1.3.1.4	Funktionsweise und Signaltransduktion der Cryptochrome	16
1.3.1.4.1	Das erste Ereignis der Signalweiterleitung	16
1.3.1.4.2	Die C-terminale Extension	16
1.3.1.4.3	Cryptochrom-Lokalisation und DNA-Bindung	17
1.3.1.4.4	Physikalische Interaktionspartner und Signalkomponenten der <i>Arabidopsis</i> Cryptochrome	18
1.3.1.5	Die Rolle der Cryptochrome in der Photomorphogenese	22
1.3.1.6	Die Rolle der Cryptochrome und Phytochrome in der Blühinduktion	23
1.3.1.7	Cryptochrome und die circadiane Uhr	24
1.3.1.7.1	Funktion der Cryptochrome und Phytochrome in der circadianen Uhr von Pflanzen	24
1.3.1.7.2	Funktionen der Cryptochrome in der circadianen Uhr von Tieren	25
1.3.1.8	Die Evolution der Cryptochrom/Photolyase-Familie	27
1.3.2	Die Phototropine	27
1.3.2.1	Aufbau der Phototropine und Lokalisation	28
1.3.3	Prokaryotische Blaulichtrezeptoren	29
1.4	ZIELSETZUNG	31

2	MATERIAL UND METHODEN	32
2.1	MATERIAL	32
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	32
2.1.2	Fotomaterialien	32
2.1.3	Antibiotika	33
2.1.4	Pflanzenhormone	33
2.1.5	Häufig verwendete Medien, Puffer und Lösungen	33
2.1.6	Verwendete Enzyme	35
2.1.6.1	Restriktionsenzyme	35
2.1.6.2	Weitere Enzyme für die Molekularbiologie	35
2.1.7	Kits	36
2.1.8	Modellorganismen dieser Arbeit	36
2.1.8.1	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	36
2.1.8.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	37
2.1.9	Stämme und <i>Arabidopsis</i> -Linien	38
2.1.9.1	<i>E.-coli</i> -Stämme	38
2.1.9.2	<i>Synechocystis</i> -sp.-PCC-6803-Stämme	39
2.1.10	Ausgangsplasmide	40
2.1.11	Oligonukleotide und Zwischenplasmide	41
2.1.12	Weitergehende Plasmid-Konstruktionen	44
2.1.12.1	Konstrukt für die Überproduktion von ORF sll1629 in <i>E. coli</i>	44
2.1.12.2	Konstruktion der Kompetitoren für qRT-PCR-Analysen	44
2.1.12.3	Konstruktionen zur <i>in vivo</i> Lokalisation von At5g24850	45
2.1.12.4	Konstruktion des Vektors für Chloroplastenimport-Studien und <i>gel shift</i> assay	45
2.1.12.5	Konstruktionen zur Überproduktion von At-cry3	45
2.1.12.6	Konstruktionen zur Komplementation der <i>Synechocystis cry</i> Mutante mit At-cry3	45
2.1.13	Leuchtröhren	46
2.1.14	Filter für Lichtfelder	47
2.1.15	Filter für Projektoren	47
2.1.16	Eingesetzte Geräte	47
2.2	METHODEN	49
2.2.1	Stamm- und <i>Arabidopsis</i> -Zellkultur-Haltung	49
2.2.1.1	Herstellen einer <i>E.-coli</i> -Vorkultur	49
2.2.1.2	Gefrierkulturen von <i>E.-coli</i> -Zellen	49
2.2.1.3	Reaktivierung einer <i>E.-coli</i> -Gefrierkultur	50
2.2.1.4	Herstellen einer <i>Synechocystis</i> -Flüssigkultur	50
2.2.1.5	Gefrierkulturen von <i>Synechocystis</i> -Zellen	50
2.2.1.6	Reaktivierung einer <i>Synechocystis</i> -Gefrierkultur	50
2.2.1.7	Entsorgung der Bakterienkulturen	51
2.2.1.8	<i>Arabidopsis</i> -Zellkultur	51

2.2.2	Genetische und molekularbiologische Methoden	51
2.2.2.1	Isolierung von Nukleinsäuren	52
2.2.2.1.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> : Minipräparation	52
2.2.2.1.2	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> : Maxipräparation	52
2.2.2.1.3	Präparation genomischer DNA aus <i>Synechocystis</i>	52
2.2.2.1.4	RNA-Isolierung aus <i>Synechocystis</i> -Flüssigkulturen	53
2.2.2.1.5	DNase-I-Verdau einer RNA-Präparation	53
2.2.2.2	Elektrophorese von Nukleinsäuren	53
2.2.2.2.1	Nichtdenaturierende Gelelektrophorese von DNA	53
2.2.2.2.2	Denaturierende Gelelektrophorese von RNA	54
2.2.2.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	55
2.2.2.3.1	Größen- und Konzentrationsbestimmung von DNA über Agarosegele	55
2.2.2.3.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	55
2.2.3	Klonierungstechniken (<i>in vitro</i> Modifikationen von DNA)	56
2.2.3.1	Restriktion von DNA	56
2.2.3.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	56
2.2.3.3	Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente	57
2.2.3.4	Auffüllen überhängender Enden	57
2.2.3.5	Ligation von DNA-Fragmenten	57
2.2.3.5.1	<i>Blunt-end</i> -Ligation	58
2.2.3.5.2	<i>Sticky-end</i> -Ligation	58
2.2.3.6	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen mit der CaCl ₂ -Methode	58
2.2.3.7	Transformation mit Plasmiden	59
2.2.3.7.1.	Überprüfung der Transformationseffizienz	59
2.2.3.8	Transformation und Ligation von PCR-Produkten mit dem TOPO TA Cloning [®] Kit und dem pGEM [®] T-Vector System I Kit	59
2.2.3.9	Transformation von <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	60
2.2.3.10	Polymerase-Ketten-Reaktion – PCR	60
2.2.3.10.1	Ganz-Zell-PCR aus <i>Synechocystis</i> -Zellen	62
2.2.3.10.2	qRT-PCR (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)	62
2.2.4	Biochemische Methoden	62
2.2.4.1	Proteinmengenbestimmung	62
2.2.4.1.1	Erstellen einer BSA-Eichgerade	63
2.2.4.1.2	Proteinmengenbestimmung mit Amidoschwarz	63
2.2.4.1.3	Proteinmengenbestimmung nach Bradford	63
2.2.4.2	SDS-Gelelektrophorese von Proteinen	64
2.2.4.3	Anfärben von SDS-Gelen	65
2.2.4.3.1	Anfärben mit <i>Coomassie</i>	65
2.2.4.3.2	Die Silberfärbung	65
2.2.4.3.3	KCl-Färbung von präparativen Gelen	65
2.2.4.4	Trocknung von Gelen	66
2.2.4.5	Fällung von Proteinen	66
2.2.4.5.1	TCA-Fällung	66
2.2.4.5.2	Ethanol-Fällung	66

2.2.4.6	Konzentration nativer Proteine	67
2.2.4.7	Umpufferung von Proteinen	67
2.2.4.8	Elektro-Elution von Proteinen	67
2.2.4.9	Transfer von Proteinen auf eine Membran (<i>Western Blot</i>)	68
2.2.4.10	Blocken und Waschen	68
2.2.4.11	Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine	68
2.2.4.12	Überexpression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	69
2.2.4.12.1	Optimierung der Proteinexpression	70
2.2.4.12.2	Präparative Proteinexpression	71
2.2.4.13	Herstellen eines <i>E.-coli</i> -Gesamtproteinextraktes	71
2.2.4.14	Gewinnung löslicher Proteine aus <i>E.-coli</i> -Zellen	72
2.2.4.15	Isolierung von Proteineinschlusskörpern ("inclusion bodies")	72
2.2.4.16	Aceton-Extraktion von Proteineinschlusskörpern	73
2.2.4.17	Reinigung 6xHis-markierter Proteine	73
2.2.4.17.1	Aufreinigung unter nativen Bedingungen	73
2.2.4.17.2	Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen	74
2.2.4.18	Untersuchungen auf Photolyaseaktivität	74
2.2.4.18.1	<i>In vitro</i> Photolyase ELISA assay	74
2.2.4.18.2	<i>In vivo</i> Untersuchung	76
2.2.4.19	<i>In vitro</i> Transkription/Translation	76
2.2.4.20	<i>gel mobility shift assay</i>	77
2.2.4.20.1	Radioaktivmarkierung der DNA	77
2.2.4.20.2	Waschen und Aktivitätsbestimmung	77
2.2.4.20.3	<i>Annealing</i> für Doppelstrangproben	78
2.2.4.20.4	<i>gel mobility shift assay</i>	78
2.2.4.20.5	Nichtdenaturierende Gelelektrophorese und Detektion	79
2.2.5	Methoden zur Lokalisation von Proteinen	80
2.2.5.1	Isolierung von Chloroplasten aus <i>Pisum sativum</i>	80
2.2.5.2	Import ³⁵ S-markierter Proteine in Chloroplasten	80
2.2.5.3	Protoplastierung und transiente Transformation einer <i>Arabidopsis</i> -Zellkultur	81
2.2.5.3.1	Herstellung der Protoplasten	82
2.2.5.3.2	Aufarbeitung und Reinigung	82
2.2.5.3.3	Transformation der Protoplasten	82
2.2.5.4	Transiente Transformation von Epidermiszellen von <i>Arabidopsis</i> -Blättern – <i>particle gun bombardment</i>	83
2.2.5.5	Konfokale Mikroskopie (GFP- und Chlorophyll-Visualisierung)	84
2.2.6	Dünnschichtchromatographie	84
2.2.7	Versuch zur <i>psbA3</i> Transkriptinduktion von <i>Synechocystis</i> -Zellen	85
2.2.8	Versuch zur Photoinhibierung von <i>Synechocystis</i> -Zellen	85

3	ERGEBNISSE	86
3.1	SLI1629 AUS SYNECHOCYSTIS – EIN BAKTERIELLES CRYPTOCHROM	86
3.1.1	Das sll1629 Gen und Protein	86
3.1.2	Wachstum und Pigmentzusammensetzung der <i>sll1629</i> Mutante unter verschiedenen Lichtbedingungen	89
3.1.3	<i>Synechocystis</i> Cryptochrom fördert die Phototaxis im Rotlicht	92
3.1.4	In der <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 <i>cry</i> Mutante erfolgt keine UV-B-induzierte <i>de novo</i> D1 Protein Synthese	94
3.1.5	Die <i>Synechocystis sll1629</i> Mutante zeigt veränderte <i>psbA3</i> Induktion unter verschiedenen Lichtbedingungen	95
3.2	EIN DRITTES CRYPTOCHROM AUS ARABIDOPSIS THALIANA?	100
3.2.1	<i>Arabidopsis cry3</i> besitzt hohe Ähnlichkeit zu <i>Synechocystis</i> Cryptochrom	100
3.2.2	<i>Arabidopsis cry3</i> wird <i>in vitro</i> in Erbsenchloroplasten transportiert	103
3.2.3	<i>Arabidopsis cry3</i> wird <i>in vivo</i> in Chloroplasten transportiert	104
3.2.4	<i>Arabidopsis cry3</i> wird in Mitochondrien transportiert	106
3.2.5	<i>Arabidopsis</i> CRY3 trägt FAD als Kofaktor	108
3.2.6	<i>Arabidopsis cry3</i> besitzt keine Photolyaseaktivität	112
3.2.6.1	<i>In vitro</i> Untersuchung	113
3.2.6.2	<i>In vivo</i> Untersuchung	115
3.2.7	<i>Arabidopsis cry3</i> bindet DNA	117
3.2.8	Komplementationsversuch der <i>Synechocystis cry</i> Mutante mit <i>Arabidopsis cry3</i>	118
3.2.9	Phylogenetische Einordnung von <i>Arabidopsis cry 3</i> und <i>Synechocystis cry</i>	119
4	DISKUSSION	121
4.1	DAS SYNECHOCYSTIS CRYPTOCHROM	121
4.1.1	Das <i>Synechocystis</i> sll1629 Gen befindet sich in einem Gencluster	121
4.1.2	Die <i>Synechocystis cry</i> Mutante besitzt keinen offensichtlich vom Wildtyp abweichenden Phänotyp	122
4.1.3	<i>Synechocystis cry</i> ist ein Aktivator der rotlichtvermittelten Phototaxis	123
4.1.4	Das <i>Synechocystis</i> sll1629 Gen kodiert für ein bakterielles Cryptochrom	124
4.1.4.1	<i>Synechocystis cry</i> fördert die UV-B-vermittelte <i>de novo</i> Synthese des D1 Proteins	124
4.1.4.2	Die <i>Synechocystis cry</i> Mutante zeigt veränderte <i>psbA3</i> Induktion unter verschiedenen Lichtbedingungen	125
4.2	EIN DRITTES CRYPTOCHROM AUS ARABIDOPSIS?	127
4.2.1	Das erste Photolyase/Cryptochrom-ähnliche Protein mit Lokalisation in Chloroplasten und Mitochondrien	128
4.2.2	Wie kodiert ein <i>At-CRY3</i> -Transkript für Proteine mit zwei unterschiedlichen Lokalisationen?	130
4.2.3	<i>At-cry3</i> ist ein Flavoprotein	131
4.2.4	<i>At-CRY3</i> kodiert keine Photolyase	132

4.2.5	At-cry3 bindet DNA	133
4.2.6	Die <i>Arabidopsis</i> Cryptochrome: Ein Beispiel für dualen horizontalen Gentransfer	134
4.2.7	Kann At-cry3 die <i>Synechocystis cry</i> Mutante komplementieren?	135
4.2.8	Wozu ein drittes Cryptochrom in <i>Arabidopsis</i> ?	135
5	AUSBLICK	138
6	ZUSAMMENFASSUNG	140
7	LITERATURVERZEICHNIS	142

ANHANG

- A1. LEBENSLAUF**
- A2. DANKSAGUNG**
- A3. ERKLÄRUNG**

II. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
<i>aqua bidest.</i>	Bidestilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BG-11	Nährmedium für die Anzucht von Cyanobakterien
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CCT1	C-Terminus von cry1
CCT2	C-Terminus von cry2
Ci	Curie
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer
cph	Phytochrom aus Cyanobakterien
cry	Cryptochrom
Da	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
<i>ds</i>	doppelsträngig (<i>double stranded</i>)
DTT	Dithiothreitol
E	Einstein
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
g	Gramm
h	Stunde
8-HDF	8-Hydroxy-5-deazaflavin
IEP	Isoelektrischer Punkt
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Km	Kanamycin
l	Liter
LAHG	<i>light activated heterotrophic growth</i>
LB	Nährmedium nach Luria Bertani
M	mol/l
min	Minute

MTHF	N ⁵ N ¹⁰ -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)
NLS	Nuclear Localization Signal
NTP	Nucleotidtriphosphat
OD	Optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
PAS	PER, ARNT, SIM
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
phot	Phototropin
(6-4)-Photoprodukt	Pyrimidin-(6-4)-Pyrimidon-Photoprodukt
phr	Photolyase
phy	Phytochrom
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rf	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen/Minute)
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sp	Spectinomycin
ss	einzelsträngig (<i>single stranded</i>)
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylendiamin
Tris/HCL	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethanhydrochlorid
U	Unit
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

1 Einleitung

Alle Lebensprozesse auf der Erde hängen von der Energie des Sonnenlichts direkt (Photoautotrophie) oder indirekt (Heterotrophie, Chemoautotrophie) ab. Pflanzliche und tierische Organismen sowie der Mensch können mit Hilfe von Pigmenten einschließlich Photorezeptoren bestimmte Strahlungsanteile des Lichts absorbieren. Licht dient in Pflanzen nicht nur als Energie- (Photosynthese), sondern auch als Informationsträger für physiologische und entwicklungsbiologische Prozesse (Batschauer, 1998; Christie und Jenkins, 1996). Licht kann durch seine spektrale Zusammensetzung, die Intensität, die Dauer der Einwirkung, die Richtung des Einfalls und die Schwingungsebene (Polarisation) als Informationsträger wirksam werden. Pflanzen benötigen als sessile Organismen eine verlässliche Information über die wechselnden Umweltbedingungen an ihrem Standort. Um die Wechsel in Qualität, Quantität und Richtung des Lichts zu detektieren, haben Pflanzen mindestens drei verschiedene Photorezeptor-Systeme entwickelt (Übersichtsartikel: Ahmad, 1999; Batschauer, 1998; 1999; Briggs und Olney, 2001): (i) die Rotlichtrezeptoren oder Phytochrome, (ii) die UV-B-Rezeptoren und (iii) die UV-A/Blaulicht-Photorezeptoren, zu denen die Phototropine und die Cryptochrome zählen. Die Cryptochrome und die Photolyasen, DNA-Reparatur-Enzyme, werden oft zur Photolyase/Cryptochrom-Familie zusammengefasst (Kanai *et al.*, 1997).

Quail *et al.* (1994) legten eine Nomenklatur für *Arabidopsis* Phytochrome fest: Wildtyp Gen, *PHY*, mutiertes Gen, *phy*, Apoprotein, *PHY*, und Holoprotein, *phy*. Diese Nomenklatur wurde auch für die *Arabidopsis* Cryptochrome (Lin, 2000a; 2002) und Phototropine übernommen (Briggs *et al.*, 2001).

1.1 Rotlichtrezeptoren – die Phytochrome

Phytochrome kontrollieren Genexpression (Hamazato *et al.*, 1997), Samenkeimung (Botto *et al.*, 1996; Shinomura *et al.*, 1996) und spielen eine wichtige Rolle in der Wahrnehmung der Tageslänge (Johnson *et al.*, 1994). *phyA* (Nagatani *et al.*, 1993; Whitelam *et al.*, 1993) und *phyE* (Hennig *et al.*, 2002) sind essenziell für die Keimlings-Deetiolierung in dunkelrot-angereichertem Licht. Phytochrome beeinflussen viele lichtregulierte Zellstreckungs-Antworten, die Vermeidung von Beschattung durch andere Pflanzen, die Regulierung des Blüh-Zeitpunktes durch die Tageslänge (Devlin *et al.*, 1998; 1999; Reed *et al.*, 1993) und kontrollieren die Pflanzen-Entwicklung (Koornneef *et al.*, 1980; Robson *et al.*, 1993; Botto *et al.*, 1996; Devlin *et al.*, 1996). Übersichtsartikel zur Funktion und Signaltransduktion der

Phytochrome liegen von Fankhauser, 2001; Kevei und Nagy, 2003; Kim *et al.*, 2002; Møller *et al.*, 2002; Nagy und Schäfer, 2002; Schäfer und Bowler, 2002; Smith, 2000 und Vierstra und Davis, 2000, vor. In Kap. 1.3.1.4 ist die Rolle der Phytochrome bei der Blühinduktion, der Kontrolle der circadianen Rhythmik und die Coaktion mit den Cryptochromen näher beschrieben.

1.1.1 Vorkommen, Chromophor, Expression und Lokalisation der Phytochrome

Phytochrome kommen in allen untersuchten Höheren und Niederen Pflanzen (Mathews und Sharrock, 1997; Mathews und Donoghue, 1999; Suetsugu und Wada, 2003) und in Prokaryoten (Vierstra und Davis, 2000) vor. In Höheren Pflanzen sind Phytochrome durch kleine Genfamilien kodiert; in *Arabidopsis* wurden fünf Gene, *PHYA* bis *PHYE*, identifiziert (Clack *et al.*, 1994; Sharrock und Clack, 2002). Der Chromophor ist das lineare Tetrapyrrol Phytychromobilin (Lagarias und Rapoport, 1980), das über eine Thioesterbindung mit einem konservierten Cystein in dem Protein verknüpft ist. Die Bilin-Bindung an die Apophytochrome erfolgt autokatalytisch (Elich und Lagarias, 1989). Im Dunkeln werden Phytochrome in ihrer inaktiven, Rotlicht (R)-absorbierenden Pr-Form synthetisiert. Nach Absorption von Rotlicht führt eine Z- zu E-Isomerisierung der C15-Doppelbindung zwischen Ring C und D des Tetrapyrrols zu einem Kofaktor, der daraufhin dunkelrotes (FR) Licht absorbieren kann (Rüdiger, 1994). Mit der Isomerisierung des Chromophors gehen Konformationsänderungen im Proteinrückgrat einher (Furuya und Song, 1994), wodurch die weitere Signaltransduktion beeinflusst wird. Die aktive, Dunkelrot (FR)-absorbierende Pfr-Form wird nach Dunkelrot-Absorption oder Dunkelreversion in die Pr-Form zurückkonvertiert. Da Sonnenlicht mehr Rot- als Dunkelrotlicht enthält, überwiegt die Pfr-Form. Phytochrome sind in zwei Gruppen eingeteilt: in den lichtlabilen Typ I (*phyA* in *Arabidopsis*) und den lichtstabilen Typ II (*phyB-phyE* in *Arabidopsis*) (Hirschfeld *et al.*, 1998). Alle fünf Mitglieder der Phytychrom-Familie werden exprimiert (Goosey *et al.*, 1997; Sharrock und Clack, 2002; Somers und Quail, 1995). Die Prozentverhältnisse von *PhyA:B:C:D:E* sind in etiolierten Keimlingen 85:10:2:1.5:1.5 und in mit Weißlicht bestrahlten Keimlingen 5:40:15:15:25 (Sharrock und Clack, 2002).

Die Regulation ihrer subzellulären Lokalisation ist möglicherweise ein bedeutender Schritt der Regulierung der biologischen Aktivität von Phytychromen (Nagy und Schäfer, 2000). In etiolierten Keimlingen und dunkeladaptierten Zellkulturen sind *phyA* und *phyB* im Zytoplasma lokalisiert. Die Phytychrome werden unter den Lichtbedingungen in den Zellkern transportiert, unter denen sie auch biologisch aktiv sind (Gil *et al.* 2000; Kim *et al.*, 2000; Kircher *et al.*, 1999; 2002; Yamaguchi *et al.*, 1999).

1.1.2 Domänen-Aufbau der Phytochrome

Eukaryotische Phytochrome existieren als Homodimere, die aus zwei ca. 125 kDa Polypeptidketten bestehen. Jedes Monomer trägt den kovalent gebundenen Tetrapyrrol-Chromophor in der hoch konservierten 60 kDa N-terminalen photonsensorischen „Eingabe“-Domäne (mehr als 50 % Sequenz-Identität zwischen den Proteinen) und die Dimerisierungs-Domänen in der weniger konservierten C-terminalen regulatorischen „Ausgabe“-Domäne. (Abb. 1.1; Montgomery und Lagarias, 2002). Die C-terminale Regulator-Region der eukaryotischen Phytochrome besitzt zwei regulatorische Unterdomänen, die sehr wichtig für die Weiterleitung des Lichtsignals sind. Diese sind eine PAS-verwandte Domäne (PRD; PAS related domain), die zwei PAS *repeats* (R1 und R2) enthält, und eine Histidin-Kinase-verwandte Domäne (HKRD; histidine kinase related domain; R3 und R4). Die HKRD-Untereinheiten R3 und R4 sind den ATP-bindenden und Histidin-Phosphotransferase-Untereinheiten aus bakteriellen Zwei-Komponenten Sensor-Proteinen (Schneider-Poetsch *et al.*, 1991) ähnlich. PAS-Domänen wurden ursprünglich in Mitgliedern der basischen Helix-Loop-Helix (bHLH) PAS-Familie von eukaryotischen Transkriptions-Faktoren identifiziert (Taylor und Zhulin, 1999). Dazu gehören PER (*period*) aus *Drosophila*, ARNT (aromatischer Kohlenwasserstoff-Rezeptor Zellkern-Translokator) aus Vertebraten und SIM (*single minded*) aus *Drosophila* (Ponting und Aravind, 1997). Die Funktion von PAS-Domänen schließt die Liganden-Bindung, die Protein-Protein-Interaktion, die Bindung von Kofaktoren zur Detektion von Licht und die Wahrnehmung von Sauerstoff und/oder Redoxstatus ein (Taylor und Zhulin, 1999). Durch Domänen-Austausch-Experimente wurde gezeigt, dass die C-terminalen Hälften von phyA und phyB aus *Arabidopsis* austauschbar sind und in der Signalweiterleitung involviert sind, wobei die N-Termini für die Lichtabsorption und die Licht-Qualitäts-Spezifität verantwortlich sind (Quail *et al.*, 1995).

Fast alle bekannten Pflanzen-Phytochrome haben einen Domänen-Aufbau wie eben beschrieben. Ausnahmen hiervon sind Phytochrom 3 (auch als Superchrom bekannt) aus dem Farn *Adiantum capillus-veneris* (Nozue *et al.*, 1998) und Phytochrom 1 aus dem Moos *Ceratodon purpureus* (Thummler *et al.*, 1995). In Prokaryoten, im Speziellen Cyanobakterien, ist die Diversität im Aufbau der Domänen von phytochromähnlichen Proteinen viel größer als im Pflanzenreich (Abb. 1.1).

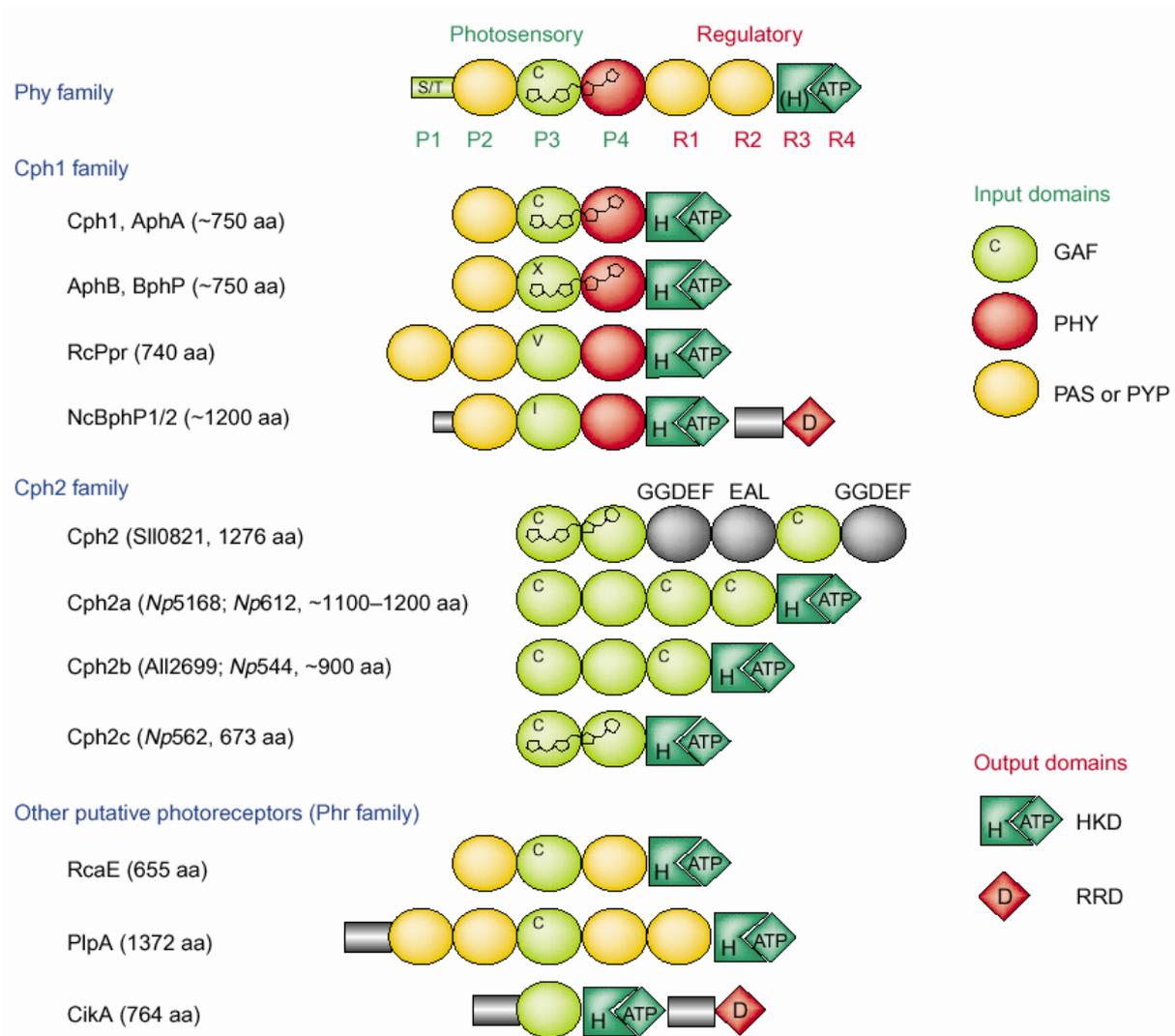


Abb. 1.1: Domänen-Organisation der Phytochrome und der mit Phytochrom verwandten Proteine (Montgomery und Lagarias, 2002). Die Photosensor- und Regulator-Domänen der eukaryotischen Phytochrome sind jeweils aus vier Unterdomänen zusammengesetzt: den P1-, P2-, P3- (Bilinlyasedomänen, BLD) und P4- (Phytochrom-Domäne, PHY) Domänen in der Photosensor-Region und den R1- bis R4-Domänen in der Regulator-Region. Orthologe und paraloge Domänen sind in den Cph1-, Cph2- und phytochromähnlichen Familien in gleichen Farben dargestellt. Der Chromophor ist bei den Familienmitgliedern eingezeichnet, wo er nachgewiesen wurde. Abkürzungen: C, Cysteinrest; D, Aspartat-Rest; GAF, Domäne in Vertebraten cGMP-spezifischen Phosphodiesterasen und in cyanobakteriellen Adenylat-Cyclasen; H, Histidin-Rest; HKD, Histidinkinasedomäne; PAS, Domäne in PER, ARNT und SIM; RRD, Responsregulator-Domäne; X, variabler hydrophober Rest; S/T, Serin oder Threonin-Rest.

1.1.3 Bakterielle Phytochrome und deren Funktion

Bis zu der Arbeit von Kehoe und Grossman (1996), in der die erste prokaryotische phytochromähnliche Sequenz, *rcaE*, aus dem Cyanobakterium *Fremyella diplosiphon* identifiziert wurde, wurde angenommen, das Vorkommen von Phytochromen sei auf Pflanzen und Cryptogamen beschränkt (Kolukisaoglu *et al.*, 1995; Lagarias *et al.*, 1995). Mittlerweile sind viele phytochromähnliche Sequenzen aus anderen Cyanobakterien, aus Purpurbakterienarten und auch aus nicht-photosynthetischen Eubakterien wie *Deinococcus* und *Pseudomonas* identifiziert (Übersichtsartikel: Vierstra und Davis, 2000). Die Entdeckung von prokaryotischen Phytochromen in Cyanobakterien (Hughes *et al.*, 1997) und Eubakterien (Davis *et al.*, 1999) und ihre Aktivität als lichtregulierte Histidinkinasen (Hughes und Lamparter, 1999; Yeh *et al.*, 1997) trieben weitere Studien zur Untersuchung einer Kinasefunktion von Phytochromen voran. Montgomery und Lagarias (2002) zeigten, dass *phyA* Ser/Thr-Kinase-Aktivität besitzt. In Übereinstimmung damit haben Cashmore und Kollegen gezeigt, dass Hafer *phyA in vitro* rekombinantes CRY1 und CRY2 spezifisch an Serin-Resten phosphorylieren kann (Ahmad *et al.*, 1998c). Als weitere wichtige Konsequenz zeigen diese Arbeiten, dass prokaryotische Phytochrome den phylogenetischen Ursprung für Pflanzen-Phytochrome darstellen. Für einige Bakteriophytochrome wurde ihre Funktion durch genetische Studien herausgefunden, für andere bleibt die Funktion bislang unklar, vielleicht weil diese Bakterien, wie Höhere Pflanzen, mehrere Phytochrome und mehrere Photorezeptoren mit überlappenden Funktionen besitzen.

Fremyella diplosiphon RcaE: *Fremyella* antwortet auf wechselnde Lichtintensität und -Qualität durch Variierung der Biliprotein-Zusammensetzung der Phycobilisomen. Dieses Phänomen wird auch als komplementäre chromatische Adaptation (CCA) bezeichnet. In *rcaE* Mutanten ist die Expression von Phycocyanin- und Phycoerythrin-Operonen unreguliert (Kehoe und Grossman, 1996).

In ***Rhodospirillum centenum Ppr*** Mutanten ist die lichtinduzierte Chalkonsynthase (*CHS*) Expression reduziert (Jiang *et al.*, 1999).

Synechocystis elongatus PCC 7942 CikA wurde als ein Protein identifiziert, das für das Stellen der circadianen Uhr in Antwort auf Licht verantwortlich ist (Schmitz *et al.*, 2000). Weil *CikA* jedoch der konservierte Cystein- oder Histidinrest fehlt, der ein Bilin binden könnte, ist seine Rolle als Photorezeptor nicht sicher (Schmitz *et al.*, 2000).

In der Gesamtsequenz von ***Deinococcus radiodurans*** konnte **BphP** als einziges phytochromähnliches Gen identifiziert werden. Daher bietet BphP die Möglichkeit, einen Organismus mit nur einem Phytochrom zu studieren und dies ohne Einflüsse durch die

Photosynthese. BphP reguliert die Carotenoid-Biosynthese, und die Mutante wächst langsamer in höheren Lichtintensitäten (Davis *et al.*, 1999).

***Synechocystis* sp. PCC 6803 plpA** (phytochrome like protein A) ist am nächsten verwandt zu RcaE aus *Fremyella*. Da *Synechocystis* keine CCA besitzt, muss plpA eine andere Funktion haben. Mutanten wachsen unter photoheterotrophen Bedingungen normal. Photoautotroph können sie sowohl im Weiß- als auch im Rotlicht, nicht aber im Blaulicht wachsen (Wilde *et al.*, 1997). Warum ein putatives R/FR-absorbierendes Pigment eine Blaulicht-Antwort reguliert, ist unklar.

Obwohl ***Synechocystis* sp. PCC 6803 Cph1** (cyanobacterial phytochrome 1; ORF slr0473) sehr gut biochemisch untersucht wurde (Hübschmann *et al.*, 2001; Hughes *et al.*, 1997; Lamparter *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2000; Sineshchekov *et al.*, 2002), ist wenig über seine biologische Funktion bekannt. Cph1 besteht aus einer Bilinlyasedomäne (BLD) und einer Histidinkinasedomäne. Cph1 autophosphoryliert lichtabhängig und phosphoryliert den Responsregulator Rcp1 (*response regulator for cyanobacterial phytochrome 1*) (Yeh *et al.*, 1997). Weder die Insertionsmutagenese von Cph1 noch die von Rcp1 zeigte bisher einen Phänotyp (Hughes und Lamparter, 1999; Garcia-Dominguez *et al.*, 2000).

***Synechocystis* sp. PCC 6803 Cph2** besitzt keine Histidinkinasedomäne, aber zwei Bilinlyasedomänen (Wu und Lagarias, 2000), wobei die N-terminale Domäne für die Photochromizität verantwortlich ist, aber interessanterweise stärkere Absorption im Blau- als im Rotlicht hat (Wu und Lagarias, 2000). Cph2 besitzt zwei GGDEF-Domänen (Abb. 1.1). GGDEF-Domänen sind putative Diguanylat-Cyclasen (Übersichtsartikel: Galperin *et al.*, 2001), sie könnten also c-diGMP, ein Effektor-Molekül (Ross *et al.*, 1991), synthetisieren. Cph2 inhibiert die Phototaxis im Blaulicht (Wilde *et al.*, 2002).

***Synechocystis* TaxD1 (PisJ)** besitzt Domänen mit Ähnlichkeit zu Bakteriophytochromen und einem Methyl-akzeptierendem Chemorezeptor und vermittelt positive Phototaxis (Bhaya *et al.*, 2001; Ng *et al.*, 2003; Yoshihara *et al.*, 2000).

1.2 DNA-Reparaturenzyme – die Photolyasen

Schäden an der DNA entstehen oft durch endogene Faktoren wie reaktive Sauerstoff-Radikale (Carell und Epple, 1998), die infolge von metabolischen Prozessen, durch exogene Faktoren wie bestimmte Chemikalien, durch γ - oder UV-Strahlung gebildet werden. UV-Strahlung induziert oxidativen Schaden (Pyrimidin-Hydrate) und *crosslinks* zwischen DNA und Protein bzw. DNA und DNA. Die überwiegenden Schäden unter den gegebenen Umweltbedingungen jedoch sind die durch UV-B (280-320 nm) verursachten DNA-Schäden wie Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPDs) und Pyrimidin-(6-4)-Pyrimidon-Photoprodukte ((6-4)-Photoprodukte) (Hwang *et al.*, 1996; Kanai *et al.*, 1997; Sancar, 1994; Sancar, 2000), wobei erstere ca. 75 % der Schäden repräsentieren. Die DNA-Schäden entstehen durch kovalente Brückenbildung zwischen zwei benachbarten Pyrimidinen (Abb. 1.2).

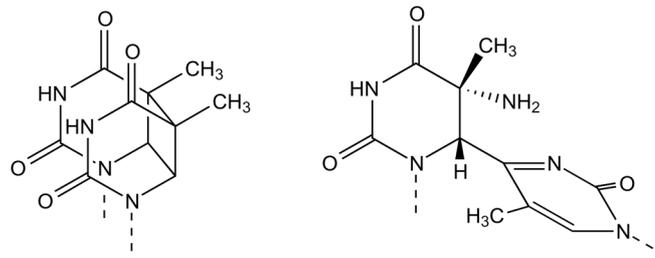


Abb. 1.2: Beispiele durch UV-Licht induzierter Photoprodukte (Britt, 1999). Auf der linken Seite ist ein Cyclobutan-(T-T)-Dimer und auf der rechten Seite ein Pyrimidin-[6-4]-Pyrimidon-(T-C)-Dimer dargestellt. Die Dimere werden durch benachbarte Basen desselben DNA-Stranges gebildet.

Solche Schäden hemmen die DNA-Replikation und Transkription, sind mutagen und potenziell letal (Sancar, 1994). Sie können durch komplizierte Reparatur-Mechanismen, wie z. B. die Nukleotidexzisions-Reparatur behoben werden (Carell und Epple, 1998; O'Brien und Houghton, 1982). Es gibt jedoch Reparaturmechanismen, bei denen nur ein Protein benötigt wird, das den Schaden erkennt und repariert. Zu den Proteinen, die einen DNA-Schaden direkt revertieren können, gehören die O^6 -Methylguanin-DNA-Reparatur-Methyltransferasen, die *Bacillus subtilis* Sporen-Photoprodukt-Lyase (Xue und Nicholson, 1996) und die Photolyasen (Übersichtsartikel: Britt, 1999; Carell *et al.*, 2001; Sancar, 1994; Sancar, 2000).

Die effiziente Reparatur von DNA ist für alle Organismen von großer Bedeutung, aber besonders für Pflanzen, da diese für die Photosynthese stets dem Sonnenlicht ausgesetzt sein müssen. Die CPDs und (6-4)-Photoprodukte werden von den Photolyasen durch gleichzeitiges oder nachfolgendes Belichten im nahen UV und Blaulicht (300-500 nm)

repariert (Sancar, 1994; Todo *et al.*, 1996). Dieser Reparaturmechanismus wird Photoreaktivierung genannt und wurde in Spezies von allen drei Reichen (Archaea, Bakterien und Eukaryoten) gefunden, aber fehlt in vielen Arten, einschließlich dem Menschen (Li *et al.*, 1993).

Photolyasen sind monomere Proteine einer Größe von 55 bis 65 kDa. Entsprechend der UV-Schäden gibt es zwei Typen von Photolyasen: die CPD-Photolyasen und die (6-4)-Photolyasen (Kanai *et al.*, 1997). Die Aminosäuresequenzen der beiden Photolyase-Typen sind sich ähnlich (Todo *et al.*, 1996), obwohl die chemische Struktur ihrer Substrate unterschiedlich ist.

1.2.1 Die CPD-Photolyasen

Die CPD-Photolyasen sind aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in zwei Unterklassen eingeteilt, die Klasse-I- und die Klasse-II-Photolyasen (Yasui *et al.*, 1994; Kanai *et al.*, 1997). Zu den Klasse-I-Photolyasen („mikrobielle Photolyasen“) gehören die meisten Photolyasen aus Mikroorganismen und einzelligen Eukaryoten wie z. B. dem Eubakterium *E. coli* (Johnson *et al.*, 1988), dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Hitomi *et al.*, 2000) und der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Sancar *et al.*, 1985). Die Klasse-II-Photolyasen („Metazoen-Photolyasen“) umfassen größtenteils die Photolyasen höherer Eukaryoten (Todo *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1997), wie z. B. der Höheren Pflanze *Arabidopsis thaliana* (Landry *et al.*, 1997), der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Yasui *et al.*, 1994), dem Goldfisch *Carassius auratus* (Yasuhira und Yasui, 1992) und dem nichtplazentalen Säuger *Monodelphis domestica* (Yasui *et al.*, 1994). Hier sind allerdings schon drei Ausnahmen bekannt: die Photolyasen aus dem Eubakterium *Myxococcus xanthus* (O’Conner *et al.*, 1996), dem Archaeobakterium *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Yasui *et al.*, 1994) und dem *Fowlpox* Virus (Srinivasan *et al.*, 2001).

1.2.1.1 Kofaktoren der CPD-Photolyasen

CPD-Photolyasen besitzen stöchiometrische Mengen zweier Kofaktoren (Jorns *et al.*, 1984). Einer dieser Kofaktoren ist ein am C-Terminus des Apoproteins nicht kovalent gebundenes Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD; Iwatsuki *et al.*, 1980; Sancar und Sancar, 1984). Ein zweiter, N-terminal gebundener, Kofaktor ist entweder das Folat Methenyltetrahydropteroylpolyglutamat (die Anzahl der Glutamate variiert von 3-6 oder selten 8; Johnson *et al.*, 1988) oder das Deazaflavin 8-Hydroxy-7,8-Didemethyl-5-Deazariboflavin (Eker *et al.*, 1981). Der zweite Kofaktor ist nicht kovalent am Aminoende des Apoproteins

gebunden und dient als Photoantenne (Übersichtsartikel: Hearst, 1995; Sancar, 1994; Sancar, 2000). Je nachdem, welcher Kofaktor als Photoantenne dient, sind die CPD-Photolyasen noch einmal in zwei Untergruppen eingeteilt: die MTHF-Photolyasen mit Absorptionsmaximum bei 360-390 nm und die 8-HDF Photolyasen mit Absorptionsmaximum bei 430-450 nm (Yasui *et al.*, 1994). Enzyme aus *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus firmus* (Übersichtsartikel: Kanai *et al.*, 1997) und *Arabidopsis thaliana* (Waterworth *et al.*, 2002) gehören zur Folat-Klasse, die aus *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Anacystis nidulans*, *Streptomyces griseus* und *Halobacterium halobium* zur Deazaflavin-Klasse (Übersichtsartikel: Kanai *et al.*, 1997).

1.2.1.2 Das Apoenzym

Sequenzvergleiche unter den Photolyasen haben ergeben, dass die N-terminale Domäne weniger stark konserviert ist. Jedoch haben in dieser Region Photolyasen mit demselben zweiten Kofaktor untereinander eine höhere Sequenzähnlichkeit als Enzyme aus zwei verschiedenen Klassen. Die letzten 150 Aminosäuren der C-terminalen Domäne hingegen sind unter allen Mitgliedern höher konserviert (30 % Identität). Beide, die N- und C-terminalen Domänen, binden unspezifisch DNA. Spezifische Bindung von geschädigter DNA als Substrat benötigt den Apoenzym-FAD-Komplex (Payne *et al.*, 1990).

1.2.1.3 Reaktionsmechanismus der CPD-Photolyasen

Photolyasen agieren als einfache Michaelis-Menten-Enzyme mit der Besonderheit, dass die Katalyse durch Licht initiiert wird. Der Reaktionsmechanismus wurde im Detail für die *E. coli* Photolyase, eine Klasse-I-CPD-Photolyase, aufgeklärt (Abb. 1.3; Übersichtsartikel: Sancar, 1994). Die Photolyase bindet zunächst in einer lichtunabhängigen Reaktion an die DNA. Wegen des Vorteils eines höheren Extinktions-Koeffizienten ist der primäre Absorber der zweite Chromophor (8-HDF oder MTHF). Die absorbierte Lichtenergie wird strahlungslos durch Förster Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf FADH⁻ übertragen. Das angeregte FADH₂-Radikal überträgt ein Elektron auf das CPD; dadurch entsteht ein neutrales Flavin-Radikal und ein Pyrimidindimer-Anion. Dieses Dimer-Anion zerfällt spontan, der Cyclobutanring wird gespalten. Am Ende wird ein Elektron zurück auf FADH übertragen und die Photolyase von der nun intakten DNA abgelöst. Direkt durch das Flavin absorbiertes Licht kann auch die **Photolyse** einleiten (Payne *et al.*, 1990), allerdings mit einer niedrigeren photochemischen Effizienz (Jorns *et al.*, 1987).

Die Photolyase mit einem oxidierten oder dem semireduzierten FAD als Kofaktor ist inaktiv. Jedoch können diese beiden Zustände des Flavins zur aktiven reduzierten Form durch Bestrahlung mit Licht im sichtbaren oder UV-A-Bereich photoreduziert werden. Dieser Prozess wird **Photoaktivierung oder Photoreduktion** genannt. Das Elektron wird von einem spezifischen Tryptophanrest (Trp306 in *E. coli*) geliefert (Li *et al.*, 1991), und wahrscheinlich verläuft die Elektronenübertragung über zwei andere Tryptophan-Reste (Trp382 und Trp359; Aubert *et al.*, 2000). Es wurde beobachtet, dass das Apoenzym auch etwas Photolyaseaktivität im UV einer Wellenlänge von 280 nm besitzt. Diese ist durch einen weiteren Tryptophanrest (Trp277 in *E. coli*) vermittelt (Kim *et al.*, 1992).

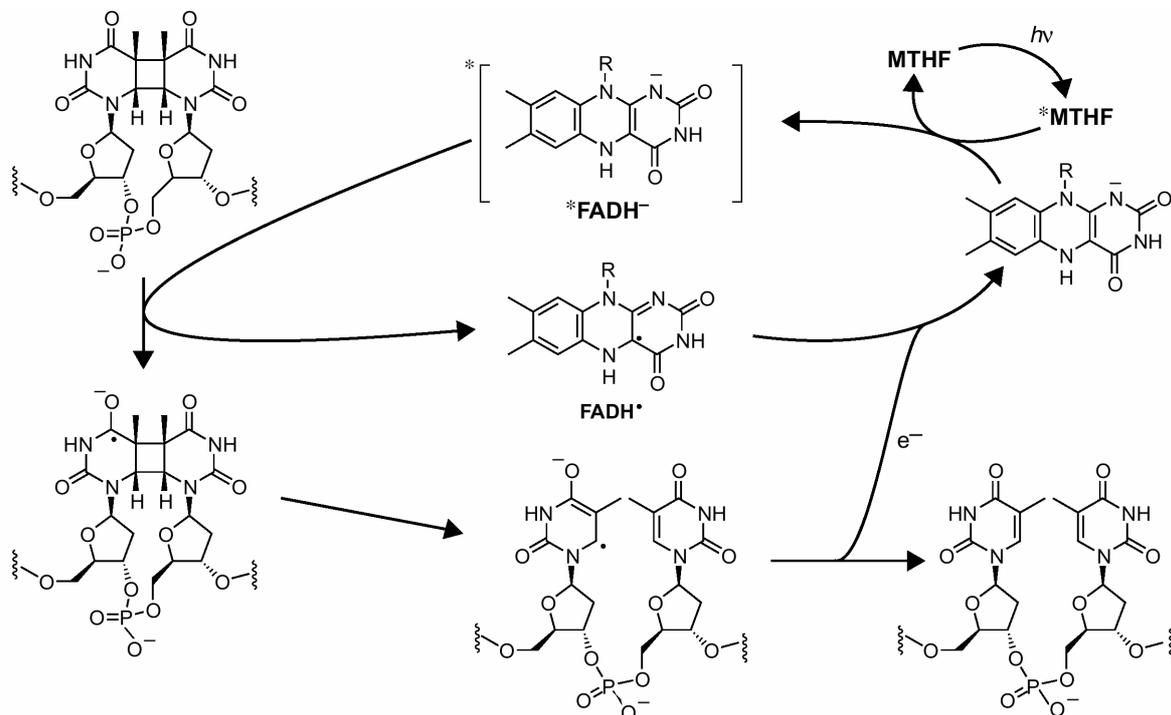


Abb. 1.3: Reparaturmechanismus einer Klasse-I-CPD-Photolyase (Carell *et al.*, 2001). Der zweite Kofaktor (hier MTHF) absorbiert Licht und überträgt die Anregungsenergie via Förster Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf das reduzierte und deprotonierte Flavinderivat. Nachfolgender Elektronen-Transfer auf das Dimer leitet den Cycloreversionsprozess ein.

Außer der Erkenntnis, dass die Klasse-II-CPD-Photolyasen die gleichen Kofaktoren wie die Klasse-I-Photolyasen besitzen (Kim *et al.*, 1996; Waterworth *et al.*, 2002), gibt es zum Reaktionsmechanismus der Klasse-II-CPD-Photolyasen weder biochemische noch spektroskopische Daten. Aus Aminosäuresequenz-Vergleichen geht hervor, dass Aminosäurereste, die in den Klasse-I-CPD-Photolyasen an der FAD- und Substratbindung beteiligt sind, auch in den Klasse-II-Photolyasen konserviert sind (Yasui und Eker, 1998). Auch sind die für die Photoreduktion der Klasse-I-Photolyase essenziellen Tryptophanreste

in allen untersuchten Klasse-II-Photolyasen vorhanden. Zusammen mit der Tatsache, dass auch in den Klasse-II-CPD-Photolyasen das FAD in seiner vollständig reduzierten Form vorliegt, lässt sich ableiten, dass Photolyasen beider Klassen eine sehr ähnliche dreidimensionale Struktur besitzen sollten, und der Mechanismus der DNA-Reparatur der gleiche sein könnte (Yasui und Eker, 1998).

1.2.1.4 Photolyase-Kristallstrukturen und Substraterkennung

Es liegen Kristallstrukturen der Klasse-I-CPD-MTHF-*E.-coli*-Photolyase (Park *et al.*, 1995), der Klasse-I-CPD-8-HDF-*Anacystis-nidulans*-Photolyase (Tamada *et al.*, 1997) und der Klasse-I-CPD-Photolyase aus *Thermus thermophilus* (ein zweiter Kofaktor wurde bisher nicht bestimmt; Komori *et al.*, 2001) vor. Alle Enzyme besitzen eine ähnliche Faltung und ähnliche FAD- und putative Substratbindungsstellen, obwohl sie unterschiedliche Antennenpigmente besitzen. Die Enzyme bestehen aus einer N-terminalen α/β - und einer C-terminalen helikalen Domäne. Ein *loop* verläuft um die α/β -Domäne und verbindet diese mit der helikalen Domäne. In diesem *loop* liegen die größten strukturellen Unterschiede zwischen den Enzymen. Die 3-D-Struktur der *T. thermophilus* Photolyase ist kompakter und weniger flexibel als die der beiden anderen Photolyasen und könnte so die Thermostabilität vermitteln (Komori *et al.*, 2001). Das FAD wird in der helikalen Domäne gebunden und nimmt in allen Proteinen eine ungewöhnliche, U-förmige Konformation ein. Es befindet sich am Boden eines Hohlraumes, der von Aminosäureresten gesäumt wird, die essenziell für die Aktivität des Enzyms sind. Nahezu alle FAD-Bindungsstellen sind konserviert. Die Bindungsstellen für den zweiten Chromophor befinden sich in den *E. coli* und *A. nidulans* Enzymen an der Grenzfläche zwischen der α/β - und der helikalen Domäne; für die *T. thermophilus* Photolyase wurde kein zweiter Chromophor gefunden (Kato *et al.*, 1997; Komori *et al.*, 2001).

Die Photolyase ist ein strukturspezifisches DNA-Bindungsprotein, dessen Spezifität durch die Rückgratstruktur der DNA an der Bindungsstelle bestimmt ist, im Gegensatz zu den sequenzspezifischen DNA-Bindungsproteinen (Husain *et al.*, 1987). Doch welche Aminosäuren tragen zur hohen Bindungsaffinität und -spezifität bei? Baer und Sancar (1993) haben herausgefunden, dass Alanin-Substitution der Aminosäuren Lys517, Arg507 und Trp387 im Hefe-Enzym die spezifische Bindung um das zehnfache bis 100fache reduziert, während die unspezifische Bindung zu ungeschädigter DNA nur etwa zehnfach reduziert ist. Lys517 und Arg507 könnten mit einer DNA-Rückgratstruktur interagieren, die kennzeichnend für ein Pyrimidin-Dimer ist, und so zur Substrat-Unterscheidung beitragen (Baer und Sancar, 1993). Dieses Modell bekam weitere Unterstützung, als die molekularen Strukturen der

E. coli (Park *et al.*, 1995) und der *A. nidulans* (Tamada *et al.*, 1997) Photolyasen gelöst wurden. Lys517 und Arg507, bzw. Lys407 und Arg397 im *E. coli* Enzym, liegen in einem Band von positivem elektrostatischen Potenzial, das sich am Eingang des FAD-Hohlraumes auf der Oberfläche des Proteins befindet. Dieses Band könnte den Kontakt mit dem Phosphatrückgrat des DNA-Stranges herstellen. Der Hohlraum, der das Band unterbricht, stellt den einzigen Zugang von der Oberfläche des Proteins zum Flavin-Chromophor dar, der sonst in dem hydrophoben Kern des Proteins vergraben ist. Da effizienter Elektronen-Transfer von FADH⁻ zum Dimer für eine effiziente Photolyse nötig ist, schlugen Deisenhofer und Mitarbeiter (Park *et al.*, 1995) vor, dass das Band des positiven elektrostatischen Potenzials und der Hohlraum, der zum Flavin führt, die DNA-Bindungsstelle der Photolyase ist, und dass im Enzym-Substrat-Komplex das Dimer aus der DNA-Helix herausgedreht ist und im Kontakt mit dem Hohlraum steht. Weitere Unterstützung für das Dimer-*flipping*-Modell gibt es durch einige computergestützte Studien (Antony *et al.*, 2000; Hahn *et al.*, 1999; Medvedev und Stuchebrukhov, 2001; Sanders und Wiest, 1999; Vande Berg und Sancar, 1998; van Noort *et al.*, 1999) und die Kristallstruktur des *T. thermophilus* Enzyms, das ein Thymin als Substrat gebunden hat (Komori *et al.*, 2001).

1.2.2 Die (6-4)-Photolyasen

1993 wurde eine lichtabhängige, für (6-4)-Photoprodukte spezifische Reparatur in *Drosophila* durch Todo *et al.* (1993) entdeckt. (6-4)-Photolyasen wurden mittlerweile aus *Drosophila melanogaster* (Todo *et al.*, 1996), dem Krallenfrosch *Xenopus laevis* (Todo *et al.*, 1997), *Arabidopsis thaliana* (Nakajima *et al.*, 1998) und dem Zebrafisch *Danio rerio* (Kobayashi *et al.*, 2000) kloniert. Beim Menschen und bei Bakterien wie *E.coli* scheint keine (6-4)-Photolyase zu existieren (Kim *et al.*, 1994; Todo *et al.*, 1993).

Die (6-4)-Photolyasen aus *Drosophila*, *Xenopus* und *Arabidopsis* tragen, wie die CPD-Photolyasen, FAD als nicht kovalent gebundenen Kofaktor (Zhao *et al.*, 1997; Todo *et al.*, 1997; Nakajima *et al.*, 1998). Über einen weiteren Chromophor ist bisher nichts bekannt. Die (6-4)-Photolyasen sind auf Aminosäureebene zu ungefähr 20 % identisch mit den Klasse-I-CPD-Photolyasen, nicht viel weniger als die Sequenzübereinstimmung der Klasse-I-CPD-Photolyasen untereinander (Todo, 1999). Der aktive Zustand des FAD in der (6-4)-Photolyase ist die vollständig reduzierte Form. Daher wird ein Elektronentransfer vom reduzierten Flavin auf das (6-4)-Photoprodukt im Reaktionsmechanismus der (6-4)-Photolyasen als wahrscheinlich angesehen (Todo, 1999). So könnten (6-4)-Photolyasen eine ähnliche Struktur und einen ähnlichen Reaktionsmechanismus wie die CPD-Photolyasen haben (Todo, 1999).

1.3 UV-A/Blaulichtrezeptoren

Blaulicht ist für viele unterschiedliche pflanzliche Entwicklungs- und Bewegungsprozesse wie den Phototropismus (Galland und Lipson, 1987; Liscum und Briggs, 1995), das Hypokotylwachstum (Ahmad *et al.*, 1995; Jackson und Jenkins, 1995) und die Öffnung der Stomata (Kinoshita und Shimazaki, 1999) verantwortlich. Auch die Phototaxis bei Algen und Cyanobakterien wie *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Choi *et al.*, 1999; Ng *et al.*, 2003; Wilde *et al.*, 2002), Blattbewegung bei *Phaseolus vulgaris* (Nishizaki, 1995) und Seitenverzweigung der Protonemata des Mooses *Physcomitrella* (Imaizumi *et al.*, 2002) werden durch Blaulicht reguliert. Blaulicht aktiviert die Expression von Photosynthese-Genen bei Pflanzen (Hoffer und Christopher, 1997; Thum *et al.*, 2001) und Cyanobakterien (El Bissati und Kirilovsky, 2001; Tsinomeras *et al.*, 1994; Tyystjärvi *et al.*, 2002) und die Expression des Chalkonsynthase-Gens in Pflanzen (Batschauer *et al.*, 1991). Diese Prozesse werden durch sehr unterschiedliche Fluenzraten und Bestrahlungsdauern ausgelöst. Schon vor über einem Jahrhundert entdeckten Darwin und Sachs die Wirkung von Blaulicht auf den Phototropismus Höherer Pflanzen (zitiert in Ahmad und Cashmore, 1996). Basierend auf molekulargenetischen Studien in *Arabidopsis* ist nun klar, dass mindestens zwei Typen von Blaulichtrezeptoren in Pflanzen existieren: die Cryptochrome und die Phototropine.

1.3.1 Cryptochrome

Obwohl schon seit über einem Jahrhundert Blaulichtantworten bekannt sind, war die Natur des vermittelnden Photorezeptors bis zur Entdeckung von cry1 aus *Arabidopsis* (Koorneef, 1980; Ahmad und Cashmore, 1993) „kryptisch“. Daher und wegen der großen Anzahl von Blaulichtantworten in Cryptogamen (Farne, Moose und Algen) bekamen die Cryptochrome ihren Namen (Gressel, 1979). Cryptochrome sind photolyaseähnliche Blaulichtrezeptoren (Ahmad und Cashmore, 1993; Batschauer, 1993; Briggs und Huala, 1999; Cashmore *et al.*, 1999; Lin, 2000a und 2002; Malhotra *et al.*, 1995), spielen aber keine Rolle in der DNA-Reparatur (Hoffman *et al.*, 1996; Imaizumi *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 1995b; Malhotra *et al.*, 1995; Perrotta *et al.*, 2000).

1.3.1.1 Vorkommen der Cryptochrome

Cryptochrome wurden in Dikotylen wie *Arabidopsis*, Senf und Tomate (Ahmad und Cashmore, 1993; Batschauer, 1993; Guo *et al.*, 1998; Hoffman *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1996b; Ninu *et al.*, 1999), in Monokotylen wie Reis (NCBI Datenbank) und Gerste (Perrotta *et al.*,

2001), in dem Farn *Adiantum capillus-veneris* (Kanegae und Wada, 1998; Imaizumi *et al.*, 2000), dem Moos *Physcomitrella patens* (Imaizumi *et al.*, 2002) und in Algen (*Chlamydomonas*; Small *et al.*, 1995) gefunden. Erst kürzlich wurde die These des Vorkommens eines Bakteriocryptochroms in dem Cyanobakterium *Synechocystis* bekräftigt (Kap. 1.3.3; Brudler *et al.*, 2003). 1996 sind zwei (6-4)-Photolyase-Homologe mit FAD und MTHF als Kofaktoren in *Homo sapiens* gefunden worden (Hsu *et al.*, 1996; Todo *et al.*, 1996). Doch diese Proteine, hcry1 und hcry2 genannt, zeigen weder (6-4)-Photolyase- noch CPD-Photolyase-Aktivität (Hsu *et al.*, 1996). Hsu *et al.* und Miyamoto und Sancar vermuteten deshalb, dass es sich um Blaulichtrezeptoren handeln könnte (Hsu *et al.*, 1996; Miyamoto und Sancar, 1998). Dies konnte auch für die nahe verwandten Proteine aus Maus (Kobayashi *et al.*, 1998) und *Drosophila* (Emery *et al.*, 1998) gezeigt werden. 2000 wurden sieben cDNA-Sequenzen mit Homologie zur Photolyase/Cryptochrom-Familie aus dem Zebrafisch (*Danio rerio*) veröffentlicht und die Funktion der kodierten Proteine charakterisiert (Kobayashi *et al.*, 2000). Viele Pflanzenarten besitzen mehrere Cryptochrome. So besitzt *Arabidopsis* mindestens zwei Cryptochromgene, *CRY1* und *CRY2* (Ahmad and Cashmore, 1993; Hoffman *et al.*, 1996); und in Tomate und Petersilie kommen jeweils mindestens drei Cryptochromgene, *CRY1a*, *CRY1b* und *CRY2*, vor (Perrotta *et al.*, 2000; 2001).

1.3.1.2 Das Protein und die Chromophore

Die meisten Cryptochrome sind 70 bis 80 kDa große Proteine mit einer N-terminalen photolyaseähnlichen Domäne und, im Gegensatz zu den Photolyasen, oft noch einer C-terminalen Domäne, die keine Sequenzähnlichkeit zu bekannten Proteinen hat (Cashmore *et al.*, 1999). Die Sequenzähnlichkeit in der Photolyase-Domäne der Cryptochrome ist viel höher als in der C-terminalen Domäne (Lin *et al.*, 1998; Imaizumi *et al.*, 2000; Perrotta *et al.*, 2000). Die C-terminalen Domänen der verschiedenen Cryptochrome variieren zudem signifikant in ihrer Länge. Von ca. 380 AS Länge in Algen (*C. reinhardtii*), ca. 190 AS bzw. ca. 120 AS in *Arabidopsis* *CRY1* bzw. *CRY2* bis zu keiner C-terminalen Extension bei SaPHR aus Senf (Batschauer, 1993), AcCRY5 des Farns *A. capillus-veneris* (Imaizumi *et al.*, 2000) und des Bakteriocryptochroms aus *Synechocystis* (Brudler *et al.*, 2003). Das Senf PHR-Protein besitzt keine DNA-Reparaturaktivität und ist deshalb sehr wahrscheinlich ein Cryptochrom (Malhotra *et al.*, 1995). Für SaPHR und AcCRY5 wurde bisher noch keine physiologische Funktion nachgewiesen, aber für das cry aus *Synechocystis* (Brudler *et al.*, 2003; eigene Daten). Es ist interessant, dass, obwohl SaPHR keine C-terminale Domäne besitzt, die AS-Sequenz zu ungefähr 90 % identisch mit den N-terminalen 500 AS des *Arabidopsis* *CRY2* ist, und somit viel höher als zwischen den *Arabidopsis* Cryptochromen.

Cryptochrome und DNA-Photolyasen teilen nicht nur Sequenzähnlichkeit, sondern tragen auch die gleichen Chromophore. Fast alle Aminosäuren, die bei der FAD-Bindung in Photolyasen wichtig sind, sind in Cryptochromen konserviert. Die Aminosäuren der Photolyasen, die bei der Bindung von DNA-Schäden und der Katalyse der DNA-Reparatur beteiligt sind, sind in Cryptochromen wenig konserviert (Ahmad und Cashmore, 1993; Todo *et al.*, 1996; Imaizumi *et al.*, 2000). Das in Insekten-Zellen exprimierte Volllänge *Arabidopsis* CRY1 bindet nicht kovalent FAD (Lin *et al.*, 1995b). In *E. coli* exprimiertes *Arabidopsis* CRY1 und *Sinapis alba* Cryptochrom binden nicht kovalent FAD und MTHF in stöchiometrischem Verhältnis (Malhotra *et al.*, 1995).

1.3.1.3 Cryptochrom-Expression

Arabidopsis CRY1 und CRY2 mRNAs wurden in allen Organen von *Arabidopsis* nachgewiesen (Ahmad und Cashmore, 1993; Lin *et al.*, 1998). Für die CRY1 und CRY2 mRNA-Level wurde durch *microarray*-Analyse gezeigt, dass sie in einem circadianen Rhythmus mit geringer Amplitude oszillieren (Harmer *et al.*, 2000). CRY1 und CRY2 mRNAs akkumulieren zu ungefähr dem gleichen Level, und die mRNAs erreichen nach vier (CRY1) bzw. acht (CRY2) Stunden nach Beginn der Lichtperiode ihre Maxima. Die Expression von CRY1 und CRY2 in Tomate und CPH1 in *Chlamydomonas* ist nicht lichtreguliert (Small *et al.*, 1995; Perrotta *et al.*, 2000), doch die des Senf-Cryptochroms (Batschauer, 1993) und einiger Farn-Cryptochrome (Imaizumi *et al.*, 2000). Der mRNA-Level des Farn CRY5 Gens in keimenden Sporen steigt nach zwölfstündiger Rot- oder Blaulichtbehandlung 300- bis 400fach an (Imaizumi *et al.*, 2000).

Auf der **Proteinebene** ist *Arabidopsis* cry1 durch Licht nicht beeinflusst, hingegen wird cry2 negativ durch UV-A, Blau- und Grünlicht reguliert (Ahmad *et al.*, 1998a; Lin *et al.*, 1998). Die Behandlung mit Cycloheximid, einem Translationshemmer, verändert diese Antwort nicht, was zusammen mit dem fehlenden Einfluss von Licht auf die CRY2 mRNA-Menge darauf deutet, dass der Abbau von cry2 lichtreguliert ist (Ahmad *et al.*, 1998a; Lin *et al.*, 1998). Die cry2 Proteinmenge zeigt einen photoperiodisch gesteuerten diurnalen Zyklus (El-Din El-Assal *et al.*, 2001). Im Kurztag ist die cry2 Proteinmenge während des Tages niedriger als in der Nacht. Dieser circadiane Zyklus ist laut Mockler *et al.* (2003) im Langtag kaum detektierbar.

1.3.1.4 Funktionsweise und Signaltransduktion der Cryptochrome

1.3.1.4.1 Das erste Ereignis der Signalweiterleitung

Das erste Ereignis in der Lichtsignaltransduktion ist die Absorption eines Photons. Damit dieses Lichtsignal von der Pflanze genutzt werden kann, muss es in chemische Energie transformiert werden, eine Einheit, die Pflanzenproteine verarbeiten können. Im Gegensatz zu den Phytochromen (Kap. 1.1.1) und Phototropinen (Kap. 1.3.2) ist diese Energiewandlung bei den Cryptochromen noch unklar. Unter Berücksichtigung des evolutionären Ursprungs besagt eine Hypothese, dass analog zu den Photolyasen die Photoantwort eine Redox-Reaktion sein könnte (Cashmore *et al.*, 1999; Sancar, 2000). Da Cryptochrome FAD, den katalytischen Chromophor von DNA-Photolyasen besitzen, ist es möglich, dass auch bei Cryptochromen ein Elektronentransfer zwischen FAD und einem intramolekularen oder intermolekularen Partner stattfindet, um die Signaltransduktionskette zu starten. Die Kristallstrukturen der Photolyasen aus *E. coli* (Park *et al.*, 1995), *A. nidulans* (Tamada *et al.*, 1997) und *T. thermophilus* (Komori *et al.*, 2001) und die des Cryptochroms aus *Synechocystis* (Brudler *et al.*, 2003) sind sehr ähnlich. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Elektronentransfer, der bei Photolyasen für die Katalyse verwendet wird, bei Cryptochromen der Signalweiterleitung dient.

1.3.1.4.2 Die C-terminale Extension

Die in Kap. 1.3.1.2 angesprochenen Unterschiede in den C-terminalen Extensionen der Cryptochrome könnten die Spezifität der Funktionen zwischen Cryptochromen des gleichen Organismus liefern. Direkte Evidenz, dass die Extensionen Effektor-Moleküle binden, wurde zuerst durch Zhao und Sancar (1997) geliefert, indem sie zeigten, dass die C-terminale Extension des menschlichen cry2 (*hcry2*) mit der Serin/Threonin-Phosphatase PP5 interagiert und ihre Aktivität beeinflusst. Auch scheint die C-terminale Domäne kritisch für die Funktion von *Arabidopsis* cry1 und cry2 zu sein, wie aus Protein-Protein-Interaktionsstudien (Ahmad *et al.*, 1998b; Jarillo *et al.*, 2001a; Wang *et al.*, 2001) und dem konstitutiven photomorphogenen Phänotyp von *Arabidopsis*-Keimlingen hervorgeht, die solche C-terminalen Domänen überexprimieren (Yang *et al.*, 2000). In Dunkelheit gewachsene Überexprimierer der C-Termini von cry1 und cry2 haben ähnliche Phänotypen wie die *cop* (constitutive photomorphogenic) und *det* (deetiolated) Mutanten (Übersichtsartikel: Deng und Quail, 1999; Fankauer und Chory, 1997). Diese Pflanzen haben bereits im Dunkeln ein kurzes Hypokotyl, offene Kotyledonen, Plastiden-Entwicklung und Anthocyanin-Pigmentierung.

Untersuchungen an Pflanzen, die cry-GUS exprimieren (Guo *et al.*, 1999) oder Fusionen aus dem cry1 bzw. cry2 N-Terminus mit jeweils dem CRY2 bzw. CRY1 C-Terminus (Ahmad *et al.*, 1998a) zeigten, dass die N-terminale photolyaseähnliche Domäne zu einer Instabilität des Proteins im Licht beiträgt, unabhängig davon, von welchem cry diese Domäne stammt. Die C-terminale Domäne von cry1, aber nicht cry2 kann in noch nicht geklärter Weise den lichtabhängigen destabilisierenden Effekt der N-terminalen Domäne unterdrücken, was zu einem stabilen cry1 im Blaulicht führt. Auch der nur 22 Aminosäuren große C-Terminus des *Drosophila* Cryptochroms ist wichtig für die Lichtabhängigkeit der Interaktionen mit anderen Proteinen (Rosato *et al.*, 2001).

Trotz des Fehlens einer größeren Sequenzähnlichkeit in den C-terminalen Domänen der verschiedenen Cryptochrome, gibt es in diesem Bereich drei übereinstimmende Motive in pflanzlichen Cryptochromen: Das DQXVP-Motiv, ein saures Motiv, welches drei bis fünf saure Reste (E und D) besitzt, und das STAES-Motiv. Ihre Anordnung ist konserviert und wird insgesamt als DAS-Domäne (DQXVP-acidic-STAES) bezeichnet. Die funktionelle Signifikanz des DQXVP-Motivs wurde für *Arabidopsis* cry1 gezeigt. Eine P549L-Mutation führte zu einem fast vollständigen Ausfall der cry1-Aktivität in der Hemmung des Hypokotyl-Wachstums (Ahmad *et al.*, 1995). Die STAES-Domäne könnte eine Protein-Phosphorylierungsstelle darstellen (Lin, 2002; Shalitin *et al.*, 2002).

1.3.1.4.3 Cryptochrom-Lokalisation und DNA-Bindung

Durch Zellfraktionierung und Reporterfusionen, die stabil in *Arabidopsis*-Pflanzen transformiert (Guo *et al.*, 1999) und transient in Petersilie-Protoplasten exprimiert wurden (Kleiner *et al.*, 1999b), wurde für *Arabidopsis* cry2 eine Lokalisation im Zellkern nachgewiesen. Da die Fusionsproteine im Licht und im Dunkeln angezogener Pflanzen im Zellkern detektiert wurden, wurde ein konstitutiver Kerntransport von cry2 postuliert (Guo *et al.*, 1999). Die C-terminale Domäne von CRY2 ist notwendig und hinreichend für den Import in den Zellkern (Guo *et al.*, 1999; Kleiner *et al.*, 1999b).

Immunologische Daten zeigten die Anwesenheit von cry1 im Zellkern (Guo *et al.*, 1999). cry1 scheint jedoch nur im Dunkeln nukleär, im Licht cytosolisch zu sein (Yang *et al.*, 2000). Auch bei cry1 vermittelt der C-Terminus den Kerntransport (Yang *et al.*, 2000).

Adiantum CRY1, CRY2 und CRY5 sind cytosolische, CRY3 und CRY4 hingegen nukleäre Proteine (Imaizumi *et al.*, 2000). *Adiantum* CRY3 wird in Dunkelheit in den Zellkern transportiert, aber nicht im Blaulicht; CRY4 akkumuliert konstitutiv im Zellkern (Imaizumi *et al.*, 2000). Auch bisher untersuchte Zebrafisch-Cryptochrome wurden im Zellkern oder im

Zytoplasma gefunden (Hirayama *et al.*, 2003). Lokalisationsstudien an Maus cry1 haben gezeigt, dass dieses Protein in den Zellkern und in Mitochondrien transportiert wird (Kobayashi *et al.*, 1998).

Arabidopsis cry2 ist mit Chromosomen assoziiert, und dafür reichen die letzten C-terminalen 105 Aminosäuren von cry2 aus (Cutler *et al.*, 2000). Somit könnten Cryptochrome an der Veränderung der Chromatin-Struktur beteiligt sein. Interessanterweise findet in Neuronen des hypothalamischen Suprachiasmatischen Nucleus (SCN) eine lichtinduzierte Phosphorylierung von Histon 3 statt (Crosio *et al.*, 2000). Der SCN ist die Region, in der die zentrale Uhr von Tieren lokalisiert ist (Whitmore *et al.*, 2000). Die Fusion aus CRY2 und GFP ist homogen im Zellkern von im Dunkeln gehaltenen transfizierten Tabak-BY-2-Protoplasten verteilt. Blaulicht hingegen induziert eine Aggregation des Fusionsproteins (*speckles*) im Zellkern, welches mit phyB-GFP-*speckles* kolokalisiert (Más *et al.*, 2000). Es ist daher nicht unwahrscheinlich, dass Cryptochrome ihre Funktion direkt an der DNA ausüben. Im Einklang damit wurden für das Cryptochrom aus *Synechocystis* (Brudler *et al.*, 2003), das Maus cry1 (Kobayashi *et al.*, 1998) und das cry2 aus dem Menschen (Özgür und Sancar, 2003) eine sequenzunabhängige DNA-Bindung gezeigt.

1.3.1.4.4 *Physikalische Interaktionspartner und Signalkomponenten der Arabidopsis Cryptochrome*

Die direkten Interaktionen der *Arabidopsis*-Photorezeptoren mit putativen Signalkomponenten sind in Abb. 1.4 schematisch dargestellt. **Phytochrome** wirken an Cryptochrom-vermittelten Signalprozessen mit (Mohr, 1994) und komplexe funktionelle Interaktionen von cry1 und cry2 mit Phytochromen wurden in zahlreichen Studien nachgewiesen (Ahmad und Cashmore, 1997; Ahmad *et al.*, 1998c; Folta und Spalding, 2001a; Hennig *et al.*, 1999; Más *et al.*, 2000; Neff und Chory, 1998; Thum *et al.*, 2001; Weller *et al.*, 2001; Übersichtsartikel: Casal, 2000). Übereinstimmend damit wurde gezeigt, dass *Arabidopsis*-Cryptochrome mit Phytochromen physikalisch interagieren. Durch *Yeast-two-hybrid*-Analysen wurde nachgewiesen, dass cry1 mit phyA interagiert, und rekombinantes Hafer phyA kann cry1 und cry2 *in vitro* phosphorylieren (Ahmad *et al.*, 1998c). *Arabidopsis* cry1 wird zudem im Rotlicht *in vivo* phosphoryliert, und die Phosphorylierung wird durch nachfolgende Dunkelrotbestrahlung revertiert (Ahmad *et al.*, 1998c). Eine Interaktion von sowohl cry1 als auch phyB mit dem PAS/F-Box/Kelch Domänen-Protein ADO1/ZTL/LKP1 wurde durch *Yeast-two-hybrid*-Analysen und *In-vitro-pull-down*-Tests gezeigt (Jarillo *et al.*, 2001a). Außer mit phyA könnte somit cry1 auch mit anderen Phytochromen, z. B. phyB, interagieren.

Mittels Co-Immunopräzipitation und Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) wurde eine direkte cry2-phyB-Interaktion gezeigt (Más *et al.*, 2000). Zusätzlich zu dem Befund, dass phyB die Lichtregulation der Transkription durch eine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor PIF3 vermitteln könnte (Martinez-Garcia *et al.*, 2000; Ni *et al.*, 1998), wäre die cry-phy-Interaktion als Schalter für lichtgesteuerte Transkription denkbar.

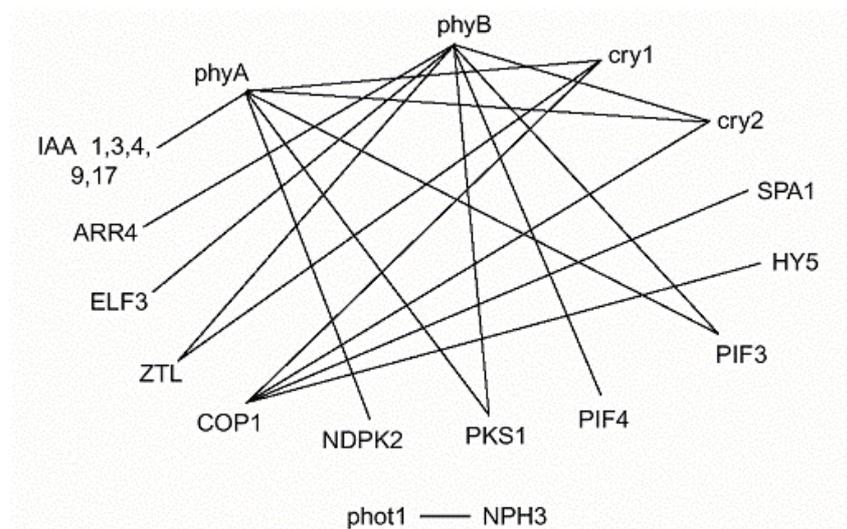


Abb. 1.4: Schema der Interaktion von Photorezeptoren aus *Arabidopsis* (Quail, 2002). Die Linien zeigen physikalische Interaktionen zwischen Photorezeptoren und verschiedenen putativen Signalkomponenten.

Die Interaktionen der Cryptochrome mit den Phytochromen können nicht vollständig die durch Cryptochrom vermittelte Blaulicht-Signaltransduktion erklären. Dies gilt insbesondere für die Rolle der Cryptochrome in der Deetiolierung. In dieser Hinsicht ist die Entdeckung der direkten Interaktion zwischen Cryptochromen und **COP1** interessant, da sie einen weiteren Mechanismus für die Cryptochrom-Signaltransduktion aufzeigt (Wang *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001). Die CRY1-COP1-Interaktion ist konstitutiv, findet also im Licht und im Dunkeln statt (Yang *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu Yang *et al.* (2001) konnten Wang *et al.* (2001) eine Interaktion zwischen GUS-CCT2 (C-Terminus von cry2 fusioniert mit GUS) und COP1 mit Hilfe von *yeast two hybrid assays* und Co-Immunopräzipitation nachweisen. Im Gegensatz zur Cashmore-Gruppe (Cashmore *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2001) favorisiert die Gruppe von Deng folgendes Modell: COP1 bindet cry1 konstitutiv. Ein Lichtsignal wird durch eine intramolekulare Redoxreaktion transduziert, was in einer Konformationsänderung der C-terminalen cry1-Domäne resultiert; dadurch werden die Eigenschaften des gebundenen COP1 verändert (Wang *et al.*, 2001). Zu dieser Hypothese passen die Daten von Shalitin *et al.* (2002), die zeigen, dass *Arabidopsis cry2* einer blaulichtabhängigen Phosphorylierung unterliegt und GUS-CCT2 konstitutiv phosphoryliert ist (Shalitin *et al.*, 2002). Diese Autoren nehmen deshalb an, dass die Lichtanregung von Cryptochrom zu einer Konformationsänderung führt, was die Phosphorylierung des Photorezeptors zulässt. Das phosphorylierte Cryptochrom ist nach diesem Modell die aktive Form und löst dann die Signaltransduktion und die damit verbundenen physiologischen Antworten aus.

COP1 ist ein Zinkfinger- und WD40-repeat-Protein. Als Untereinheit eines E3-Ubiquitin-Ligasekomplexes hemmt COP1 im Dunkeln den basischen Leucin-Transkriptionsfaktor HY5, einen Aktivator lichtregulierter Gene, wahrscheinlich dadurch, dass COP1 HY5 dem Proteasom zuführt (Osterlund *et al.*, 2000). Diese Beobachtungen stimmen mit dem Transkriptions-Regulations-Modell für die Cryptochrom-vermittelte Deetiolierungsantwort überein (Wang *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2000). Entsprechend dieses Modells interagiert COP1 mit HY5 im Dunkeln; dadurch wird HY5 abgebaut, um so den „Aus“-Status lichtinduzierter Genexpression und damit das Etiolement zu sichern. Der Ausschluss von cry1 und COP1 vom Zellkern im Licht (von Arnim und Deng, 1994; Yang *et al.*, 2000) erlaubt eine Anreicherung des Transkriptionsfaktors HY5 und die Transkriptionsaktivierung von Genen, die für die Photomorphogenese benötigt werden. Kürzlich wurde postuliert, dass COP1 auch eine Rolle im lichtinduzierten cry2-Abbau spielt, da cry2 in *cop1* Mutanten größere Stabilität besitzt (Shalitin *et al.*, 2002). Da in *cop1* Nullmutanten der lichtabhängige cry2-Abbau nur verlangsamt ist, müssen weitere Faktoren am cry2-Abbau beteiligt sein. In transgenen Pflanzen, die GUS-CCT1- oder GUS-CCT2-Fusionsproteine exprimierten, akkumulierte HY5, ähnlich wie in der *cop1* Mutante (Osterlund *et al.*, 2000). Dies bekräftigt die Hypothese, dass die N-terminale Domäne der Cryptochrome benötigt wird, um die C-terminale Domäne im Dunkeln im inaktiven Zustand zu halten.

Aus der Suche nach *Arabidopsis*-Mutanten, die im schwachen Blaulicht in der Hemmung des Hypokotylwachstums gestört sind, ging das **SUB1** Gen (short under blue light) hervor (Guo *et al.*, 2001). Die *sub1* Mutante ist hinsichtlich Hypokotylstreckungswachstum, Genexpression und des Flächenwachstums der Kotyledonen im Blau- und Dunkelrotlicht niedriger Fluenzraten hypersensitiv. Die Mutante macht keine Photomorphogenese im Dunkeln und entwickelt sich normal im Rotlicht unter allen Fluenzraten. Die Analysen von Photorezeptor-*sub1*-Doppelmutanten ergaben, dass die Aktivität von cry1 und cry2 zumindest im schwachen Blaulicht von SUB1 abhängt und dass SUB1 für phyA ein Modulator ist. SUB1 ist ein negativer Regulator der lichtinduzierten HY5-Akkumulation. Die Analyse der *hy5 sub1* Doppelmutante zeigte, dass HY5 unterhalb von SUB1 agiert. SUB1 ist also im Schnittpunkt der Cryptochrom- und phyA-Signalwege lokalisiert und scheint zwischen den Photorezeptoren und HY5 zu liegen (Abb. 1.5). SUB1 besitzt zwei EF-Hand-ähnliche Kalzium-Bindungsmotive. Ein *in vitro* Kalziums-Bindungs-assay bestätigte, dass SUB1 mit niedriger Affinität Kalzium bindet (Guo *et al.*, 2001). Jenkins und Mitarbeiter zeigten für *Arabidopsis*-Zellkulturen, dass Blaulicht die Akkumulation von Kalzium im Zytoplasma fördert und dass Substanzen, die spannungssensitive Kalziumkanäle oder Ca²⁺-ATPasen hemmen, signifikant die Blau/UV-A-induzierte *CHS*-Expression reduzieren (Christie und Jenkins, 1996; Long und Jenkins, 1998). SUB1 ist mit der Kernhülle assoziiert (Guo *et al.*, 2001). Hinsichtlich der Funktion von SUB1 vermutet Lin (2002), dass eine

blaulichtinduzierte lokale Erhöhung der Kalziumkonzentration um den Zellkern die SUB1-Aktivität beeinflusst und dadurch den Transport der Photorezeptoren oder ihrer Signaltransduktionskomponenten zwischen Zellkern und Zytoplasma beeinflusst.

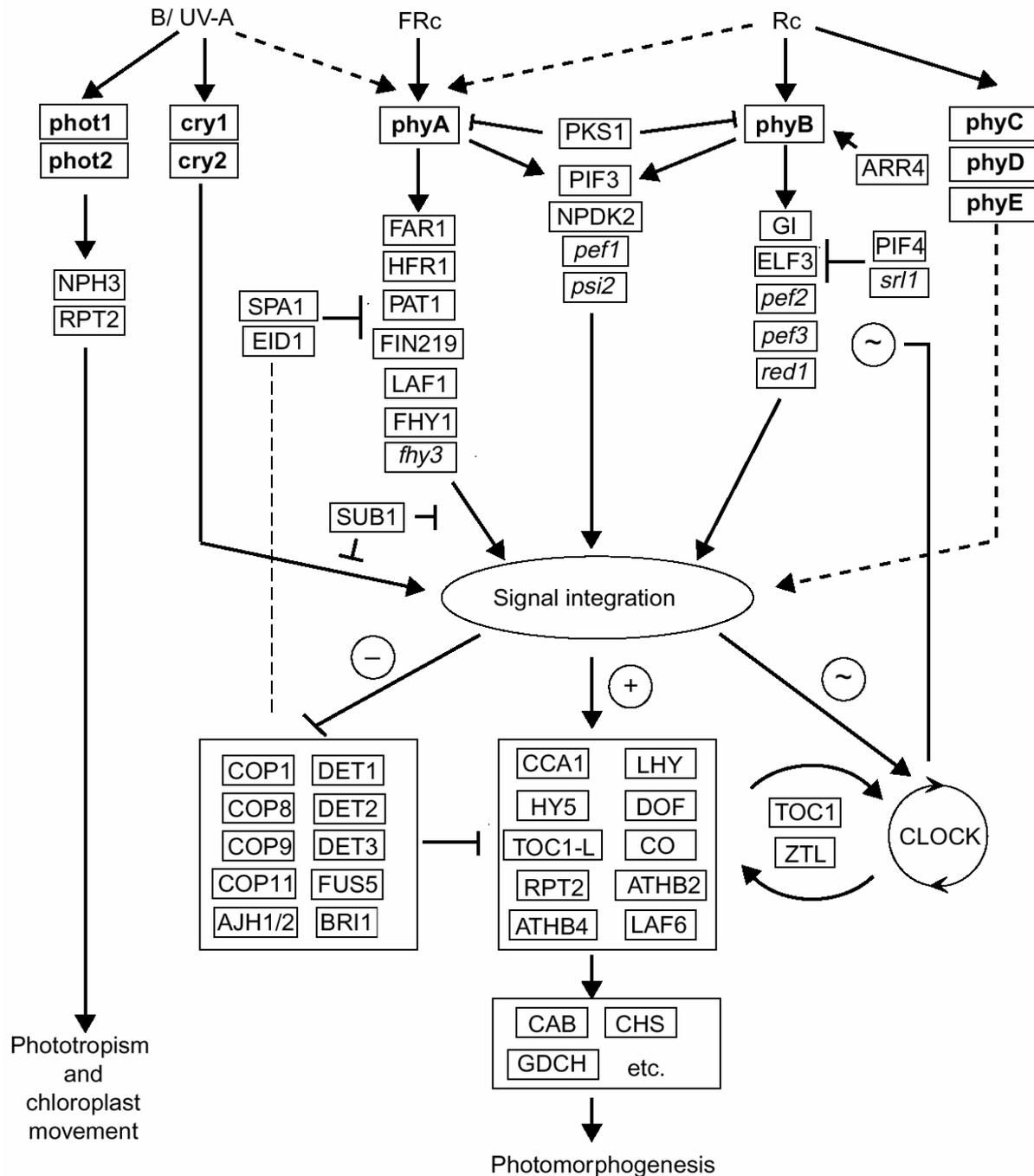


Abb. 1.5: Photorezeptor-Signalwege und Interaktionsfaktoren (Quail, 2002). Vereinfachtes Schema von vorgeschlagenen Signalwegen, die auf aktuellen Studien an *Arabidopsis* beruhen.

Die blaulichtinduzierte schnelle Depolarisierung der Plasmamembran ist eine frühe Blaulichtantwort (Spalding und Cosgrove, 1989). Diese Membran-Depolarisierung resultiert vermutlich aus der Öffnung von Ionenkanälen in Antwort auf Blaulicht (Cho und Spalding, 1996). *Arabidopsis cry1* und *cry2* Mutanten sind in der blaulichtinduzierten Membran-Depolarisierung und der blaulichtaktivierten Öffnung von Anionenkanälen beeinträchtigt. So scheint die Öffnung von Anionenkanälen ein früher Prozess der Signalleitung von Cryptochromen zu sein (Cho und Spalding, 1996; Folta und Spalding, 2001b).

1.3.1.5 Die Rolle der Cryptochrome in der Photomorphogenese

Weil die Hemmung des Hypokotyl-Streckungswachstums einfach zu messen ist, wurde diese Antwort sehr oft bei der Untersuchung der Cryptochromfunktion benutzt. So wurde *Arabidopsis CRY1* durch die Analyse der *hy4* Mutante, die in der Inhibierung des Hypokotyl-Streckungswachstums im Blaulicht beeinträchtigt ist (Koornneef *et al.*, 1980), identifiziert (Ahmad und Cashmore, 1993). Zudem sind andere Blaulichtantworten wie die Stimulierung der Kotyledonenöffnung (Neff und Chory, 1998), die Induktion der Anthocyanbildung und die Chalkonsynthase-Genexpression (Ahmad *et al.*, 1995; Jackson und Jenkins, 1995; Lin *et al.*, 1996a), das Stellen der circadianen Uhr (Weller, 2001) und die Regulierung der Blühinduktion (Bagnall, 1996; Mockler *et al.*, 1999) in der *cry1* Mutante beeinträchtigt. Cryptochrome arbeiten nicht nur im Blaulicht. *cry1* überexprimierende *Arabidopsis* Keimlinge besitzen erhöhte *steady-state* Mengen an *CHS* mRNA und verstärkte Akkumulation von Anthocyanen in Antwort auf UV-A, blaues und grünes Licht (Lin *et al.*, 1995a). Die Aktion im Grünlicht kann damit erklärt werden, dass zumindest in *cry1*, das in Insektenzellen exprimiert wurde, das FAD in der Semichinonform vorliegt (Lin *et al.*, 1995b). Das Semichinon kann zwischen 500 und 600 nm absorbieren.

cry2 Mutanten wurden auch bei einem *screening* für lange Hypokotyle im Blaulicht isoliert (Guo *et al.*, 1998). *Arabidopsis cry2* Keimlinge entwickeln im kontinuierlichen Blaulicht niedriger Fluenzrate lange Hypokotyle, und die Kotyledonenöffnung ist reduziert (Lin *et al.*, 1998). *cry2* hat bei der Deetiolierung unter niedrigen Fluezraten eine stärkere Bedeutung als unter höheren, was als Konsequenz des Abbaus von *cry2* im Blaulicht interpretiert werden kann (Lin *et al.*, 1998). Es besteht eine offensichtliche funktionelle Redundanz zwischen *cry1* und *cry2*, da die *cry1 cry2* Doppelmutante einen stärkeren Phänotyp aufweist als die Einzelmutanten (Mazzella *et al.*, 2001; Mockler *et al.*, 1999).

1.3.1.6 Die Rolle der Cryptochrome und Phytochrome in der Blühinduktion

Eines der wichtigsten Umweltsignale, das den Blühzeitpunkt beeinflusst, ist die Tageslänge oder Photoperiode. *Arabidopsis* ist eine fakultative Langtagpflanze, d. h., eine lange Photoperiode beschleunigt den Übergang von der vegetativen zur reproduktiven Phase (Übersichtsartikel: Coupland, 1995). *cry2* spielt eine wichtige Rolle in der Tageslängen-Wahrnehmung, da *pha* Mutanten, die Mutationen im *CRY2* Gen tragen, unter Langtagbedingungen zeitlich stark verzögert blühen (Koorneef *et al.*, 1991; Guo *et al.*, 1998).

Dauerdunkelrot- und Dauerblaulicht fördern das Blühen in *Arabidopsis*, Dauerrotlicht hingegen hemmt es. Somit wird die Beschleunigung des Blühens durch *phyA* (Mockler *et al.*, 2003), die Hemmung durch *phyB* vermittelt (Lin, 2000b). Die Funktion von *cry2* bei der Blühinduktion ist von gleichzeitiger Einstrahlung von Rot- und Blaulicht abhängig (Guo *et al.*, 1998; Mockler *et al.*, 1999). Es wird vermutet, dass *phyB* die rotlichtabhängige Unterdrückung der Blütenbildung und *cry2* eine blaulichtabhängige Hemmung der *phyB*-Funktion vermittelt, d. h., durch Hemmung des Inhibitors *phyB* wird eine positive Wirkung auf den Blühzeitpunkt erreicht (Guo *et al.*, 1998; Mockler *et al.*, 1999). Die *cry2* Mutante blüht ungefähr zur gleichen Zeit wie der Wildtyp, wenn sie unter Weiß- mit zusätzlichem Dunkelrotlicht angezogen wird (Más *et al.*, 2000); anscheinend wird die Pfr-Form des Phytochroms für die Ausbildung des *cry2* Mutantenphänotyps benötigt.

Die Funktion von *cry2* in der Regulation des Blühzeitpunktes wurde durch die Klonierung des *EDI* (early daylight insensitive) Lokus des *Arabidopsis* Cvi (Cape Verdean Island)-Ökotyps unterstützt (El-Din El-Assal *et al.*, 2001). Der *EDI*-Lokus, der im Wesentlichen für das frühe Blühen des Cvi-Ökotyps verantwortlich ist, wurde als Allel des *CRY2* Gens identifiziert. Cvi *CRY2* kodiert ein *CRY2* Protein mit einer Methionin-Substitution an der Valin-Position 376. Val³⁷⁶ ist unter acht miteinander verglichenen *CRY2* Genen aus verschiedenen *Arabidopsis*-Ökotypen außer in dem Cvi *CRY2* konserviert. Im Cvi-Ökotyp wird im Kurztag *cry2* mit reduzierter circadianer Amplitude exprimiert. Vermutlich ist dieser reduzierte Expressionswechsel für das frühere Blühen der Cvi-Pflanzen verantwortlich.

Zusätzlich zur *cry2* Mutante gibt es *Arabidopsis*-Mutanten, die im Langtag spät blühen, sich aber im Kurztag ähnlich wie der Wildtyp verhalten. Diese sind in den Genen *CONSTANS* (*CO*), *GIGANTEA* (*GI*), *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) und *FWA* (Koorneef *et al.*, 1991) defekt. *FT* und *FWA* agieren *downstream* von *CO* und auch in anderen Signaltransduktionswegen (Kardailsky *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999; Onouchi *et al.*, 2000), wohingegen *GI* und *CRY2* *upstream* von *CO* agieren (Abb. 1.5; Guo *et al.*, 1998). Lin und Mitarbeiter (Mockler *et al.*, 2003) haben kurz nach Yanovsky und Kay (2002) ein

modifiziertes *external coincidence model* vorgestellt. In diesem Modell kann die Signaltransduktion des Blau- und Dunkelrotweges über *cry2* und *phyA* nur die Blühinduktion durch Expression von *FT* durch CO unterstützen, wenn sie mit der sensitiven Phase des PRR (*photoperiodic response rhythm*) zusammentrifft. Für eine Langtagpflanze wie *Arabidopsis* ist das Zusammentreffen des B- und FR-Weges und der sensitiven Phase des PRR im Langtag wahrscheinlicher als im Kurztag. Die circadiane Kontrolle der Expression des Transkriptionsfaktors CO ist essenziell für die FT Expression und somit für die Photoperioden-Unterscheidung (Yanovsky und Kay, 2002).

1.3.1.7 Cryptochrome und die circadiane Uhr

Circadiane Uhren sind weit verbreitet. Sie wurden u.a. in Cyanobakterien (Übersichtsartikel: Kondo und Ishiura, 2000), Pilzen wie *Neurospora* (Übersichtsartikel: Bell-Pedersen *et al.*, 2001), Pflanzen wie *Arabidopsis* (Hayama und Coupland, 2003), der Fruchtfliege *Drosophila* (Hendricks, 2003), der Maus (Reppert und Weaver, 2002) bis hin zum Menschen (Piggins, 2002) gefunden. Innere Uhren ermöglichen einem Organismus, sich auf einen anstehenden Wechsel in der Umwelt vorzubereiten. Z. B. steigert eine Pflanze die Synthese von Photosyntheseproteinen, bevor die Sonne aufgeht, und hört damit in der Abenddämmerung auf. Cryptochrome haben eine wichtige Funktion bei der Regulation der circadianen Uhr in *Neurospora*, *Drosophila*, Säugern, und *Arabidopsis* (Übersichtsartikel: Fankhauser und Staiger, 2002; van Gelder, 2001). Obwohl Cryptochrome als ein wesentlicher Teil des zentralen Oszillators in Tieren wirken, konnte eine solche Funktion für Pflanzencryptochrome nicht gezeigt werden (van Gelder, 2002). Sie dienen aber dem Lichteingang zur Uhr.

1.3.1.7.1 Funktion der Cryptochrome und Phytochrome in der circadianen Uhr von Pflanzen

In der *Arabidopsis cry1* Mutante ist der circadiane Rhythmus der Expression eines Katalasegens signifikant beeinflusst (Zhong *et al.*, 1997). Sowohl in hohen als auch niedrigen Blaulichtfluenzraten sind die Periodenlängen der *CAB* Promotoraktivität in der *cry1* Mutante länger als im Wildtyp (Somers *et al.*, 1998). Die *cry2* Mutante hingegen zeigt einen geringen Effekt auf die Periodenlänge nur in relativ niedrigen Blaulichtfluenzraten. Dies kann, wie schon angesprochen, an der Instabilität des *cry2* Proteins im Hochintensitäts-Blaulicht liegen. Da die *cry1 cry2* Doppelmutante in niedrigen und hohen Blaulichtintensitäten eine deutlich größere Periodenlänge hat als die *cry* Einzelmutanten (Devlin und Kay, 2000), ist die Rolle von *cry2* in der Regulation der circadianen Uhr klar gezeigt. Zudem besitzt die *cry1 cry2* Doppelmutante eine starke Ausdehnung der Periodenlänge in relativ niedrigen

Rotlichtfluenzraten (Devlin und Kay, 2000), was ein Hinweis auf eine Cryptochrom/Phytochrom-Interaktion beim Eingang zur Inneren Uhr sein könnte. Cryptochrome können unterhalb von phyA in der Signalkette angeordnet werden, da sich eine Mutation von phyA und von cry nicht additiv auswirkt. Diese lichtunabhängige Rolle der Cryptochrome scheint auf den Lichteingang zur Inneren Uhr beschränkt zu sein, da sowohl die *cry1* Einzel- als auch die *cry1 cry2* Doppelmutante ein völlig normales Verhalten in der rotlichtvermittelten Hemmung des Hypokotylstreckungswachstums zeigen (Devlin und Kay, 2000). *Arabidopsis cry1 cry2* Doppelmutanten behielten immer noch robuste Rhythmicität (Devlin und Kay, 2000). Daher sind Cryptochrome nicht als essenzieller Bestandteil der Inneren Uhr in Pflanzen anzusehen.

Die *Arabidopsis phyA phyB cry1 cry2* Mutante ist immer noch rhythmisch und vermag die Innere Uhr durch Licht zu synchronisieren (Yanovski *et al.*, 2000). Somit könnten weitere Photorezeptoren für die lichtabhängige Synchronisierung der Inneren Uhr zuständig sein. Kandidaten hierfür sind Mitglieder der ZTL/FKF/LKP (Zeitlupe/Flavin-bindend, Kelch repeat, E-Box/LOV Kelch Protein)-Familie (Kiyosue und Wada, 2000; Nelson *et al.*, 2000; Somers *et al.*, 2000; Schultz *et al.*, 2001). Diese Proteine besitzen eine N-terminale LOV/PAS-Domäne, die in Analogie zu Phototropinen (Kap. 1.3.2) ein Chromophor binden oder Protein-Protein-Interaktionen vermitteln könnte. Tatsächlich interagiert ADO1/ZTL/LKP1 mit *cry1* und *phyB* und hat Einfluss auf die *clock*-kontrollierte Transkription, die Hypokotylverlängerung, die Blattbewegung und das photoperiodisch kontrollierte Blühen (Kiyosue und Wada, 2000; Somers *et al.*, 2000; Jarillo *et al.*, 2001a).

1.3.1.7.2 Funktionen der Cryptochrome in der circadianen Uhr von Tieren

Die *Drosophila* Mutante *cry^{baby}* (*cry^b*) wurde dadurch identifiziert, dass die Expression der *PERIOD* (*PER*) und *TIMELESS* (*TIM*) Gene nicht mehr rhythmisch erfolgt (Emery *et al.*, 1998; Stanewsky *et al.*, 1998). Die *cry^b* Mutation reduzierte die Sensitivität gegenüber Blaulicht beim Stellen der circadianen Uhr (Egan *et al.*, 1999) und rief eine langsamere Anpassung an neue Licht/Dunkel-Zyklen im Vergleich zum Wildtyp hervor (Emery *et al.*, 2000). dCRY ist also offenbar nicht der einzige Photorezeptor, der die circadiane Uhr in *Drosophila* stellt. Nur wenn zusätzlich die Signaltransduktion für die Phospholipase *norpA^{P41}*, die für den Signalweg der visuellen Wahrnehmung nötig ist (Pearn *et al.*, 1996), ausgeschaltet ist, konnte die Uhr nicht mehr über Licht synchronisiert werden (Stanewsky *et al.*, 1998).

In *Drosophila* übt Cryptochrom seine Funktion auf die circadiane Uhr durch physikalische Interaktion mit zentralen Oszillator-Komponenten aus (Ceriani *et al.*, 1999; Rosato *et al.*,

2001). Hier hat wie bei *Arabidopsis*-Cryptochromen der C-Terminus eine besondere Rolle: Er vermittelt die lichtabhängige Interaktion von dCRY mit TIM und PER (Rosato *et al.*, 2001). Zusätzlich zur Funktion von dCRY als circadianer Photorezeptor im Gehirn könnte dCRY im peripheren Gewebe ein Teil des Oszillators sein (Krishnan *et al.*, 2001).

Maus und Mensch besitzen jeweils zwei Cryptochrome (Hsu *et al.*, 1996; Todo *et al.*, 1996; van der Spek *et al.*, 1996). Um die Funktion der Säugercryptochrome aufzuklären, wurde hauptsächlich am Mausmodell gearbeitet (Kobayashi *et al.*, 1998; Miyamoto und Sancar, 1998). *mCRY1* und *mCRY2* werden in vielen Geweben exprimiert, wobei die *mCRY1* Expression im suprachiasmatischen Nukleus (SCN; sitzt im ventralen Hypothalamus und dort ist die Hauptuhr der Mäuse lokalisiert), die *mCRY2* Expression in der Netzhaut besonders hoch ist (Miyamoto und Sancar, 1998). In *mCRY2* Mutanten ist die circadiane Periode verlängert (Thresher *et al.*, 1998; van der Horst *et al.*, 1999). Die Deletion von *mCRY1* hingegen verkürzt die circadiane Periode (van der Horst *et al.*, 1999; Vitaterna *et al.*, 1999). Mäuse, die in beiden Cryptochromgenen defekt sind, zeigen in Laufradexperimenten einen kompletten Verlust ihres circadianen Verhaltens in konstanter Dunkelheit (van der Horst *et al.*, 1999; Vitaterna *et al.*, 1999).

mCRY1 und *mCRY2* sind redundant, zusammen aber essenziell in einer negativen Rückkopplungsschleife mit den zentralen Oszillatorkomponenten PER, CLK (CLOCK) und BMAL1 (Kume *et al.*, 1999; Reppert und Weaver, 2001; Shearman *et al.*, 2000). Da Cryptochrome Teil des zentralen Oszillators bei der Maus sind, ist es fast unmöglich, eine lichtabhängige Funktion beim Stellen der Uhr zu testen. Die Ergebnisse von Miyamoto und Sancar, 1998, Thresher *et al.*, 1998 und van der Horst *et al.*, 1999, stellen die Rolle der Cryptochrome als Photorezeptoren in Säugern in Frage. Doch wurde für Säugercryptochrome auch gezeigt, dass sie als Photorezeptoren für die Regulation der circadianen Uhr und lichtinduzierter Genexpression fungieren könnten. Analog zu *Drosophila* können Mäuse, die entweder nur die Cryptochrome oder nur die visuellen Photorezeptoren besitzen, ihr Verhalten mit dem Licht-Dunkel-Zyklus synchronisieren. Tripelmutanten-Mäuse, die in beiden Cryptochromen mutiert sind und eine retinale degenerative Mutation tragen, sind nahezu arhythmisch unter Licht-Dunkel-Zyklus-Bedingungen, und die lichtinduzierte Expression von Genen im SCN ist deutlich reduziert (Selby *et al.*, 2000).

Im **Zebrafisch** wurden sieben Photolyase/Cryptochrom-homologe Gene gefunden (Kobayashi *et al.*, 2000). Ein Gen kodiert für eine (6-4)-Photolyase, zwei für Homologe der *Drosophila* Cryptochrome (zCRY3 und zCRY4) und die restlichen vier (zCRY1a, 1b, 2a, 2b) gruppieren mit den Säugercryptochromen. Die letzten vier, so wie die identifizierten drei Cryptochrome aus dem Krallenfrosch *Xenopus laevis* (Zhu und Green, 2001) und die zwei

Cryptochrom-Homologen aus **Huhn** (Yamamoto *et al.*, 2001) können die durch CLOCK:BMAL-vermittelte transkriptionelle Aktivierung von Uhrgenen unterdrücken. In *Xenopus laevis* ist diese Inhibierung sogar lichtabhängig.

1.3.1.8 Die Evolution der Cryptochrom/Photolyase-Familie

Aus phylogenetischen Analysen geht hervor, dass Pflanzencryptochrome eher mit den CPD-Photolyasen verwandt sind, während tierische Cryptochrome mit den (6-4)-Photolyasen gruppieren. Deshalb kann vermutet werden, dass pflanzliche und tierische Cryptochrome sich unabhängig voneinander entwickelt haben (Cashmore *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 2000). Die Cryptochrome sind damit ein Beispiel für wiederholte Evolution, ein spezieller Fall der konvergierenden Evolution, in der eine neue Genfunktion sich aus zwei unterschiedlichen Genen heraus gebildet hat. Dieses Phänomen steht im Gegensatz zur klassischen konvergierenden Evolution, bei der die ursprünglichen Gene nicht verwandt sind (Cashmore *et al.*, 1999). Cashmore und Mitarbeiter (1999) nehmen an, dass sich die Cryptochrome erst nach dem Erscheinen der Eukaryoten entwickelten. Kanai *et al.* vermuten, dass das ursprüngliche Gen der Photolyase/Cryptochrom-Familie für eine CPD-Photolyase kodierte, welches sich mehrmals vor der Trennung von Pro- und Eukaryoten duplizierte, und dass sich die Cryptochrome schon vor dem Erscheinen von Eukaryoten entwickelten (Kanai *et al.*, 1997). Eine ähnliche Schlussfolgerung geht aus der kürzlich erschienenen Arbeit von Brudler *et al.* (2003) hervor, in der eine neue Cryptochromklasse (CRY DASH) definiert wird, die Mitglieder aus *Drosophila*, *Arabidopsis* (At5g24850), *Synechocystis* und *Homo sapiens* besitzt (Brudler *et al.*, 2003).

1.3.2 Die Phototropine

Blaulicht ist die effektivste Wellenlänge, die den Phototropismus, die Chloroplastenbewegung und die Stomataöffnung reguliert (Briggs und Huala, 1999). Durch genetische Studien an *Arabidopsis* wurden die Phototropine phot1 (nph1, *non-phototropic hypocotyl* 1; Liscum und Briggs, 1995; Huala *et al.*, 1997) und phot2 (npl1, *nph1 like* 1; Jarillo *et al.*, 1998; Briggs *et al.*, 2001) als die Photorezeptoren identifiziert, die o.g. Bewegungen regulieren (Übersichtsartikel: Briggs *et al.*, 2001; Briggs und Christie, 2002; Kagawa, 2003). Einen Überblick über Phototropin-vermittelte Prozesse gibt Abb. 1.6. phot1 und phot2 aus *Arabidopsis* vermitteln gleiche Blaulichtantworten, besitzen aber verschiedene Photosensitivitäten. phot1 vermittelt den negativen Phototropismus der Wurzel über ein weites Spektrum an Lichtintensitäten und kann im Niedrigintensitätslicht den positiven Phototropismus des Hypokotyls hervorrufen (Huala *et al.*, 1997; Liscum und Briggs, 1995).

Im Licht hoher Fluenzraten agieren phot1 und phot2 redundant in der Vermittlung des Hypokotyl-Phototropismus (Sakai *et al.*, 2001). phot2 ist der bedeutendste Photorezeptor, der die Vermeidungs-Reaktion der Chloroplasten im Hochintensitätslicht vermittelt (Kagawa *et al.*, 2001; Jarillo *et al.*, 2001b), wobei phot1 und phot2 zusammenarbeiten, um die blaulichtinduzierte Stomataöffnung zu kontrollieren (Kinoshita *et al.*, 2001) und die Chloroplasten-Akkumulation an der beleuchteten Seite der Zelle im Blaulicht niedriger Fluenzraten zu vermitteln (Sakai *et al.*, 2001).

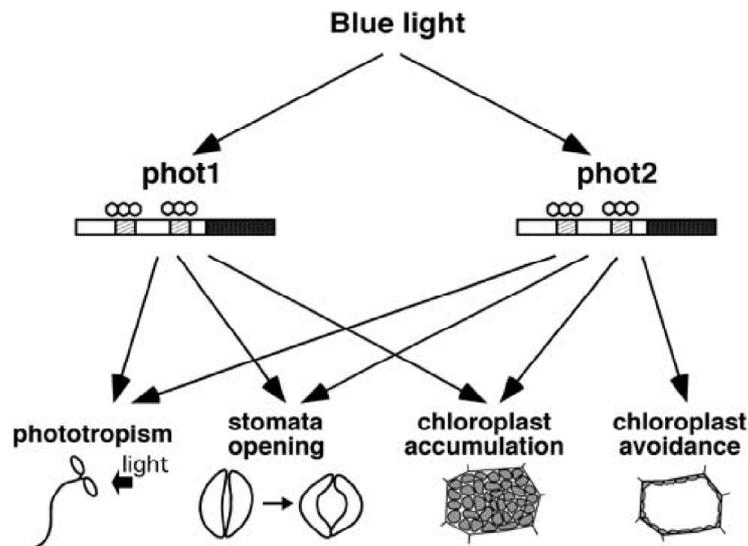


Abb. 1.6: Schema physiologischer Phänomene, die durch Phototropine aus *Arabidopsis* vermittelt werden (verändert nach Kagawa, 2003).

Außer in *Arabidopsis* wurden Phototropine auch in anderen Pflanzen wie Reis (Kanegae *et al.*, 2000), Mais, Hafer, der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (Christie und Briggs, 2001) und dem Farn *Adiantum capillus-veneris* (Nozue *et al.*, 2000) identifiziert (Übersichtsartikel: Briggs *et al.*, 2001; Briggs und Olney, 2001; Suetsugu und Wada, 2003). Zusätzlich zu zwei Phototropingenen besitzt *Adiantum* ein Gen, das für ein Phytochrom-Phototropin-Hybrid-Protein, PHY3, kodiert (Nozue *et al.*, 1998).

1.3.2.1 Aufbau der Phototropine und Lokalisation

Die *Arabidopsis* Phototropine sind etwa 120 kDa große Proteine, welche aus jeweils zwei N-terminalen PAS-Domänen und einer C-terminalen Serin/Threonin-Kinase-Domäne bestehen (Huala *et al.*, 1997; Hardie, 1999). Die PAS-Domänen der Phototropine sind eng mit denen von Proteinen verwandt, die durch Sauerstoff- und Spannungswechsel reguliert werden, und wurden deshalb als LOV-Domänen (light, oxygen, voltage) bezeichnet (Huala *et al.*, 1997).

Die in *E. coli* exprimierten LOV-Domänen-Fragmente (LOV1 und LOV2) binden Riboflavin-5'-Mononukleotid (FMN) nicht kovalent und stöchiometrisch. Demnach enthält ein Holophototropin-Molekül zwei FMNs (Christie *et al.*, 1999). Phot1 aus *Arabidopsis* ist mit der Plasmamembran assoziiert (Liscum und Briggs, 1995), wobei in Epidermiszellen die Verteilung an der Plasmamembran gleichmäßig ist, aber in den Kortikalzellen der Wurzel und des Hypokotyls phot1 an den apikalen und basalen Enden der Plasmamembran lokalisiert ist (Sakamoto und Briggs, 2002).

Die primäre Photochemie der Phototropine wurde mit in *E. coli* exprimierten rekombinanten LOV-Domänen (Salomon *et al.*, 2000; Swartz *et al.*, 2001) und an der Kristallstruktur einer LOV-Domäne von *Adiantum* phy3 (Crosson und Moffat, 2001) untersucht. LOV-Domänen durchlaufen einen Photozyklus, der aus der Bildung und Auflösung eines FMN-Cysteinyll-Adduktes besteht und durch eine abnehmende und dann wieder zunehmende Blaulichtabsorption begleitet wird. In jüngster Zeit ist intensiv am Photozyklus, der Flavin-Cysteinyll-Addukt-Bildung und der Struktur der Phototropin LOV-Domänen geforscht worden (Ataka *et al.*, 2003; Corchnoy *et al.*, 2002; Fedorov *et al.*, 2003; Iwata *et al.*, 2002; Kay *et al.*, 2003; Kennis *et al.*, 2003; Kottke *et al.*, 2003). Die Bildung des FMN-Addukts induziert vermutlich eine Konformationsänderung im Phototropin.

1.3.3 Prokaryotische Blaulichtrezeptoren

Über die Blaulichtrezeptoren der Prokaryoten und deren Signaltransduktion ist bisher weniger bekannt. Da in aquatischen Ökosystemen Blaulicht wegen der filternden Eigenschaften des Wassers vorherrscht, scheint für marine Organismen wie z. B. Cyanobakterien die Fähigkeit, Blaulicht zu detektieren, essenziell. Infolge der Sequenzierung vieler prokaryotischer Genome wurden zahlreiche putative Photorezeptoren identifiziert. Die geringe Komplexität der Prokaryoten und die Möglichkeit gerichteter Mutagenese der Prokaryoten sollte ein rasches Aufklären der Funktion dieser Photorezeptoren ermöglichen.

In *Caulobacter*, *Brucella*, *Xanthomonas*, *Anabaena*, *Bacillus*, *Listeria* und *Synechocystis* existieren einige Gensequenzen, die für LOV-Domänen-Proteine kodieren (Übersichtsartikel: Crosson, 2003). Das Protein YtvA aus *Bacillus subtilis* besitzt eine Domäne, die aufgrund von computergestützten 3-D-Analysen ein prokaryotischer Vorläufer der Phototropin LOV-Domäne sein könnte (Losi *et al.*, 2002). In *E. coli* überexprimiertes YtvA absorbiert Blaulicht und besitzt spektrale Eigenschaften, die mit einer Cysteinyll-Addukt-Bildung übereinstimmen (Losi *et al.*, 2002). PYP (photoactive yellow protein) aus dem Purpurbakterium *Ectothorhodospira halophila* (oder *Halorhodospira halophila*) vermittelt negative Phototaxis

im Blaulicht hoher Fluenzraten (Sprenger *et al.*, 1993). PYP besitzt eine PAS-Domäne und durchgeht einen Photozyklus mit verschiedenen rot geschifteten Intermediaten, wobei der stabilste Zustand eine blau-absorbierende Form ist (Perman *et al.* 1998).

In dem phototrophen Proteobakterium *Rhodobacter sphaeroides* wurde das Protein AppA entdeckt, dass für die Aktivierung von Photosynthesegenen gebraucht wird (Gomelsky und Kaplan, 1998). Der N-Terminus dieses Proteins bindet nicht kovalent FAD (Gomelsky und Kaplan, 1998) und wird als BLUF (sensors of blue-light using FAD)-Domäne bezeichnet (Gomelsky und Klug, 2002). AppA ist homolog zur blaulichtaktivierten Adenylyl-Cyclase aus *Euglena gracilis* (Iseki *et al.*, 2002). Die vom *Synechocystis* ORF slr1694 abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt eine große Homologie zur FAD-Bindedomäne von AppA und zur *Euglena* Adenylyl-Cyclase.

Die für *Synechocystis* bekannten Blaulichtantworten wie die blaulichtabhängige Glukoseverwertung (Anderson und McIntosh, 1991), die Phototaxis (Choi *et al.*, 1999; Ng *et al.*, 2003; Wilde *et al.*, 2002) und die Beeinflussung der Genexpression (El Bissati und Kirilovsky, 2001; Tyystjärvi *et al.*, 2002) deuten auf ein Vorhandensein von sensorischen Blaulichtrezeptoren. Die Blaulichtperzeption könnte durch cph2 und plpA (Kap. 1.1.3) und anderen Pigmenten übernommen werden, die mit Blaulichtrezeptoren (z. B. Cryptochrome oder AppA) anderer Organismen verwandt sind, durch Photosynthesepigmente oder durch bislang unbekannte Photorezeptoren. Im durchsequenzierten *Synechocystis*-Genom (<http://www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html>) sind neben den bereits oben beschriebenen phytochromähnlichen Genen (Kap. 1.1.3) zwei offene Leseraster – slr0854 und sl11629 – mit Homologie zur Photolyase/Cryptochrom-Familie vorhanden. Der ORF slr0854 kodiert für eine Photolyase, aber nicht der ORF sl11629 (eigene Daten; Hitomi *et al.*, 2000; Ng und Pakrasi, 2001). Kürzlich wurde die Kristallstruktur von sl11629 veröffentlicht (Brudler *et al.*, 2003). Brudler *et al.* postulierten, dass sl11629 bei der transkriptionellen Regulation in *Synechocystis* eine Rolle spielt, und zeigten, dass sl11629 DNA binden kann.

1.4 Zielsetzung

Cryptochrome sind bisher in Pflanzen, Tieren und im Menschen gefunden worden (Übersichtsartikel: Deisenhofer, 2000; Lin, 2002, van Gelder, 2002). Zu Beginn dieser Arbeit gab es noch keinen experimentellen Nachweis eines bakteriellen Cryptochroms. Im durchsequenzierten Genom des Cyanobakteriums *Synechocystis* (<http://www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html>) sind zwei offene Leseraster – slr0854 und sl11629 – mit Homologie zur Photolyase/Cryptochrom-Familie vorhanden. Der ORF slr0854 kodiert für eine Photolyase, nicht aber der ORF sl11629 (eigene Daten; Hitomi *et al.*, 2000; Ng und Pakrasi, 2001). In der vorliegenden Arbeit sollte durch Insertionsmutagenese eine mögliche Funktion von sl11629 als Photorezeptor geklärt werden. Sollte sl11629 als Photorezeptor fungieren, dann würde dies auf einen bakteriellen Ursprung der Cryptochrome deuten. Die heterologe Expression des Proteins in *E. coli* und dessen spektroskopische Analyse sollten Aufschluss darüber geben, ob Kofaktoren vorhanden und welcher Natur sie sind.

Im Laufe der Doktorarbeit wurde durch die Aufklärung des *Arabidopsis*-Genoms (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) die Zielsetzung erweitert. In *Arabidopsis* wurden bislang zwei Cryptochrome beschrieben und charakterisiert (Übersichtsartikel: Lin, 2002). In der *Arabidopsis*-Datenbank (<http://mips.gsf.de/proj/thal/db/index.html>) finden sich zusätzlich drei nicht charakterisierte Gensequenzen mit Homologie zur Photolyase/Cryptochrom-Familie: *At2g47590* (Ahmad *et al.*, 1998d), *At4g25290* und *At5g24850*. Aufgrund der Tatsache, dass die Identität zwischen der aus *At5g24850* abgeleiteten Aminosäuresequenz und dem *Synechocystis* sl11629 Protein ca. 50 % in einem Bereich von über 400 Aminosäuren beträgt, sollte zudem das *At5g24850* Protein charakterisiert werden. Die heterologe Expression des Proteins in *E. coli* sollte auch für dieses Protein Aufschluss über das Vorhandensein und die Natur von gebundenen Kofaktoren geben. Um die Frage zu klären, ob die N-terminale Extension von *At5g24850* für eine Lokalisation in Chloroplasten und/oder Mitochondrien verantwortlich ist, wie dies durch *in silico* Analysen vorhergesagt wurde, sollten *in vitro* Importuntersuchungen und die Analyse transient transformierter GFP-Fusionen in *Arabidopsis*-Protoplasten durchgeführt werden. Eine mögliche Photolyasefunktion von *At5g24850* sollte durch Komplementationsversuche mit Photolyase-defizienten *E.-coli*-Zellen und durch *in vitro* Enzymassays überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die für diese Arbeit verwendeten, aber nachfolgend nicht aufgeführten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad „pro analysis“. Sie wurden hauptsächlich entweder von Roth, Karlsruhe oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, bezogen. Die Herkunft der an dieser Stelle nicht berücksichtigten Chemikalien ist in den einzelnen Methoden-Kapiteln beschrieben.

Agarose	Pharmacia, Freiburg
Bacto-Agar	Difco, Detroit, Mi, USA
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit, Mi, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, Mi, USA
DNA-Marker: λ DNA/Eco47I (Avall)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Proteinmarker: SDS-7b Marker: Polypeptidgemisch, Mr: 26.6, 36.5, 48.5, 58, 84, 116 und 180 kDa vorgefärbt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.1.2 Fotomaterialien

Hyperfilm™ECL™	amersham pharmacia biotec, Buckinghamshire, England
Kodak BioMax TranScreen-LE (Low Energy) Intensifying Screen	Kodak, Rochester, New York, USA
Röntgenfilm-Entwickler: Kodak GBX developer and replenisher	bezogen über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Röntgenfilm-Fixierer: Kodak GBX fixer and replenisher	bezogen über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.1.3 Antibiotika

Die Antibiotika-Stammlösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, in *aqua bidest.* angesetzt, steril filtriert und in folgenden Konzentrationen angesetzt:

Antibiotikum	Hersteller	Konzentration der Stammlösung [mg/ml]	Arbeitskonzentration [$\mu\text{g/ml}$]
Ampicillin Natriumsalz	Roth, Karlsruhe	100	100
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe	10 in MeOH	20
Kanamycin Monosulfat	Duchefa, Haarlem, Niederlande	50	50
Spectinomycin Dihydrochlorid Pentahydrat	Fluka über Sigma-Aldrich, Steinheim	20	20
Tetrazyklin HCl	Duchefa, Haarlem, Niederlande	12,5	12,5

2.1.4 Pflanzenhormone

Hormon	Hersteller	Konzentration der Stammlösung [mg/ml]	Arbeitskonzentration [$\mu\text{g/ml}$]
2,4-D (2,4-Dichlorophenoessigsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim	2	1
Kinetin	Sigma-Aldrich, Steinheim	1	0.5
NAA (α -Naphthalen-essigsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim	1	0.1

2.1.5 Häufig verwendete Medien, Puffer und Lösungen

Alle eingesetzten Pufferlösungen sowie Glas- und Kunststoffgefäße wurden durch Dampfsterilisation für 20 bis 60 min bei 121° C von Keimen und DNase-Aktivitäten befreit.

Die Sterilisation von Impfösen, Scheren oder Skalpellen erfolgte durch Abspülen mit Ethanol (70 %; v/v) und anschließendem Abflammen.

Angegebene Prozentwerte bezeichnen Gewicht pro Volumen (w/v) bei Feststoffen und Volumen pro Volumen (v/v) bei Flüssigkeiten. Die Lösungen sind in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt.

Alle verwendeten, aber hier nicht beschriebenen Puffer wurden entweder vom Hersteller in den entsprechenden Kits mitgeliefert oder das Rezept am Ende eines Kapitels beschrieben.

10 x TBE-Puffer	890 mM Tris/HCl, pH 8.3, 890 mM H ₃ BO ₃ , 25 mM EDTA
100 x BG-F.P.C.	1.76 M NaNO ₃ , 30.4 mM MgSO ₄ x 6H ₂ O, 24.5 mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O, 3.12 mM Zitronensäure, 279 µM Na ₂ EDTA, 100 ml 1000 x Spurenelementlösung nach Rippka (1988)/I Medium
1000 x Spurenelementlösung (nach Rippka, 1988)	46.3 mM H ₃ BO ₃ , 4.15 mM MnCl ₂ x 4 H ₂ O, 0.77 mM ZnSO ₄ x 7 H ₂ O, 1.61 mM Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O, 0.32 mM CuSO ₄ x 5 H ₂ O, 0.17 mM Co(NO ₃) ₂ x 6 H ₂ O
BG-11 (autotroph)	10 ml/l 100 x BG-F.P.C., 1 ml/l 189 mM Na ₂ CO ₃ , 1 ml/l 175 mM K ₂ HPO ₄ , 5 ml/l 1 M TES, pH 8.0, 1 ml FeNH ₄ Citrat (Rippka <i>et al.</i> , 1979)
BG-11 (heterotroph)	BG-11 (autotroph) werden 2.5 ml/l 2 M Glucose zugesezt
BG-11-Plattenmedium	1 l BG-11 werden 15 g Agar zugesezt
BG-11-Plattenmedium für Phototaxis	1 l BG-11 werden 5 g Agar zugesezt
Bromphenolblau-Probenpuffer für DNA	1 x TBE-Puffer, pH 8.3, 10 % Glycerin, 0.004 % Bromphenolblau
LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl
LB-Plattenmedium	1 l LB-Medium werden 15 Agar zugesezt
Proteingel-Laufpuffer	25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS, pH 8.8 stellt sich von selbst ein
Protein-Probenpuffer (2x)	62.5 mM Tris/HCl, pH 6.8, 20 % Glycerin, 4 % SDS, 100 mM DTT, 0.05 %

	Bromphenolblau
TBS-Puffer	20 mM Tris/HCl, pH 7, 150 mM NaCl
TBS-T-Puffer	20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween 20
EB	10 mM Tris/HCl, pH 8.0
10 x TBE	890 mM Tris/HCl, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA; pH 8.0
TE	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA ; pH 7.5 oder pH 8.0

2.1.6 Verwendete Enzyme

2.1.6.1 Restriktionsenzyme

Die Restriktionsenzyme wurden von den Firmen MBI Fermentas, Wilna, Litauen und Amersham LifeScience, Braunschweig, bezogen.

2.1.6.2 Weitere Enzyme für die Molekularbiologie

Enzym	Konz.	Firma
DNase I	10 U/ μ l	Amersham Biosciences, Freiburg
Klenow Polymerase	1 U/ μ l	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
RNAguard™ RNase Inhibitor	34 U/ μ l	Amersham Biosciences, Freiburg
Shrimp Alkaline Phosphatase	1 U/ μ l	Amersham LifeScience, Braunschweig
SuperScript™ RNase H ⁻ Reverse Transkriptase	200 U/ μ l	GibcoBRL® Life Technologies, Karlsruhe
T4 DNA Ligase	5 U/ μ l bzw. 30 U/ μ l	MBI Fermentas, Wilna, Litauen
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	5 U/ μ l	MBI Fermentas, Wilna, Litauen
Vent DNA-Polymerase	2 U/ μ l	New England Biolabs® Inc., Schwalbach/Taunus

2.1.7 Kits

HiSpeed™ Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
pGEM® T-Vector System I	Promega, Mannheim
QIAex® II Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick™ PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
RNeasy® Mini Kit	QIAGEN, Hilden
TOPO® TA Cloning Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande

2.1.8 Modellorganismen dieser Arbeit

2.1.8.1 *Synechocystis* sp. PCC 6803

Der Gattungsname *Synechocystis* kommt aus dem Griechischen und heißt übersetzt „zusammenhängende Blase“ (syneches = zusammenhängend, kystis = Blase). Wahrscheinlich gehören die Chroococcales, zu deren Ordnung *Synechocystis* gezählt wird, zu den ältesten Typen der Cyanobakterien. Als Cyanobakterium besitzt *Synechocystis* zwar einen prokaryotischen Zellaufbau, aber auch die Fähigkeit zur oxygenen Photosynthese Höherer Pflanzen (Churin, 1995). Es wird angenommen, dass Cyanobakterien die Vorläufer der Chloroplasten Höherer Pflanzen sind (Endosymbiontentheorie; McFadden, 2001; Cavalier-Smith, 2002). Kaneko und Mitarbeiter haben mit der Aufklärung des Genoms von *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kaneko *et al.*, 1996; Kaneko *et al.*, 1996, Supplement) das erste Genom eines photosynthetischen Organismus entschlüsselt. Es besteht aus 3 573 470 Basenpaaren und 3 168 offenen Leserastern (ORFs).

Synechocystis sp. PCC 6803 kann sowohl autotroph als auch heterotroph angezogen werden. Bei heterotropher Anzucht zeigt *Synechocystis* sp. PCC 6803 eine blaulichtabhängige Glukoseverwertung. Anderson und McIntosh haben festgestellt, dass *Synechocystis* auf Glukose wächst, wenn ein täglicher Blaulichtpuls von mindestens fünf Minuten und mindestens $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ gegeben wird (Anderson und McIntosh, 1991). Dieses Wachstum wird als LAHG (light activated heterotrophic growth) bezeichnet.

Synechocystis sp. PCC 6803 ist von Natur aus mit exogener DNA transformierbar (Grigorieva und Shestakov, 1982). Da in *Synechocystis* Gene durch homologe Rekombination deletiert und ersetzt werden können, sind zahlreiche Mutationen in Photosynthese- und andere Gene eingeführt worden (Giacometti *et al.*, 1996). Durch die

geringe Komplexität des Genoms, die leichte Transformierbarkeit (Grigorieva und Shestakov, 1982), ein funktionierendes homologes Rekombinationssystem und die Fähigkeit zur Photosynthese wurde *Synechocystis* sp. PCC 6803 zu einem Modellorganismus der Pflanzenphysiologie.

2.1.8.2 *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana (Ackerschmalwand) wurde von Johannes Thal im 16. Jahrhundert im Harz entdeckt und ist ein Vertreter aus der Familie der Kreuzblütengewächse (Brassicaceae). In diese Familie gehören auch Nutzpflanzen wie Raps, Kohl und Rettich. *A. thaliana* ist heimisch in West-Eurasien und Ost-Afrika, wurde durch den Menschen aber auch in Japan und Amerika ausgebreitet, sowie in geringerem Maße auch in Australien, Neuseeland und Chile. Die Art bevorzugt saure Böden, und man findet sie hauptsächlich an offenen Stellen im Gelände. *A. thaliana* ist eine fakultative Langtagpflanze, einjährig und selbstbestäubend. Auch wenn die Ackerschmalwand von keinem besonderen ökonomischen Nutzen ist, so bietet sie doch wichtige Vorteile, die sie als Modellorganismus der Pflanzen-Biologie qualifizieren, um die Biologie einer Blütenpflanze auf dem molekularen Niveau zu verstehen. Die Vorteile sind ein kurzer Lebenszyklus (ungefähr 6 Wochen), sehr effiziente Samenproduktion, einfache Kultivierung auf wenig Platz; die Pflanze ist sowohl in Erde als auch auf künstlichen Medien kultivierbar und kann wegen ihrer leicht zugänglichen Blüten relativ einfach gekreuzt werden. Das Vorhandensein von vielen Mutationslinien (<http://atidb.cshl.org/>) und das 125 Mb kleine, auf nur fünf Chromosomen lokalisierte (diploid, also 10 Chromosomen) Kerngenom, das seit 2000 vollständig sequenziert vorliegt (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), sind weitere Vorteile. Ein zusätzlicher entscheidender Faktor ist die Transformierbarkeit. Für *A. thaliana* sind verschiedene Transformationssysteme etabliert worden. Diese umfassen den direkten Gentransfer in Protoplasten (Damm *et al.*, 1989) sowie den *Agrobacterium-tumefaciens*-vermittelten Gentransfer (Übersichtsartikel: Gelvin, 2003). Es existieren zwei hocheffiziente Transformationssysteme, bei denen keine Gewebekultur benötigt wird. Dabei werden entweder Samen oder ganze Pflanzen mit einer *Agrobacterium-tumefaciens*-enthaltenden Suspension inkubiert bzw. Vakuum-infiltriert.

2.1.9 *E.-coli*- und *Synechocystis*-Stämme

2.1.9.1 *E.-coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Verwendung	Firma/Herkunft
BL21(DE3)	<i>lambda (DE3) (lacI, lacUV5-T7 gene 1, ind1, sam7, nin5), F⁻, dcm, ompT, hsdS(r⁻ B, m⁻ B), gal</i>	heterologe Expression	Promega, Mannheim
JM109 (DE3)	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r⁻ k, m⁺ k), relA1, supE44, delta (lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI^q Z delta M15], lambda (DE3)</i>	heterologe Expression	Promega, Mannheim
KY1056	<i>argE3 his-4 leu-6 proA2 thr-1 thi-1 rpsL31 galK2 lacY1 ara-14 xyl-5 mtl-1 sopE44 srlC300::Tn10recA56</i>	Test auf Photolyasefunktion eines Proteins	Akasaka und Yamamoto, 1991
KY1225	<i>argE3 his-4 leu-6 proA2 thr-1 thi-1 rpsL31 galK2 lacY1 ara-14 xyl-5 mtl-1 sopE44 srlC300::Tn10recA56 phr-36</i>	Test auf Photolyasefunktion eines Proteins	Akasaka und Yamamoto, 1991
M15 [pREP4]	<i>nal^s, str^s, rif^s, thi⁻, lac⁻, ara⁺, gal⁺, mtl⁻, F⁻, recA⁺, uvr⁺, lon⁺</i>	heterologe Expression	QIAGEN, Hilden
TOP10	<i>F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 DlacX74 deoR recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG, zdroj</i>	Für PCR-Klonierungen unter Verwendung des TOPO TA Cloning® Kits von Invitrogen	Invitrogen, Groningen, Niederlande
XL1-Blue	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r⁻ k, m⁺ k), relA1, supE44, delta (lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI^q Z delta M15], lambda (DE3)</i>	Für sämtliche Klonierungen ohne nähere Angaben	Stratagene, Amsterdam, Niederlande

2.1.9.2 *Synechocystis*-sp.-PCC-6803-Stämme

Stamm	Herkunft
Wildtyp	Prof. Dr. Lee McIntosh, MSU, PRL, DOE, East Lansing, Mi, USA
<i>slr0854</i> [Wildtyp]	In den ORF <i>slr0854</i> wurde in die XmaI-Schnittstellen eine 2000 bp große Spectinomycin-Kassette inseriert (Examensarbeit Tatjana Kleine, Marburg, 1999)
<i>sl1629</i> [Wildtyp]	In den ORF <i>sl1629</i> wurde in die Schnittstellen NcoI und Eco91I eine 1400 bp große Kanamycin-Kassette inseriert (Abb. 2.1 und Examensarbeit Tatjana Kleine, Marburg, 1999)
„Börner“ Wildtyp	Thomas Börner, Humboldt Universität Berlin; für Phototaxis-Experiment
<i>sl1629</i> [„Börner“ Wildtyp]	
<i>cph2</i> [„Börner“ Wildtyp]	
<i>sl1629 cph2</i> [„Börner“ Wildtyp]	
„Grossman“ Wildtyp	
<i>sl1629</i> [„Grossman“ Wildtyp]	
<i>cph2</i> [„Grossman“ Wildtyp]	

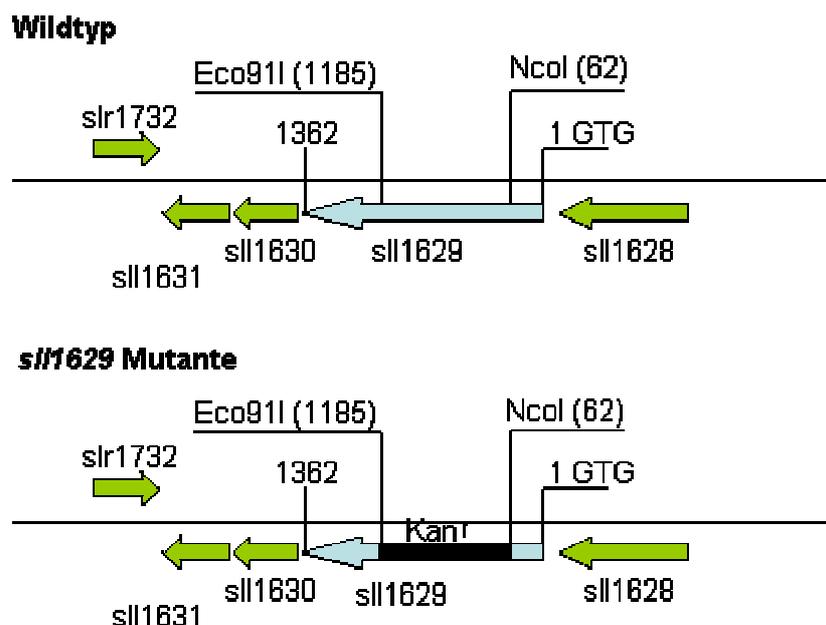


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der sll1629-Mutagenese.

2.1.10 Ausgangsplasmide

Sämtliche Plasmide tragen eine Antibiotikum-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli*. Alle Klonierungsschritte wurden durch Restriktionsanalyse überprüft und eingebrachte PCR-Amplifikate wurden sequenziert.

Plasmid	Verwendung	Herkunft
pAVA393	zur transienten Expression in Pflanzenzellen, C-terminale GFP-Fusion	Albrecht von Arnim, The University of Tennessee, Knoxville, TN, USA
pCR-TOPO	zur Klonierung von PCR-Produkten mittels Topoisomerase-Aktivität; Blau-Weiß-Selektion möglich	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pET-15b	zur heterologen Protein-Expression in <i>E. coli</i> , N- und C-terminaler His-tag möglich; <i>in vitro</i> Transkription/Translation	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
pET-28a	zur heterologen Protein-Expression in <i>E. coli</i> ; N- und C-terminaler His-tag möglich	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
pGEM-T	Klonierung von PCR-Produkten ; Blau-Weiß-Selektion möglich	Promega, Mannheim

pHP45Ω	enthält eine Spectinomycin-Kassette zur Selektion in Bakterien	Prentki und Krisch, 1984
pQE-30	zur heterologen Protein-Expression in <i>E. coli</i> , N-terminaler His-tag	QIAGEN, Hilden
pQE-60	zur heterologen Protein-Expression in <i>E. coli</i> , C-terminaler His-tag	QIAGEN, Hilden
pUC4K	enthält eine Kanamycin-Kassette zur Selektion in Bakterien	Taylor und Rose, 1988
pUC57	Klonierung von PCR-Produkten ; Blau-Weiß-Selektion möglich	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.11 Oligonukleotide und Zwischenplasmide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg, synthetisiert; die Nukleotidsequenz ist jeweils vom 5'- in Richtung 3'-Ende angegeben. PCR-Reaktionen für Klonierungen wurden mit *Vent*-Polymerase durchgeführt und die Sequenzen der PCR-Fragmente durch Sequenzierungen (AG Maier, Marburg) auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

5' primer	3' primer
#1 (22.10.99) GTC GAC TCT AGA CTC GAG GCG GCC GCC CAC CGC GGT GGG AGC TCA GAT CTG	#2 (22.10.99) GTC GAC AGA TCT GAG CTC CCA CCG CGG TGG GCG GCC GCC TCG AGT CTA GAG TCG
#5 (22.10.99) GCG GCC GCA TAA CTT CGT ATA GCA TAC ATT ATA CGA AGT TAT GAA TTC GCG AAG CTT	#6 (22.10.99) AAG CTT ATA ACT TCG TAT AGC ATA CAT TAT ACG AAG TTA TCC ACC GCG GTG G
#1 (22.10.99), #2 (22.10.99), #5 (22.10.99) und #6 (22.10.99) dienen als Oligonukleotide für <i>Gel-shift</i> -Analysen	
BlueJA-N CAT ATG TAC TGT TAC GAC CCC AGA C zur Amplifikation des ORFs <i>sll1629</i> aus genomischer DNA aus <i>Synechocystis</i> , generiert durch gerichtete PCR-Mutagenese eine NdeI-Schnittstelle vor das Start-Codon	BlueJA-C CAT GGC GCT AAC CTA AGC AA zur Amplifikation des ORFs <i>sll1629</i> aus genomischer DNA aus <i>Synechocystis</i>
<i>primer</i> BlueJA-N und BlueJA-C dienen der PCR-Überprüfung der <i>sll1629</i> Mutagenese	
#1 (6. 7. 1999) GAG CTC GTG TAC TGT TAC GAC CCC AG zur Amplifikation des	#2 (6. 7. 1999) GTC GAC AGC AAT AAC ACC CAT CTG TTC AAT zur Amplifikation

ORFs sll1629 aus genomischer DNA aus <i>Synechocystis</i> , generiert durch gerichtete PCR-Mutagenese eine SacI-Schnittstelle vor das Start-Codon	des ORFs sll1629 aus genomischer DNA aus <i>Synechocystis</i> , generiert durch gerichtete PCR-Mutagenese eine Sall-Schnittstelle
1358 bp großes PCR-Produkt der <i>primer</i> #1 (6.7. 1999) und #2 (6.7.1999) in den Zwischenvektor pCR2.1TOPO resultiert in pCR/sll1629	
#3 (13.06.01) ACT CTC CAA CAG CGC GAA AG mit #5 (13.06.01) Amplifikation eines 231 bp großen <i>psbA2/psbA3</i> -Fragmentes aus <i>Synechocystis</i> und als <i>primer</i> für quantitative RT-PCR-Studien, Anfang: Position 10 in <i>psbA2</i> bzw. <i>psbA3</i>	#5 (13.06.01) ACC AGA GAT GAT GTT GTT ACC G zur Amplifikation eines 231 bp großen <i>psbA2/psbA3</i> -Fragmentes bzw. eines 300 bp großen <i>psbA3</i> -Fragmentes aus <i>Synechocystis</i>
231 bp großes PCR-Produkt der <i>primer</i> #3 (13.06.01) und #5 (13.06.01) in pGEM resultiert in pGEM/#43	
#4 (13.06.01) TCT CTG AGC TTG AGG CCA AAT C mit #5 (13.06.01) zur Amplifikation eines 300 bp großen <i>psbA3</i> -Fragmentes aus <i>Synechocystis</i> und als <i>primer</i> für quantitative RT-PCR-Studien; Anfang: Position -59 von <i>psbA3</i>	
300 bp großes PCR-Produkt der <i>primer</i> #4 (13.06.01) und #5 (13.06.01) in pGEM resultiert in pGEM/#44	
#6 (13.06.01) GGC ACA CTA GAA AAA GAG AGT TAG G mit #7 (13.06.01) Amplifikation eines 400 bp großen <i>mpB</i> -Fragmentes aus <i>Synechocystis</i> und als Primer für quantitative RT-PCR-Studien; Anfang: Position 95 von <i>mpB</i>	#7 (13.06.01) TTG GGG AGT TAT CTA TCT GGG A zur Amplifikation eines 400 bp großen <i>mpB</i> -Fragmentes aus <i>Synechocystis</i> und als <i>primer</i> für quantitative RT-PCR-Studien; Ende: Position 494 von <i>mpB</i>
400 bp großes PCR-Produkt der <i>primer</i> #6 (13.06.01) und #7 (13.06.01) in pGEM resultiert in pGEM/rnpB (95-494 bp)	
#1 (08.11.01) CC ATG GCG GCT TCC TCT CTC TC zur Amplifikation der kodierenden Region der <i>At5g24850</i> Volllänge und <i>At5g24850</i> (1-63) mit cDNA aus <i>Arabidopsis</i> Ökotyp <i>Landsberg erecta</i> als <i>template</i> ; generiert durch gerichtete PCR-Mutagenese eine NcoI-Schnittstelle	#2 (8.11.01) C CAT GGC AGG ACC ATT GTG TCT AGA AC zur Amplifikation von <i>At5g24850</i> mit cDNA aus <i>Arabidopsis</i> Ökotyp <i>Landsberg erecta</i> als <i>template</i> , generiert durch gerichtete PCR-Mutagenese eine NcoI-Schnittstelle. Zusätzlich ist ein Cytosin 5' der NcoI-Schnittstelle eingefügt,

<p>vor das Start-Codon. Das ATG-Codon in der NcoI-Schnittstelle ist auch der natürliche Start von <i>At5g24850</i>.</p>	<p>damit C-terminale Fusionen (GFP und His-tag) im Leserahmen angefügt werden.</p>
<p>1720 bp großes PCR-Produkt der <i>primer</i> #1 (08.11.01) und #2 (08.11.01) in pGEM resultiert in pGEM/CRY3 (1-569)</p>	
<p>#3 (8.11.01) CCATGGG ATC CGC CGC AAA AAT GAA CGA – 3' zur Amplifikation der kodierenden Region für ein N-terminales <i>At5g24850</i> Deletionskonstrukt (AS 40-569) mit cDNA aus <i>Arabidopsis</i> Ökotyp Landsberg erecta als <i>template</i>, generiert durch gerichtete PCR-Mutagenese eine NcoI-Schnittstelle. Zusätzlich sind Guanin und Adenin 3' der NcoI-Schnittstelle eingefügt, damit die Sequenz im richtigen Leserahmen abgelesen wird.</p>	
<p>1600 bp großes PCR-Produkt der <i>primer</i> #3 (08.11.01) und #2 (08.11.01) in pGEM resultiert in pGEM/CRY3 (40-569)</p>	
	<p>#1 (03.05.02) CCAT GGC GGC GAC GGA GTC AAT CTC TT zur Amplifikation der kodierenden Region für ein N-terminales <i>At5g24850</i> Konstrukt (AS 1-63) mit cDNA aus <i>Arabidopsis</i> Ökotyp Landsberg erecta als <i>template</i>, generiert durch gerichtete PCR-Mutagenese eine NcoI-Schnittstelle</p>
<p>195 bp großes PCR-Produkt aus #1 (03.05.02) und #2 (08.11.01) in pGEM resultiert in pGEM/CRY3 (1-63)</p>	
<p>up-sll1629-5' (#1 (20.6.02)) GAA TTC CAG GAT TAA GAC CTT TCC AAGC zur Amplifikation eines 280 bp großen, direkt von ORF sll1629 stromaufwärts gelegenen, Fragmentes mit genomischer DNA aus <i>Synechocystis</i> als <i>template</i>, generiert durch gerichtete PCR-Mutagenese eine EcoRI-Schnittstelle; Position -278 von ORF sll1629</p>	<p>up-sll1629-3' (#2 (20.6.02)) CCA TGG CGG TAA TTG CTA AAC CAG ATT TTA zur Amplifikation eines 290 bp großen, direkt von ORF sll1629 stromaufwärts gelegenen, Fragmentes mit genomischer DNA aus <i>Synechocystis</i> als <i>template</i>, generiert durch gerichtete PCR-Mutagenese eine NcoI-Schnittstelle; Position -1 von ORF sll1629</p>

290 bp großes PCR-Produkt aus #1 (20.6.02) und #2 (20.6.02) in pGEM resultiert in pGEM/upsII1629	
down-sII1629-5´ (#3 (20.6.02)) GGA TCC GTT AGC GCC ATG GAA GAA TTA TTG zur Amplifikation eines 190 bp großen, direkt von ORF sII1629 stromabwärts gelegenen, Fragmentes mit genomischer DNA aus <i>Synechocystis</i> als <i>template</i> , generiert durch gerichtete PCR-Mutagenese eine BamHI-Schnittstelle; Position 1363 von ORF sII1629	down-sII1629-3´ (#4 (20.6.02)) GTC GAC ATT AGT GCT TCT TGC CTC CGC zur Amplifikation eines 190 bp großen, direkt von ORF sII1629 stromabwärts gelegenen, Fragmentes mit genomischer DNA aus <i>Synechocystis</i> als <i>template</i> , generiert durch gerichtete PCR-Mutagenese eine Sall-Schnittstelle; Position 1551 von ORF sII1629
200 bp großes PCR-Produkt aus #3 (20.6.02) und #2 (20.6.02) in pGEM resultiert in pGEM/downsII1629	

2.1.12 Weitergehende Plasmid-Konstruktionen

Als Ausgangsplasmide dienen die Plasmide aus Kap. 2.1.10 und Kap. 2.1.11.

2.1.12.1 Konstrukt für die Überproduktion von ORF sII1629 in *E. coli*

Das 1360 bp große SacI/Sall-Insert aus pCR/sII1629 wurde in die SacI- und Sall-Schnittstellen des Vektors pQE-30 ligiert. Der daraus entstandene Vektor wurde **pQE-30/sII1629** genannt.

2.1.12.2 Konstruktion der Kompetitoren für qRT-PCR-Analysen

Ein 50 bp KpnI-Eco91I-Fragment wurde aus pGEM/#44 und ein 60 bp Paul-XagI Fragment aus pGEM/*mpB* geschnitten. Die linearisierten Fragmente wurden durch jeweilige *blunt end* Ligation zirkularisiert; die resultierenden Vektoren, **pGEM/44-50bp** und **pGEM/rnpB-60bp** wurden als Kompetitoren in qRT-PCR-Analysen eingesetzt.

2.1.12.3 Konstruktionen zur *in vivo* Lokalisation von At5g24850

Die Vektoren pGEM/CRY3(1-569), pGEM/CRY3(40-569) und pGEM/CRY3(1-63) wurden mit NcoI geschnitten und die isolierten Inserts jeweils in den GFP-Expressionsvektor pAVA393 *sticky end* ligiert. Bei der Überprüfung der Vektoren wurde nicht nur auf das Vorhandensein des Inserts, sondern auch auf dessen Orientierung getestet. Die resultierenden Vektoren **pAVA393/CRY3(1-569)**, **pAVA393/CRY3(40-569)** und **pAVA393/CRY3(1-63)** wurden in Lokalisationsstudien eingesetzt.

2.1.12.4 Konstruktion des Vektors für Chloroplastenimport-Studien und *gel shift assay*

Das 1720 bp große NcoI-Fragment aus pAVA393/CRY3(1-569) wurde *sticky end* in den Vektor pET-15b ligiert und resultierte im Vektor **pET-15b/CRY3(1-569)**. Der Vektor wurde nicht nur auf Vorhandensein des Inserts, sondern auch auf dessen Orientierung getestet.

2.1.12.5 Konstruktionen zur Überproduktion von At-cry3

Die Vektoren pAVA393/CRY3(1-569) und pAVA393/CRY3(40-569) wurden beide mit NcoI geschnitten und die isolierten 1720 bp bzw. 1590 bp großen Inserts jeweils in den 6xHis Expressionsvektor pQE-60 *sticky end* ligiert. Bei der Überprüfung der Vektoren wurde nicht nur auf das Vorhandensein des Inserts, sondern auch auf dessen Orientierung getestet. Die resultierenden Vektoren – **pQE-60/CRY3(1-569)** und **pQE-60/CRY3(40-569)** – wurden in Tests auf Photolyaseaktivität des Proteins und zur Aufreinigung des Proteins eingesetzt.

2.1.12.6 Konstruktionen zur Komplementation der *Synechocystis cry* Mutante mit At-cry3

In der nachfolgenden Beschreibung wird CRY3* synonym sowohl für CRY3 (1-569) als auch für CRY3 (40-569) gebraucht. Die Klonierungsstrategie ist in Abb. 2.2 dargestellt. Der Vektor pQE-60/CRY3* wurde EcoRI/BamHI-geschnitten und das Insert in den Vektor pUC57 ligiert. In den resultierenden Vektor pUC57/CRY3* wurde das EcoRI/NcoI-geschnittene Insert aus pGEM/upsII1629 (Kap. 2.1.11) ligiert. Daraus entstand der Vektor pUC57/upsII1629/CRY3*. In diesen Vektor wurde das BamHI/Sall-geschnittene Insert aus pGEM/downsII1629 ligiert, was den Vektor pUC57/upsII1629/CRY3*/downsII1629 ergab. Abschließend wurde pHP45Ω mit BamHI geschnitten und das 2060 bp große Fragment in pUC57/upsII1629/CRY3*/downsII1629 ligiert. Dies resultierte im Vektor

pUC57/upsII1629/CRY3*/Spec/downsII1629. Mit diesem Konstrukt wurden *Synechocystis* Wildtyp- und sll1629 Mutanten-Zellen transformiert.

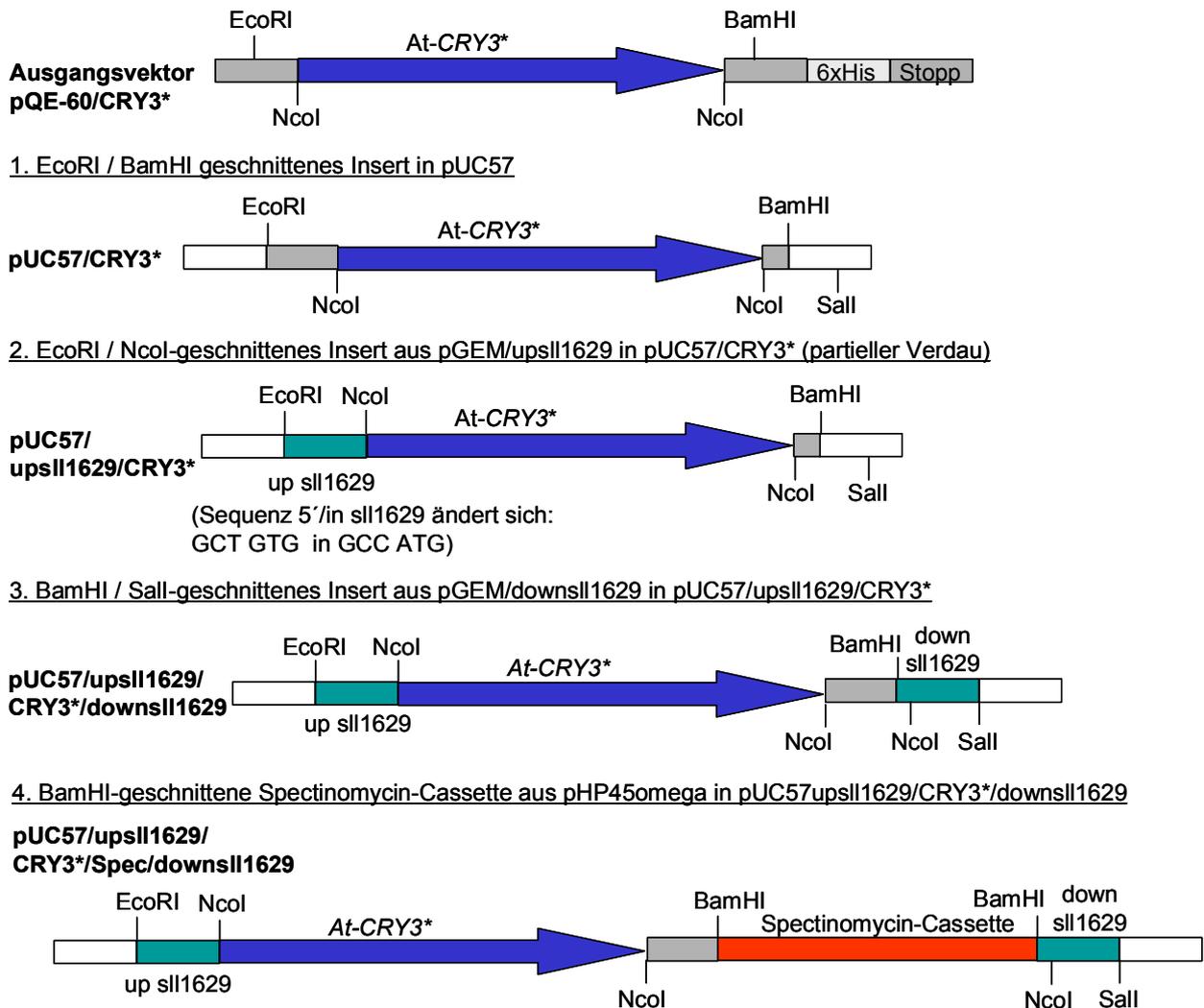


Abb. 2.2: Strategie zur Herstellung des Konstruktes zur Komplementation der *Synechocystis cry* Mutante mit *At-cry3*. Die Klonierungsschritte sind im Text erläutert.

2.1.13 Leuchtröhren

Blaulichröhren	Philips TLD 36W/18 Blue, $\lambda_{\max} = 436 \text{ nm}$
Rotlichtröhren	Philips TLD 36W/15, $\lambda_{\max} = 642 \text{ nm}$
UV-B-Röhren	Philips TL40W/12
Weißlichtröhren	Osram L36W/32 Warmton de Luxe Osram L36W/19 Tageslicht

2.1.14 Filter für Lichtfelder

Blaufeld	PG 627/3 (Plexiglas von Röhm und Haas)
Rotfeld	PG 501/3 (Plexiglas von Röhm und Haas)

2.1.15 Filter für Projektoren

Es wurden Filter der Schott Glaswerke, Mainz, eingesetzt.

Bezeichnung	Transmission [%]	Bandbreite [nm]
UV-IL 333	44	6
UV-IL 372	41	7.5
UV-IL 383	29	8
IL 403	32	13
DAL 424	34	17
DAL 447	41	14
AL 662	53	19
IL 732	44	14

2.1.16 Eingesetzte Geräte

Gerät	Bezeichnung	Firma
Diaprojektor	Prado Universal 31047	Ernst Leitz GmbH, Wetzlar
Digitalkamera	Coolpix 5000	Nikon
Folienschweißgerät	Vacupak	Krups
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
<i>Imagestation</i>	Gel Doc 1000	Bio-Rad, München
Magnetrührer	RCT basic	IKA®Werke, Staufen
PCR-Cycler	UNO Thermoblock	Biometra, Göttingen
	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
Protein-Transferapparatur	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
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		<i>MSE</i> (Measuring & Scientific Equipment)
Wärmeschrank	B 6060	Heraeus Instruments, South Plainfield, NJ, USA
Wasserbad	Typ 1003	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Zentrifugen	Biofuge pico	Heraeus Instruments, South Plainfield, NJ, USA
	Labofuge 400 R	Heraeus Instruments, South Plainfield, NJ, USA
	J2-21 Centrifuge	Beckmann

2.2 Methoden

2.2.1 Stamm- und *Arabidopsis*-Zellkultur-Haltung

Die verwendeten *E.-coli*- und *Synechocystis*-Zellen wurden sowohl in flüssigem als auch auf festem Nährmedium angezogen bzw. gelagert, wobei für die *E.-coli*-Bakterien LB-Medium und für die Cyanobakterien BG-11-Medium verwendet wurde.

Das LB- bzw. BG-11-Medium wurde aliquotiert, die Glasbehältnisse mit Alufolie verschlossen und autoklaviert. So behandelt, waren die Medien für mehrere Wochen haltbar. Zur Herstellung von Plattenmedien wurde den Medien vorher jeweils 15 g/l Bacto-Agar hinzugefügt. Nach der Dampfsterilisation wurde die Lösung in einem Wasserbad auf 60° C abgekühlt und 1 ml/l der entsprechenden Antibiotika zur Selektion steril filtriert hinzugegeben (zur Konzentration der Antibiotika s. 2.1.3). Nun wurde das Medium so in die Platten gegossen, dass der Boden gut bedeckt war. Die Platten blieben über Nacht in der Sterilarbeitsbank zum Trocknen stehen und wurden dann bei 8° C im Kühlraum gelagert.

Zellkolonien von *E. coli* auf Platte sollten nicht länger als vier Wochen bei 4° C aufbewahrt werden. Zur längeren Lagerung wurden Gefrierkulturen (2.2.1.2) angefertigt angelegt. *Synechocystis* wurde autotroph bei 30° C und einer Belichtung von 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Weißlicht auf BG-11-Platten angezogen. Es musste etwa alle drei Wochen auf frisches Medium überimpft werden. Die heterotrophe Anzucht erfolgte in Flüssigkulturen mit 5 mM Glucose im BG-11-Medium bei 28° C mit einer täglichen Weißlichtgabe von 10 min und 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.2.1.1 Herstellen einer *E.-coli*-Vorkultur

Um *E.-coli*-Zellen zu vermehren, wurden 3 ml LB mit den erforderlichen Antibiotika (zur Konzentration s. 2.1.3) zur Selektion mit einer Kolonie von einer LB-Agar-Platte inokuliert und über Nacht bei 250-300 rpm und 37° C geschüttelt.

2.2.1.2 Gefrierkulturen von *E.-coli*-Zellen

Um eine Gefrierkultur anzulegen, wurden 500 μl einer Vorkultur mit 200 μl 76 %igem Glycerin versetzt und bei -70° C tiefgefroren.

2.2.1.3 Reaktivierung einer *E.-coli*-Gefrierkultur

Es wurde mit einer Impföse etwas Flüssigkeit der Gefrierkultur auf einer LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert.

2.2.1.4 Herstellen einer *Synechocystis*-Flüssigkultur

50 bzw. 200 ml BG-11 wurden mit *Synechocystis*-Zellen von der Platte inokuliert und für etwa eine Woche auf einem Schüttler bei 170 rpm, 30° C und 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ inkubiert.

2.2.1.5 Gefrierkulturen von *Synechocystis*-Zellen

Eine rasch wachsende *Synechocystis*-Flüssigkultur (OD_{730} von ca. 0.3) wurde auf eine OD_{730} von ca. 0.15 verdünnt und ü. N. bei 30° C weiter kultiviert. Die Zellen wurden für 12 min bei RT und 4 500 g zentrifugiert. Das Pellet wurde zu einer OD_{730} von etwa 3.0 in BG-11-Medium resuspendiert. Es wurde Methanol bzw. DMSO in einer Konzentration von 5 bzw. 8 % dazu gegeben und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bei -70° C gelagert.

Obwohl Glycerin ein effektives Cryoprotektivum für Bakterien ist, ist es für die meisten Cyanobakterien nicht geeignet. Befinden sich die Zellen schon in Methanol bzw. DMSO, werden sie schnell durch Lichteinfluss getötet.

2.2.1.6 Reaktivierung einer *Synechocystis*-Gefrierkultur

Es wurde mit einer Impföse etwas Flüssigkeit der Gefrierkultur auf einer BG-11-Platte, versetzt mit den entsprechenden Antibiotika, ausgestrichen. Zudem wurden 10 ml BG-11 ohne Antibiotika und 10 ml BG-11 mit Antibiotika mit der Gefrierkultur angeimpft. Die Platte und die Flüssigkulturen wurden für 2-3 Tage bei sehr niedriger Lichtfluenzrate stehen gelassen. Die Flüssigkulturen wurden in diesen Tagen nicht oder nur bei 50 rpm geschüttelt. Wenn nach 2-3 Tagen die Kulturen hoch gewachsen waren, konnten sie in höhere Lichtintensitäten gestellt und bis zum Erreichen der gewünschten OD geschüttelt werden. Die BG-11-Platte und der Kolben ohne Antibiotika dienten der Absicherung der Kultur.

2.2.1.7 Entsorgung der Bakterienkulturen

Alle nicht mehr benötigten Bakterien-Kulturen wurden durch Autoklavieren für 40 min bei 121° C zerstört.

2.2.1.8 *Arabidopsis*-Zellkultur

In dieser Arbeit wurden eine *Arabidopsis*-Wurzelzellenkultur und eine *Arabidopsis*-Mesophyllzellenkultur verwendet. Die Kulturen wurden bei 22° C (Wurzelzellen) bzw. 25° C (Mesophyllzellen) und 130 rpm geschüttelt. Alle 7 Tage wurden 6-10 ml in 35 ml MS-Medium überimpft. Die Wurzelzellenkultur wurde im Dunkeln inkubiert, und dem Medium wurden das Hormon 2,4-D (2,4-Dichlorophenoessigsäure) in einer Endkonzentration von 1 mg/l und 10 ml/l der Vitamin-Stammlösung zugesetzt. Die Mesophyllzellenkultur wurde im Kurztag (8 h hell, 16 h dunkel) inkubiert. Dem Medium waren die Hormone Kinetin (Sigma) und NAA (α -Naphthalenessigsäure, Sigma) in einer Konzentration von 0.5 mg/l und 0.1 mg/l und 2.5 ml der Vitamin-Stammlösung zugesetzt.

MS-Medium:

4.3 g/l MS basal salt mixture (Sigma #5524),
30 g/l Saccharose; mit KOH auf pH 5.7, 15 min
autoklavieren

2,4-D:

2 mg/ml 2,4-D in wenig 0.5 M KOH lösen, mit
aqua bidest. auf Endvolumen; mit HCl auf pH 6-
7; steril-filtrieren und bei 4° C aufbewahren

Vitamin-Stammlösung:

250 mg/l Nikotinsäure, 250 mg/l Pyridoxin-HCl,
2.5 g/l Thiamin-HCl, 25g/l Myo-Inositol; steril-
filtrieren und bei -20° C aufbewahren; wird
beim Auftauen milchig

2.2.2 Genetische und molekularbiologische Methoden

Grundlegende molekularbiologische Methoden wurden, wenn nicht explizit angegeben, nach „Current Protocols in Molecular Biology“ (John Wiley and Sons, Inc.) durchgeführt.

2.2.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.2.2.1.1 *Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli: Minipräparation*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus den verwendeten *E.-coli*-Stämmen wurden Präparationen ausgehend von 3 ml *E.-coli*-Vorkultur nach den Methoden der Alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) oder der *boiling preparation* (Holmes und Quigley, 1981) durchgeführt. Die DNA wurde zum Schluss in 50 µl TE, EB oder *aqua bidest.* aufgenommen und hatte dann eine Konzentration – je nach präpariertem Plasmid - von 20-250 ng/µl.

2.2.2.1.2 *Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli: Maxipräparation*

Um Plasmide in einem größeren Maßstab zu präparieren, wurde das HiSpeed™ Plasmid Maxi Kit von QIAGEN (Hilden) verwendet. Die DNA wurde in 500 µl TE aufgenommen und hatte eine Konzentration von 0.75-2 µg/µl.

2.2.2.1.3 *Präparation genomischer DNA aus Synechocystis*

Entweder wurden *Synechocystis*-Zellen mit der Impföse von der Platte genommen und in 400 µl 1 x TE suspendiert oder 40 ml einer Flüssigkultur abzentrifugiert (12 min, 4 000 g). Danach wurden 200 µl Glasperlen, 8 µl 10 % SDS, 8 µl Na-Lauroyl-Sarkosin und 400 µl Phenol zu den Zellen hinzugegeben. Anschließend wurde, um die Zellen mechanisch aufzubrechen, dreimal für jeweils 30 s stark durchmischt und dann für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert (Kühltschzentrifuge Labofuge 400 R, Hereaus). Die wässrige Phase – der Überstand – wurde erneut mit 400 µl Phenol extrahiert. Dazu wurden 400 µl Phenol zum Überstand gegeben, stark durchmischt und 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Dann wurde zum dritten Mal die obere Phase mit 400 µl Phenol/Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert. Die obere Phase davon wurde anschließend dreimal mit je 400 µl Chloroform extrahiert. Zur oberen Phase wurden ein Zehntel des Gesamtvolumens, also 40 µl 3 M NaAc, und das zweifache Volumen, also 800 µl, eisgekühltes 99 %iges Ethanol gegeben und 1 min lang stark durchmischt. Die DNA wurde bei –20°C über Nacht gefällt. Am nächsten Tag wurde in der Kühlzentrifuge bei –10° C und 13000 rpm 15 bis 30 min zentrifugiert, der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 1 ml eisgekühltem 70 %igem Ethanol 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert, danach getrocknet und in 20 µl TE (pH 8.0) aufgenommen.

2.2.2.1.4 RNA-Isolierung aus *Synechocystis*-Flüssigkulturen

Für die RNA-Präparation aus *Synechocystis* wurde das RNeasy® Mini Kit (QIAGEN, Hilden) verwendet. 2 ml einer Flüssigkultur einer OD₇₃₀ von 1.5 bis 3 wurden 1 min bei 13 000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen, und das Pellet in 100 µl TE, pH 8.0, resuspendiert. Nach Zugabe von etwa 70 µl Glasperlen wurde sechsmal 30 s mit je einer Pause von 30 s kräftig geschüttelt. Nach Zugabe von 350 µl RLT-Puffer (vom Hersteller) wurde kräftig durchmischt, zentrifugiert (1 min, 13000 rpm, RT) und mit dem Überstand weiter nach Anweisung des Kits verfahren. Die RNA wurde zweimal mit 30 µl RNase-freiem *aqua bidest.* eluiert und bei -70° C aufbewahrt.

2.2.2.1.5 DNase-I-Verdau einer RNA-Präparation

Da die präparierte RNA nicht vollkommen DNA-frei war, jedoch mittels der sensitiven RT-PCR (s. Kap. 2.2.3.10.2) quantifiziert werden sollte, wurde die RNA nach folgendem Ansatz mit DNase I behandelt:

RNA	60 µl
H ₂ O	20,6 µl
10 x DNase-I-P.	10 µl
RNase-Inhibitor	0,4 µl
DNase I	1 µl
0.1 M DTT	8 µl

Der Ansatz wurde für 30 min bei 37° C im Heizblock (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Die so behandelte RNA wurde mit dem RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

2.2.2.2 Elektrophorese von Nucleinsäuren

2.2.2.2.1 Nichtdenaturierende Gelelektrophorese von DNA

Bei der Gelelektrophorese wird genutzt, dass die DNA ein Polyanion ist und daher im elektrischen Feld zur Anode wandert. Die Wanderungstrecke von linearer doppel- oder einzelsträngiger DNA durch ein Molekularsieb ist antiproportional zum Logarithmus ihrer Größe. Daher wandern kleinere Fragmente schneller als größere. So lassen sich DNA-

Fragmente zwischen 100 bp und 20 kbp in – je nach Größe der zu trennenden Fragmente – in 0.6 bis 2 %igen Agarose-Gelen auftrennen. Je kleiner die Fragmentgröße ist, desto höher sollte die Agarose konzentriert sein. Vor dem Auftragen wird die DNA-Probe mit einem Probenpuffer versetzt, der Glycerin und Bromphenolblau enthält. Glycerin erhöht das spezifische Gewicht der Probe, so dass sie beim Auftragen in die Tasche sinkt, Bromphenolblau wandert in einem 0.9 %igem Gel so schnell wie DNA von etwa 100 bp und kann so die Front der Elektrophorese anzeigen. Die aufgetrennten DNA-Fragmente werden durch dem Gel zugesetztes Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Dieses interkaliert in die DNA und emittiert nach Anregung durch UV Fluoreszenzlicht im Orange/Rotbereich. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 10 ng DNA.

Es wurden analytische Gele der Größe 75 mm x 95 mm x 8 mm und präparative Gele der Größe 140 mm x 210 mm x 8 mm verwendet. Die Elektrophorese wurde in horizontalen Apparaturen mit Agarosegelen durchgeführt, die 0.8 bis 2 % Agarose und 1 µg/ml Ethidiumbromid in 1 x TBE-Puffer (enthält Elektrolyte für den Stromfluss) enthielten. Die präparativen Gele liefen bei 150 V, die analytischen Gele bei 100 V konstanter Spannung.

2.2.2.2 Denaturierende Gelelektrophorese von RNA

Die Auftrennung von RNA-Fragmenten erfolgte durch Elektrophorese in einem denaturierenden Agarosegel. Es wurden analytische 1.2 %ige Formaldehyd-Gele der Größe 140 mm x 210 mm x 8 mm verwendet. Die Elektrophorese wurde horizontal in entsprechend gereinigten Gel-Apparaturen (mind. 15 min 0.1 N NaOH, anschließendes zweimaliges Wässern mit autoklaviertem *aqua bidest.*) durchgeführt. Das Volumen der RNA-Probe wurde auf 5 µl eingestellt, 25 µl RNA-Probenpuffer dazu gegeben und für 15 min bei 65 °C im Wasserbad erwärmt. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt, kurz anzentrifugiert, 2 µl Ethidium-Bromid-Lösung (1mg/ml) hinzugegeben und auf das Gel geladen.

Die Elektrophorese wurde in 1 x MOPS-Laufpuffer bei 100 V für etwa 4 h durchgeführt bis das Bromphenolblau 2/3 der Gellänge zurückgelegt hatte. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf 14 cm x 16 cm zugeschnitten und auf einem gut gereinigten UV-Transluminator fotografiert.

10 x MOPS/EDTA-Puffer:

0.2 M MOPS, 50 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA,
mit 10 N NaOH-Lösung auf pH 7.0

1.4 % Bromphenolblaulösung:

0.7 g Bromphenolblau in 50 ml 36 % Glycerin

1.2 % Formaldehyd-Gel:

3.12 g Agarose in 26 ml 10 x MOPS/EDTA-Puffer und 226 ml autoklaviert; auf 50° C abgekühlt, dann Zugabe von 13.3 ml 37 % Formaldehyd

1 x MOPS-Laufpuffer:

1:10-Verdünnung des 10 x MOPS/EDTA-Puffers

RNA-Probenpuffer:

750 µl dionisiertes Formamid, 150 µl 10 x MOPS/EDTA-Puffer, 240 µl 37 % Formaldehyd, 280 µl 1.4 % Bromphenolblaulösung

2.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

2.2.2.3.1 *Größen- und Konzentrationsbestimmung von DNA über Agarosegele*

Die Größe und Konzentration von DNA in Agarosegelen ist durch Mitaufragen eines Markers bestimmter Konzentration und definierter Fragmentlängen bestimmt worden. Nach der Elektrophorese konnte die aufgetragene DNA-Menge abgeschätzt werden, indem die Fluoreszenzintensität der DNA-Probe mit den einzelnen Banden des Markers verglichen wurde.

2.2.2.3.2 *Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren*

Die Konzentration von Nucleinsäuren wurde photometrisch mit dem UV-2401 PC UV-VIS Recording Spectrophotometer (Shimadzu) bestimmt. Die Nucleinsäuren absorbieren bei 260 nm, noch vorhandene Proteine bei 280 nm. Die Konzentration der Nucleinsäuren ist proportional zur Absorption, und eine Absorption von 1 entspricht einer Konzentration von 40 µg RNA/ml, 50 µg dsDNA/ml, 37 µg ssDNA/ml und 30 µg Oligonukleotiden/ml. Der Quotient der Messwerte bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm erlaubt eine Aussage über die Reinheit der Nucleinsäuren. Bei DNA sollte er ungefähr bei 1.8 liegen, und reine RNA sollte einen Wert von ungefähr 2 haben. Die Absorption bei 230 nm spiegelt eine Kontamination der Probe durch Substanzen wie Carbohydrate, Peptide, Phenole oder aromatische Gemische wider. Das Verhältnis der Messwerte bei den Wellenlängen 260 nm und 230 nm sollte ungefähr 2.2 betragen.

2.2.3 Klonierungstechniken (*in vitro* Modifikationen von DNA)

2.2.3.1 Restriktion von DNA

Restriktionsendonukleasen werden aus verschiedenen Bakterienarten isoliert und bilden in ihnen, zusammen mit der Modifikations-Methylase, eine Schutzfunktion gegen fremde, gewöhnlich virale DNA. Restriktionsendonukleasen erkennen eine für sie jeweils spezifische Basensequenz von 4 bis 8 Basen in doppelsträngiger DNA. Die meisten Erkennungssequenzen enthalten eine Rotationssymmetrie, die auch als Palindrom bezeichnet wird. Die zu analysierende DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen vom Typ II geschnitten, denn diese in den späten 1960er Jahren entdeckten Enzyme schneiden im Gegensatz zu Typ I direkt an der Erkennungssequenz, wobei entweder klebrige Enden (*sticky ends*) oder glatte Enden (*blunt ends*) entstehen. Die „klebrigen Restriktionsschnitte“ können zu überstehenden 5'- oder 3'-Enden führen.

Es wurden mindestens 1-3 U Restriktionsendonuklease pro μg zu spaltender DNA eingesetzt, jedoch höchstens 1/10 des Endvolumens der Probe. *Aqua bidest.* und Puffer wurden nach Angaben des Herstellers dazu gegeben. Für einen Probeverdau wurden etwa 200 ng DNA eingesetzt, für einen präparativen 1-5 μg . Der Verdau wurde für wenige min (partieller Verdau) oder für einen vollständigen Verdau mindestens 1.5 h oder über Nacht durchgeführt. So verdaute Plasmide wurden nach dem Restriktionsverdau auf die Größe der entstehenden Fragmente überprüft oder auf ein präparatives Gel aufgetragen, um Insert oder Vektor zu isolieren (Kap. 2.2.3.2).

2.2.3.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der QIAex® II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden) verwendet. Mit diesem Kit können DNA-Fragmente von 40 bp bis zu 50 kbp Länge aus 0.3-2 %igen TAE- oder TBE-Agarosegelen gereinigt und isoliert werden. Das Prinzip besteht darin, die DNA unter Hochsalzbedingungen an eine Silikatmatrix zu binden, von Verunreinigungen frei zu waschen und schließlich unter Niedrigsalzbedingungen die DNA von dieser Matrix zu eluieren.

Die gewünschte DNA-Bande wurde unter dem UV-Schirm mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die weitere Aufarbeitung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, und die DNA abschließend in 20 bis 40 μl

EB-Puffer aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung des DNA-Fragmentes erfolgte wie in 2.2.2.3 beschrieben.

2.2.3.3 Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente

Wenn ein DNA-Fragment in einen Vektor mit identischen *sticky ends* ligiert werden soll, oder wenn beide *blunt ends* besitzen, wird der Vektor zunächst alkalisch dephosphoryliert. Dabei werden die 5'-Phosphatreste des Vektors entfernt und so eine Selbstligation des Vektors unterbunden. Dazu wurde das Enzym *Shrimp Alkaline Phosphatase* benutzt.

Zur geschnittenen und isolierten Vektor-DNA wurde 1/10 des Gesamtvolumens des entsprechenden mitgelieferten Dephosphorylierungspuffers und 1 U Phosphatase pro 500 ng DNA gegeben und bis zum Endvolumen mit *aqua bidest.* aufgefüllt. Die Lösung wurde 1 h bei 37° C inkubiert und die Reaktion durch Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65° C für 20 min abgestoppt.

2.2.3.4 Auffüllen überhängender Enden

Falls Insert und Vektor mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten wurden, können diese *blunt end* ligiert werden. Dazu müssen die 5'- bzw. 3'-überhängenden Enden der DNA-Stränge mit Nukleotiden aufgefüllt werden.

Es wurden DNA, 10 x Puffer, *aqua bidest.*, dNTPs (je 10 mM) und entweder 1 U Klenow-Polymerase oder 1 U T4 DNA Polymerase zusammengegeben und 20 min bei 37° C bzw. 5 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65° C für 20 min gestoppt. Die Vektoren wurden danach alkalisch dephosphoryliert (Kap. 2.2.3.3)

2.2.3.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation verknüpfen DNA-Ligasen eine freie 5'-Phosphat-Gruppe eines DNA-Doppelstranges mit der freien 3'-OH-Gruppe eines anderen oder auch des gleichen DNA-Moleküls durch Phosphodiesterbrücken. Im zweiten Fall resultiert das in einer Zirkularisierung der DNA.

2.2.3.5.1 Blunt-end-Ligation

Vektor (etwa 50-100 ng) und Insert wurden im molaren Verhältnis von etwa 1:7 bis 1:10 zusammengegeben und 1 µl T4 DNA-Ligase (30 U/µl) und *aqua bidest.*, 10 x Puffer und PEG nach Angaben des Herstellers der Ligase dazu gegeben. Die Ligation erfolgte für 1 h oder ü. N. im Wasserbad bei 22° C.

2.2.3.5.2 Sticky-end-Ligation

Die *Sticky-end*-Ligation ist weniger problematisch als die zuvor beschriebene. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert sollte hier bei ungefähr 1:2 liegen. 1 µl T4 DNA-Ligase (5 U/µl) und *aqua bidest.*, 10 x Puffer und PEG wurden nach Angaben des Herstellers zur DNA gegeben. Die Ligation erfolgte für 1 h oder ü. N. im Wasserbad bei 22° C.

2.2.3.6 Herstellung kompetenter *E.-coli*-Zellen mit der CaCl₂-Methode

Um Plasmid-DNA in *E.-coli*-Zellen einschleusen zu können, müssen die Bakterienzellen vorher „kompetent“, also aufnahmefähig für Plasmid-DNA, gemacht werden. Ist das Plasmid in die Zelle gelangt, so wird es exprimiert. Um eine Selektion der Zellen zu gewährleisten, die das Plasmid tragen, sind in die gängigen Plasmide Antibiotika-Resistenzgene eingebaut. Wird dem Nährmedium das adäquate Antibiotikum zugesetzt, wird selektiert, und es überleben nur die Zellen mit dem aufgenommenen Plasmid.

500 ml LB-Medium wurden mit einer Vorkultur inokuliert und bei 18° C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0.5 bis 0.8 erreicht war. Die Zellen wurden auf Eis überführt und danach für 15 min bei 4° C und 3 000 rpm zentrifugiert (Beckmann Kühlzentrifuge, JA 14-Rotor), und das Zellpellet in 200 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂-Puffer resuspendiert. Nach Inkubation für ca. 30 min auf Eis wurde nochmals wie oben zentrifugiert und die Zellen in 20 ml 50 mM CaCl₂-Puffer vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden mit 65 % Glycerin zu einer Endkonzentration von 30 % versetzt, bei -70° C tiefgefroren und waren mehrere Wochen verwendbar.

2.2.3.7 Transformation mit Plasmiden

Für die Transformation kompetenter *E.-coli*-Zellen reichen 10 ng Plasmid-DNA aus. So wurden entweder 3-5 µl eines Ligationsreaktions-Gemisches bzw. 10-50 ng Plasmid-DNA mit 100 µl auf Eis aufgetauten kompetenten Bakterienzellen zusammengegeben. Nachdem 30 min auf Eis inkubiert wurde, wurde für 1 min ein Hitzeschock bei 42° C gegeben und erneut 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium wurde für 1 h horizontal bei 200 rpm und 37° C in einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden nach Transformation eines fertigen Plasmids 50 µl bzw. nach Transformation eines Ligations-Ansatzes die gesamte Zellsuspension auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotika-Zusatz ausplattiert und über Nacht bei 37° C inkubiert. Zur Kontrolle erfolgten nach jeder Transformation von mehreren Bakterienkolonien Plasmid-Minipräparationen (Kap. 2.2.2.1.1), die dann durch Restriktionsanalyse (Kap. 2.2.3.1) auf das Vorhandensein eines Inserts überprüft wurden. Außerdem wurden Gefrierkulturen angelegt (Kap. 2.2.1.2).

2.2.3.7.1.1 Überprüfung der Transformationseffizienz

Je 1 µl Plasmid-DNA in drei verschiedenen Verdünnungen (1, 10, 100 ng/µl) wurden in je 100 µl kompetente *E.-coli*-Zellen transformiert. Davon wurden jeweils 10 und 100 µl auf Platten mit dem passenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37° C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Berechnung der Effizienz nach folgendem Schema:

$$\frac{\text{Volumen Zellsuspension} + \text{Volumen Nährmedium} \times \text{gezählte Kolonienzahl}}{\text{ausplattiertes Volumen}} = \text{Koloniengesamtzahl.}$$

Die Koloniengesamtzahl lag bei der CaCl₂-Methode bei ca. 2 x 10⁷ pro µg DNA.

2.2.3.8 Transformation und Ligation von PCR-Produkten mit dem TOPO TA Cloning® Kit und dem pGEM® T-Vector System I Kit

Diese beiden Kits dienen der Ligation eines PCR-Produktes in einen Zwischenvektor. In beiden Kits wird ein T-Vektor, d.h., ein offenes Plasmid mit überhängenden T-Enden, mitgeliefert. So musste ein einzuklonierendes PCR-Produkt, falls dieses nicht durch eine PCR mit *Taq*-Polymerase entstand, vorher mit *Taq*-Polymerase behandelt werden (Kap. 2.2.3.10).

Das TOPO TA Cloning® Kit basiert auf einer an den Vektor gebundenen Topoisomerase, es muss also keine zusätzliche Ligase zum Reaktionsansatz gegeben werden.

Die Ligation in den pCR- (TOPO Kit) bzw. pGEM-Vektor und die nachfolgende Transformation wurden nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Der gesamte Transformations-Ansatz wurde auf LB-Antibiotika-Platten mit einem Zusatz von 4 % X-Galactosidase und 100 µM IPTG zur Blau-Weiß-Selektion ausplattiert.

2.2.3.9 Transformation von *Synechocystis* sp. PCC 6803

Eine *Synechocystis*-Kultur (OD_{730} von etwa 0.3) wurde zu einer OD_{730} von 0.05 bis 0.15 in einem 50 ml Volumen verdünnt und in einem 200-ml-Kolben ü. N. bei 30° C und 170 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Kultur in ein 50-ml-Röhrchen überführt und 12 min bei 4 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet so in BG-11 resuspendiert, dass die Kultur eine OD_{730} von etwa 3.0 – das entspricht einer Zellzahl von etwa 2×10^8 /ml – besaß. Nun wurden 300 µl Zellen mit 6 µl Vektor-DNA einer Konzentration von 1-3 mg/ml in einem 2-ml-Reaktionsgefäß vermischt und eine Negativ-Kontrolle mit *aqua bidest.* angesetzt. Die Ansätze kamen für 3-4 h in ein 30° C warmes Wasserbad und wurden alle 30 min invertiert. Unterdessen wurden sechs zurechtgeschnittene, in *aqua bidest.* autoklavierte, Nylon-Membranen luftblasenfrei auf BG-11-Platten ohne Antibiotika ausgelegt. Nach der Inkubationszeit wurden jeweils 3 x 100 µl der Ansätze auf den Membranen ausplattiert und für 30-60 h in einen klimatisierten 30°-C-Raum gestellt. Danach wurden die Filter auf BG-11-Platten, die die entsprechenden Antibiotika enthielten, transferiert.

Etwa 20-30 der gewachsenen Kolonien der Transformation wurden auf BG-11-Antibiotika-Platten ausgestrichen. Dieser Vorgang wurde, abhängig davon, wie schnell die Kolonien gewachsen waren, etwa alle zwei Wochen wiederholt.

2.2.3.10 Polymerase-Ketten-Reaktion – PCR

Mit Hilfe der von Mullis und Faloona (1987) entwickelten Polymerase-Kettenreaktion (PCR von *polymerase chain reaction*) können definierte DNA-Sequenzen aus einem komplexen Gemisch von DNA selektiv angereichert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR zum Einbau von synthetischen Restriktionsschnittstellen, dem Nachweis der Mutagenese in *Synechocystis* und als ein Schritt der Transkriptmengenbestimmung eingesetzt.

Es wurden zwei verschiedene Polymerasen verwendet: die *Taq*- und die Vent-DNA-Polymerase. Die *Taq*-Polymerase besitzt keine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität. So ist mit diesem Enzym bei der Synthese des neuen DNA-Stranges die Fehlerwahrscheinlichkeit

erhöht. Dennoch wurde sie bei dem Nachweis der Mutagenese und der Transkriptmengenbestimmung eingesetzt, da es hier nicht auf ein fehlerfreies Produkt ankam. Anders, wenn das Produkt kloniert werden sollte. Da die Vent-Polymerase eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität besitzt und damit nahezu fehlerfrei arbeitet, wurde sie für diesen Zweck eingesetzt.

Standard-PCR-Ansätze sahen wie folgt aus:

Komponente	Volumen für einen Ansatz mit	
	<i>Taq</i> -Polymerase	Vent-Polymerase
H ₂ O (auf 50 µl)	39.8 µl – x µl	40 µl – x µl
10 x Puffer	5 µl	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl	/
MgSO ₄ (100 mM)	/	1 µl
dNTPs (je 10 mM)	0.5 µl	1 µl
5' primer (100 pmol/µl)	0.25 µl	0.25 µl
3' primer (100 pmol/µl)	0.25 µl	0.25 µl
Template (1-10 ng/Ansatz)	x µl	x µl
<i>Taq</i> -Polymerase (+ BSA; 5 U/µl)	0.2 µl	/
Vent-Polymerase (2 U/µl)	/	0.5 µl

Wurde eine PCR mit Vent-Polymerase durchgeführt, in der das Produkt für weitere Klonierungen verwendet werden sollte, musste im Anschluss eine spezielle Behandlung des PCR-Reaktionsgemisches mit *Taq*-Polymerase erfolgen, um die für die T-A-Klonierung erforderlichen 3'-dA-Nukleotide an die Produkt-Enden zu hängen. Folgender Ansatz wurde zusammenpipettiert und für 10 min bei 72° C inkubiert:

PCR-Ansatz	50 µl
10 x Puffer	7.5 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)	0.4 µl
MgCl ₂ (25 mM)	6 µl
dATPs (1 mM)	1 µl
BSA (2 mg/ml)	3.75 µl
<i>aqua bidest.</i>	6.35 µl

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Kap. 2.1.11 aufgeführt.

2.2.3.10.1 Ganz-Zell-PCR aus *Synechocystis*-Zellen

Zur einfachen Überprüfung von Transformanden kann eine PCR direkt aus *Synechocystis*-Zellen durchgeführt werden. Diese Technik hat sich als zuverlässige Vorauswahl richtiger Transformanden erwiesen. Es sollte jedoch beachtet werden, dass die Kolonien nicht älter als vier Wochen sind, und es sollte auch nicht zu viel Zellmaterial eingesetzt werden. Eine Kolonie von 2 mm Durchmesser ist völlig ausreichend.

2.2.3.10.2 qRT-PCR (*quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*)

Die RT-PCR wurde in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurde die cDNA synthetisiert. Als template dienten 200 ng DNase-verdauter, gereinigte RNA:

template	x μ l
H ₂ O	12 – x μ l
0,1 M DTT	2 μ l
5xSuperSript-Puffer	4 μ l
dNTPs	1 μ l
random primer	0,2 μ l (200 ng; entspricht ca. 54 pmol)
RNase-Inhibitor	0,4 μ l
SuperScript (200 U/ μ l)	0,4 μ l (80 U)

Der Ansatz wurde 10 min bei 25 °C, 50 min bei 37 °C und abschließenden 95 °C (5 min) inkubiert. Es wurden Verdünnungen hergestellt, die dann als *template* in einer darauf folgenden PCR eingesetzt wurden.

2.2.4 Biochemische Methoden

2.2.4.1 Proteinmengenbestimmung

Es gibt verschiedene Methoden der Konzentrationsbestimmung von Proteinen. Im einfachsten Fall nutzt man die in Proteinen vorhandenen aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan und misst deren charakteristische Absorption bei 280 nm. Da der Gehalt an diesen Aminosäuren von Protein zu Protein variiert, ist dieses Vorgehen nur bedingt zur Quantifizierung von Proteinen geeignet. Daher wurden weitere Methoden angewendet.

2.2.4.1.1 Erstellen einer BSA-Eichgerade

Es wurden sechs Proben mit folgenden Proteinkonzentrationen hergestellt: 0, 5, 10, 15, 20 und 25 µg BSA. Die Proben wurden je nach Einsatz wie in den nachfolgenden Kapiteln 2.2.4.1.2 (Proteinbestimmung mit Amidoschwarz) oder 2.2.4.1.3 Proteinbestimmung nach Bradford) behandelt und die Extinktion bei 615 bzw. 595 nm bestimmt. Mit diesen Werten wurde eine Regressionsgerade erstellt.

2.2.4.1.2 Proteinmengenbestimmung mit Amidoschwarz

Bei der Proteinbestimmung mit Amidoschwarz (Popov *et al.*, 1975) werden die Proteine in einem Methanol/Essigsäuregemisch in Anwesenheit des Farbstoffes Amidoschwarz ausgefällt und anschließend wieder resuspendiert.

Die zu bestimmende Proteinlösung wurde mit *aqua bidest.* auf 100 µl aufgefüllt und 400 µl Amidoschwarz-Lösung dazu gegeben, 3- bis 4mal invertiert und 12 min bei RT und 13 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 ml Wasch-Lösung kräftig aufgeschüttelt und wie oben zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und nachdem das Pellet für 10 min getrocknet wurde, wurde es in 1 ml 0.2 M NaOH gelöst und die Extinktion bei 615 nm gemessen.

Als Referenz wurde immer eine Probe des entsprechenden Puffers ohne Protein mitbestimmt. Anhand einer erstellten BSA-Eichgeraden (s. Kap 2.2.4.1.1) konnte nun die Proteinmenge bestimmt werden.

Amidoschwarz-Lösung:

10 % Essigsäure, 90 % Methanol,
1 Spatelspitze Amidoschwarz 10B auf 500 ml;
die OD₆₀₀ der Färbelösung sollte bei 10 liegen

Waschlösung:

10 % Essigsäure, 90 % Methanol

2.2.4.1.3 Proteinmengenbestimmung nach Bradford

Hierfür wurde der Biorad Protein-Assay (Biorad, Bad Soden) verwendet. Dieser Assay beruht auf der Methode von Bradford (1976). Die Bestimmung der Proteinmenge ist aufgrund der spezifischen, hydrophoben und elektrostatischen Bindung des Trimethylmethan-Farbstoffes Coomassie Brilliantblau G, der bevorzugt an Argininreste der Proteine bindet, möglich. Im sauren Milieu wird bei der Bildung des Farbstoff-Proteinkomplexes insbesondere die

anionische Form des Farbstoffes stabilisiert, und dadurch eine Absorptionsmessung bei 595 nm in Anwesenheit des freien Farbstoffes (Extinktion bei 465 nm) ermöglicht. Die Nachweisgrenze der Bradford-Methode unter optimalen Bedingungen liegt im 1-ml-Assay unter 1 µg Protein. Dazu ist jedoch notwendig, dass die Probe relativ frei von Detergentien wie SDS, Triton X-100 und Nonidet P-40 ist.

Die zu bestimmende Proteinlösung und die Lösungen zur Bestimmung der BSA-Eichgeraden wurden mit *aqua bidest.* auf 200 µl aufgefüllt und 800 µl einer 1:5 verdünnten Biorad Protein-Assay-Lösung dazu gegeben. Nach mindestens 5 min konnte die Extinktion bei 595 nm gemessen werden und aufgrund der bestimmten Eichgeraden die Proteinmenge der Probe bestimmt werden.

2.2.4.2 SDS-Gelelektrophorese von Proteinen

Es wurde die Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet (Lämmli, 1970). Die Proteine werden in Gegenwart von SDS und DTT aufgekocht und dadurch denaturiert. Die relative Mobilität der Proteine im Polyacrylamidgel ist linear zum Logarithmus ihrer molaren Masse, so dass die Auftrennung der Proteine gemäß ihrer molaren Massen erfolgt. Je höher die Polyacrylamidkonzentration des Gels, desto höher seine Trennleistung. Es wird zwischen zwei vertikale Glasplatten ein Trenngel und darüber ein weitmaschigeres Sammelgel gegossen. Die Proteine werden an der Grenze der Gele aufgrund des pH-Sprungs verdichtet und anschließend nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch dieses diskontinuierliche System wird eine höhere Bandenschärfe erzielt. Für analytische Zwecke wurden in der Regel 5 cm x 8 cm große und 0.75 mm dicke Gele verwendet und 10 µg Proteinextrakt in einer Mini Protean® 3 Cell Apparatur (Bio-Rad) bei 25 mA für etwa 1 h aufgetrennt. Für präparative Zwecke wurden Trenngele der Größe 19.5 cm x 16 cm und einer Dicke von 15 mm verwendet. Diese Gele liefen bei 19 mA über Nacht. Für die Auftrennung von Proteinen wurden je nach Größe des Zielproteins 8-12 %ige Trenngele verwendet. Als Proteinstandard wurde der vorgefärbte SDS 7b M Proteinmarker verwendet.

Sammelgel:

125 mM Tris/HCl, pH 6.8, 5 % (w/v) Acrylamid,
0.13 % (w/v) Bisacrylamid, 0.2 % (w/v) SDS,
0.075 % (v/v) Ammoniumpersulfat, 0.05 % (v/v)
TEMED

Trenngel:

375 mM Tris/HCl, pH 8.8, 10 % Acrylamid,
0.27 % Bisacrylamid, 0.1 % SDS, 0.04 % (v/v)
Ammoniumpersulfat, 0.06 % (v/v) TEMED

2.2.4.3 Anfärben von SDS-Gelen

2.2.4.3.1 Anfärben mit Coomassie

Zur Visualisierung der Proteinbanden wurden die Gele nach der Auftrennung für 1 h in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend in 10 % Essigsäure entfärbt, bis die Banden gut sichtbar waren.

Coomassie-Färbelösung:

25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure, 0.05 %

Coomassie R250

2.2.4.3.2 Die Silberfärbung

Bei der Silberfärbung bildet das Silberion Komplexe mit den Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteine. Alkalisches Formaldehyd reduziert das Ag^+ der Komplexe zu Ag, so dass sich an der Stelle, an der sich Proteine im Gel befinden, braune bis schwarze Banden abzeichnen. Die Silberfärbung ist mit einer Nachweisgrenze von 5 bis 30 ng Protein pro Bande wesentlich sensitiver als die *Coomassie*-Färbung mit 200 bis 400 ng. Eine Vorfärbung des Gels mit *Coomassie* soll die Silberfärbung verstärken (Moreno *et al.*, 1985).

Die Gele wurden nach der Elektrophorese für 20 min mit 50 % MeOH/5 % Essigsäure fixiert und anschließend zweimal 10 min mit *aqua dest.* gewaschen. Nach einer 1minütigen Inkubation in 0.02 % Natrium-Thiosulfat wurde zweimal 1 min mit *aqua bidest.* gewaschen. Es folgte eine 20minütige Inkubation in 0.1 % Silbernitrat bei 4° C. Es wurde wieder zweimal 1 min mit Wasser gewaschen und dann das Gel in 0.04 % Formalin mit 2 % Na-Carbonat bei intensivem Schütteln entwickelt. Wenn sich die Lösung gelb färbte, wurde sie durch frische Lösung ersetzt, und das Gel bis zur gewünschten Intensität gefärbt.

2.2.4.3.3 KCl-Färbung von präparativen Gelen

Prussak *et al.* (1989) fällen in Lämmli-Gelen das SDS mit KCl aus. Dabei werden die Proteinbanden als weiße K-SDS-Proteinkomplexe sichtbar. Der Vorteil dieser Methode ist, dass sie für das Protein sehr schonend sein soll.

Das Gel wurde in einem Eisbad im Kühlraum für mindestens 3 h in einer 100 mM KCl-Lösung geschwenkt. Danach konnte die weiß angefärbte Zielproteinbande mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten werden.

2.2.4.4 Trocknung von Gelen

Die Gele wurden zwischen zwei gut gewässerten Einmachfolien in einen Hartplastik-Rahmen eingespannt und über Nacht im Abzug getrocknet.

2.2.4.5 Fällung von Proteinen

2.2.4.5.1 TCA-Fällung

Die TCA-(Trichloressigsäure)-Fällung bietet sich als kleinvolumige Fällungs-Methode an, jedoch kann sie unter Umständen aufgrund des stark sauren Milieus zur Hydrolyse der Proteine führen, und es muss am Ende darauf geachtet werden, dass die Proteinprobe nicht zu sauer zur Weiterverarbeitung ist.

Zur Proteinlösung wurde TCA bis zu einer Endkonzentration von 10 % gegeben, 30 min auf Eis inkubiert, 15 min bei 4° C und 16 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Pellet getrocknet und in dem gewünschten Puffer aufgenommen.

2.2.4.5.2 Ethanol-Fällung

Dies ist eine gute Methode, Guandidin-Hydrochlorid aus der Proteinlösung vor der SDS-PAGE zu entfernen.

Zu 1 Vol. Proteinlösung wurden 9 Vol. eiskaltes 100 % Ethanol gegeben, gemischt, für mind. 10 min bei -20° C stehen gelassen, 15 min bei 4° C und 16 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Pellet mit 90 % Ethanol gewaschen und getrocknet und in dem gewünschten Puffer aufgenommen.

2.2.4.6 Konzentration nativer Proteine

Die Konzentration löslicher Proteine erfolgte für Volumina bis zu 15 ml mit „centriprep“-Röhrchen (amicon, Beverly, MA, USA) und für Volumina bis zu 2 ml mit „centricon10“-Konzentratoren (amicon, Beverly, MA, USA).

Die Proteinlösung wurde in das Röhrchen gegeben und so lange bei 3 000 g und 4° C zentrifugiert, bis sich die Lösung auf das gewünschte Volumen reduziert hatte. Nachdem die Proteinlösung aus dem Röhrchen entfernt wurde, wurde das Röhrchen gewaschen, indem noch mal mit *aqua bidest.* zentrifugiert wurde. Das Molekularsieb des Röhrchens wurde feucht gehalten und konnte so – bei 4-7° C gelagert – mehrmals für das gleiche Protein verwendet werden.

2.2.4.7 Umpufferung von Proteinen

Die Umpufferung von Proteinen wurde mit einer „Column PD-10“-Säule (Pharmacia Biotech) durchgeführt.

Zunächst wurde die Säule mit 25 ml des Puffers äquilibriert, in den das Protein umpuffert werden sollte. Die Probe wurde in einem 2.5-ml-Volumen auf die Säule gegeben und dann mit 3.5 ml des gewünschten Puffers von der Säule eluiert. Die Säule konnte in *aqua bidest.* und bei 4-7° C gelagert werden und mehrmals für ein gleiches Protein benutzt werden.

2.2.4.8 Elektro-Elution von Proteinen

Nach der präparativen SDS-Gelelektrophorese konnten Proteine aus dem Gel eluiert werden. Dazu wurde die gewünschte Proteinbande aus dem Gel ausgeschnitten und mit einem Skalpell zerkleinert. Danach wurden die Proteinstückchen in eine mit SDS-Laufpuffer gefüllte und mit Membranen (BT1 bzw. BT2, S & S BIOTRAP-Membranen, glycerinfeucht bzw. trocken, Schleicher & Schuell) vorbereitete Elutions-Apparatur gegeben. Es wurde eine Spannung von 100 V angelegt. Die Elution erfolgte für mind. 16 h im klimatisierten Raum (7° C).

2.2.4.9 Transfer von Proteinen auf eine Membran (*Western Blot*)

Beim *Blotten* werden die Proteine eines Gels elektrophoretisch auf eine Membran übertragen. Auf dem *Blot* können die Proteine angefärbt, ansequenziert oder mit Antikörpern nachgewiesen werden.

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels einer *Semi-Dry*-Elektro-Blot-Apparatur (TransBlot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad) auf eine Nitrocellulose- (porablot NCP; Macherey-Nagel, Düren) oder Polyvinylidendifluorid (PVDF)- (porablot PVDF; Macherey-Nagel, Düren) Membran transferiert. Dabei wurde das Gel zunächst 20 min in BSN-Transferpuffer äquilibriert und die Membran 5 min in Methanol aktiviert und 5 min in BSN-Transferpuffer äquilibriert. Der *Blot* wurde folgendermaßen aufgebaut (von unten = Anode nach oben = Kathode): sechs in BSN-Transferpuffer getränkte Whatman-3 MM-Papiere, die Membran, das Gel, sechs in BSN-Transferpuffer getränkte Whatman-3 MM-Papiere. Die Proteine wurden durch Anlegen der Spannung (1 h 21 V) auf die Membran transferiert.

BSN-Transferpuffer:

48 mM Tris/HCl, 39 mM Glycin, 0.0375 % SDS,
20 % Methanol, pH 9.2

2.2.4.10 Blocken und Waschen

Vor der Reaktion eines *Blots* mit Antikörpern werden die unspezifischen Proteinbindungsstellen der Blotmembran mit einem Blocker wie z. B. BSA, entfettetem Milchpulver, Tween 20 oder Gelatine abgesättigt.

Dazu wurde die Membran nach dem Elektro-*Blot* für 1 h bei RT oder ü. N. bei 4° C mit 3 % BSA (für eine nachfolgende Behandlung mit Anti-His-Antikörpern) oder 7 % Magermilchpulver in TBS-Puffer geblockt. Anschließend wurde die Membran zweimal für 10 min mit TBS-T/Triton-Puffer und einmal 10 min mit TBS-Puffer gewaschen.

2.2.4.11 Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine

Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgte mit Hilfe eines gegen das Zielprotein gerichteten Antikörpers (primärer Antikörper) und der an die sekundären Antikörper (bindet an den primären Antikörper) gekoppelten alkalischen Phosphatase (AP).

Der Blot wurde für 1 h bei RT in 0.1 µg/ml des Anti-His-*tag*-Antikörpers (QIAGEN, Hilden bzw. Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach) in TBS + 3 % BSA, inkubiert. Nachdem zweimal 10 min mit TBS-T/Triton und einmal 10 min mit TBS gewaschen wurde, wurde die Membran für 1 h bei RT in einer 1:8000-Verdünnung des sekundären Antikörpers, verdünnt in TBS + 3 % BSA, inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein monoklonaler AP-konjugierter Ziegen Anti-Maus IgG-Antikörper verwendet. Abschließend wurde die Membran viermal 10 min mit TBS-T/Triton gewaschen.

Zur AP-Detektion wurde die Membran 1.5 min in AP-Entwicklerlösung äquilibriert und dann in Färbelösung inkubiert. Je nach Proteinmenge waren nach 1-15 min Banden zu erkennen.

AP-Entwicklerlösung:

100 mM Tris/HCl, pH 9.7, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂

BCIP-Lösung:

5 % (w/v) BCIP in 100 % (v/v) DMF

NBT-Lösung:

7.5 % (w/v) NBT in 70 % (v/v) DMF

Färbelösung:

10 ml Entwicklerlösung, 33 µl BCIP-Lösung, 44 µl NBT-Lösung

2.2.4.12 Überexpression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Eine Möglichkeit, größere Mengen eines definierten Proteins zu gewinnen, ist die heterologe Überexpression in *E.-coli*-Zellen. Dazu wird die kodierende Region für das Protein in einen geeigneten Vektor (hier: pET-15b und pET-28b bzw. pQE-30 und pQE-60) kloniert. pET-15b und pET-28b besitzen einen T7*lac* Promotor. Diese Expressionsplasmide werden in einen Expressionsstamm transformiert, der das T7 RNA Polymerase Gen unter Kontrolle des *lac* UV5 Promotors enthält. Die pQE-Plasmide besitzen einen T5 Promotor; dieser wird in dem Konstrukt nur effizient reguliert und reprimiert, wenn das Plasmid pREP4 anwesend ist.

Weiterhin enthalten die Expressionsplasmide noch Sequenzen für ein Affinitätsepitop, welches die Reinigung des rekombinanten Proteins ermöglicht. Die hier verwendeten Expressionssysteme basieren auf dem 6xHis-Epitop zur Reinigung. Zur Überexpression von Proteinen in pET-Konstrukten wurde der *E.-coli*-Stamm JM109(DE3) und von pQE-Konstrukten der *E.-coli*-Stamm M15[pREP4] benutzt.

Abb. 2.3 gibt einen Überblick, wofür in der vorliegenden Arbeit heterolog in *E. coli* exprimierte Proteine verwendet wurden.

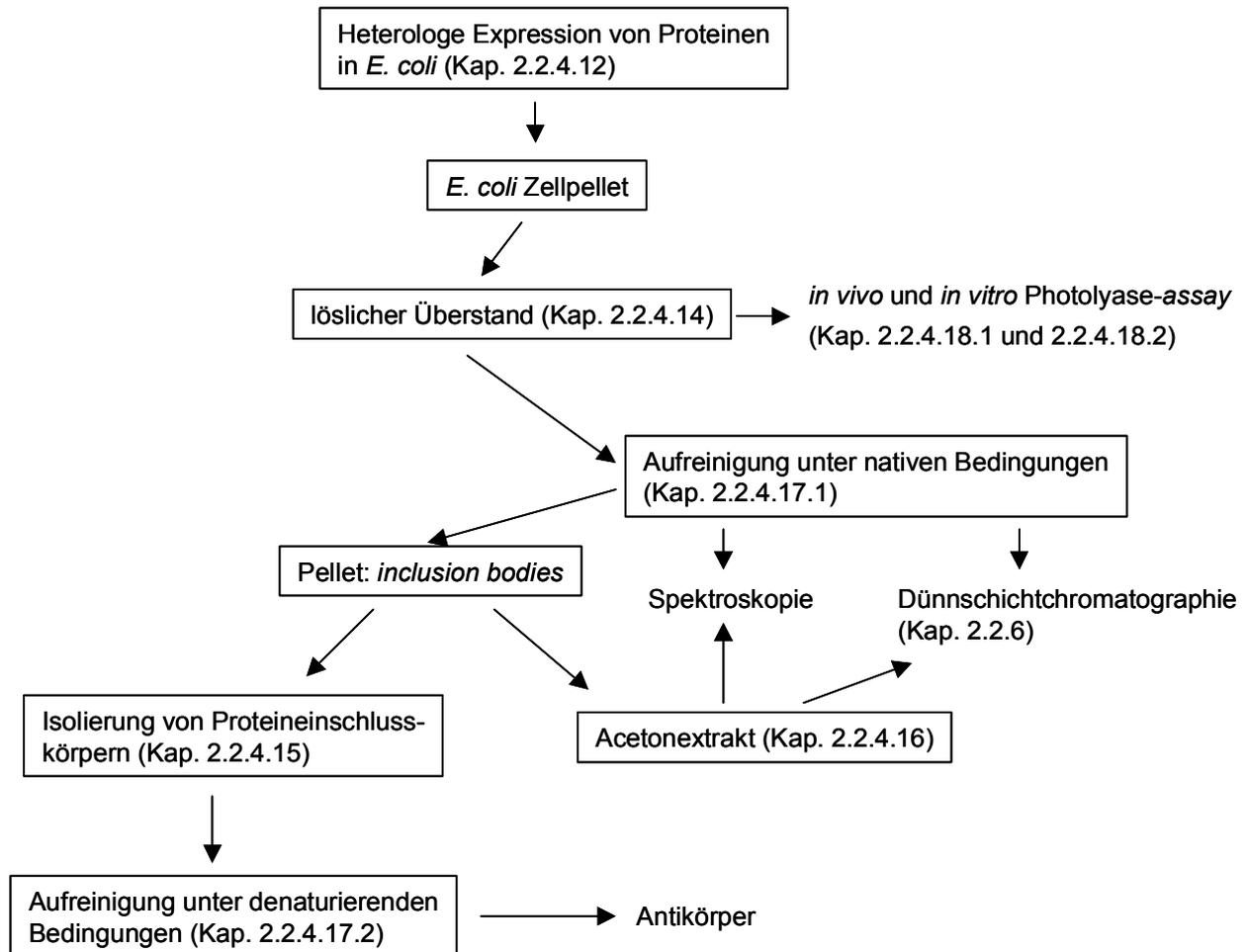


Abb.2.3: Verwendung von heterolog in *E. coli* exprimierten Proteinen in der vorliegenden Arbeit.

2.2.4.12.1 Optimierung der Proteinexpression

Bevor ein rekombinantes Protein in ausreichender Menge isoliert werden kann, müssen die Bedingungen für die Überexpression optimiert werden. Wichtige Kriterien sind neben der Ausbeute z.B. die Löslichkeit des Proteins und das Auftreten kleinerer Fragmente durch Proteolyse oder Verwendung alternativer Startcodons. Parameter, die variiert werden können, sind Temperatur sowie Induktionsstärke und -dauer.

Zur Optimierung wurden jeweils 25 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika-Zusätzen aus einer Ü.-N.-Kultur angeimpft und bei 30-37° C kultiviert, bis eine OD₆₀₀ zwischen 0.5 und 0.8 erreicht war. Bei gewünschter Expression bei 18° C wurden die Zellen zunächst für eine Stunde adaptiert, bevor mit IPTG induziert wurde. Fand die Expression bei Temperaturen zwischen 28 und 30° C statt, wurde direkt mit IPTG in einer Konzentration von 0.05 bis 1 mM induziert. Nach 3-5 h (bei einer Expression zwischen 28 und 37° C bzw. 24 h

(Expression bei 18° C) wurden die Zellen geerntet (10 min, 5 000 g) und die Expression im SDS-Gel mit *Coomassie*-Färbung (Kap. 2.2.4.3.1) und/oder Western-Transfer (Kap. 2.2.4.9) überprüft.

Für die Expression von pQE-60/At5g24850(1-569), pQE-60/At5g24859(40-569) und pET-28b/At5g24850(207-569) (Kap. 2.1.12) stellte sich eine Expressionstemperatur von 37° C, eine IPTG-Konzentration von 1 mM und eine Dauer von etwa 4 h als optimal heraus. Für die Expression von pQE-30/sll1629 wurde eine optimale Expressionstemperatur von 30° C und eine optimale Dauer von 5 h ermittelt. Auch hier wurde mit 1 mM IPTG induziert.

2.2.4.12.2 Präparative Proteinexpression

Nach der Optimierung wurde die Proteinexpression in größerem Maßstab durchgeführt werden, um genug Protein zur Charakterisierung oder zur Antikörperproduktion zu gewinnen. Ein halber Liter LB-Medium (in einem 2-l-Erlenmeyerkolben) mit den entsprechenden Antibiotika-Zusätzen wurde mit 10 bis 25 ml einer Ü.-N.-Kultur angeimpft. Die Expression wurde unter den ermittelten optimierten Bedingungen durchgeführt, und am Ende die Zellen bei 4° C und 5 000 g für 12 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde einmal in *E.-coli*-Waschpuffer gewaschen. Die Zellen konnten so ü. N. bei –20° C oder für mehrere Wochen bei –70° C gelagert oder direkt weiterverarbeitet werden.

***E.-coli*-Waschpuffer:**

20 mM Tris/HCl, pH 7.8, 300 mM NaCl

2.2.4.13 Herstellen eines *E.-coli*-Gesamtproteinextraktes

Zur Isolierung von Gesamtproteinextrakten aus *E.-coli*-Zellen wurden 200 µl (Zellen direkt vor der Induktion des Zielproteins) bzw. 100 µl (Zellen nach Expression) Zellsuspension für 1 min bei 16 000 g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet konnte nun bei –20° C bis zur Weiterverarbeitung gelagert werden. Oder es wurde direkt in 100 µl 2 x SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 15 min bei 95° C denaturiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (15 min, 16 000 g) entfernt, und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

2.2.4.14 Gewinnung löslicher Proteine aus *E.-coli*-Zellen

Zur Isolierung von löslichen Proteinen aus *E.-coli*-Zellen wurden diese durch Lysozym und Ultraschall aufgeschlossen.

Das aus einer Expression hervorgegangene *E.-coli*-Zellpellet wurde für 15 min aufgetaut und in 2-5 ml pro g Feuchtgewicht Lyse-Puffer resuspendiert. Nach 1 h Schütteln auf Eis wurden die Zellen weiterhin durch Ultraschall aufgebrochen. Nach 30 s Ultraschall folgten 30 s Pause. Die Zellsuspension wurde so lange mit Ultraschall behandelt, bis sie dünnflüssig war. Für ein Zellpellet von 0.5 l Kultur wurden etwa 9 x 30 s Ultraschall bei maximaler Leistung benötigt. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation für 60 min bei 48 000 g und 4° C entfernt und der die löslichen Proteine enthaltende Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

Die beschriebene Extraktion wurde so lange wiederholt (etwa zwei- bis dreimal), bis der Überstand nach Zentrifugation nicht mehr gelblich war.

Lyse-Puffer:

50 mM NaPi, pH 7.5, 300 mM NaCl, 10 %
Glycerin, 0.5 % Triton X-100, 1 mM EDTA,
1mg/ml Lysozym

2.2.4.15 Isolierung von Proteineinschlusskörpern ("inclusion bodies")

Für die Reinigung von rekombinanten Proteinen, die als unlösliche Einschlusskörper vorlagen, wurde das Zellpellet, das aus der Gewinnung löslicher Proteine hervorgegangen war (Kap. 2.2.4.14), verwendet.

Das Zellpellet wurde in 5 ml pro g Zellfeuchtgewicht GuHCl- oder Harnstoff-Puffer resuspendiert. (GuHCl ist ein effizienteres Solubilisierungsmittel und Zell-Lysis-Reagenz, hat aber den Nachteil, dass es nicht direkt auf das Gel aufgetragen werden kann.) Die Zellen wurden für mind. 1 h oder ü. N. bei RT geschüttelt und lysiert. Die Lyse war komplett, wenn die Lösung durchscheinend und homogen war. Das Lysat wurde für 1 h bei 48 000 g und RT zentrifugiert, um den zellulären Abfall zu pelletieren.

GuHCl-Puffer:

6 M GuHCl; 0.1 M NaH₂PO₄; 0.01 M Tris/HCl,
pH 8.0

Harnstoff-Puffer:

8 M Harnstoff; 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris/HCl,
pH 8.0

wegen der Dissoziation des Harnstoffs sollte der
pH direkt vor Gebrauch eingestellt werden; nicht
autoklavieren

2.2.4.16 Aceton-Extraktion von Proteineinschlusskörpern

Zum Zellpellet von etwa 1-2 g *E.-coli*-Zellen, das aus der Gewinnung löslicher Proteine hervorging (Kap. 2.2.4.14), wurden 2 ml Aceton und 2.6 µl konzentrierte Salzsäure gegeben. Das Pellet wurde durch Pipettieren und Ultraschall homogenisiert, für 1 h geschüttelt und für 45 min bei 20 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in weitergehende Analysen eingesetzt.

2.2.4.17 Reinigung 6xHis-markierter Proteine

2.2.4.17.1 *Aufreinigung unter nativen Bedingungen*

Zum Überstand nach Zellaufschluss unter nativen Bedingungen (Kap. 2.2.4.14) wurden je nach Expressionsstärke des Zielproteins 500 µl bis 1 ml in Wasch-Puffer äquilibrierte Ni-NTA-Matrix gegeben und unter vorsichtigem Schütteln auf Eis für 1-2 h inkubiert. (Die Bindungs-Kapazität des Ni-NTA-Säulenmaterials hängt vom Protein ab, und liegt normalerweise bei 5-10 mg/ml.) Die Matrix wurde zweimal mit je 10 ml eiskaltem Wasch-Puffer gewaschen und dann das Säulenmaterial mit insgesamt 10 ml Wasch-Puffer auf die Säule überführt. Es wurde mit weiteren 20 ml eiskaltem Wasch-Puffer gewaschen und zum Schluss das Protein mit 2 x 2.5 ml eiskaltem Elutions-Puffer von der Säule eluiert, auf 3.5 ml eingengt (Kap. 2.2.4.6) und in Photolyase-Puffer umgepuffert (Kap. 2.2.4.7).

Wasch-Puffer:

50 mM NaPi, pH 7.5, 300 mM NaCl, 10 %
Glycerin, 0.5 % Triton X-100, 1 mM EDTA

Photolyasepuffer:

50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl,
1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5 % Glycerin

Elutionspuffer:

50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM
EDTA, 1 mM DTT, 5 % Glycerin, 250 mM
Imidazol

2.2.4.17.2 Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen

Je nach Expressionslevel des Zielproteins wurden 500 µl bis 1.5 ml 50 % Ni-NTA-Matrix zu 20 ml Lysat aus Kapitel 2.2.4.15 gegeben und vorsichtig für 1 h bei RT geschüttelt. Das Lysat-Matrix-Gemisch wurde auf eine Säule gegeben und viermal mit 10 ml Puffer C gewaschen. Das Protein wurde mit viermal 1 ml Puffer D, gefolgt von viermal 1 ml Puffer E, eluiert. (Monomere eluieren generell in Puffer D, während Multimere, Aggregate und Proteine mit zwei 6xHis-Markierungen in Puffer E eluieren.)

Puffer C:

8 M Harnstoff, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris/HCl,
pH 6.3

Puffer D:

8 M Harnstoff; 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris/HCl,
pH 5.9

Puffer E:

8 M Harnstoff, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris/HCl,
pH 4.5

Wegen der Dissoziation des Harnstoffes sollte der pH der Puffer C, D und E direkt vor Gebrauch eingestellt werden und die Puffer nicht autoklaviert werden.

2.2.4.18 Untersuchungen auf Photolyaseaktivität

Zunächst wurden KY1225 *E.-coli*-Zellen jeweils mit den Plasmiden pQE-60, pQE-60/At5g24850(1-569) und pQE-60/At5g24850(40-569) transformiert. Für die Photolyase-Experimente wurden je 25 ml LB mit den entsprechenden Antibiotika 1:20 mit Ü.-N.-Kulturen von KY1056, KY1225 und den transformierten KY1225 Zellen angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 bei 250 rpm und 37° C geschüttelt. Nach der Induktion durch IPTG einer Endkonzentration von 1 mM wurden die Zellen weitere 3.5 h geschüttelt und dem Versuch entsprechend (s. Kap. 2.2.4.18.1 und 2.2.4.18.2) weiterverarbeitet.

2.2.4.18.1 In vitro Photolyase ELISA assay

Die induzierten Zellen wurden für 12 min bei RT und 5 000 g pelletiert und in 500 µl Photolyase-Puffer (Kap. 2.2.4.17.1), der 1 mg/ml Lysozym enthielt, resuspendiert. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen zusätzlich durch Ultraschall aufgebrochen bis die Lösung durchsichtig wurde. Um den löslichen Überstand zu erhalten, wurde für 1 h bei 4° C und 40 000 g zentrifugiert. Die Proteinkonzentration der jeweiligen Überstände wurde durch eine Dreifachbestimmung mit der Amidoschwarzmethode (Kap. 2.2.4.1.2) bestimmt, und der Zellextrakt im ELISA assay eingesetzt.

T<>T Dimere in DNA wurden folgendermaßen erzeugt: Zweimal mit Phenol, einmal mit Chloroform extrahierte und mit EtOH präzipitierte Lachssperma-DNA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) wurde in H₂O aufgenommen und für 24 h mit UV-B bestrahlt (Lampe: 1 Philips TL 40W/12, 10 cm Abstand, WG 295 nm Cut-off-Filter). Danach wurde die DNA mit EtOH gefällt und auf eine Konzentration von 50 µg/ml eingestellt. 1.5-ml-Reaktionsgefäße wurden mit 570 µl CTAB-Puffer (Stopp-Lösung) gefüllt. In *wells* von vier Mikrotiterplatten wurden je 10 µl der T<>T-haltigen DNA sowie 190 µl Zellextrakt, der 440 µg Protein enthielt, gegeben und vermischt. Dieser und die nachfolgenden Schritte erfolgten im roten Sicherheitslicht. Je 180 µl der Proben wurden als Kontrolle sofort in die mit CTAB-Puffer vorbereiteten Reaktionsgefäße pipettiert. Eine Platte wurde für 1 h im Dunkeln (Dunkelkontrolle), die zweite für 30 min im photoreaktivierenden UV-A (10 Wm⁻², Osram L36W/73) und die dritte Platte für 60 min im UV-A bei 25° C inkubiert. Danach wurden aus jedem *well* je 180 µl abgenommen und in die vorbereiteten Gefäße mit CTAB pipettiert. Alle Proben wurden für 30 min bei 60° C im Dunkeln inkubiert und dann auf Eis gestellt. Die nachfolgenden Schritte erfolgten im Weißlicht. Jede Probe wurde mit 750 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1; v:v) versetzt, gemischt und 5 min bei 4° C und 13 000 rpm zentrifugiert. In neuen 1.5-ml-Reaktionsgefäßen wurden 600 µl der wässrigen Oberphase mit 600 µl -20°C kaltem Isopropanol vermischt und 10 min bei 4° C und 13 000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig abgenommen, die Pellets in 300 µl TE resuspendiert. Zum Denaturieren der DNA wurden die Proben für 5 min im Wasserbad gekocht und sofort auf Eis gestellt. Für den ELISA wurden jeweils 50 µl der DNA-Lösungen in jeweils ein *well* von Mikrotiterplatten mit Flachboden pipettiert und die Platten geöffnet ü. N. bei 37° C inkubiert. Bei diesem Schritt wurde die DNA an den Boden der *wells* fixiert. Die Platten wurden danach fünfmal mit PBS-T gewaschen und mit 200 µl BSA-Lösung pro *well* für 1 h bei 37° C inkubiert, um unspezifische Bindung der Antikörper in den nachfolgenden Schritten zu verhindern. Die BSA-Lösung wurde entfernt und die Platten fünfmal mit PBS-T gewaschen. Die Platten wurden dann mit dem ersten Antikörper (monoklonaler Antikörper gegen T<>T, KTM53; Kamiya Biomedical Company, Seattle, USA; pro *well* 50 µl einer 1:1000-Verdünnung in PBS) für 1 h bei 37° C inkubiert und anschließend fünfmal mit PBS-T gewaschen. Danach wurden pro *well* 50 µl des zweiten Antikörpers (in PBS 1:2000 verdünnter HRP Ziegen-Anti-Maus-Antikörper; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) aufgetragen und die Platten abgedeckt bei 37° C für 60 min inkubiert. Die Platten wurden dreimal mit PBS-T und zweimal mit Citrat-Phosphat-Puffer gewaschen. Für die Farbentwicklung wurden je 100 µl o-Phenylendiamin-H₂O₂ benutzt und die Reaktion nach ca. 10 min bei 25° C durch Zugabe von 50 µl 2 M Schwefelsäure gestoppt. Die Platten wurden bei 490 nm ausgelesen.

CTAB-Puffer:

2 % (w/v) Cetyltrimethylammoniumbromid, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris/HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 0.2 % (w/v) 2-Mercaptoethanol

PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung):

10 mM NaP_i, 150 mM NaCl, pH 7.4

PBS-T:

500 µl Tween 20 in 1 l PBS

BSA-Lösung:

3 % (w/v) BSA in PBS, hochtourig abzentrifugiert und durch einen 0.45 µm Sterilfilter filtriert

Citrat-Phosphat-Puffer:

50 mM Na₂HPO₄ x 12 H₂O werden mit 24 mM Zitronensäure auf pH 5.0 titriert

o-Phenylendiamin-H₂O₂-Lösung:

0.04 % (w/v) OPD (o-Phenylendiamin) in Citrat-Phosphat-Puffer; 2 µl Perhydrol (35 % H₂O₂-Lösung) zu 10 ml OPD-Lösung

2.2.4.18.2 In vivo Untersuchung

Die induzierten *E.-coli*-Zellen wurden auf Eis gestellt und die OD₆₀₀ gemessen. Hiernach wurde die Zellkonzentration berechnet: Eine OD₆₀₀ von 1 entspricht ungefähr 5 x 10⁷ Zellen pro ml. Die Zellzahl wurde auf 1 x 10⁷ Zellen pro ml eingestellt. Pro Ansatz wurden 5 Reagenzgläser mit 4.5 ml Medium vorbereitet und damit 5 weitere Verdünnungsstufen mit 1 x 10⁶, 1 x 10⁵, 1 x 10⁴, 2 x 10³, 2 x 10² Zellen pro ml hergestellt. Auf die mindestens zwei Tage alten LB-Agar-Platten wurden für die Bestrahlungen entsprechend jeweils 100 µl der Zellsuspension ausplattiert. Zur Kontrolle wurden Platten mit aufgebrachtener Zellsuspension der zwei niedrigsten Verdünnungsstufen nicht dem UV-B ausgesetzt, die anderen (je zwei Platten aller Verdünnungsstufen) wurden mit offenem Deckel in einem Abstand von 53 cm zur UV-B-Lampe (Philips TL40W/12) mit variablen Zeiten im Sekundenbereich bestrahlt. Eine Hälfte der Platten wurde direkt im schwachen Rotlicht in eine lichtsichere Box verpackt, die andere Hälfte wurde für eine Stunde in photoreaktivierendes Weißlicht einer Photonen-Fluenzrate von 50 µmol m⁻² s⁻¹ gestellt. Die Kolonien wurden nach Ü.-N-Inkubation im Dunkeln bei 37° C gezählt.

2.2.4.19 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 ³⁵S-Methionin (1 000 Ci mmol⁻¹, Hartmann Analytic, Braunschweig) 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™ PCR

Purification Kit, QIAGEN, Hilden). Die entstandenen Produkte wurden entweder in einem *in vitro* Chloroplastenimport-Versuch oder in einem *gel mobility shift assay* eingesetzt. Für den *gel mobility shift assay* wurde die *in vitro* Transkription/Translation in Anwesenheit von 0.3 μM FAD durchgeführt.

2.2.4.20 *gel mobility shift assay*

2.2.4.20.1 *Radioaktivmarkierung der DNA*

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

H ₂ O	1.5 μl
Oligo #5(22.10.99) (2 pmol/ μl)	10 μl
10 x Reaktionspuffer A	2.5 μl
^{32}P - γ ATP	10 μl
T4 Polynukleotidkinase (10 U/ μl)	1 μl

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

2.2.4.20.2 *Waschen und Aktivitätsbestimmung*

Zum obigen Ansatz wurden 10 μl 4 M NaCl und 300 μl 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 μl 80 % EtOH gewaschen und wie oben zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet nach Trocknung in 100 μl H₂O resuspendiert und die Aktivität bestimmt.

2.2.4.20.3 *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)) ds Oligonukleotide erzeugt. Dafür wurden die jeweils komplementären Oligonukleotide gemischt, im Wasserbad auf 90° C erhitzt und langsam auf RT abgekühlt.

2.2.4.20.4 *gel mobility shift assay*

5 x *Gel-shift*-Puffer:

250 mM Tris/HCl, pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 %

Glycerin, 0.5 mM EDTA, 5 mM DTT

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

H ₂ O	13.5 µl
ds ³² P-Sonde	1.5 µl (84 000 cpm pro Ansatz)
5 x <i>Gel-shift</i> -Puffer	75 µl

Für die *gel mobility shift assays* wurden TNT-Reaktionen (Kap. 2.2.4.19) mit dem Vektor pET-15b/PHR3(1-569) („TNT CRY3“) bzw. H₂O („TNT unprogrammiert“) als *template* eingesetzt, die einzelnen Komponenten in 25-µl-Ansätzen nach folgendem Schema zusammenpipettiert und für 30 min bei RT inkubiert:

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Komponente											
H ₂ O [μl]	19	15	15	14	14	14	14	14	14	14	14
Shift-Mix [μl]	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
TNT unprogrammiert [μl]		4									
TNT CRY3 [μl]			4	4	4	4	4	4	4	4	4
spez. Komp. ds (0.1 pmol/μl) [μl]				1							
spez. Komp. ds (1 pmol/μl) [μl]					1						
unspez. Komp. ds (0.1 pmol/μl) [μl]						1					
unspez. Komp. ds (1 pmol/μl) [μl]							1				
spez. Komp. ss (0.1 pmol/μl) [μl]								1			
spez. Komp. ss (1 pmol/μl) [μl]									1		
unspez. Komp. ss (0.1 pmol/μl) [μl]										1	
unspez. Komp. ss (0.1 pmol/μl) [μl]											1

2.2.4.20.5 Nichtdenaturierende Gelelektrophorese und Detektion

Je 20 μl der *Gel-shift*-Ansätze und in einer separaten Tasche 20 μl *Gel-shift*-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 0.25 x TBE bei 170-200 V durchgeführt bis das Bromphenolblau $\frac{3}{4}$ der Trennstrecke erreicht hatte. Nach dem Gellauf wurde das Gel mit in Wasser eingeweichter 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.

Nichtdenaturierendes 5 % Polyacrylamidgel:

10 ml 30 % Polyacrylamid, 4 ml 2 %
Bisacrylamid, 1.5 ml 10 x TBE, 750 μl 10 %
APS, mit *aqua bidest.* auf 60 ml, 60 μl TEMED,
1 h auspolymerisieren lassen

Gel-shift-Marker:

1 x *Gelshift*-Puffer, 0.04 % Bromphenolblau,
0.04 % Xylencyanol

2.2.5 Methoden zur Lokalisation von Proteinen

2.2.5.1 Isolierung von Chloroplasten aus *Pisum sativum*

Die Isolierung intakter Chloroplasten aus Erbsenpflanzen (*Pisum sativum*, Sorte "Kleine Rheinländerin") wurde in modifizierter Form nach Schindler *et al.* (1986) und Perry *et al.* (1991) durchgeführt. Nach Anzucht der Erbsen für 10 Tage bei Raumtemperatur wurde das Blattgewebe mit Isolationsmedium in einen Küchenmixer (Braun) viermal je 2 s homogenisiert und anschließend durch zwei Lagen Nylongaze filtriert. Das Filtrat wurde bei 2 000 g 1 min zentrifugiert und das Pellet in 1 ml Waschpuffer (1 x HMS) resuspendiert. Um intakte von zerstörten Plastiden in der Rohplastidenfraktion zu trennen, wurde 1 ml dieser Fraktion auf ein 40 %iges Percoll-Kissen (9 ml) geschichtet und 5 min lang bei 2 000 g in einem Festwinkelrotor (SS34-Rotor, Sorvall) zentrifugiert. Zerstörte Plastiden lagen dem Kissen auf, wohingegen intakte Plastiden pelletierten. Das Pellet wurde in 1 x HMS-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (1 min, 2 000 g) und in einem kleinen Volumen 1 x HMS-Puffer (50-100 µl) aufgenommen.

Zur Chlorophyllbestimmung wurden 5-10 µl Suspension mit 80 % Aceton auf 1 ml aufgefüllt und die Extinktion bei 652 und 750 nm gemessen. Die Chlorophyll-Konzentration (µg/µl) errechnet sich aus: $(OD_{652} - OD_{750}) \times \text{Verdünnungsfaktor} / 36$.

Anhand der Chlorophyllbestimmung wurde die erforderliche Menge an Chloroplasten für weitergehende Analysen eingesetzt.

Isolationsmedium:

330 mM Sorbitol, 20 mM MOPS, 13 mM Tris,
3 mM MgCl₂, 0,1 % BSA

Waschpuffer (1 x HMS):

330 mM Sorbitol, 50 mM Hepes/KOH, pH 7.6,
3 mM MgCl₂

5 x HMS:

1.65 M Sorbitol, 250 mM Hepes/KOH, pH 7.6,
15 mM MgCl₂

40 % Percoll-Kissen:

40 % Percoll (v/v), 40 % *aqua bidest.* (v/v), 20 %
5 x HMS

2.2.5.2 Import ³⁵S-markierter Proteine in Chloroplasten

Der *in vitro* Import wurde in 400-µl-Ansätzen durchgeführt. Die Ansätze enthielten 2 mM ATP, 20 mM Kalium-Gluconat, 5 mM Methionin, 20 mM NaHCO₃, 2 % Rinderserum-Albumin, 330 mM Sorbitol, 50 mM Hepes/KOH, pH 7.6, 3 mM MgCl₂ und 40 µl des ³⁵S-markierten *In-*

in vitro-Translations-Produktes (Kap. 2.2.4.19). Das Import-Gemisch wurde für 30 min bei 25° C inkubiert.

Nach der Inkubation wurde der Import durch Zentrifugation (1 min, 1 000 g, 10° C) abgestoppt, in 300 µl Waschmedium aufgenommen, auf Eis gestellt und sofort weiterverarbeitet.

Der Ansatz wurde für die weiteren Schritte in 3 x 100 µl aliquotiert und wie im Schema angegeben weiterbehandelt:

Plastiden-Fraktion	Thermolysin-Fraktion	Triton-Fraktion
+ 1/10 Vol. 10 mM CaCl ₂	+ 1/10 Vol. Thermolysin-Stammlösung	+ 0.2 % (v/v) Triton X-100, 10 min RT, + 1/10 Vol. Thermolysin
10minütige Inkubation auf Eis		
+ EDTA zu einer Endkonzentration von 10 mM		
1 min, 1 000 g, 10° C		+ 4 Vol. Aceton
Waschen: +300 µl Waschmedium, 1 min, 1 000 g, 10° C		15 min, 20 000 g, 4° C, trocknen
Die Pellets wurden in 15 µl SDS 2 x Probenpuffer resuspendiert.		

Thermolysin-Stammlösung in Waschpuffer:

1 mg/ml Thermolysin, 10 mM CaCl₂ in

1 x Waschpuffer

2.2.5.3 Protoplastierung und transiente Transformation einer *Arabidopsis*-Mesophyllzellen-Kultur bzw. einer *Arabidopsis*-Wurzelzellen-Kultur

Die Protoplasten wurden von einer *Arabidopsis* Landsberg erecta Mesophyllzellen-Kultur (Gabe von Aidyn Mouradov und Csaba Koncz) bzw. einer *Arabidopsis* Wurzelzellen-Kultur (Gabe von Csaba Koncz) hergestellt und in Anlehnung an das Protokoll von Altmann *et al.* (1992) transformiert. Die Protoplasten wurden chemisch mit der PEG-Methode mit 30 µg der jeweiligen Plasmide transformiert und für 24 h inkubiert, bevor sie konfokal analysiert wurden.

2.2.5.3.1 Herstellung der Protoplasten

30-50 ml einer 3-4 Tage alten Zellkultur wurde in ein 50-ml-Gefäß überführt und 5 min bei 60 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgeschüttet, das Pellet in 35 ml Enzymlösung gründlich resuspendiert, und danach drei Petrischalen mit jeweils 12 ml Protoplasten-Suspension beschickt. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen und mindestens 17 h bei 25° C und 40 bis 50 rpm inkubiert.

Enzymlösung:

1 % (w/v) Cellulase „Onozuka“ R-10 (Serva),
0,25 % Macerocym R-10 (Serva) in 8 mM
CaCl₂/0.4M Mannitol-Lösung lösen; der pH stellt
sich von selber auf etwa 5.5 ein, sonst mit
w/KOH auf pH 5.5 bis 5.8; sterilfiltriert

2.2.5.3.2 Aufarbeitung und Reinigung

Die Protoplasten-Suspension wurde in ein 50-ml-Gefäß überführt und für 5 min, 60 g, zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 10 ml W5 einmal gewaschen (5 min, 60 g), wiederum der Überstand verworfen, und das Pellet in 10 ml W5 resuspendiert. Während diese Suspension für mindestens 0.5 bis 2 h auf Eis lagerte, wurden die Protoplasten unter dem Mikroskop kontrolliert.

W5:

150 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 5 mM
Glucose, pH 5.8 mit w/KOH; sterilfiltriert oder
autoklaviert

2.2.5.3.3 Transformation der Protoplasten

Die Protoplasten wurden 5 min bei 60 g abzentrifugiert, und in so viel MaMg aufgenommen, dass die Protoplastenzahl ungefähr 1.6 bis 2 x 10⁷ pro ml betrug. Die Konzentration der in der Transformation verwendeten DNA wurde auf 1 mg/ml eingestellt. Die Transformationsansätze wurden in 15-ml-Gefäße oder Reagenzgläser pipettiert. Im Nachfolgenden ist ein einfacher Transformations-Ansatz beschrieben, der beliebig vervielfacht werden kann: 20-50 µg Plasmid-DNA wurden mit 50 µg *carrier* DNA (DNA aus Lachs-Sperma; Konzentration 10 mg/ml) vermischt, 300 µl Protoplasten dazu gegeben,

durch leichtes Schütteln durchmischt und 5 min bei 25° C stehen gelassen. Danach wurden 300 µl PEG-CMS-Lösung dazugegeben; dies resultierte in einer PEG-Endkonzentration von 20 %. Nach 30 min bei 25° C wurden die Protoplasten in zwei Schritten gewaschen, um das PEG zu entfernen: 8 ml W5 wurden in 2-ml-Schritten über eine 10-min-Periode unter vorsichtigem Schütteln zu der Suspension gegeben und 5 min bei 60 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4.5 ml 0.5 M Mannitol + 0.5 ml W5 resuspendiert. Es wurde abermals für 5 min bei 60 g zentrifugiert, das Pellet in 12 ml B5-Medium (+Glucose) aufgenommen und in eine Petrischale überführt. Diese wurde mit Parafilm verschlossen und über Nacht bei 25° C im Dunkeln bis zur Expressions-Analyse stehen gelassen.

MaMg-Lösung (Negrutiu et al., 1978):

15 mM MgCl₂, 0.5 M Mannitol, 5 mM MES, mit w/KOH auf pH 5.6, also pro 50 ml: 1.5 ml 0.5 M MgCl₂, 4.55 g Mannitol, 48.8 mg MES; sterilfiltriert oder autoklaviert

PEG-CMS-Lösung:

40 % w/w PEG 6000 (Merck) gelöst in 0.4 M Mannitol, 0.1 M Ca(NO₃)₂, pH 7-9, sterilfiltriert, 2-ml-Aliquots abgefüllt und bei -20 °C gelagert

B5-Medium (+ Glucose):

Gamborgs B5-Medium mit 72.6 g/L Glucose und entsprechenden Hormonen, pH 5.8

2.2.5.4 Transiente Transformation von Epidermiszellen von *Arabidopsis*-Blättern – *particle gun bombardment*

Blätter von vier Wochen alten *Arabidopsis* Col-O-Pflanzen wurden mit der Oberseite nach unten auf MS-Platten gelegt. Für jedes getestete GFP-Konstrukt wurden 300 µg Gold-Partikel (1 µm Durchmesser, Biorad) mit je 10 µg des GFP-Konstruktes und eines 35S-LUC-Konstruktes (pGN35S-luc; Gabe von Dr. Neuhaus-Url) nach Anweisung des Herstellers (Biorad) beschichtet. Die beschichteten Goldpartikel wurden schließlich in 48 µl Ethanol aufgenommen und bis zum Beschießen der *Arabidopsis*-Blätter auf Eis aufbewahrt. Um die Goldpartikel in die Epidermiszellen der *Arabidopsis*-Blätter zu schießen, wurde eine „Biolistic PD-1000/He Particle delivery Gun“ (Biorad) mit einem Hepta-Adapter und einem Druck von 900 psi verwendet. Beschossene Proben wurden bei 22° C für 24 h im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Blätter mit 1 mM Luciferin (in 0.1 % Triton X-100) besprüht, und die Licht-Emission mit einer Hamamatsu HPD:CP CCD-Kamera (Hamamatsu Photonics, Hersching) quantifiziert. Luciferase-exprimierende Blätter wurden für die Konfokale Mikroskop-Analyse auf Objektträger in Wasser eingebettet.

2.2.5.5 Konfokale Mikroskopie (GFP- und Chlorophyll-Visualisierung)

Arabidopsis-Blätter wurden mit einem Leica TCS-4D konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim) und einem 63 x Öl-Immersion-Objektiv untersucht. GFP wurde mit Hilfe eines Argon/Krypton-Lasers mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt; die Fluoreszenz-Emission wurde mit einem Band-Pass-Filter für FITC (*green fluorescence*, 535/50) detektiert.

Arabidopsis-Protoplasten wurden mit einem Leica TCS SP2 Konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop und einem HCX PL APO 40x/1.25-0.75 Öl CS Objektiv untersucht. Die Mitochondrien wurden durch eine 30minütige Inkubation in Mitotracker-Lösung vitalgefärbt. GFP und Chlorophyll wurden bei 488 nm angeregt, Mitotracker bei 543 nm; die resultierende Fluoreszenz wurde mit einem Strahlenteiler (TD 488/543/633) und zwei verschiedenen Photomultipliern einer Bandweite von 500-520 nm bzw. 625-720 nm für GFP- bzw. Chlorophyllfluoreszenz oder von 500-520 nm bzw. 565-585 nm für GFP- bzw. Mitotrackerfluoreszenz, detektiert. Die Bilder wurden mit der zugehörigen Leica Software gespeichert und mit Adobe Photoshop 5.5 weiterverarbeitet.

Mitotracker-Lösung:

5 nM CMTM Ros (Molecular Probes, Leiden, Niederlande), 0.5 M Mannitol, 15 mM NaCl, 12.5 mM CaCl₂, 0.5 mM KCl, 0.5 mM Glucose; pH 5.8

2.2.6 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie zum Nachweis von Flavinen wurde mit DC-Alufolie Kieselgel 60 Platten (20 x 20 cm; Merck KGaA, Darmstadt) durchgeführt. Als Standards dienen Riboflavin, FMN und FAD einer Konzentration von 0.1 % (w/v) in 50 % Methanol. Die Standards und die Probe wurden 2.5 cm vom unteren Rand entfernt in einem 5- μ l-Volumen aufgetragen, in eine mit 2.5 % (w/v) Na₂HPO₄ x 2H₂O 2 cm hoch gefüllte gut schließende Kammer gestellt und für etwa 45-60 min entwickelt. Das entspricht einer Trennstrecke von etwa 15 cm. Die Lauffront wurde markiert, die Flavine mit UV (254 nm) sichtbar gemacht und die R_f-Werte berechnet.

2.2.7 Versuch zur *psbA3* Transkriptinduktion von *Synechocystis*-Zellen

Die *Synechocystis*-Zellen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{730} = 0.3$) bei 2 500 g für 12 min abzentrifgiert und in frischem BG-11-Medium zu einer Chlorophyll-Konzentration von $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ resuspendiert. Die Zellen wurden für eine Stunde in Weißlicht niedriger Fluenzrate ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) inkubiert, um die *psbA* Transkriptmenge herunterzusetzen. Dann wurden die Zellen mit verschiedenen Wellenlängen bestrahlt. Monochromatisches Licht wurde durch mit Filtern (Schott Glaswerke, Mainz) versehenen Diaprojektoren (Prado Universal 31047, Ernst Leitz GmbH, Wetzlar) erzeugt.

2.2.8 Versuch zur Photoinhibierung von *Synechocystis*-Zellen

Der Versuch zur Photoinhibierung des *Synechocystis* sp. PCC 6803 Wildtyps und der *phr* und *cry* Mutanten wurde im Labor von Imre Vass, Szeged, Ungarn, durchgeführt. Hierbei sei auf die Veröffentlichungen von Sass *et al.*, 1997 und Vass *et al.*, 2000 verwiesen.

3 Ergebnisse

3.1 sll1629 aus *Synechocystis* – ein bakterielles Cryptochrom

Das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 kann sowohl auto- als auch heterotroph wachsen. Für das heterotrophe Wachstum wird ein täglicher Blaulichtpuls benötigt (Anderson and McIntosh, 1991). Es existieren *Synechocystis*-Stämme, die Phototaxis zeigen (Choi *et al.*, 1999b), und durch *differential display* und *microarray*-Analysen wurden viele Gene gefunden, deren Expression durch Licht beeinflusst wird (Bhaya *et al.*, 2000; Hihara, 2001). Über die beteiligten Photorezeptoren der physiologisch z. T. gut definierten Lichtantworten in *Synechocystis* ist wenig bekannt. Die bei *Synechocystis* durch Blaulicht ausgelösten Prozesse deuten auf ein Vorhandensein von sensorischen Blaulichtrezeptoren. Die Blaulichtperzeption könnte sowohl von neuartigen Photorezeptoren, von Photosynthesepigmenten oder von Pigmenten übernommen werden, die bereits bei anderen Organismen als Photorezeptoren identifiziert wurden.

Wir und andere (Hitomi *et al.*, 2000; Ng und Pakrasi, 2001; Brudler *et al.*, 2003) haben durch Suchen in der *Synechocystis* Datenbank (<http://www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html>) nach Sequenzen mit Ähnlichkeit zu bekannten Photorezeptoren zwei offene Leseraster (ORFs), slr0854 und sll1629, mit Homologie zur Photolyase/Cryptochrom-Familie gefunden. Es wurde gezeigt, dass der ORF slr0854 für eine Photolyase kodiert (eigene Ergebnisse; Hitomi *et al.*, 2000; Ng *et al.*, 2000), nicht aber sll1629. Eine mögliche Funktion von sll1629 als Photorezeptor sollte in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

3.1.1 Das sll1629 Gen und Protein

Nahe sll1629 liegen drei weitere ORFs: 270 Basenpaare stromaufwärts sll1628 und 10 Basenpaare stromabwärts sll1630, 40 Basenpaare stromabwärts von sll1630 liegt sll1631. Die durch sll1628 kodierte Aminosäuresequenz besitzt Homologie zu anderen noch nicht klassifizierten Proteinen aus Cyanobakterien und eine schwache Homologie zu einem TPR (*tetratricopeptide repeat*)-Domänen besitzenden Protein aus dem Archaeobakterium *Methanosarcina acetivorans*. Die sll1630 Aminosäuresequenz ist zu keinem bekannten Protein homolog. Für die sll1631 Proteinsequenz wird eine putative Funktion einer Cytidin- oder Deoxycytidylat-Deaminase vorhergesagt (<http://www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html>).

Die Gene von Bakterien werden oft in Form einer so genannten polycistronischen (polygenischen) mRNA transkribiert. Solche gemeinsam oder koordiniert exprimierten Gene werden als Operon bezeichnet (Knippers, 1997). Mit RT-PCR sollte festgestellt werden, ob die ORFs aus der unmittelbaren Umgebung von sll1629 mit sll1629 ein Operon bilden. Es wurden genomische DNA, RNA und cDNA gleicher Konzentrationen in einer PCR amplifiziert. Dafür wurden zwei verschiedene *Primer*-Paare benutzt (zur Lage der *primer* s. auch Abb. 3.1 a). Das erste *Primer*-Paar (up-sll1629-5', up-sll1629-3') diente zur Amplifikation des Bereiches zwischen ORF sll1628 und sll1629. up-sll1629-5', als 5'*primer*, schloss die letzten acht Basenpaare der 3'Region von sll1628 mit ein, up-sll1629-3' begann als 3'*primer* direkt stromaufwärts von sll1629. Mit dieser Kombination sollte bei Amplifizierung genomischer DNA ein PCR-Produkt einer Größe von 290 Basenpaaren entstehen. Das zweite *Primer*-Paar (down-sll1629-5', down-sll1629-3') diente zur Amplifikation des Bereiches zwischen ORF sll1629 und sll1630. down-sll1629-5' schloss als 5'*primer* die letzten zwei Basenpaare der 3'Region von sll1629 mit ein, mit dem 3'*primer* down-sll1629-3' wurden die ersten 200 Basenpaare der 5'Sequenz von sll1630 mit eingeschlossen. Mit genomischer DNA als *template* sollte ein PCR-Produkt einer Größe von etwa 200 Basenpaaren entstehen.

Die genomische DNA diente als Positivkontrolle in der PCR. Wie in Abb. 3.1 b gezeigt, entstanden PCR-Produkte der richtigen Größe. RNA als *template* für eine Kontrolle für DNA-Verunreinigungen der RNA-Präparation lieferte ebenfalls ein Produkt. Für den Bereich zwischen sll1629 und sll1630 war dieses Produkt in einer weitaus geringeren Menge als das Produkt mit cDNA als *template* vorhanden (Abb. 3.1 b). Auch für den Bereich zwischen sll1629 und sll1628 hat die Menge an Produkt zugenommen, wenn cDNA als *template* eingesetzt wurde. Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass sll1628, sll1629 und sll1630 in einem Operon liegen.

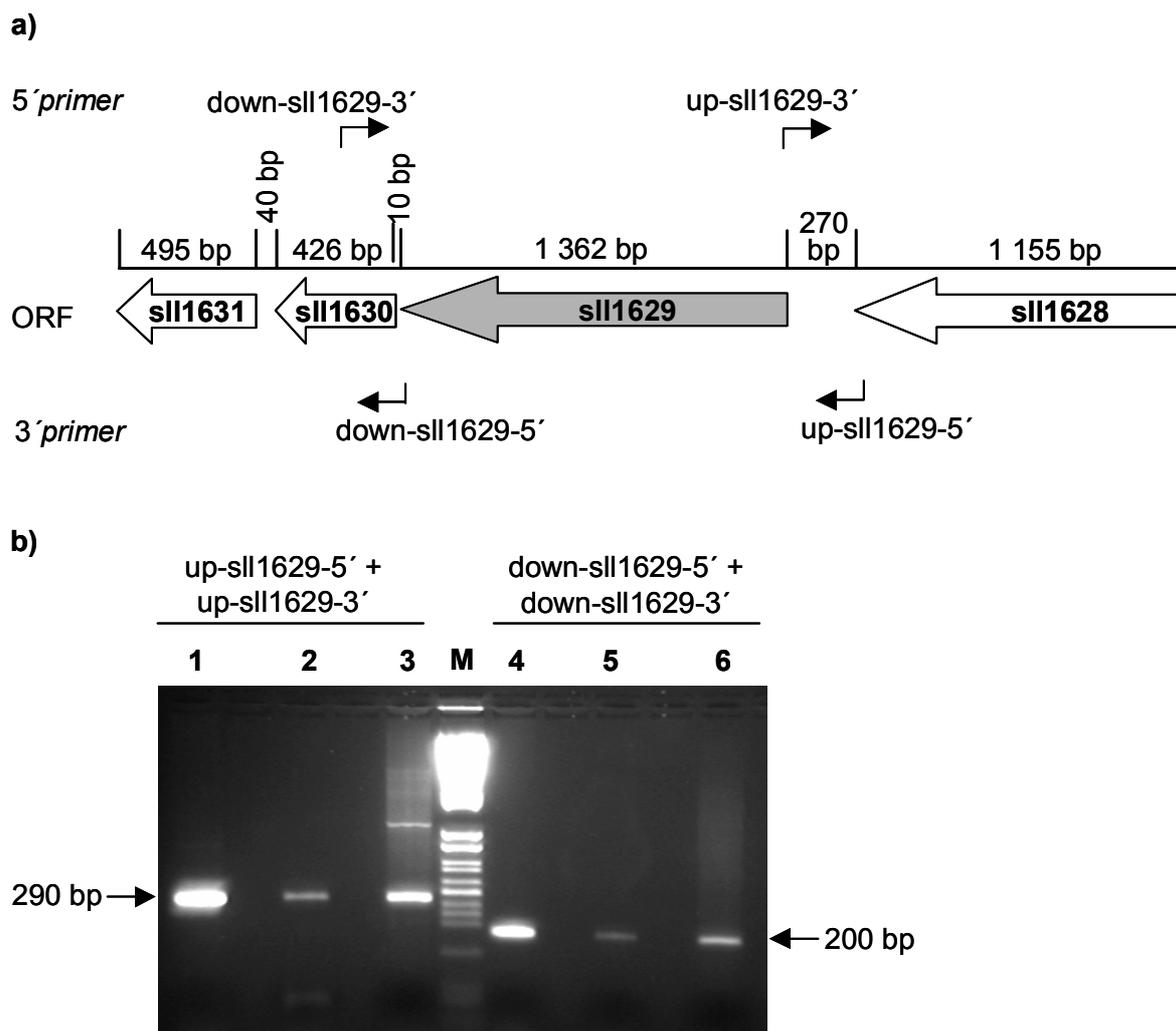


Abb. 3.1: Gencluster-Struktur von sll1628-sll1631. a) Gezeigt sind die ORFs mit der Angabe ihrer jeweiligen Größen und der Größe der Abstände zwischen ihnen. Die verwendeten *primer* sind als Pfeile eingezeichnet. b) Es wurden PCRs mit den eingezeichneten *Primer*-Paaren durchgeführt und auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Pfeile markieren die Produkte. 1 und 4, genomische DNA; 2 und 5, RNA; 3 und 6, cDNA.

sll1629 kodiert für ein 453 AS großes Protein mit einer Molekülmasse von etwa 53 kDa und einem theoretischen Isoelektrischen Punkt von 8.61. Das Protein wurde als N-terminale *His-tag*-Fusion in den Vektor pQE-30 kloniert (Kap. 2.1.12.1) und in M15[pREP4] *E. coli*-Zellen transformiert. Die Induktion mit 1 mM IPTG und nachfolgende Expression für 5 h bei 30° C ergab eine gute Anreicherung des Proteins. Es konnten aber nur etwa 10 % des gebildeten Proteins in der löslichen Fraktion detektiert werden. Aufreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie resultierte in einer Ausbeute von etwa 100 µg Protein pro Liter Expressionskultur. Mit Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie konnte FAD als nicht kovalent gebundener Kofaktor nachgewiesen werden (nicht gezeigte Daten).

Die Charakterisierung der *Synechocystis sll1629* Mutante ist ein Hauptprojekt dieser Arbeit. Die Mutagenese des *sll1629* Gens ist in Abb. 2.1 (Kapitel 2.1.9.2) schematisch dargestellt. Erst kürzlich wurde für das durch *sll1629* kodierte Protein eine Cryptochromfunktion postuliert (Brudler *et al.*, 2003). Daher wird in dieser Arbeit synonym für *sll1629* auch Cryptochrom (*cry*) gebraucht.

3.1.2 Wachstum und Pigmentzusammensetzung der *sll1629* Mutante unter verschiedenen Lichtbedingungen

Das Fehlen der Evidenz für eine Photolyasefunktion von *sll1629* gab Anlass zu vermuten, dass *sll1629* für einen Photorezeptor kodieren könnte. Unter photoautotrophen Wachstumsbedingungen (Weißlicht, $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) zeigten *sll1629* Mutantenzellen in zwei Kulturansätzen eine veränderte Pigmentzusammensetzung im Vergleich zu gleich alten Wildtyp- und *slr0854* Mutantenzellen (Abb. 3.2). Die Kolonien waren gelblich statt blau-grün, ein Hinweis darauf, dass sie weniger Chlorophyll enthielten als der Wildtyp. Dieser Phänotyp war aber nicht stabil. Unter photoheterotrophen Wachstumsbedingungen (täglich 10 min $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Weißlicht) waren die Mutanten *sll1629* und *slr0854* und der Wildtyp phänotypisch gleich. Es wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Luciferase-exprimierende *Synechocystis*-Stämme untersucht (nicht gezeigte Daten). Ein Stamm, pSTV3, enthielt die kodierende Region für die „firefly luciferase“ unter der Kontrolle des *psbA2* Promotors. Das chimäre Gen war im *psbA1* Gen integriert (zu den *psbA* Genen s. Kap 3.1.4). Auch in diesem Stamm wurde der ORF *sll1629* mit dem schon beschriebenen Konstrukt (Kap. 2.1.9.2, Abb. 2.1) ausgeschaltet. Die pSTV3/*sll1629*-Kultur zeigte unter heterotrophen Bedingungen im Gegensatz zur pSTV3-Kultur auch eine gelbliche Färbung.



Abb. 3.2: Unter photoautotrophen Bedingungen angezogene *Synechocystis*-Kolonien. Gezeigt sind Platten des Wildtyps (WT), der *slr0854* Mutante ($\Delta\text{slr0854}$) und der *sll1629* Mutante ($\Delta\text{sll1629}$). Dieser Phänotyp der *sll1629* Mutantenzellen war aber nicht stabil.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurden Wachstumskurven von autotroph (Weißlicht, $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) angezogenen *Synechocystis*-Flüssigkulturen aufgenommen und der Chlorophyll-, Phycobilin- und Carotinoidgehalt bestimmt. Die *sl1629* und *slr0854* Mutantenzellen zeigten allerdings unter diesen Anzuchtbedingungen hinsichtlich des Wachstums und der Pigmentzusammensetzung keinen Unterschied zum Wildtyp (Daten nicht gezeigt).

Die Synthese von Photosynthesepigmenten wird durch Licht, besonders durch Rot- und Blaulicht beeinflusst. An dieser Regulation sind sowohl Phytochrome als auch Cryptochrome beteiligt (Matters und Beale, 1995; McCormac und Terry, 2002). Die oben genannten Parameter wurden deshalb auch im Rot- und Blaulicht untersucht.

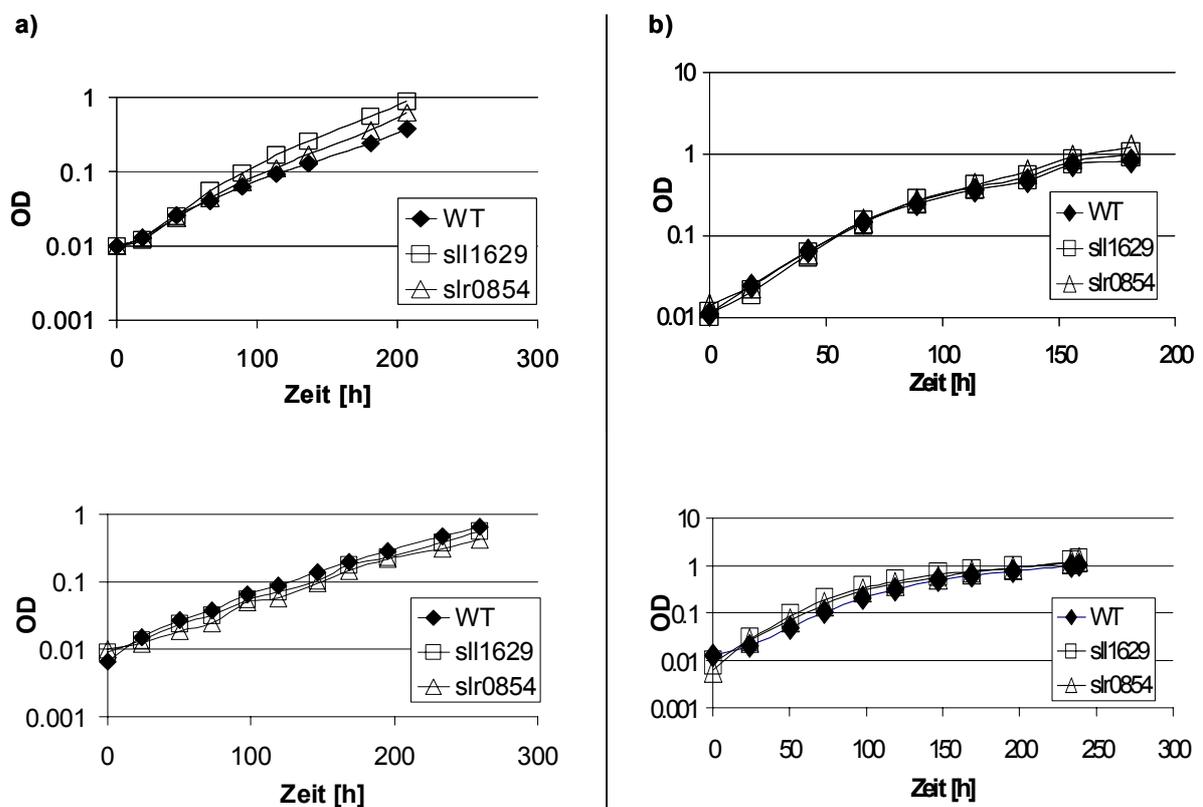


Abb. 3.3: *Synechocystis* Wildtyp, Cryptochrom- und Photolyase-Mutante zeigen gleiches Wachstum im Blau- und Rotlicht. Rasch wachsende *Synechocystis*-Flüssigkulturen von Wildtyp (WT), Cryptochrom (*sl1629*) und Photolyase (*slr0854*) Mutante wurden auf eine OD_{730} (OD) von 0.01 eingestellt und für die jeweils angegebene Zeit a) im Blaulicht und b) im Rotlicht angezogen. Es sind Wachstumskurven von jeweils zwei Kulturansätzen gezeigt.

Rasch wachsende, im Weißlicht angezogene *Synechocystis*-Flüssigkulturen des Wildtyps, der *sll1629* und der *sir0854* Mutante wurden jeweils auf eine OD_{730} von 0.01 eingestellt und je eine Kultur im Rotlicht ($15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) oder Blaulicht ($15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) weiterkultiviert. Alle 12-24 h wurden Proben entnommen und die OD_{730} gemessen. Am Ende der Kinetik wurden Proben zur Bestimmung der Pigmentzusammensetzung genommen und aus Absorptionsspektren die relativen Chlorophyll- und Phycobilingehalte berechnet. Zudem wurde das Chlorophyll mit 80 % Methanol extrahiert und die Konzentration bestimmt (Daten nicht gezeigt).

Wie in Abb. 3.3 zu sehen, gibt es auch im Blau- und Rotlicht keine signifikanten Wachstumsunterschiede zwischen *Synechocystis* Wildtyp, *cry* und *phr* Mutante. Sowohl der Chlorophyll- als auch der Phycobilingehalt waren in beiden Lichtqualitäten in der *cry* Mutante gegenüber dem Wildtyp leicht, aber nicht signifikant, erhöht (Abb. 3.4). Die *phr* Mutante hatte nahezu den gleichen Chlorophyll- und Phycobilingehalt wie der Wildtyp.

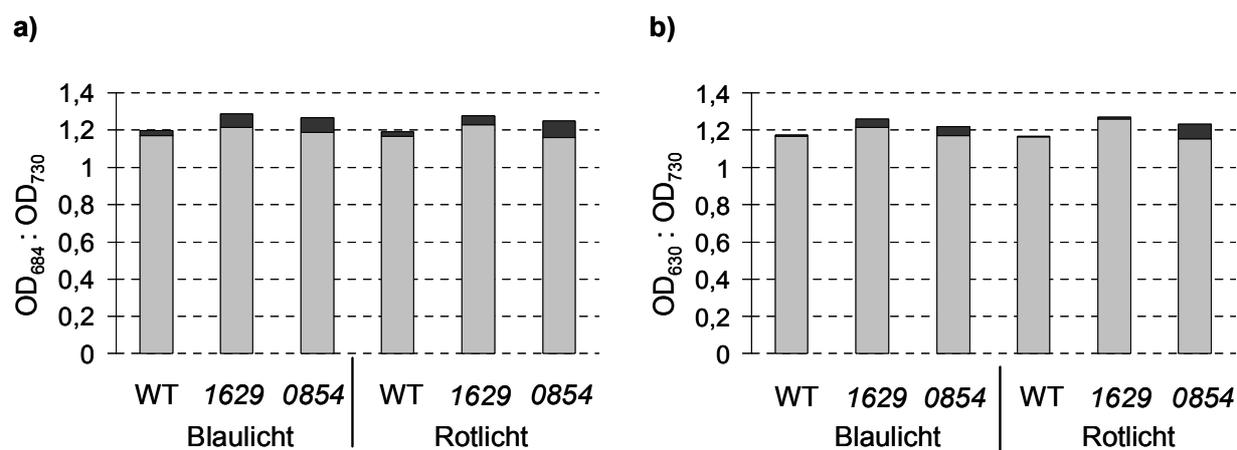


Abb. 3.4: Chlorophyll- und Phycobilingehalt sind bei im Blau- und Rotlicht gewachsenen Wildtyp-, *cry*- und *phr*-Mutantenzellen von *Synechocystis* annähernd gleich. Wildtyp (WT), *cry* Mutanten (1629) und *phr* Mutanten (0854) *Synechocystis*-Zellen wurden für 7 Tage im Blau (BL)- bzw. Rotlicht (RL) in Flüssigkultur angezogen. Der Chlorophyll (a)- bzw. Phycobilingehalt (b) wurde als der Quotient der Werte aus OD_{684} und OD_{730} bzw. OD_{630} und OD_{730} aus *in vivo* Spektren bestimmt. Die Daten sind aus jeweils zwei Kulturansätzen entstanden. Das obere Ende der grauen Balken stellt den unteren Wert, das obere Ende der schwarzen Erweiterung den oberen Wert dar.

3.1.3 *Synechocystis* Cryptochrom fördert die Phototaxis im Rotlicht

Viele Cyanobakterien besitzen die Fähigkeit zur Phototaxis, d. h., sie können sich orientiert in Abhängigkeit von der Lichtrichtung bewegen, um Lichtbedingungen für optimales Wachstum zu erreichen. *Anabaena* sp. zeigt bei niedrigen Fluenzraten positive Phototaxis, also zum Licht hin, und negative Phototaxis bei höheren Fluenzraten. Auch *Synechocystis* sp. PCC 6803 kann sich phototaktisch bewegen, jedoch ist dieser Phänotyp labil (Castets *et al.*, 1986), und manche Stämme haben diese Eigenschaft verloren. Auch gibt es widersprüchliche Aussagen bezüglich der benötigten Lichtqualität und -quantität für positive oder negative Phototaxis (Bhaya *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 1999; Ng *et al.*, 2003; Wilde *et al.*, 2002; Yoshihara *et al.*, 2000). Dies könnte an genetischen Differenzen der verschiedenen Laborstämme oder an voneinander abweichenden Versuchsbedingungen liegen. Die für diese Arbeit durchgeführten Phototaxis-Experimente erfolgten in Kooperation mit Annegret Wilde und Brita Fiedler aus der Arbeitsgruppe von Thomas Börner, Humboldt Universität, Berlin. Für diese Arbeit wurden zwei verschiedene *Synechocystis*-Stämme verwendet. Der erste *Synechocystis*-Stamm zeigt Phototaxis im Weiß-, Grün-, Rot- und Dunkelrotlicht. Im Gegensatz zu Befunden anderer Gruppen (Choi *et al.*, 1999; Ng *et al.*, 2003) zeigt dieser Stamm im Blaulicht keine Phototaxis. Börner und Mitarbeiter haben gefunden, dass sich durch Ausschalten von *cph2*, einem bakteriellen Phytochrom (Kap. 1.1.3), die Mutantenzellen im Gegensatz zu den Wildtypzellen zum Blaulicht hin orientieren (Wilde *et al.*, 2002). Zellen des zweiten untersuchten *Synechocystis*-Wildtyps, dem „Grossman“-Stamm, orientieren sich phototaktisch im Blaulicht. In diesem Stamm wurde kürzlich ein potenzieller Photorezeptor, TaxD1, der die Phototaxis im Rotlicht beeinflusst, beschrieben (Ng *et al.*, 2003). Es wird vermutet, dass zusätzlich zu TaxD1 und *cph2* ein oder mehrere UV-A/Blaulichtrezeptor(en) eine Rolle im phototaktischen Verhalten von *Synechocystis* sp. PCC 6803 spielen. Daher wurde in dieser Arbeit auch die *Synechocystis cry* Mutante auf veränderte Phototaxis untersucht. Choi *et al.* (1999b) haben herausgefunden, dass sich ihr *Synechocystis*-Stamm in Antwort auf UV-A-Licht negativ phototaktisch verhält. Entsprechend wurden die in dieser Arbeit verwendeten *Synechocystis*-Stämme auch auf das phototaktische Verhalten im UV-A-Licht untersucht.

Synechocystis Wildtyp, *cph2* (als Kontrolle), *cry* und *cry cph2* Mutantenzellen wurden in einer Linie auf 0.5 % Glucose-Agar-Platten aufgetragen. Die Platten wurden vor durch Trennwände voneinander abgegrenzte Projektoren gestellt. Die Projektoren waren mit verschiedenen Filtern versehen, so dass Licht der Wellenlängen 372, 662 und 732 nm mit einem Energiefluss von $2.2 \text{ W m}^{-2}\text{s}^{-1}$ generiert wurde. Nach drei (Rotlicht) bzw. zehn bis vierzehn Tagen wurden die Platten ausgewertet (Abb. 3.5).

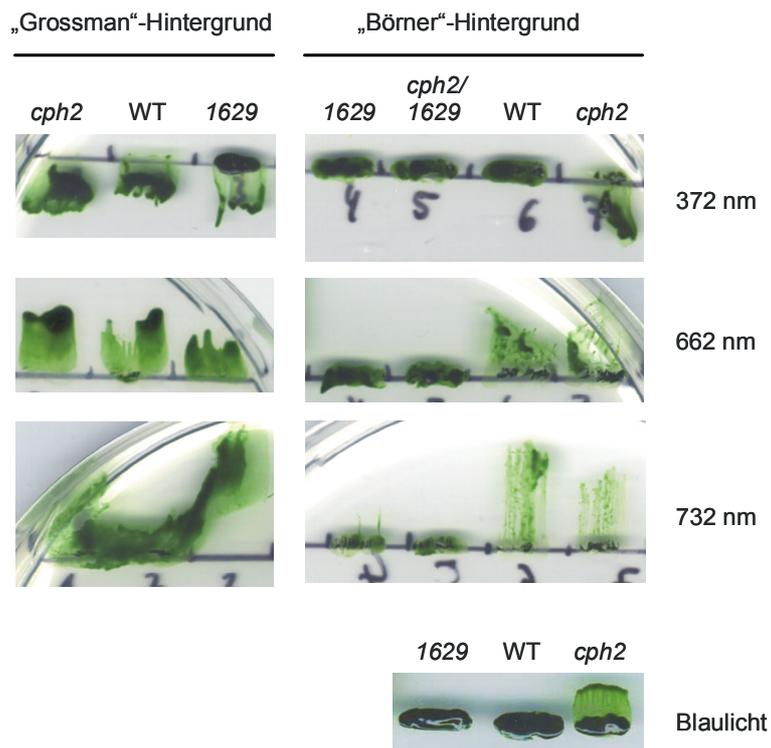


Abb. 3.5: *Synechocystis cry* beeinflusst die Phototaxis im Rot- und Dunkelrotlicht. *Synechocystis* Wildtyp (WT), *cph2* Mutanten- (*cph2*), *sll1629* Mutantenzellen (1629) im „Grossman“- und im „Börner“-Hintergrund und *cph2 sll1629* Doppelmutantenzellen im „Börner“-Hintergrund wurden auf 0.5 %ige Agarose-Platten versetzt mit 5 mM Glucose aufgetragen und für 3-14 Tage mit den angegebenen Wellenlängen seitlich belichtet.

Bei 372 nm zeigten alle im „Grossman“-Hintergrund untersuchten Linien negative Phototaxis. Die „Börner“-Wildtypzellen konnten sich – wie schon im Blaulicht gezeigt – nicht phototaktisch bewegen. Auch die *sll1629* und *cph2 sll1629* Mutantenzellen zeigten keine Phototaxis; die *cph2* Mutante jedoch zeigte negative Phototaxis. Im Rotlicht (662 nm) gab es keine Unterschiede zwischen den Linien im „Grossman“-Hintergrund; alle zeigten positive Phototaxis. Auch Wildtyp und *cph2* Mutante im „Börner“-Hintergrund zeigten positive Phototaxis. Die *sll1629* und *cph2 sll1629* Mutantenzellen im „Börner“-Hintergrund haben jedoch die Fähigkeit zur Phototaxis verloren. Bei 732 nm zeigten alle im „Grossman“-Hintergrund untersuchten Zellen positive Phototaxis, wobei die *sll1629* Mutante wesentlich schneller „lief“ als die anderen Stämme. Auch zeigten der Wildtyp und die *cph2* Mutante im „Börner“-Hintergrund positive Phototaxis, die *cph2 sll1629* Mutante war zur Phototaxis nicht mehr fähig. Nur einige *sll1629* Mutantenzellen zeigten Phototaxis. Es kann geschlossen werden, dass *Synechocystis cry* die Phototaxis zumindest im Rotlicht fördert.

3.1.4 In der *Synechocystis* sp. PCC 6803 *cry* Mutante erfolgt keine UV-B-induzierte *de novo* D1 Protein Synthese

Synechocystis hat drei *psbA* Gene: *psbA1*, *psbA2* und *psbA3* (Jansson *et al.*, 1987). *psbA1* wird nicht abgelesen, *psbA2* und *psbA3* kodieren für eine identische Form des D1 Proteins, welches zusammen mit dem D2 Protein das Reaktionszentrum von Photosystem II bildet. Photosystem II katalysiert die lichtinduzierte Reduktion von Plastochinon durch Wasser in Organismen, die oxygene Photosynthese betreiben. Hohe Lichtintensitäten und UV-Licht schädigen den Photosystem II Komplex, besonders die D1 und D2 Proteine. Dadurch wird die Photosyntheserate vermindert und weniger Sauerstoff entwickelt. Dieser Prozess wird als Photoinhibierung bezeichnet, und der Schaden kann nur durch Abbau und *de novo* Synthese speziell des D1 Proteins repariert werden. Die *de novo* Synthese wird sowohl durch UV-B als auch durch sichtbares Licht induziert (Sass *et al.*, 1997).

In Kooperation mit Imre Vass (Szeged, Ungarn) wurden *Synechocystis* Wildtyp-, *phr* und *cry* Mutantenzellen auf die Fähigkeit hin untersucht, nach Gabe von UV-B den PS-II-Schaden zu reparieren. Dies konnte durch Messen der Sauerstoffproduktion bestimmt werden. Zunächst wurde die Sauerstoffentwicklung für Wildtyp, *cry* und *phr* Mutante unter UV-B mit gleichzeitiger Gabe von sichtbarem Licht gemessen (Abb. 3.6). Jeweils ein Teil einer Kultur wurde nicht, der andere mit Lincomycin, einem Proteinsynthese-Inhibitor, behandelt. Unter diesen Bedingungen verhielten sich die drei getesteten *Synechocystis*-Stämme sehr ähnlich (Daten nicht gezeigt). Mit Lincomycin-Behandlung war die Sauerstoffproduktion nach zwei Stunden auf etwa 30 % des Ausgangswertes zurückgegangen. Dieser Abfall spiegelt die Photoinhibierung des Photosystem-II-Komplexes wider, da durch den Proteinsyntheseinhibitor keine *de novo* Proteinsynthese stattfinden konnte. Ohne Lincomycin produzierten alle Zellen auch noch nach zwei Stunden Bestrahlung nahezu soviel Sauerstoff wie am Anfang des Experimentes.

Wie oben erwähnt, wird die *de novo* Synthese des D1 Proteins auch durch alleinige UV-B-Gabe induziert. Ein zweites Experiment wurde entsprechend dem ersten durchgeführt, mit dem Unterschied, dass UV-B ohne zusätzliches sichtbares Licht gegeben wurde. Unter diesen Bedingungen konnte ein eindeutiger Unterschied zwischen der *cry* Mutante einerseits und dem Wildtyp und der *phr* Mutante andererseits festgestellt werden. Wildtyp- und *phr* Zellen konnten in Abwesenheit von Lincomycin mehr Sauerstoff entwickeln als in Anwesenheit des Proteinsyntheseinhibitors (Abb. 3.6). D. h., hier fand im UV-B *de novo* Synthese des D1 Proteins statt. Die *cry* Mutante hingegen zeigte keinen Unterschied der Sauerstoffentwicklung in An- oder Abwesenheit von Lincomycin (Abb. 3.6). Offenbar kann in

der *cry* Mutante die *de novo* Synthese des D1 Proteins bei Gabe von UV-B ohne Weißlichtzusatz nicht stattfinden.

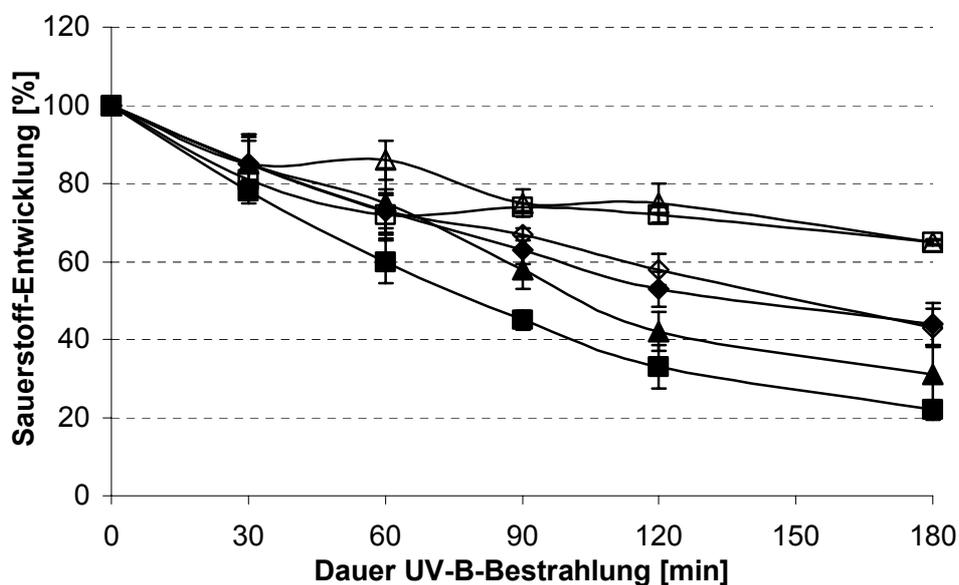


Abb. 3.6: In der *Synechocystis cry* Mutante ist die Induktion der *de novo psbA* Proteinsynthese gestört. Flüssigkulturen von *Synechocystis* Wildtyp- (Quadrat), *cry*- (Raute) und *phr*- (Dreieck) Mutanten wurden in Anwesenheit (geschlossene Symbole) oder Abwesenheit (leere Symbole) mit UV-B bestrahlt und die Sauerstoff-Entwicklung gemessen.

3.1.5 Die *Synechocystis sl1629* Mutante zeigt veränderte *psbA3* Induktion unter verschiedenen Lichtbedingungen

Die Ergebnisse zur Photoinhibierung gaben einen ersten Hinweis darauf, dass die Induktion der *psbA* Gene in der *cry* Mutante beeinträchtigt sein könnte. Bei der *psbA* Genexpression spielen Transkriptstabilität (Mohamed und Jansson, 1991; Mulo *et al.*, 1998; Tyystjärvi *et al.*, 1998) und Translationsaktivität (Tyystjärvi *et al.*, 2001) eine Rolle, jedoch ist die Expression hauptsächlich auf Transkriptionsebene reguliert (Golden, 1994).

Obwohl es gut dokumentiert ist, dass die Transkription der *psbA* Gene durch Licht aktiviert ist, konnte bisher noch nicht geklärt werden, wie Cyanobakterien das Lichtsignal aufnehmen und weiterleiten. Es wurden redox-abhängige (Alfonso *et al.*, 2000; Li und Sherman, 2000) und redox-unabhängige Regulations-Mechanismen (Tyystjärvi *et al.*, 1998; Máté *et al.*, 1998; Herranen *et al.*, 2001) diskutiert. Die Lichtrezeptoren könnten Photosynthese-Pigmente wie Phycobiline, Chlorophyll a und Carotenoide oder Bakteriophytochrome sein. Diskutiert

wurden ebenfalls sensorische Blaulichtrezeptoren (Tsinoremas *et al.*, 1994; 1999; van Waasbergen *et al.*, 2002).

Um eine mögliche Funktion von *sll1629* als Blaulichtrezeptor zu klären, wurden in dieser Arbeit Effekte auf die lichtinduzierte *psbA* Transkription durch Mutation im *sll1629* Gen untersucht. Da gezeigt wurde, dass *psbA3* im UV um das 20- bis 30fache, *psbA2* aber nur um das Zwei- bis Dreifache induziert wird (Máté *et al.*, 1998), wurde hier die *psbA3*-Expression analysiert.



Relative *psbA3* Induktion von cDNA2 gegenüber cDNA1:

$$\frac{10}{2.5} \cdot \frac{4}{6} = 2.7$$

Abb. 3.7: Vorgehensweise zur relativen Transkriptmengenbestimmung. Definierte Mengen der *psbA3* und *rnpB* Kompetitoren wurden mit jeweils den gleichen Mengen cDNA in einer PCR amplifiziert und die PCR-Reaktionen in 2 %igen Agarosegelen aufgetrennt. Die Gele wurden eingescannt und mit dem Programm „ImageJ“ bearbeitet. Der Äquivalenzpunkt zwischen Kompetitor-DNA und cDNA ist durch senkrechte Pfeile markiert. Der *psbA3* Äquivalenzpunkt wurde mit dem *rnpB* Äquivalenzpunkt ins Verhältnis gesetzt. *rnpB* wird konstitutiv exprimiert und dient so als interne Kontrolle der cDNA-Konzentration. Die relative *psbA3* Induktion von cDNA2 gegenüber cDNA1 errechnet sich aus dem Produkt aus den Quotienten der Werte des *psbA3* und des *rnpB* Äquivalenzpunktes, d. h. (Wert Äquivalenzpunkt *psbA3* von cDNA2 : Wert Äquivalenzpunkt *rnpB* von cDNA2) * (Wert Äquivalenzpunkt *psbA3* von cDNA1 : Wert Äquivalenzpunkt *rnpB* von cDNA1).

Die Transkriptmengen wurden mittels kompetitiver RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) quantifiziert. Dazu wurden Kompetitoren für das *psbA3* Gen und das *rnpB* Gen, das für die RNA-Untereinheit der Ribonuklease P kodiert, hergestellt (Kap. 2.1.12.2). *rnpB* wird konstitutiv exprimiert (Vioque, 1992) und diente als Kontrolle dafür, dass jeweils gleich viel cDNA in den PCR-Ansätzen eingesetzt wurde. Die optimalen PCR-Bedingungen für die Amplifikation von *rnpB* und *psbA3* waren: *annealing* bei 57.5° C,

Synthese für 30 s und 27 Zyklen. Eingesetzt wurden pro Reaktion 500 pg cDNA für den Nachweis von *psbA3* und 10 pg cDNA für den Nachweis von *mnpB*. Unter diesen Bedingungen entstanden keine Nebenprodukte und die Vermehrung der Produkte befand sich im linearen Bereich. Die Vorgehensweise zur Transkriptmengenbestimmung ist in Abb. 3.7 erläutert. Es wurde durch Arbeiten anderer Gruppen gezeigt, dass die *psbA3* Expression in *Synechocystis* im UV-B (Máté *et al.*, 1998), im Blaulicht (El Bissati und Kirilovsky, 2002) und im Wechsel von Niedrig- zu Hochintensitäts-Weißlicht (Mohamed und Jansson, 1989; Hihara *et al.*, 2001) hochreguliert wird. Um zu prüfen, ob Wildtyp und *cry* Mutante in Bezug auf die *psbA3* Induktion verschieden auf unterschiedliche Lichtqualitäten reagieren, wurden dunkeladaptierte *Synechocystis* Wildtyp- und *sll1629* Mutantenzellen für jeweils fünfzehn Minuten mit Weißlicht ($300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), zehn Minuten mit Blaulicht ($10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Philips TLD 36W/18) bzw. 90 Minuten mit UV-B ($3 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Philips TL40W/12) bestrahlt und danach die *psbA3* und *mnpB* Transkriptmenge mittels kompetitiver RT-PCR bestimmt. In den Wildtypzellen war die *psbA3* Transkriptmenge im Weißlicht acht-, im Blaulicht mehr als drei- und im UV-B sechsfach höher als in den dunkel adaptierten Zellen. Die Induktion der *psbA3* Transkription in der Mutante hingegen betrug nur die Hälfte des Wildtyps im Weiß- und Blaulicht und war im UV-B um mehr als das Dreifache reduziert (Abb. 3.8).

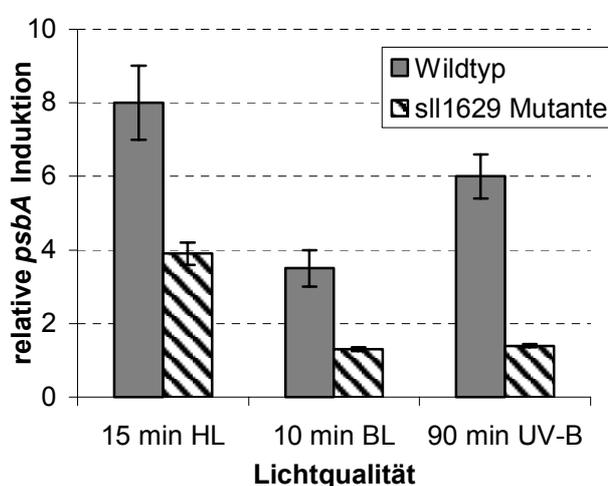


Abb. 3.8: Die Lichtinduktion der *psbA3* Expression ist in der *Synechocystis sll1629* Mutante reduziert. Wildtyp- und *sll1629* Mutantenzellen wurden 15 min mit Weißlicht hoher Intensität (15 min HL), 10 min mit Blaulicht (10 min BL) und 90 min UV-B (90 min UV-B) bestrahlt. Die *psbA3* Transkriptlevel wurden mittels kompetitiver RT-PCR bestimmt. Dargestellt ist die Induktion gegenüber Schwachlicht-behandelten Zellen. Aufgetragen ist der Mittelwert zweier unabhängiger Experimente. Oberer und unterer Wert des Balkens stellen die Mittelwerte der beiden Experimente dar.

Durch Arbeiten anderer Gruppen wurde außerdem gezeigt, dass Rot- (Tyystjärvi *et al.*, 2002) und Dunkelrotlicht (El Bissati und Kirilovsky, 2002) und UV-A (Mohamed und Jansson, 1989; Tyystjärvi *et al.*, 2002) einen induktiven Effekt auf die *psbA* Expression haben; insbesondere UV-A. Da wir eine Cryptochromfunktion für *sll1629* vermuteten, wurde in weiterführenden Experimenten eine detailliertere Analyse der *psbA3* Transkriptinduktion im UV-A/Blau-Bereich durchgeführt. Der Einfluss von Rot- und Dunkelrotlicht wurde ebenfalls untersucht. *Synechocystis* Wildtyp- und *cry* Mutantenzellen wurden mit gleichen Photonenfluenzen ($2.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) im Bereich von 333 nm (UV-A) bis 732 nm (Dunkelrot) bestrahlt. Die *psbA3* Transkriptlevel wurden wiederum durch kompetitive RT-PCR bestimmt.

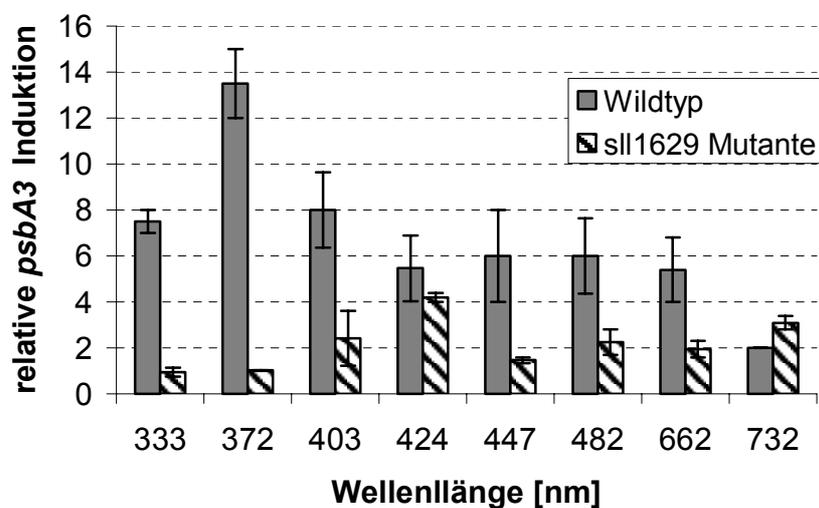


Abb. 3.9: Die UV-, Blau- und Rotlichtinduktion der *psbA3* Expression ist in der *Synechocystis cry* Mutante reduziert. Wildtyp- und *cry* (*sll1629* Mutante) Mutantenzellen wurden 10 min mit monochromatischem Licht verschiedener Wellenlängen des UV-A-, Blau- und Rotbereiches bestrahlt. Die *psbA3* Transkriptlevel wurden mittels kompetitiver RT-PCR quantifiziert. Dargestellt ist die Induktion gegenüber Schwachlicht-behandelten Zellen. Aufgetragen ist der Mittelwert zweier unabhängiger Experimente. Oberer und unterer Wert des Balkens stellen die Mittelwerte der beiden Experimente dar.

Im Wildtyp wurde die *psbA3* Expression durch alle getesteten Lichtqualitäten induziert, wobei langwelliges UV-A (372 nm) den stärksten Effekt hatte. Dort wurde eine dreizehnfache Induktion gegenüber schwachlichtadaptierten Zellen gefunden. Im Blaulicht (403, 424, 447 und 482 nm), im Rotlicht (662 nm) und im Dunkelrotlicht (732 nm) war die *psbA3* Expression im Wildtyp ebenfalls induziert, mit dem geringsten Effekt im Dunkelrotlicht (Abb. 3.9). In der *cry* Mutante fand im UV-A-Bereich (333 und 372 nm) keine *psbA3* Induktion statt, und war im Blau- und Rotlicht um die Hälfte reduziert. Im Dunkelrotlicht war die *psbA3* Induktion in der *cry* Mutante im Vergleich zum Wildtyp etwas erhöht. Wie auch schon bei den Phototaxis-Experimenten beschrieben, sind die Effekte der *sll1629* Deletion im Rot- und Dunkelrotlicht

etwas unerwartet für einen putativen Blau/UV-A-Rezeptor. Die *Arabidopsis cry1* Mutante zeigt allerdings auch einen Phänotyp im Rot- und Dunkelrotlicht (Jackson and Jenkins, 1995; Ahmad und Cashmore, 1997; Hennig *et al.*, 1999). Es kann geschlossen werden (s. auch Diskussion), dass *sll1629* für ein Cryptochrom kodiert und dieser Photorezeptor insbesondere im UV-A operiert.

3.2 Ein drittes Cryptochrom aus *Arabidopsis thaliana*?

3.2.1 *Arabidopsis cry3* besitzt hohe Ähnlichkeit zu *Synechocystis* Cryptochrom

In *Arabidopsis* wurden bisher zwei Photolyasen, eine Klasse-II-CPD-Photolyase (Ahmad *et al.*, 1997; Kleiner *et al.*, 1999a) und eine (6-4)-Photolyase (Nakajima *et al.*, 1998), und zwei Cryptochrome (CRY1 und CRY2) identifiziert und charakterisiert (Übersichtsartikel: Lin, 2002). Die Suche in der *Arabidopsis*-Datenbank (<http://mips.gsf.de/proj/thal/db/index.html>) zeigte außerdem noch drei andere nicht charakterisierte Proteinsequenzen mit Homologie zur Photolyase/Cryptochrom-Familie: At2g47590 (Ahmad *et al.*, 1998d), At4g25290 und At5g24850. In dieser Arbeit wurde das Protein At5g24850 näher untersucht. Die Expression des At5g24850 Gens ist durch die Anwesenheit korrespondierender ESTs in der Datenbank (wie z. B. ETG NP424316) und eigene Studien verifiziert. Das At5g24850 Gen, das im folgenden Text *At-CRY3* genannt wird, liegt auf dem *Arabidopsis* Chromosom V, setzt sich aus 11 Introns und 12 Exons zusammen (Abb. 3.10) und kodiert für ein 569 AS großes Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 64 kDa und einem theoretischen Isoelektrischen Punkt von 9.21.

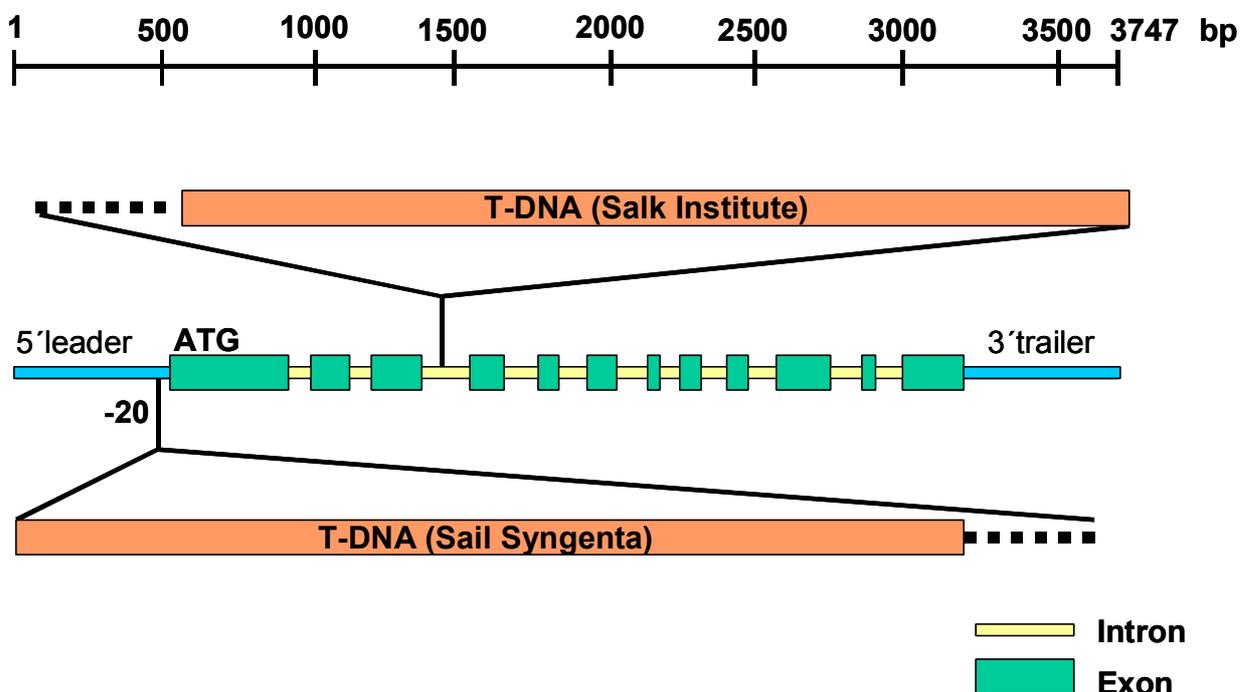


Abb. 3.10: *At-CRY3* Genstruktur mit verfügbaren T-DNA-Insertionen. Das Gen besteht aus 11 Introns und 12 Exons. Dargestellt sind die Positionen der T-DNA-Insertionen der in unserem Labor vorhandenen Linien vom Salk Institute und von Syngenta.

Abb. 3.11 (Fortsetzung): Gezeigt ist ein Vergleich von Proteinsequenzen aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 (sll1629, Zugangs-Nr. S74805), *Arabidopsis* CRY3 (Zugangs-Nr. NP_568461), *Arabidopsis* CRY1 (Zugangs-Nr. Q43125), *Arabidopsis* CRY2 (Zugangs-Nr. Q96524) und dem α -Proteobakterium *Caulobacter crescentus* (Cc PHR, Zugangs-Nr. NP_420241). Die Aminosäurepositionen, die im *Synechocystis* CRY (sll1629) und dem *Arabidopsis* CRY3 konserviert sind, sind mit einem Pluszeichen in der oberen Reihe markiert. Die konservierten Positionen des *Arabidopsis* CRY1 bzw. CRY2 und dem *Caulobacter* Protein der Cryptochrom/Photolyase-Familie sind mit einem Sternchen in der unteren Reihe markiert. Identische Aminosäuren aller Proteine sind grün markiert, ähnliche Positionen aller Proteine grau unterlegt. In pink sind konservierte Tryptophane dargestellt und in türkis Aminosäurepositionen in *Arabidopsis* CRY3, die auch in der *Anacystis nidulans* Klasse-I-CPD-Photolyase konserviert und an der FAD-Bindung beteiligt sind. Die Zugangsnummern stammen aus der NCBI Proteindatenbank.

Bemerkenswert ist, dass die Identität zwischen At-CRY3 und dem *Synechocystis* Cryptochrom über 50 % in einem Bereich von über 400 Aminosäuren beträgt. Wie Abb. 3.11 zeigt, ist diese Identität viel höher als die zwischen *Synechocystis* CRY und *Arabidopsis* CRY1 bzw. CRY2 (weniger als 20 % Identität) und auch höher als die zwischen CRY1 und CRY2 (58 % Identität in der N-terminalen Domäne, aber unter 14 % in der C-terminalen Domäne). Durch Suchen mit dem BLAST-Algorithmus konnte keine andere Sequenz gefunden werden, die höhere Homologie zu At-cry3 als die Sequenz von sll1629 hat.

At-CRY3 besitzt eine 40 AS lange N-terminale Extension. Die Suche in Datenbanken (<http://www.inra.fr/servlets/WebPredotar>; <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>) ergab mit einer hohen Wahrscheinlichkeit die Anwesenheit einer *Targeting*-Sequenz für Chloroplasten-(Predotar) bzw. Mitochondrien-Lokalisation (TargetP) innerhalb der ersten 40 AS des N-Terminus (Abb. 3.12). Um herauszufinden, ob diese Voraussagen richtig sind, wurden mit At-cry3 *in vitro* Importstudien in Erbsenchloroplasten durchgeführt und die Lokalisation von At-cry3 *in vivo* in *Arabidopsis*-Blättern und -Protoplasten untersucht.

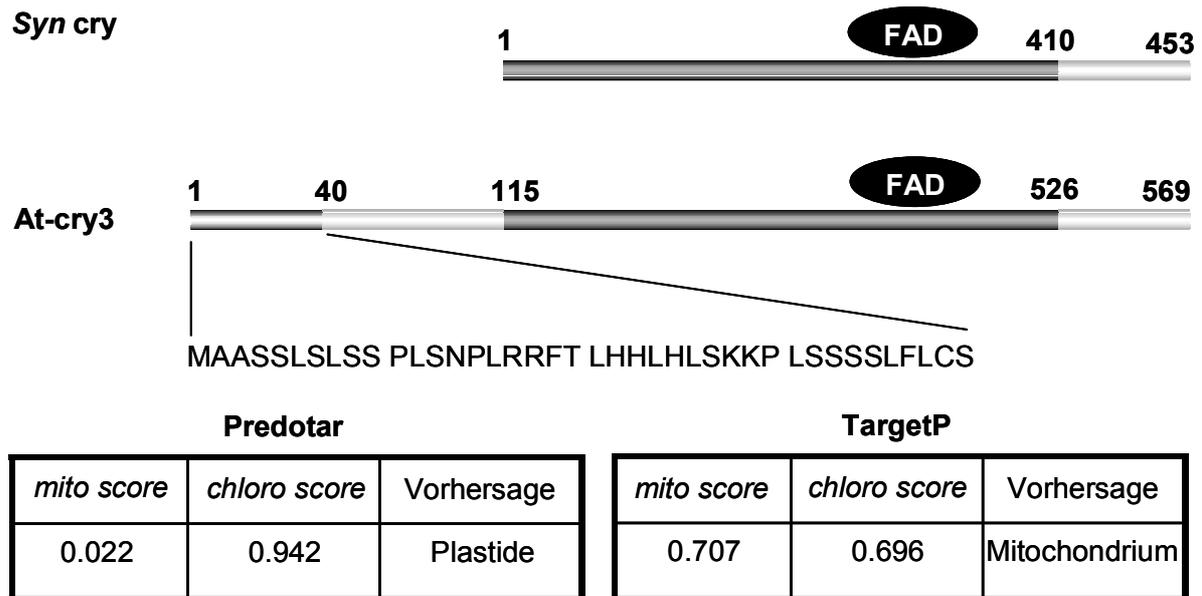


Abb. 3.12: At-cry3 besitzt eine N-terminale Targeting-Sequenz. Die Aminosäuresequenz des *Synechocystis* Cryptochroms (*Syn cry*) wurde mit der des *Arabidopsis* CRY3 (*At-cry3*) verglichen. Sie zeigen in einem Bereich von über 400 AS mehr als 50 % Identität. Für die N-terminalen 40 AS von *At-cry3* wird eine Funktion als Targeting-Sequenz für Chloroplasten- bzw. Mitochondrien-Import vorhergesagt. Beide Proteine binden FAD (*Synechocystis*: Hitomi *et al.*, 2000 und eigene Daten; *Arabidopsis*: diese Arbeit).

3.2.2 *Arabidopsis cry3* wird *in vitro* in Erbsenchloroplasten transportiert

Es wurden *in vitro* Importstudien mit ^{35}S -Met-markiertem Vollängen *At-cry3* an isolierten Erbsenchloroplasten durchgeführt. Für die *in vitro* Transkription/Translation wurde das Plasmid pET-15b/At5g24850 (1-569) verwendet. Dieses Plasmid trägt die gesamte kodierende Region von *At-CRY3* unter der Kontrolle des T7 Promotors. Eine Protease-resistente Bande von geringerer Mobilität als die des TNT-produzierten Proteins konnte nach Inkubation mit Chloroplasten detektiert werden (Abb. 3.13). Wurden die Chloroplasten nach der Importreaktion mit Triton X-100 behandelt und derart permeabilisiert mit Thermolysin behandelt, so war das Signal vollständig verschwunden. Dies zeigt, dass *At-cry3* *in vitro* in Chloroplasten transportiert wird.

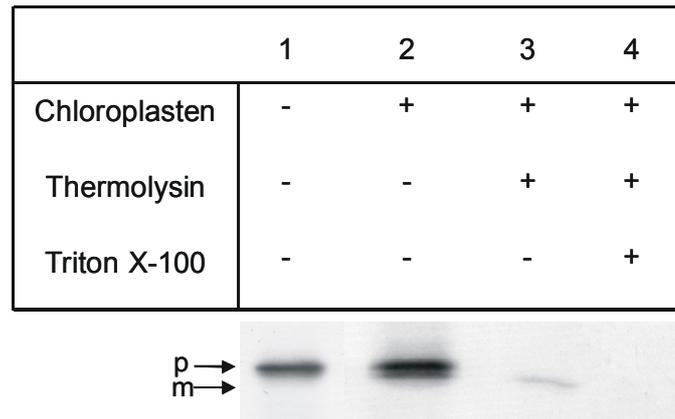


Abb. 3.13: At-cry3 wird in isolierte Chloroplasten transportiert. At-cry3 wurde *in vitro* in Anwesenheit von ^{35}S -Methionin synthetisiert (1) und mit transportkompetenten Chloroplasten aus der Erbse inkubiert (2). Spur 3 zeigt eine Thermolysin-behandelte Importreaktion, Spur 4 eine Triton X-100- und Thermolysin-behandelte Importreaktion. Die Pfeile zeigen auf das Vorläufer- (p) und das prozessierte (m) Protein. Die ^{35}S -markierten Proteine wurden durch Autoradiographie nach SDS-PAGE sichtbar gemacht.

3.2.3 *Arabidopsis cry3* wird *in vivo* in Chloroplasten transportiert

Die *in vitro* Importstudien wurden durch *in vivo* Lokalisationsstudien ergänzt. Dazu wurden verschiedene Teile der At-CRY3-Aminosäuresequenz C-terminal mit GFP fusioniert. Protoplasten von *Arabidopsis*-Mesophyllzellen wurden mit diesen Konstrukten transformiert und die Lokalisation der Fusionsproteine mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop untersucht.

Es wurden verschiedene Konstrukte (pAVA393/At5g24850(1-569), pAVA393, pAVA393/At5g24850(40-569) und pAVA393/At5g24850(1-63)) verwendet, deren Aufbau in Abb. 3.14 dargestellt ist. Die Expression wurde in allen Konstrukten durch zwei Kopien des CaMV (*Cauliflower Mosaic Virus*)-35S-Promotors getrieben.

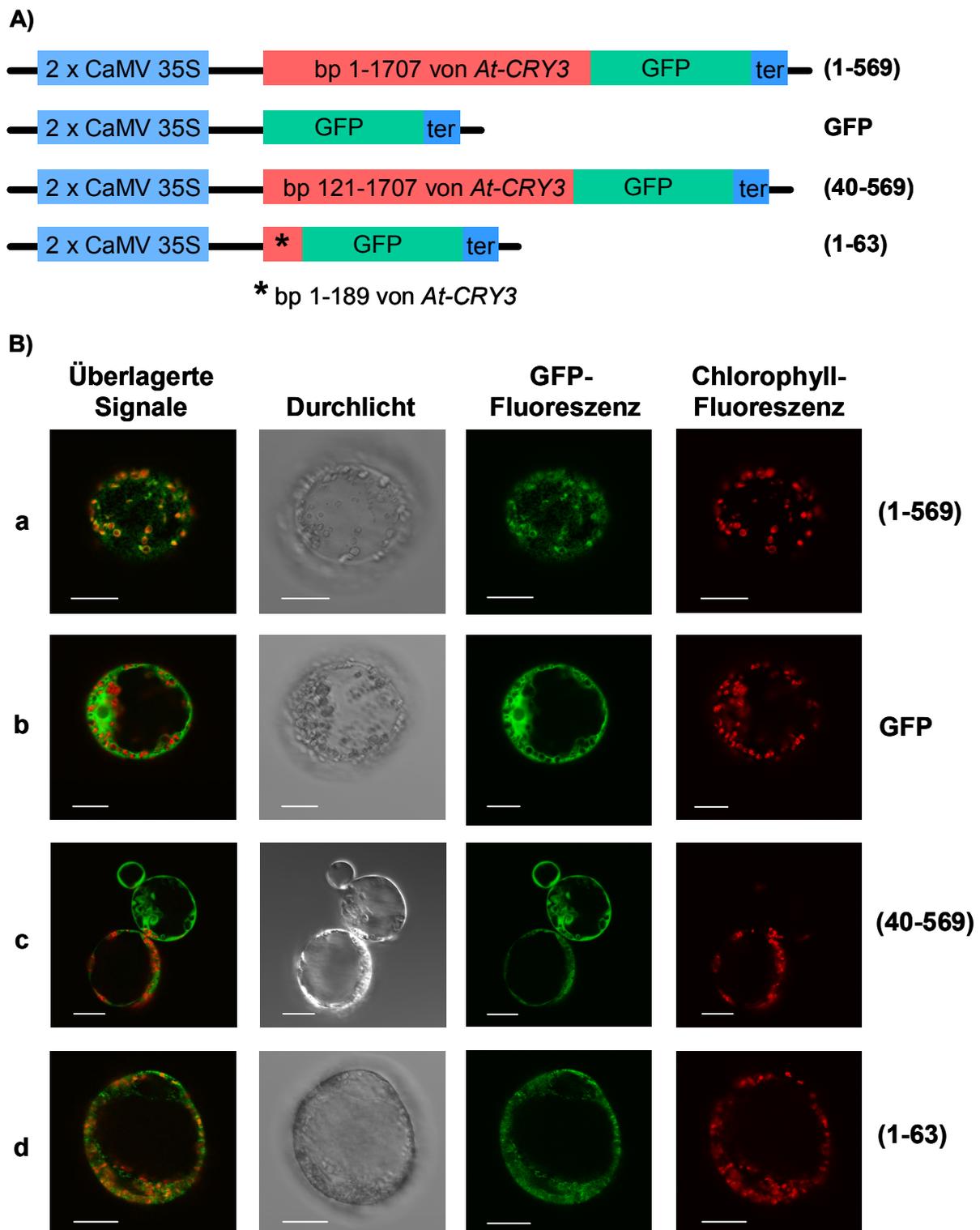


Abb. 3.14: Das *Arabidopsis At-cry3* Protein wird in Chloroplasten transportiert. A) Schematische Darstellung der zur Lokalisationsanalyse verwendeten Konstrukte. B) Konfokalaufnahmen von GFP-exprimierenden *Arabidopsis*-Protoplasten. Protoplasten transformiert mit a) einem Volllängen *At-cry3*-GFP-Fusionskonstrukt, b) einem unfusionierten GFP-Konstrukt als Kontrolle, c) einem Fusionskonstrukt aus N-terminal verkürztem ($\Delta 1-40$) *At-cry3*, d) einem Konstrukt, in dem GFP mit dem N-Terminus (AS 1-63) von *At-cry3* fusioniert ist.

Wie Abb. 3.14 B a zeigt, kolokalisiert das GFP-Signal des Volllängen At-cry3-Proteins mit dem Chlorophyll-Fluoreszenzsignal. In Kontrollzellen, die nur GFP exprimierten, war das GFP-Signal homogen im Cytoplasma und im Zellkern verteilt und konnte nicht in den Chloroplasten detektiert werden (Abb. 3.14 B b). In Protoplasten, die eine N-terminal verkürzte, mit GFP fusionierte Version von At-cry3 exprimierten, konnte kein Fluoreszenzsignal in den Chloroplasten detektiert werden. Stattdessen wurde eine homogene Verteilung von GFP im Cytosol (Abb. 3.14 B c) gefunden. Protoplasten, transformiert mit dem Konstrukt, das die N-terminalen 63 AS von At-cry3 fusioniert mit GFP enthielt, zeigten das gleiche GFP-Signal in den Chloroplasten wie bei Expression der Volllängen-Proteinfusion (Abb. 3.14 B d). Daraus kann geschlossen werden, dass At-cry3 auch *in vivo* in Chloroplasten transportiert wird. Ferner zeigen diese Daten, dass die N-terminalen 63 AS notwendig und ausreichend für den Chloroplastenimport sind, d. h. innerhalb dieses Bereichs befindet sich das Transitpeptid.

3.2.4 *Arabidopsis cry3* wird in Mitochondrien transportiert

Nach Transformation von (chloroplastenfreien) *Arabidopsis* Epidermiszellen durch *particle gun bombardement* zeigten die Volllängen und die N-terminalen At-cry3 GFP-Fusionen eine sehr ähnliche GFP-Markierung von partikulären Strukturen mit einem Durchmesser von 0.5-1 μm (Abb. 3.15 A a und c). Die N-terminal verkürzte GFP-Fusion zeigte dagegen die gleiche homogene Verteilung im Cytosol (Abb. 3.15 A b) wie die GFP-Kontrolle (Abb. 3.15 A d). Zeitrafferfilme, die mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen wurden, zeigen, dass diese Partikel im Cytoplasma bewegt wurden.

Außer Epidermiszellen wurden *Arabidopsis*-Protoplasten einer Wurzelzellenkultur mit den verschiedenen GFP-Konstrukten transformiert. Das Volllängen- und das N-terminale Fragment von At-cry3 zeigten auch hier eine Färbung von Partikeln mit etwa 0.5-1 μm Durchmesser (Abb. 3.15 B a und c). Eine Färbung mit Mitotracker®, einem Fluoreszenz-Farbstoff, der spezifisch Mitochondrien anfärbt, zeigte eine Kolokalisation des GFP-Signals mit Mitochondrien. Das um die ersten 40 AS verkürzte At-cry3-GFP zeigte keine mitochondriale Lokalisation (Abb. 3.15 B b). Zusammen mit den Ergebnissen aus Kap. 3.2.3 folgt, dass der N-Terminus von At-cry3 sowohl als Präsequenz für den Mitochondrienimport als auch als Transitpeptid für den Chloroplastenimport fungiert.

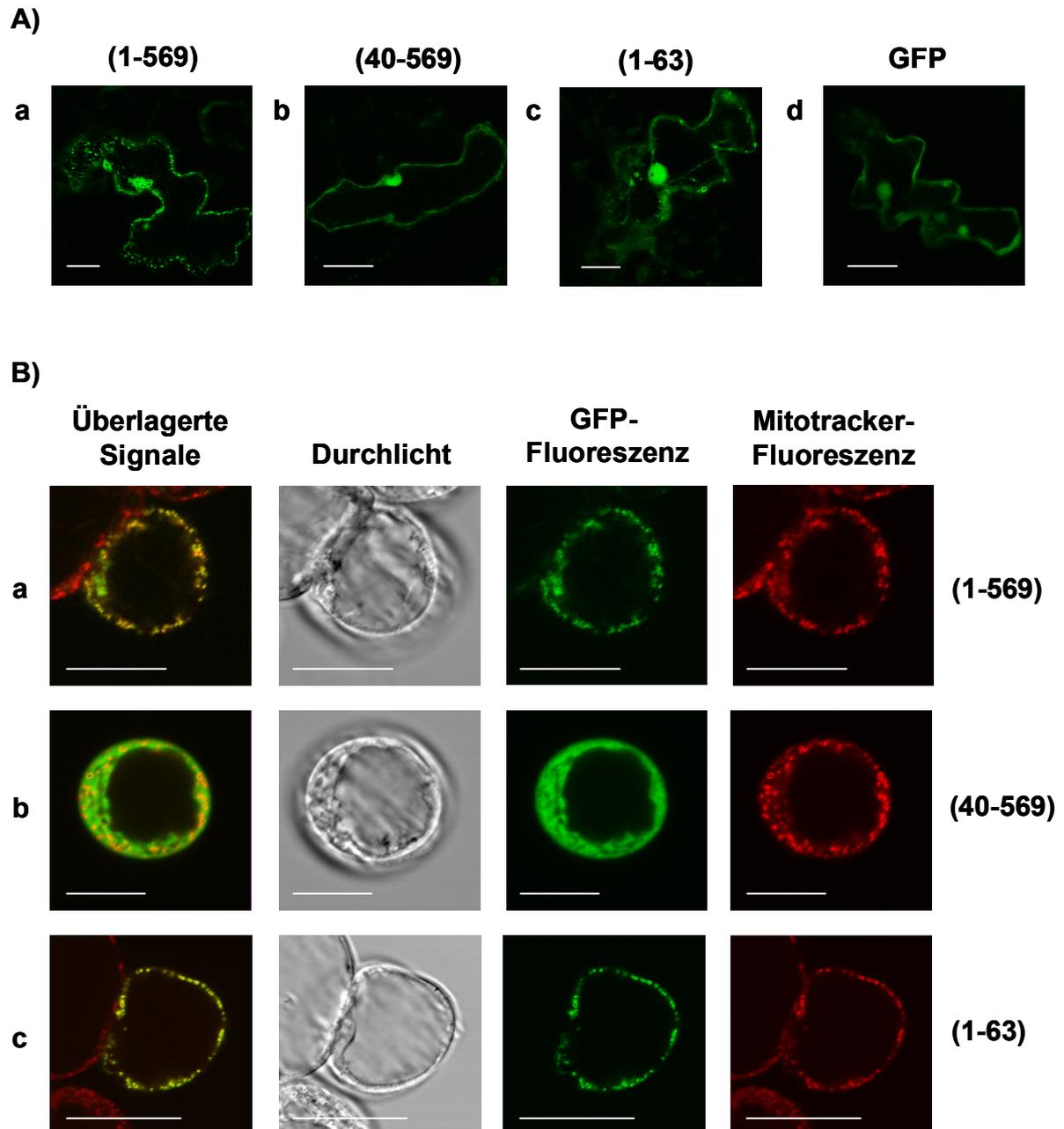


Abb. 3.15: Das *Arabidopsis At-cry3* Protein wird in Mitochondrien transportiert. A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GFP-exprimierenden *Arabidopsis*-Epidermiszellen. B) Konfokalaufnahmen von GFP-exprimierenden *Arabidopsis*-Protoplasten einer Zellkultur aus Wurzeln. Epidermiszellen bzw. Protoplasten transformiert mit a) dem Vollängen At-cry3-GFP-Fusionskonstrukt, b) dem Fusionskonstrukt aus N-terminal verkürztem ($\Delta 1-40$) At-cry3, c) dem Konstrukt, in dem GFP mit dem N-Terminus (AS 1-63) von At-cry3 fusioniert ist, d) dem unfusionierten GFP-Konstrukt als Kontrolle.

3.2.5 *Arabidopsis* CRY3 trägt FAD als Kofaktor

Die kodierende Region für die Aminosäuren 40-569 von At-cry3 wurde als C-terminale 6xHis-tag-Fusion in den Expressionsvektor pQE-60 kloniert (Kap. 2.1.12.5) und mit diesem Konstrukt der *E.-coli*-Stamm M15[pREP4] transformiert. Die Expression des Fusionsproteins wurde im Ein-Liter-Maßstab wie in Kap. 2.2.4.12 beschrieben durchgeführt. Nach Zugabe von 1 mM IPTG war im Gesamtproteinextrakt keine induzierte Bande zu erkennen (Abb. 3.16, Spuren 2 und 3). Erst mit einem Anti-His-tag-Antikörper konnte 6xHis-At-cry3 detektiert werden. Es wurde eine native Aufreinigung mittels Ni-NTA-Metallaffinitätschromatographie (Kap. 2.2.4.17) durchgeführt. Abb. 3.16 zeigt in Spur 6 das gereinigte Protein nach Auftrennung in der SDS-PAGE (a) und im *Western blot* nach Detektion mit Anti-His-tag-Antikörper (b). Das Protein ließ sich trotz der geringen Expression gut anreichern und stellte mindestens 80 % des Proteineluates der Affinitätsäule dar. Die Ausbeute betrug mindestens 2.5 mg Protein pro Liter Expressionskultur.

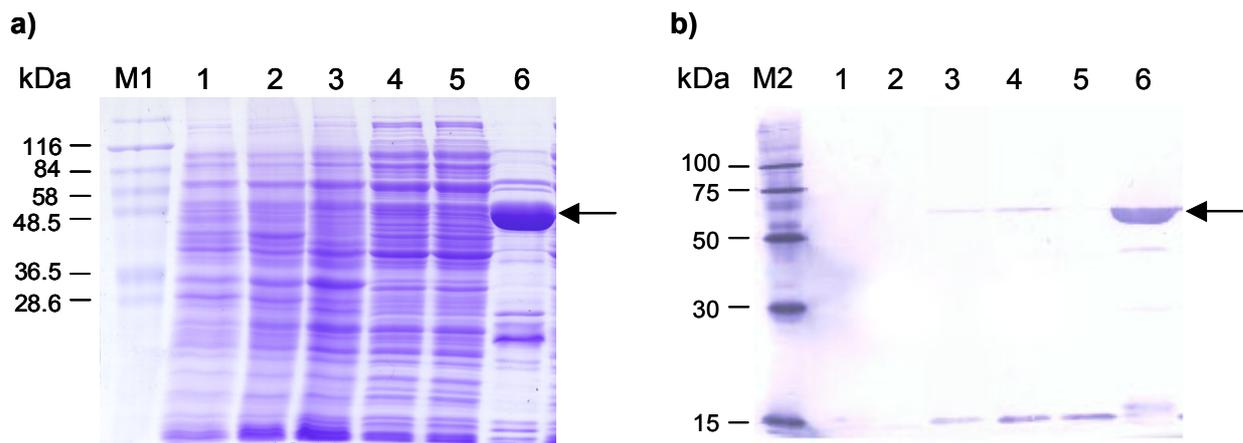


Abb. 3.16: Expression und Aufreinigung von At-cry3. Die Proteine wurden in einer 11 % SDS-PAGE aufgetrennt. a) Mit *Coomassie* gefärbtes Gel. b) *Western blot* nach Detektion der 6xHis-markierten Proteine mit Anti-Hexa-His-Antikörpern gefolgt von chromogener Detektion mit AP-konjugiertem Ziegen Anti-Maus IgG-Antikörper und NBT/BCIP-Detektion. Aufgetragen sind der Gesamtproteinextrakt induzierter M15[pREP4]-Zellen mit dem Expressionsplasmid ohne *insert* (1), der Gesamtproteinextrakt nicht induzierter M15[pREP4]-Zellen mit dem Expressionsplasmid für At-cry3 (40-569) (2), der Gesamtproteinextrakt induzierter M15[pREP4]-Zellen mit dem Expressionsplasmid für At-cry3 (40-569) (3), der lösliche Überstand aus At-cry3 (40-569) exprimierenden M15[pREP4]-Zellen (4), der Überstand nach Inkubation mit der Ni-NTA-Matrix (5) und Eluat (6). M, Marker.

Alle bisher charakterisierten Mitglieder der Photolyase/Cryptochrom-Familie tragen FAD als Kofaktor (Sancar, 2000). Das Proteineluat von der Affinitätssäule zeigte eine gelbe Farbe, was charakteristisch für Flavoproteine ist. Deshalb wurde das Eluat auf das Vorhandensein eines Chromophors untersucht. Das Eluat wurde entweder direkt in der Absorptionsspektroskopie eingesetzt oder vorher in 0.1 M HCl für 15 min bei 65° C denaturiert und abzentrifugiert. Das Absorptionsspektrum des nativen Proteins (Abb. 3.17 a) zeigte Maxima bei 270 nm (nicht gezeigt) und 382 nm. Dies ist konsistent mit der Anwesenheit eines Flavinchromophors in der vollständig reduzierten Form. Wie das Absorptionsspektrum in Abb. 3.17 zeigt, ist der Chromophor nach Hitzebehandlung im sauren Medium im Überstand vorhanden, hat sich also vom Protein abgelöst. Das stimmt damit überein, dass FAD in Photolyasen/Cryptochromen nicht kovalent gebunden ist. Dieses Spektrum zeigt drei Maxima bei 265 nm, 370 nm und 448 nm. Der Vergleich mit den Absorptionsspektren von reinem FAD und FMN (Abb. 3.17 b) lässt noch keinen Schluss darüber zu, ob es sich bei dem Chromophor um FAD oder FMN handelt.

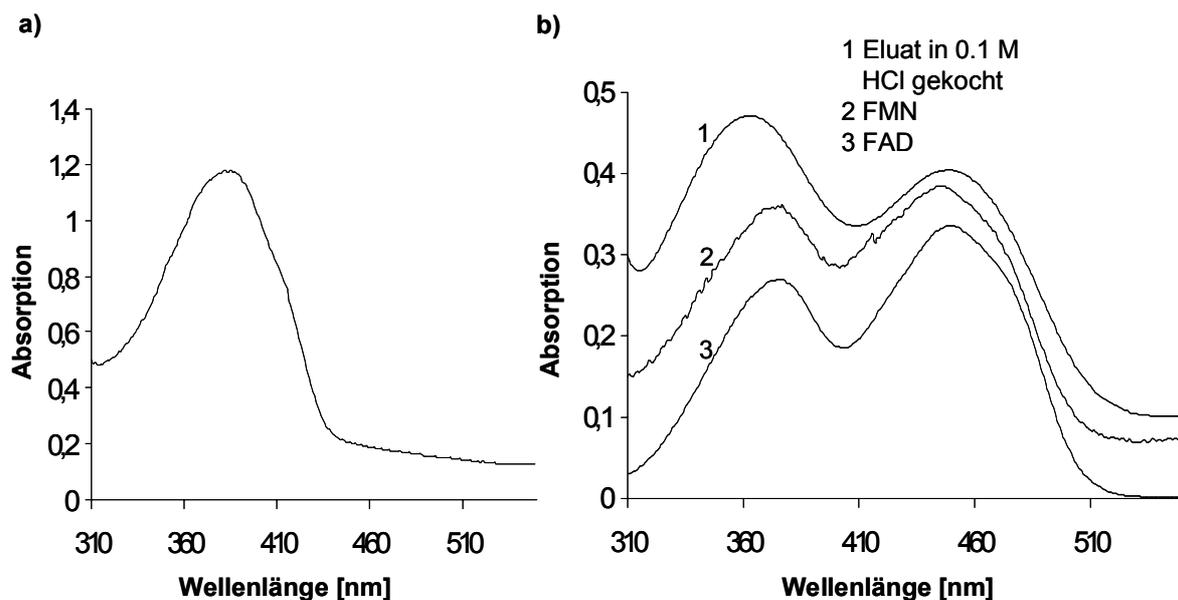


Abb. 3.17: At-CRY3 besitzt ein Flavin als Kofaktor. Absorptionsspektrum a) des in *E. coli* überproduzierten At-cry3 (40-569) Proteins, b) des Überstandes des in 0.1 M HCl hitzedenaturierten At-cry3 (40-569) Proteins und von reinem FMN und FAD.

FAD und FMN lassen sich durch fluoreszenzspektroskopische Analysen voneinander unterscheiden. Anregung bei 450 nm führt bei beiden zu einem Emissionsmaximum bei 530 nm. Jedoch ist die Fluoreszenzausbeute in Abhängigkeit vom pH-Wert bei FAD und FMN unterschiedlich (Singer *et al.*, 1971; Abb. 3.18). FAD zeigt eine relativ starke Emission bei pH 2, eine maximale Emission bei pH 3 und bei darüber steigendem pH-Wert eine Abnahme der Emission (Abb. 3.18). FMN hingegen hat bei pH 3 seine maximale Emission erreicht und behält sie bei steigendem pH-Wert (Abb. 3.18; Übersichtsartikel: Koziol, 1971 und Singer *et al.*, 1971).

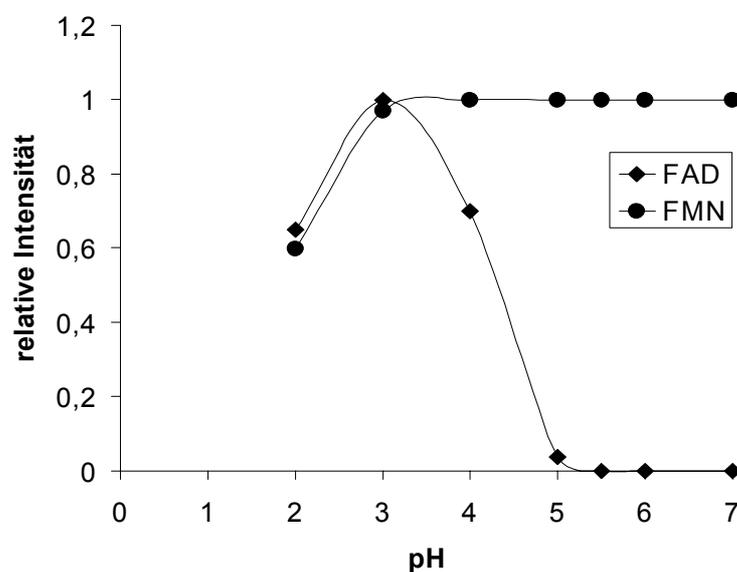


Abb. 3.18: FAD und FMN zeigen in ihrem Fluoreszenzverhalten verschiedene pH-Wert-Abhängigkeiten (verändert nach Singer *et al.*, 1971). FAD und FMN wurden bei 450 nm angeregt und die Emission bei 530 nm in Abhängigkeit verschiedener pH-Werte gemessen.

Mit dem von At-cry3 abgelösten Chromophor wurden fluoreszenzspektroskopische Analysen durchgeführt. Die Emission wurde mit einer Anregung bei 450 nm bei pH 1, pH 2, pH 4, pH 5.5 und pH 8 gemessen (Abb. 3.19 a). In Abb. 3.19 b sind die jeweiligen Emissionswerte der Maxima bei 530 nm in Abhängigkeit des pH-Wertes dargestellt. Diese Kurve entspricht der FAD-Kurve aus Abb. 3.18. Ein weiteres Charakteristikum für FAD ist die Wiedererlangung höherer Emissionsintensität nach Wiedereinstellung eines geeigneten pH-Wertes. Bei pH 8 wurde das Emissions-Intensitätsminimum erreicht. Bei Wiedereinstellen des pH-Wertes auf 2 (pH2' in Abb. 3.19 a) erhöhte sich jedoch die Emissions-Intensität wieder. Damit ist gezeigt, dass At-cry3 FAD als Chromophor bindet.

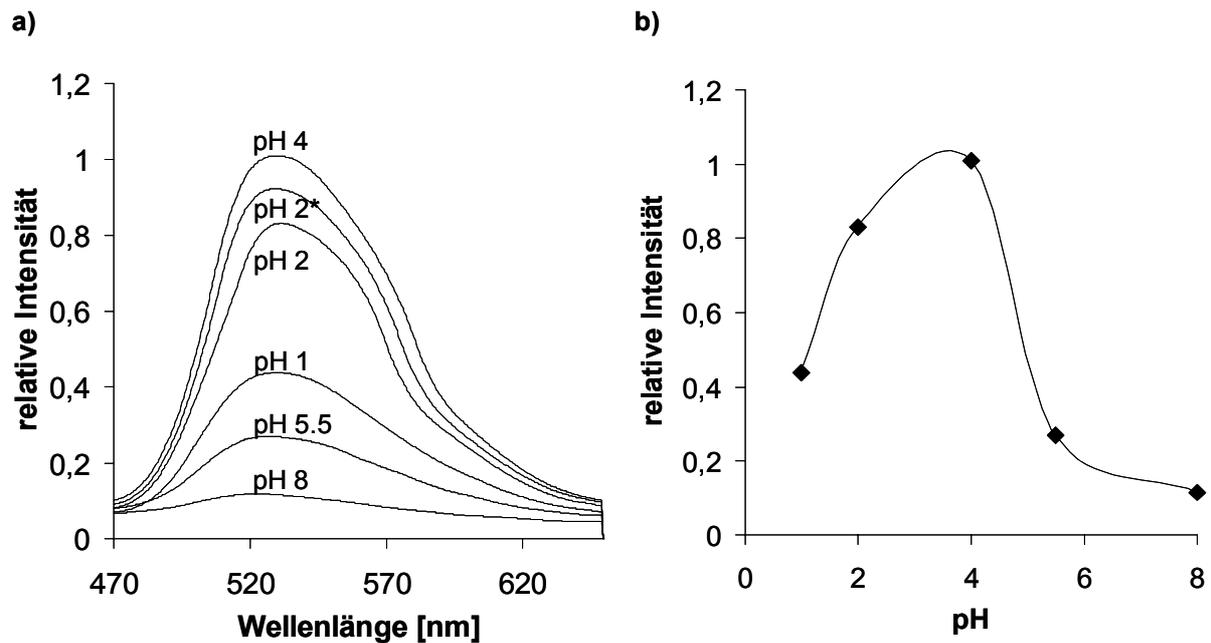


Abb. 3.19: At-CRY3 bindet FAD. In *E. coli* überproduziertes At-cry3 wurde in Anwesenheit von 0.1 M HCl durch Hitze denaturiert und der Überstand in der Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt. a) Bei einer Anregung von 450 nm aufgenommene Emissionsspektren. Die pH-Werte der Lösungen, in denen sich der Chromophor befand, sind angegeben. pH 2': Chromophor zunächst in Lösung mit pH 8, dann auf pH 2 titriert. b) Darstellung der in a) aufgenommenen Intensitätswerte im Emissionsmaximum (530 nm) in Abhängigkeit des pH-Werts.

Phototropine können zwei Flavinmoleküle (FMN) pro Proteinmolekül binden (Crosson *et al.*, 2003), Photolyasen und Cryptochrome hingegen binden jeweils nur ein FAD pro Apoproteinmolekül (Sancar, 2000). Die Konzentration des Zielproteins im Eluat betrug 2.5 mg/ml. Die Extinktion des freigesetzten FADs bei 450 nm betrug 0.4. Ausgehend davon, dass 1 µg Protein 16.5 pMol entsprechen, und der Extinktionskoeffizient von FAD bei 450 nm $11.3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ beträgt, liegt das kalkulierte Verhältnis von FAD zu Protein bei knapp 1. Daher bindet At-CRY3 FAD in einer 1:1-Stöchiometrie.

Die Absorptionsspektroskopie lieferte keinen Hinweis auf einen zweiten Chromophor. Da Cryptochrome und Photolyasen MTHF als zweiten Kofaktor besitzen können (Malhotra *et al.*, 1995), wurde speziell die Fluoreszenz-Emission bei pH 10 und 360 nm, 380 nm und 400 nm Anregung gemessen. Hierbei deutete nichts auf MTHF als zweiten Chromophor. Um diese spektroskopischen Daten abzusichern, wurde eine Dünnschichtchromatographie mit dem abgelösten Chromophor durchgeführt. Hiermit konnte nur eine Bande mit dem gleichen R_f -Wert wie der von reinem FAD identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). So konnte, wie für in *E. coli* exprimiertem *Synechocystis* Cryptochrom (Hitomi *et al.*, 2000) oder für in *E. coli*

überexprimierter Klasse-II-CPD-Photolyase (Kleiner *et al.*, 1999a) nur FAD als Kofaktor nachgewiesen werden.

Das FAD:Protein-Verhältnis der At-cry3-Proteinpräparation schließt das Vorhandensein des Kofaktors FAD als Verunreinigung im Eluat weitgehend aus. Um jedoch vollständig auszuschließen, dass das nachgewiesene FAD eine Verunreinigung sein könnte, wurde ein weiteres Konstrukt, pET-28a/At5g24850 (210-569), für die Expression in *E. coli* verwendet. Dieses Konstrukt enthielt die kodierenden Aminosäuren 210-569 von At-cry3 fusioniert mit einem C-terminalen 6xHis-tag und einem N-terminalen 7xHis-tag im Expressionsvektor pET-28a und wurde in *E.-coli*-JM109-(DE3)-Zellen transformiert. Da in Analogie zu anderen Cryptochromen dieser Bereich von cry3 FAD binden sollte und auch alle Aminosäuren konserviert sind, die bei Photolyasen an der FAD-Bindung beteiligt sind, sollte die exprimierte Domäne FAD binden. Ein N- und C-terminaler His-tag sollte die Bindungsaffinität zur Ni-NTA-Matrix steigern. Die Expression des Fusionsproteins wurde im Ein-Liter-Maßstab wie in Kap. 2.2.4.12 beschrieben durchgeführt. Das exprimierte Protein fand sich ausschließlich in *inclusion bodies* (Daten nicht gezeigt). Diese Einschlusskörper ließen sich aber bis zur Homogenität aufreinigen. Sie wurden mit saurem Aceton (1.7 µl konz. HCl in 1 ml Aceton) extrahiert und der Überstand lieferte die gleichen Ergebnisse wie für das nativ aufgereinigte At-cry3, nämlich die Bindung von FAD in 1:1-Stöchiometrie.

3.2.6 *Arabidopsis cry3* besitzt keine Photolyaseaktivität

Die Aminosäuresequenz von At-cry3 erlaubt keine eindeutige Aussage über dessen Funktion. Daher wurde überprüft, ob At-cry3 Photolyaseaktivität hat. Es wurde hierfür getestet, ob die Expression von At-cry3 in einem Photolyase-defizienten *E.-coli*-Stamm (KY1225) die Photoreaktivierung dieses Stammes wiederherstellen kann. Dazu wurden sowohl eine *in vivo* als auch eine *in vitro* Untersuchung durchgeführt.

Für beide Untersuchungen wurde in KY1225 *E.-coli*-Zellen At-cry3 überproduziert. Die kodierende Region für die Aminosäuren 1-569 bzw. 40-569 von At-cry3 (At5g24850 (1-569) bzw. At5g24850 (40-569)) wurden als C-terminale 6xHis-tag-Fusion in den Expressionsvektor pQE-60 kloniert (Kap. 2.1.12.5) und in den *E.-coli*-Stamm KY1225 transformiert. Die Expression des Fusionsproteins wurde im 25-ml-Maßstab durchgeführt. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG. Es wurde überprüft, ob die ersten 40 Aminosäuren von At-cry3 einen Transport in das Periplasma von *E. coli* verursachen. Dies war nicht der Fall (Daten nicht gezeigt).

Zunächst wurde durch SDS-PAGE und *Western-blot*-Analyse bestätigt, dass beide Konstrukte tatsächlich in KY1225 exprimiert wurden und im löslichen Überstand vorhanden waren. Wie Abb. 3.20 zeigt, wurden beide Fusionsproteine löslich exprimiert.

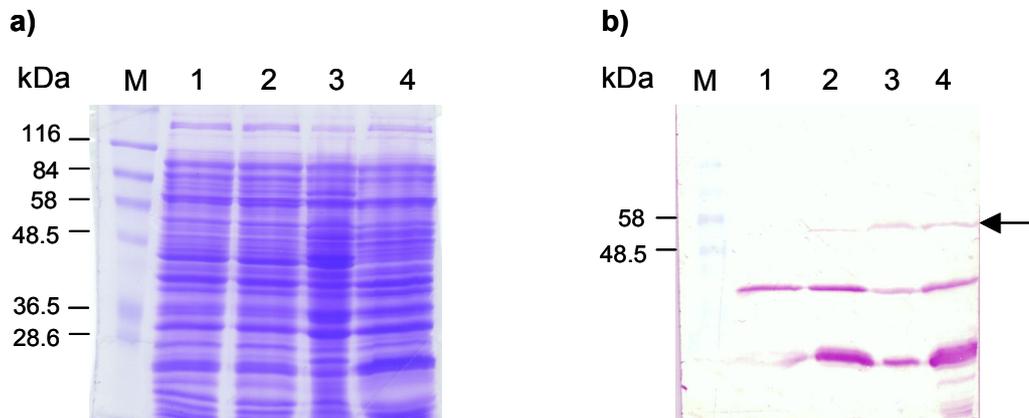


Abb. 3.20: In KY1225 *E.-coli*-Zellen exprimierte *At-cry3* Fusionsproteine sind löslich. Die Proteine wurden in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt. a) Mit *Coomassie* gefärbtes Gel. b) *Western blot* und Detektion der 6xHis-markierten Proteine mit Anti-Hexa-His-Antikörpern. Aufgetragen sind der Gesamtproteinextrakt nichtinduzierter KY1225 Zellen mit dem Expressionsplasmid für Vollängen *At-cry3* (1) bzw. das N-terminale *At-cry3* Deletionskonstrukt (2), löslicher Überstand aus KY1225-Zellen, die Vollängen *At-cry3* (3) bzw. N-terminal verkürztes *At-cry3* exprimierten (4). M, Marker.

3.2.6.1 *In vitro* Untersuchung

Die *in vitro* Untersuchung wurde mit den löslichen Überständen (Kap. 2.2.4.14) durchgeführt, die sowohl das *At-cry3* Vollängen- als auch das N-terminale Deletionsprotein enthielten. Als Negativkontrolle diente der lösliche Überstand von KY1225-*E.-coli*-Zellen, die den pQE-60-Vektor ohne *insert* trugen, als Positivkontrolle der lösliche Überstand von Photolyasehaltigen KY1056-*E.-coli*-Zellen, dem Wildtyp des Stamms KY1225. Zum Nachweis von Photolyaseaktivität wurde ein ELISA mit monoklonalen gegen CPDs gerichteten Antikörpern durchgeführt (s. Kap. 2.2.4.18.1). CPD-haltige DNA ohne vorherige Inkubation mit den Extrakten (Kontrolle) und CPD-haltige DNA, die mit den Extrakten für 60 min im Dunkeln (Dunkelkontrolle) und für 30 und 60 min im photoreaktivierenden Licht inkubiert wurde, wurde an Mikrotiterplatten gekoppelt. Die Menge an CPDs bzw. die Abnahme der CPDs nach Inkubation mit den Proteinextrakten wurde durch ELISA bestimmt.

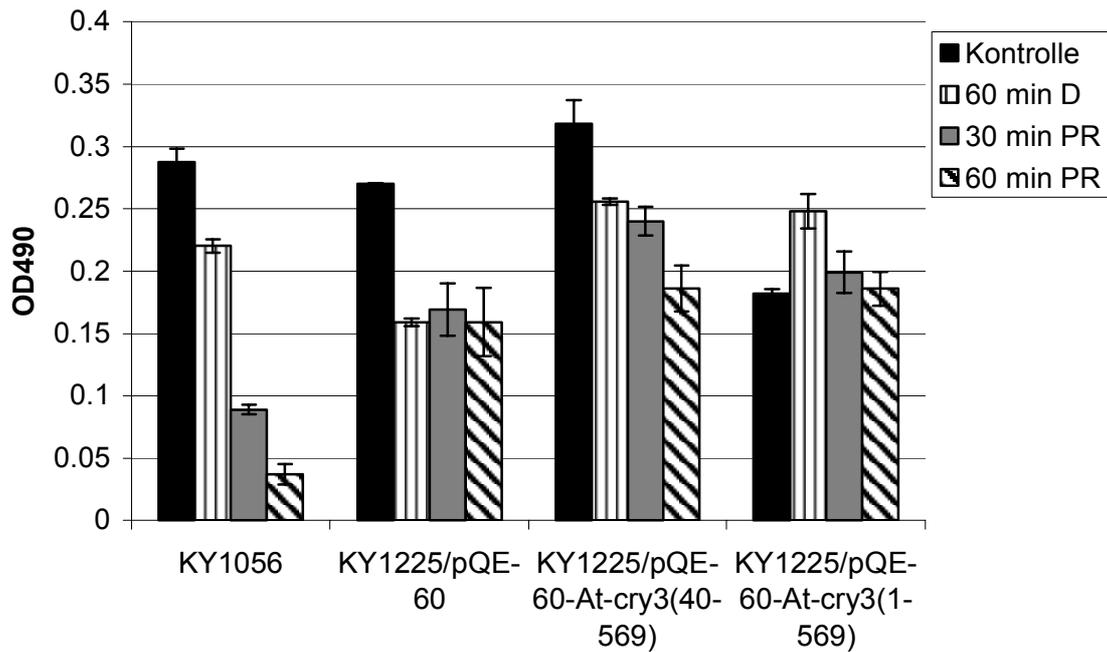


Abb. 3.21: In Zellextrakten aus *At-cry3* überproduzierenden *E.-coli*-Zellen ist keine Photolyaseaktivität detektierbar. Es wurden lösliche Proteinfractionen aus Photolyase-defizienten KY1225-*E.-coli*-Zellen gewonnen, die Vollängen *At-cry3* (*At-cry3* (1-569))- und das N-terminale Deletionsprotein (*At-cry3* (40-569)) exprimierten. Als Negativkontrolle diente der lösliche Überstand von KY1225-*E.-coli*-Zellen, die den pQE-60-Vektor ohne *insert* enthielten, als Positivkontrolle der lösliche Überstand von Photolyase-haltigen KY1056-*E.-coli*-Zellen. CPD-haltige Lachssperma-DNA wurde mit diesen Proteinextrakten inkubiert und dann an Mikrotiterplatten gekoppelt. Es wurde ein ELISA mit monoklonalen, gegen CPDs gerichteten Antikörpern durchgeführt. Ein Peroxidasegekoppelter sekundärer Antikörper diente dann dem Nachweis der CPDs und die Platten wurden bei 490 nm gelesen. Je niedriger der 490-nm-Wert war, desto mehr Reparatur hatte stattgefunden. Eine Platte diente als Kontrolle und wurde sofort gelesen (Kontrolle), eine andere wurde als Kontrolle für eventuell stattfindende Dunkelreparatur 60 min im Dunkeln inkubiert (60 min D), die anderen für 30 bzw. 60 min mit photoreaktivierendem Licht bestrahlt (30 min PR bzw. 60 min PR). Mittelwerte und Standardabweichung sind jeweils aus 5 Messpunkten entstanden.

Je niedriger der Absorptionswert war, desto mehr CPDs waren repariert worden. Bei allen löslichen Extrakten fand eine Dunkelreparatur statt, mit Ausnahme des Extrakts aus KY1225-Zellen, die Vollängen-*At-cry3* exprimierten. Bezogen auf die sofort gemessene Kontrolle waren nach 30 min Photoreaktivierung 69 % der CPDs durch den KY1056-Extrakt repariert, nach 60 min 87 %. Bezogen auf die Dunkelkontrolle waren nach 60 min 83 % der CPDs entfernt. Mit Zellextrakten aus KY1225-Zellen, die pQE-60 ohne *insert* trugen (Negativkontrolle), waren nach 30 min bzw. 60 min photoreaktivierendem Licht 37 bzw. 41 % der CPDs repariert. Im Vergleich zur 60minütigen Dunkelkontrolle fand allerdings keine Photoreparatur statt. Mit dem Extrakt aus KY1225-Zellen, die das N-terminale

Deletionskonstrukt von At-cry3 exprimierten, waren nach 30 min bezogen auf die Kontrolle 25 % und nach 60 min 42 % der CPDs repariert. Bezogen auf die Dunkelkontrolle waren es nach 60 min 27 %. Bei dem Extrakt aus KY1225-Zellen, die das Volllänge At-cry3 exprimierten, sind die Werte der Dunkelproben niedriger als die der 60minütigen Dunkelprobe und die der beiden Proben, die mit photoreaktivierendem Licht behandelt wurden. Es kann somit festgestellt werden, dass nach Gabe von 60 min photoreaktivierendem Lichts eine Reparatur im Vergleich zur 60minütigen Dunkelprobe von nur 25 % stattgefunden hat. Dies deutet insgesamt darauf hin, dass At-cry3 keine Photolyaseaktivität besitzt.

3.2.6.2 *In vivo* Untersuchung

Eine Methode, Proteine auf Photolyasefunktion zu testen, ist deren Expression in Photolyase-defizienten *E.-coli*-Stämmen und die Überprüfung, ob das exprimierte Protein den Defekt komplementieren kann (Hitomi *et al.*, 2000; Hoffman *et al.*, 1996; Imaizumi *et al.*, 2000; Malhotra *et al.*, 1995). Zur Untersuchung der Photolyaseaktivität von At-cry3 wurde solch ein *in vivo* Test durchgeführt. Hierbei wurde zusätzlich zu den At-cry3-Konstrukten die schon charakterisierte Klasse-II-CPD-Photolyase aus *Arabidopsis* (Kleiner *et al.*, 1999a) auf die Fähigkeit hin überprüft, den Photolyase-defizienten *E.-coli*-Stamm KY1225 zu komplementieren.

Die *E.-coli*-Zellen wurden direkt nach der Expression auf Eis gestellt und verschiedene Verdünnungsstufen auf LB-Platten ausplattiert. Jeweils zwei Platten der gleichen Verdünnungsstufe wurden für verschiedene Zeiten mit UV-B bestrahlt. Eine Platte wurde für eine Stunde in photoreaktivierendem Weißlicht ($35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) inkubiert, die andere sofort lichtdicht verpackt. Als Referenz dienten nicht mit UV-B bestrahlte Platten. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37° C wurden die Kolonien ausgezählt und daraus die Überlebensrate bestimmt.

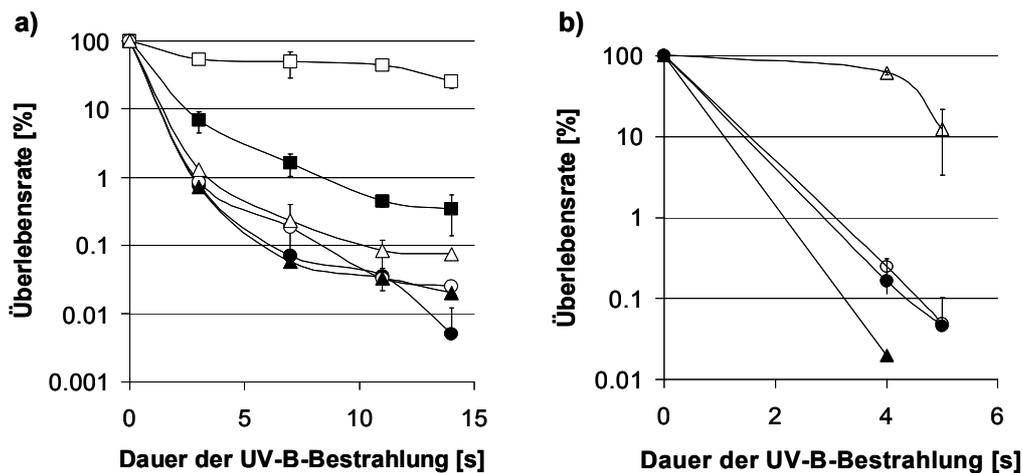


Abb. 3.22: *Arabidopsis cry3* besitzt keine Photolyaseaktivität *in vivo*. a) Photolyase-defiziente *E. coli*-KY1225-Zellen wurden mit dem Expressionsvektor pQE-60 (Kreise) als Kontrolle oder mit pQE-60 mit der kodierenden Region für Vollängen *At-cry3* als *insert* (Dreiecke) transformiert. Als Positivkontrolle dienten Photolyase-haltige Wildtyp KY1056 *E. coli*-Zellen (Quadrate). Die Zellen wurden auf LB-Platten ausplattiert und für verschiedene Zeiten mit UV-B bestrahlt. Die eine Hälfte der Platten wurde für 60 min in photoreaktivierendes Licht (nicht gefüllte Symbole) gestellt, die andere Hälfte wurde sofort lichtdicht verpackt (gefüllte Symbole). b) Wie in a), nur wurde hier die *Arabidopsis* Klasse-II-CPD-Photolyase *At-PHR1* in KY1225 *E. coli*-Zellen exprimiert (Dreiecke) und KY1225-Zellen dienten als Kontrolle (Kreise). Die Platten wurden für 16 h bei 37° C in Dunkelheit inkubiert und dann die Kolonien ausgezählt. Die Ergebnisse für das N-terminale Deletionskonstrukt von *At-cry3* unterscheiden sich nicht von denen für das exprimierte Vollängenkonstrukt (Daten nicht gezeigt). Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei Experimenten mit jeweils 3-5 Messdaten gewonnen.

Wie Abb. 3.22 zeigt, gab es keinen deutlichen Unterschied in der Überlebensrate von KY1225-Zellen, die entweder mit dem *At-cry3* Vollängenexpressionskonstrukt oder dem leeren Vektor pQE-60 transformiert worden waren. Gleiches gilt auch für das N-terminale Deletionskonstrukt von *At-cry3* (Daten nicht gezeigt). Der entsprechende *E. coli* Wildtyp-Stamm KY1056 zeigte hingegen eine starke Photoreaktivierung (Abb. 3.22 a). Auch stellte die in KY1225-Zellen exprimierte Klasse-II-CPD-Photolyase die Photoreaktivierung in diesem Stamm wieder her (Abb. 3.22).

Zusammen mit den Ergebnissen der *in vitro* Untersuchung kann folglich geschlossen werden, dass *At-cry3* keine Photolyaseaktivität besitzt.

3.2.7 *Arabidopsis cry3* bindet DNA

Für Maus Cryptochrom 1 (Kobayashi *et al.*, 1998) sowie kürzlich für *Synechocystis* Cryptochrom (Brudler *et al.*, 2003) und Cryptochrom 2 aus dem Menschen (Özgür und Sancar, 2003) wurde gezeigt, dass sie DNA binden. Um zu prüfen, ob At-cry3 ebenfalls DNA bindet, wurde ein Mobilitäts-*shift-assay* mit At-cry3 durchgeführt. At-cry3 wurde hierfür in Anwesenheit von FAD *in vitro* synthetisiert (Kap. 2.2.4.19). Als Sonde diente eine ³²P-markierte doppelsträngige DNA mit zufällig ausgewählter Sequenz (Kap. 2.2.4.20). Proteine, die an DNA binden, verzögern den Lauf des gebundenen DNA-Fragments während einer nichtdenaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese, was als „shift“ bezeichnet wird. Wie in Abb. 3.23 (Spur1) zu sehen ist, bindet At-cry3 an DNA. Als Negativkontrolle wurde unprogrammiertes Retikulozytenlysat in der Bindungsreaktion eingesetzt. Dies führte zu keiner Retardierung der DNA-Sonde (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Hierfür wurde Kompetitor-DNA in 5- und 50fachem molaren Überschuss zugegeben. Als Kompetitoren dienten DNA gleicher Sequenz wie die der Sonde (Eigen) als Doppel- (ds) oder Einzelstrang (ss), sowie Oligonukleotide gleicher Länge, aber anderer Sequenz (Fremd) als Doppel- oder Einzelstrang. Bei allen Kompetitor-Ansätzen wurde durch 50fachen Kompetitor-Überschuss weniger der markierten DNA-Probe „geschifft“ als durch 5fachen Überschuss. Die DNA-Bindung wurde zudem mit den verschiedenen DNA-Proben gleich stark kompetitiert, so dass geschlossen werden kann, dass die Bindung von At-cry3 an DNA weder sequenzspezifisch, noch doppel- oder einzelstrangabhängig ist.

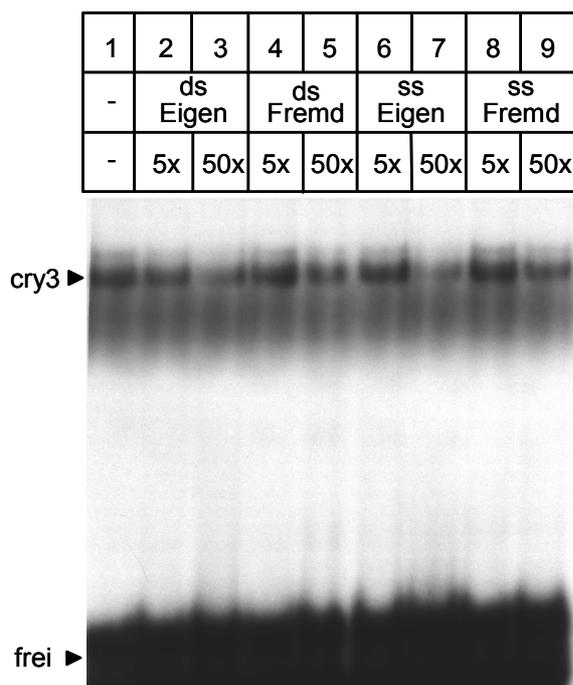


Abb. 3.23: At-cry3 bindet DNA. At-cry3 wurde *in vitro* in der Anwesenheit von FAD synthetisiert und mit einem ³²P-markierten doppelsträngigen Oligonukleotid inkubiert. Die Bindungsreaktionen wurden auf einem nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Gezeigt ist ein Autoradiogramm des Gels. Spur 1 zeigt eine Reaktion ohne Kompetitor-DNA. Bei Spuren 2-9 wurde Kompetitor-DNA entweder als einzelsträngige (ss) oder doppelsträngige (ds) DNA in fünf- bzw. 50fachem molaren Überschuss zugegeben. Die Kompetitionen erfolgten mit DNA, die mit der Sonde sequenzidentisch war (Eigen) oder eine andere Sequenz als die der Sonde hatte (Fremd). frei: freie markierte Oligonukleotide; cry3: cry3-spezifische „geschiftete“ Bande.

3.2.8 Komplementationsversuch der *Synechocystis cry* Mutante mit *Arabidopsis cry3*

Da, wie in dieser Arbeit gezeigt, die *Synechocystis* Cryptochrom Mutante vom Wildtyp phänotypisch abweicht und *At-cry3* mit *Synechocystis cry* eine hohe Identität besitzt, wurde versucht, die *Synechocystis cry* Mutante mit *At-cry3* zu komplementieren. Zusätzlich sollte *At-cry3* im *Synechocystis* Wildtyp exprimiert werden. Die Transformation von *Synechocystis* Wildtyp und der *cry* Mutante sollte mit zwei verschiedenen Konstrukten durchgeführt werden: Der unter der Kontrolle des *sll1629* (*Syn CRY*) Promotors stehenden kodierenden Region für das *At-cry3* Volllängeprotein und einer unter der Kontrolle des *sll1629* Promotors stehenden DNA-Sequenz, die für ein *At-cry3* Protein kodiert, dem die N-terminalen 40 AS fehlen. Die *Synechocystis cry* Mutante ist Kanamycin-resistent; für eine Selektion transformierter Wildtyp- und *cry*-Mutantenzellen wurden beide Genkonstrukte am 3'Ende mit einer Spectinomycin-Kassette fusioniert. Die Strategie ist in Abb. 3.24 schematisch dargestellt.

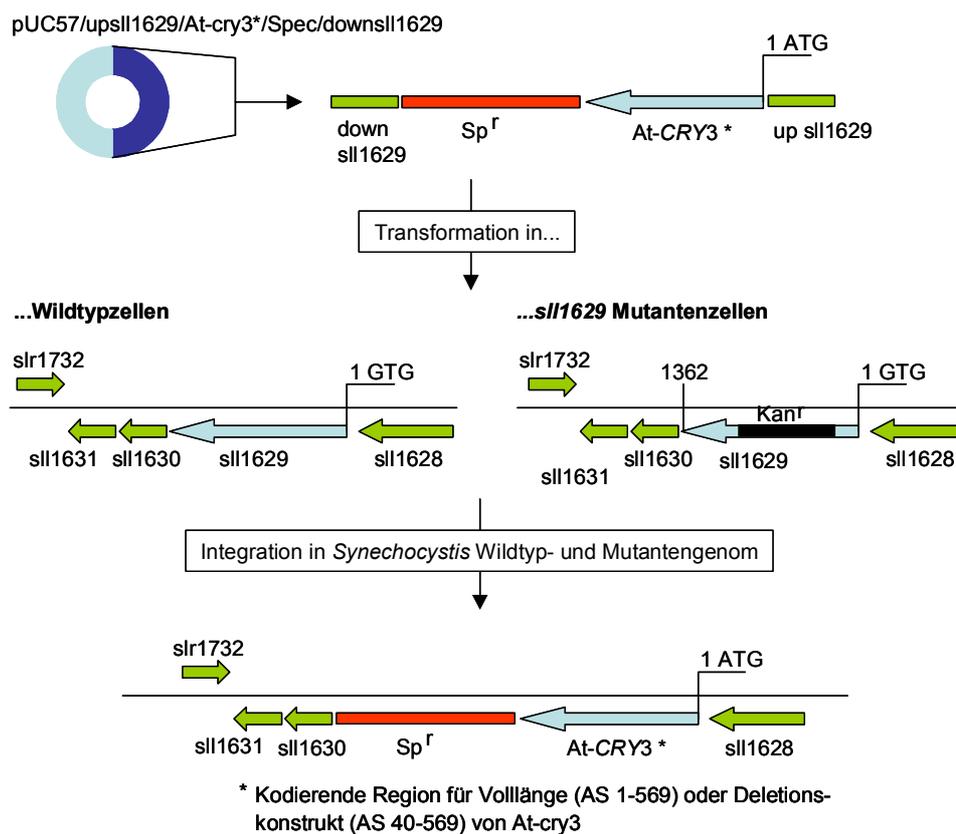


Abb. 3.24: Integration der kodierenden Region von *At-cry3* Volllänge oder *At-cry3* (40-569). Die kodierende Region von *sll1629* wurde durch die kodierende Region für *At-cry3* ersetzt und am 3'Ende mit einer Spectinomycin-Kassette (*Sp^r*) zur Selektion im Wildtyp und in der *cry* Mutante (Kanamycin-resistent) fusioniert.

Das Konstrukt für das At-cry3 Volllängen-Protein wurde in *Synechocystis* Wildtyp und *cry* Mutante transformiert und die Zellen auf Spectinomycin selektioniert. Die Segregation ist in beiden Stämmen noch nicht vollständig durchgesetzt, doch wurde für beide Stämme durch PCR-Analyse gezeigt, dass At-cry3 an der richtigen Stelle in das *Synechocystis*-Genom integriert wurde (nicht gezeigte Daten). Mit noch segregierenden Zellen wurde untersucht, ob At-cry3 die *Synechocystis cry* Mutation komplementieren kann. Hierfür wurde nachgeprüft, ob die Induktion von *psbA3* im UV-A (372 nm; $2.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) wieder erfolgt. Dunkeladaptierte *Synechocystis* Wildtyp- und *cry* Mutantenzellen und *cry* Mutantenzellen mit At-cry3-Volllängen-Kopien („Komplementations“-Mutantenzellen) wurden wie in Kap. 3.1.5 mit UV-A bestrahlt und mit einer quantitativen RT-PCR die *psbA3* Transkriptinduktion untersucht. Die *psbA3* Expression war im Wildtyp induziert, in der „Komplementations-Mutante“ konnte keine erhöhte *psbA3* Induktion im Vergleich zur *cry* Mutante nachgewiesen werden. Somit konnte eine Komplementation der *Synechocystis cry* Mutante durch At-cry3 bisher nicht gezeigt werden (Abb. 3.25).

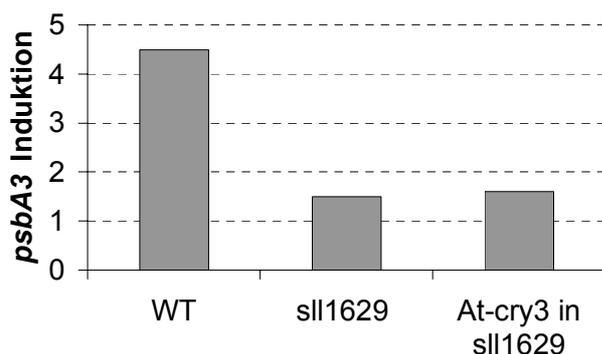


Abb. 3.25: Die UV-A-Induktion der *psbA3* Expression war in der *Synechocystis At-cry3* „Komplementations“-Mutante nicht wiederhergestellt. *Synechocystis* Wildtyp-, *cry*- (sll1629) und „Komplementations“-Mutantenzellen (At-cry3 in sll1629) wurden 10 min mit UV-A bestrahlt. Die *psbA3* Transkriptlevel wurden mittels kompetitiver RT-PCR quantifiziert. Dargestellt ist die Induktion gegenüber Schwachlicht-behandelten Zellen.

3.2.9 Phylogenetische Einordnung von *Arabidopsis cry 3* und *Synechocystis cry*

In der Proteindatenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) sind über 70 Sequenzen mit Homologie zu Photolyasen und Cryptochromen eingetragen. Aus annähernd allen Sequenzen wurde in Kooperation mit unserer AG von Peter Lockhart, Massey University, Palmerston North, New Zealand, ein Stammbaum der Photolyase/Cryptochrom-Familie erstellt (Abb. 3.26). Aus diesem Stammbaum geht hervor, dass At-CRY3 mit dem *Synechocystis* Cryptochrom gruppiert, *Arabidopsis* CRY1 und CRY2 aber Photolyase/Cryptochrom-Sequenzen aus α -Proteobakterien näher stehen.

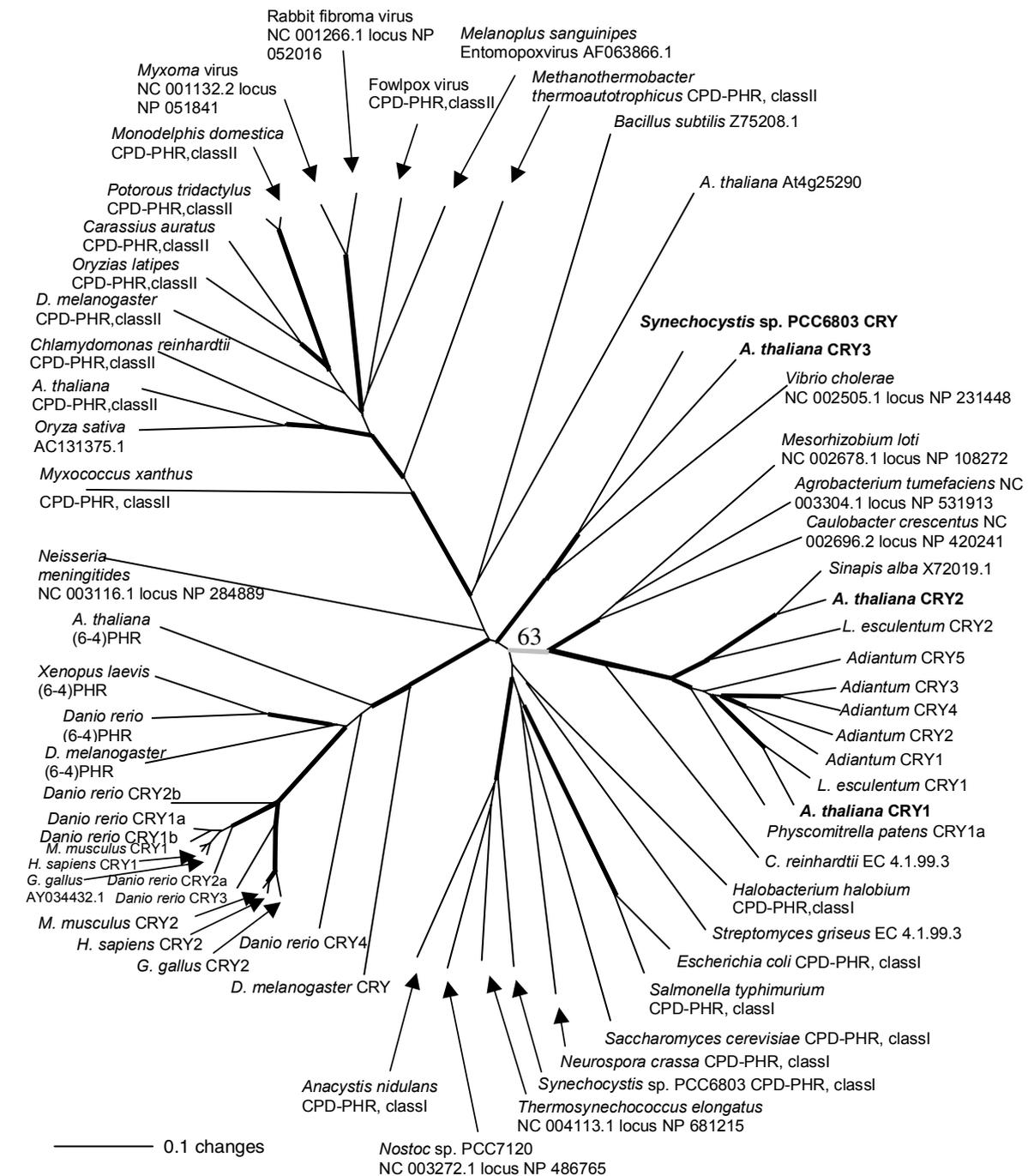


Abb. 3.26: Stammbaum der Photolyase/Cryptochrom-Familie. Die Zweige, die in dicken Linien dargestellt sind, werden mit >95 % „bootstrap“-Werten unterstützt. Die Gruppierung der Pflanzen CRY Sequenzen mit denen der α -Proteobakterien (*Mesorhizobium*, *Agrobacterium*, *Caulobacter*) ergab 63 % nicht parametrische „bootstrap“-Unterstützung. Die alternative Gruppierung der Pflanzen CRY Sequenzen der CRY1/CRY2-Familie mit *At*-CRY3 und *Synechocystis* Cryptochrom ergab 0 % Unterstützung. *Arabidopsis* CRY1, CRY2, CRY3 und *Synechocystis* Cryptochrom sind in fetten Buchstaben dargestellt. CRY, Cryptochrom; (6-4)PHR, (6-4) Photolyase; CPD-PHR, CPD Photolyase. Es handelt sich um einen *unrooted weighted phylogenetic tree*, der von Peter Lockhart berechnet wurde.

4 Diskussion

4.1 Das *Synechocystis* Cryptochrom

Bisher wurden Cryptochrome in Pflanzen, Tieren und im Menschen gefunden (Übersichtsartikel: Deisenhofer, 2000; Lin, 2002, van Gelder, 2002). Über den Ursprung der Cryptochrome gibt es widersprüchliche Aussagen. Cashmore und Mitarbeiter (Cashmore *et al.*, 1999) vermuten, dass sich Cryptochrome erst nach dem Auftreten von Eukaryoten aus Photolyasen entwickelt haben. Kanai *et al.* (1997) schließen aus Vergleichen von Photolyase/Cryptochrom-Sequenzen, dass sich Cryptochrome von den Photolyasen schon vor dem Erscheinen von Eukaryoten getrennt haben könnten. Bis vor kurzem gab es noch keinen experimentellen Nachweis für die Existenz eines bakteriellen Cryptochroms. In *Synechocystis* sp. PCC 6803 gibt es zwei ORFs, slr0854 und sll1629, deren Sequenzen Homologie zu Photolyase/Cryptochrom besitzen. Alle bisher charakterisierten Photolyasen und Cryptochrome binden FAD als Kofaktor (Cashmore *et al.*, 1999). Sowohl das durch slr0854 kodierte Protein als auch das sll1629 Protein besitzen FAD als Kofaktor (eigene Daten; Hitomi *et al.*, 2000). slr0854 kodiert für eine Photolyase, nicht aber sll1629 (eigene Ergebnisse; Hitomi *et al.*, 2000; Ng *et al.*, 2000). Es war lange unklar, welche Funktion das durch sll1629 kodierte Protein ausübt. Dennoch wurde vermutet, dass sll1629 für ein Cryptochrom kodieren könnte (Hitomi *et al.*, 2000; Kong *et al.*, 2003; Ng und Pakrasi, 2001).

Cyanobakterien gelten als Vorläufer der Chloroplasten (Cavalier-Smith, 2002; McFadden, 2001). Phytochromähnliche Photorezeptoren wurden in Cyanobakterien wie *Synechocystis* sp. PCC 6803 gefunden (Hughes *et al.*, 1997; Yeh *et al.*, 1997). Deshalb wird vermutet, dass Pflanzen ihre Phytochromrezeptoren durch horizontalen Gentransfer eines Vorläufers der Chloroplasten bekommen haben. Um zu prüfen, ob dies auch für die Cryptochrome gelten könnte, wurde im ersten Abschnitt dieser Arbeit die Funktion des ORFs sll1629 aus *Synechocystis* analysiert.

4.1.1 Das *Synechocystis* sll1629 Gen befindet sich in einem *Gencluster*

Die *sll1629* (*cry*) Mutante wurde durch Deletion eines 1120 bp großen sll1629-Fragmentes und einer Insertion einer Kanamycin-Resistenzcassette hergestellt (Kap. 2.1.9.2, Abb. 2.1). Der ORF sll1629 bildet zumindest mit dem stromaufwärts gelegenen ORF sll1628 und dem stromabwärts gelegenen ORF sll1630 ein Operon (Kap. 3.1.1, Abb. 3.1). So könnte eine

Unterbrechung des *sll1629* Gens auch Auswirkungen auf die Expression des ORFs *sll1630* haben. Doch die von *sll1630* abgeleitete 141 Aminosäuren lange Sequenz ist zu keinem bekannten Protein homolog. Auch die abgeleitete Aminosäuresequenz des von *sll1630* stromabwärts gelegenen ORFs *sll1631* hat nur schwache Homologie zu einem Protein, das nach derzeitigem Kenntnisstand nichts mit Lichtperzeption zu tun haben kann. So sind wohl alle in der *sll1629* (*cry*) Mutante auftretenden Phänotypen auf einen Defekt des *sll1629* Gens und nicht auf einen polaren Effekt zurückzuführen.

Interessant ist, dass im ORF *sll1628* zwischen den AS 266-299, AS 300-333 und AS 334-367 TPR (tetratricopeptide repeat)-Regionen vorhanden sind. Dieses Motiv ist für seine Rolle in Protein-Interaktionen bekannt (Das *et al.*, 1998). Im Menschen interagieren das TPR Protein 1, Tpr1, und die Serin/Threonin-Phosphatase 5, die das TPR-Motiv enthält, mit Cryptochrom hcry2 (Zhao und Sancar, 1997). Für *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurde gezeigt, dass das von ORF *sll0886* kodierte TPR-Protein das lichtaktivierte heterotrophe Wachstum (LAHG) beeinflusst (Kong *et al.*, 2003). Dieser Effekt konnte bei sehr niedrigen Fluenzraten ($0.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) beobachtet werden.

4.1.2 Die *Synechocystis cry* Mutante besitzt keinen offensichtlich vom Wildtyp abweichenden Phänotyp

Da die *sll1629* (*cry*) Mutante weder unter photoautotrophen noch unter heterotrophen Wachstumsbedingungen einen makroskopisch sichtbaren, stabilen und vom Wildtyp abweichenden Phänotyp zeigte, wurde nach anderen Effekten der Mutation gesucht. Dabei wurde nicht nur nach Effekten im Blaulicht, sondern auch nach Effekten im Rotlicht gesucht (Kap. 3.1.2), da es Beispiele dafür gibt, dass Cryptochrome auch im Grün/Rotlicht absorbieren können und an der Rotlichtsignaltransduktion beteiligt sind. *Arabidopsis cry1* wurde z. B. in signifikanten Mengen mit FAD in seiner semireduzierten Form aus Insektenzellen isoliert (Lin *et al.*, 1995b). Semireduziertes Flavin absorbiert bei Wellenlängen deutlich über 500 nm (Schmidt und Galland, 1999). Außerdem gibt es in Pflanzen viele Beispiele für die Interaktion von Cryptochromen und Phytochromen (Kap. 1.3.1.4.4). So zeigt die *cry1* Mutante einen Phänotyp im Rotlicht (Ahmad und Cashmore, 1997; Devlin und Kay, 2000, Hennig *et al.*, 1999; Jackson und Jenkins, 1995). In Analogie zu Pflanzen könnte man daher ähnliche Interaktionen zwischen Photorezeptoren in *Synechocystis* vermuten.

Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Analysen der Pigmentzusammensetzung wurde zusätzlich zur *cry* Mutante die *phr* Mutante untersucht, um zu zeigen, dass ein möglicher Effekt spezifisch für die *cry* Mutante ist. Hinsichtlich Wachstum und

Pigmentzusammensetzung wurden signifikante Unterschiede weder unter photoautotrophen Bedingungen noch im Blau- oder Rotlicht gefunden. Hier ist die Situation ähnlich wie bei dem Bakteriophytochrom *cph1* aus *Synechocystis*: Obwohl biochemisch und spektroskopisch schon sehr gut untersucht (Hübschmann *et al.*, 2001; Hughes *et al.*, 1997; Lamparter *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2000; Sineshchekov *et al.*, 2002), konnte bisher in der *cph1* Mutante noch kein Phänotyp gefunden werden. Für Cyanobakterien-Phytochrome im Allgemeinen wurde bislang noch keine rot/dunkelrotreversible physiologische Funktion nachgewiesen (Wilde *et al.*, 2002).

4.1.3 *Synechocystis cry* ist ein Aktivator der rotlichtvermittelten Phototaxis

Wie bereits im Ergebnisteil beschrieben (Kap. 3.1.3), kann sich *Synechocystis* sp. PCC 6803 phototaktisch bewegen. Dies ist jedoch ein labiler Phänotyp (Castets *et al.*, 1986), und manche Stämme haben diese Eigenschaft verloren, so auch der in dieser Arbeit zumeist verwendete Laborstamm. In der Arbeitsgruppe von Thomas Börner, Humboldt Universität Berlin, wird mit einem *Synechocystis*-Stamm gearbeitet, der die Fähigkeit zur Phototaxis besitzt. In Kooperation mit dieser Arbeitsgruppe wurden *sll1629* und *sll1629 cph2* Doppelmutanten generiert. Zum einen wurde ein Stamm benutzt, der Phototaxis im Weiß-, Grün-, Rot- und Dunkelrotlicht zeigt, was in Übereinstimmung mit den meisten Untersuchungen anderer Stämme ist. Jedoch wird im Gegensatz zu von anderen Arbeitsgruppen untersuchten Stämmen (Choi *et al.*, 1999; Ng *et al.*, 2003) durch Blaulicht keine Phototaxis ausgelöst. Börner und Mitarbeiter zeigten, dass sich durch Ausschalten von *cph2*, einem bakteriellen Phytochrom, die Mutantenzellen im Gegensatz zu den Wildtypzellen zum Blaulicht hin bewegen können (Wilde *et al.*, 2002). Zum anderen wurde der „Grossman“-Wildtyp benutzt, der sich auch im Blaulicht phototaktisch bewegen kann. In diesem Stamm wurde ein potenzieller Photorezeptor, TaxD1, beschrieben, der die positive Phototaxis beeinflusst (Bhaya *et al.*, 2001; Ng *et al.*, 2003; Yoshihara *et al.*, 2000). Es wird vermutet, dass zusätzlich zu TaxD1 und *cph2* ein oder mehrere UV-A/Blaulichtrezeptoren eine Rolle im phototaktischen Verhalten von *Synechocystis* sp. PCC 6803 spielen. Daher wurde in dieser Arbeit die *Synechocystis cry* Mutante auf eine veränderte Phototaxis hin untersucht. Choi *et al.* (1999) haben gezeigt, dass sich deren *Synechocystis*-Stamm in Antwort auf UV-A negativ phototaktisch verhält. Entsprechend wurde das phototaktische Verhalten des „Börner“- und des „Grossman“-Wildtyps auch im UV untersucht.

Sowohl im „Börner“- als auch im „Grossman“-Wildtyp konnte unter den hier benutzten Bedingungen (0.7 W m^{-2}) bei 333 nm und bei 362 nm keine Phototaxis nachgewiesen werden. Bei 372 nm mit $2.2 \text{ W m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ konnte allerdings negative Phototaxis induziert werden.

Die anderen beiden UV-A-Wellenlängen waren unter Umständen deshalb unwirksam, weil die maximal erreichbaren Fluenzraten zu niedrig waren. „Grossman“-Wildtyp und *sll1629* und *cph2* Mutante zeigten bei 372 nm Phototaxis. Im „Börner“-Wildtyp konnte durch den Ausfall von *cph2* Phototaxis im UV-A wiederhergestellt werden; bei der *cph2 sll1629* Mutante war jedoch keine Phototaxis mehr zu beobachten (Kap. 3.1.3, Abb. 3.5). Warum in der *cph2 sll1629* Mutante die Phototaxis wieder ausfällt, konnte bisher nicht geklärt werden. Allerdings gehen die *cph2* und *cph2 sll1629* Mutanten aus unterschiedlichen *cph2*-Konstrukten hervor. In der *cph2* Mutante sind nur die GGDEF- und die GAF3-Domäne ausgeschaltet (zu den *cph2* Domänen s. Abb. 1.1, Kap. 1.1.2), in der *cph2 sll1629* Mutante die gesamte kodierende Region für das *cph2* Protein. Durch den Ausfall von *sll1629* konnte die Phototaxis im Blaulicht im „Börner“-Wildtyp nicht wiederhergestellt werden. Im Rotlicht konnte ein Effekt von *sll1629* auf die Phototaxis im „Börner“-Wildtyp beobachtet werden. *sll1629* scheint in diesem Wellenlängenbereich für die Phototaxis notwendig zu sein. Das ist insofern interessant, weil das als Rotlichtrezeptor postulierte *cph2* als Repressor der Phototaxis im Blaulicht (Wilde *et al.*, 2002) und anscheinend auch im UV-A wirkt. Wie schon angesprochen, könnten *sll1629* als Cryptochrom und *cph2* als Phytochrom redundant wirken. Es wurden in den hier beschriebenen Experimenten keine zusätzlichen Effekte in der *sll1629 cph2* Mutante gefunden, die nicht auch in den Einzelmutanten beobachtet wurden. Auch im Dunkelrotlicht zeigte die *sll1629* Mutante verminderte Phototaxis. Allerdings waren hier noch einige Zellen phototaktisch aktiv. Dies kann daran liegen, dass noch Wildtyp-Kopien des *sll1629* Gens in der Mutante vorhanden waren, die ausreichten, eine Phototaxis in Antwort auf 732-nm-Licht zu vermitteln. Der Phänotyp der *sll1629* Mutante im Rot- und Dunkelrotlicht könnte durch eine Funktion von *sll1629 downstream* von Phytochromen oder anderen Photorezeptoren hervorgerufen sein; *cph2* scheint nicht der Photorezeptor für Rot- und Dunkelrotlicht-vermittelte Phototaxis zu sein. Eine direkte Photoperzeption durch eine halbreduzierte Form des FAD im *Synechocystis cry* (*sll1629*) kann zumindest für den Effekt bei 730 nm ausgeschlossen werden.

4.1.4 Das *Synechocystis sll1629* Gen kodiert für ein bakterielles Cryptochrom

4.1.4.1 *Synechocystis cry* fördert die UV-B-vermittelte *de novo* Synthese des D1 Proteins

Wie in Kap. 3.1.4 beschrieben, kann die Schädigung und Inaktivierung des Photosystem II, die Photoinhibierung, durch *de novo* Synthese der D1 und D2 Proteine repariert werden. Die *de novo* Synthese wird durch sichtbares Licht und UV-B induziert (Sass *et al.*, 1997). Photoinhibierung und *de novo* Synthese können über die Rate der Sauerstoffentwicklung

verfolgt werden. Die *de novo* Synthese der D1 und D2 Proteine in Weißlicht und UV-B wurden in dieser Arbeit für die *phr* und *cry* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Bei gleichzeitiger Gabe von Weißlicht und UV-B ergab sich kein signifikanter Unterschied (Kap. 3.1.4, Abb. 3.6). Bei alleiniger Gabe von UV-B zeigte sich jedoch in der *cry* Mutante im Gegensatz zur *phr* Mutante und zum Wildtyp ein Unterschied in der Sauerstoffentwicklung. Die Sauerstoffentwicklung wurde unter zwei Bedingungen bestimmt, um *de novo* Synthese von D1 und D2 nachzuweisen: zum einen in Anwesenheit von Lincomycin, einem Proteinsynthese-Inhibitor, zum anderen ohne diesen Inhibitor. Bei Wildtyp und *phr* Mutante zeigte sich ein klarer Unterschied: In Anwesenheit von Lincomycin wurde wesentlich weniger Sauerstoff produziert als ohne Lincomycingabe. Bei der *cry* Mutante hingegen gab es keinen Unterschied der Sauerstoffentwicklung bei An- und Abwesenheit von Lincomycin. Da durch Lincomycin die *de novo* Synthese der D1 und D2 Proteine unterdrückt wird und in Abwesenheit von Lincomycin in der *cry* Mutante nicht mehr Sauerstoff produziert wurde als in Anwesenheit, ist dies ein klarer Hinweis darauf, dass *Synechocystis cry* ein wichtiger Regulator der UV-B-induzierten *de novo* Synthese von D1 und/oder D2 ist. Die Regulation der D1 Expression durch *Synechocystis cry* konnte durch *psbA* Transkriptanalysen bestätigt werden (Kap. 3.1.5); zur Regulation der D2 Expression wurde kein weiterer Nachweis erbracht. *Synechocystis cry* besitzt FAD als Chromophor. FAD hat zusätzlich zu den Absorptionsmaxima im UV-A und sichtbaren Licht ein Absorptionsmaximum im UV-B bei 269 nm. Daher könnte *Synechocystis cry* im UV-B sehr wohl eine Rolle als Photorezeptor spielen. Tyystjärvi *et al.* (2002) haben den Einfluss von Licht im Bereich von 400-700 nm auf die Photoinhibierung in *Synechocystis* sp. PCC 6803 untersucht und haben gezeigt, dass in diesem Bereich Licht von 400-500 nm am effektivsten ist. Dieser Wellenlängenbereich wurde in der vorliegenden Arbeit nicht in die Analysen einbezogen. *Synechocystis phr* besitzt wie *cry* FAD als Chromophor; die Mutante verhält sich hinsichtlich der Photoinhibierung aber nicht anders als der Wildtyp. *Synechocystis phr* scheint folglich ausschließlich als Photolyase und nicht als Photorezeptor zu agieren und wurde daher in den weiteren Untersuchungen nicht mehr berücksichtigt.

4.1.4.2 Die *Synechocystis cry* Mutante zeigt veränderte *psbA3* Induktion unter verschiedenen Lichtbedingungen

Die Untersuchungen zur Photoinhibierung gaben einen ersten Hinweis auf die Funktion von *sll1629* als Cryptochrom. Bei der Photoinhibierung wird vor allem der Abbau des D1 Proteins induziert (Greenberg *et al.*, 1989, Melis *et al.*, 1992). Das D1 Protein wird in *Synechocystis* durch die *psbA2* und *psbA3* Gene kodiert (Mohamed und Jansson, 1989); *psbA1* wird nicht abgelesen. Bei der *psbA* Genexpression spielen sowohl Transkriptstabilität (Mohamed und

Jansson, 1991; Mulo *et al.*, 1998; Tyystjärvi *et al.*, 1998) als auch Translationsaktivität (Tyystjärvi *et al.*, 2001) eine Rolle, jedoch ist die Expression hauptsächlich auf Transkriptionsebene reguliert (Golden, 1994). *PsbA2* macht unter normalen Wachstumsbedingungen 90 % des Transkriptes aus (Mohamed *et al.*, 1993). Da gezeigt wurde, dass *psbA3* bei UV-B-Gabe um das 20-30fache, *psbA2* aber nur um das 2-3fache induziert wird (Máté *et al.*, 1998), wurde in der vorliegenden Arbeit die *psbA3*-Expression untersucht.

Die Sequenzen der *psbA2* und *psbA3* Gene sind nahezu identisch; sie unterscheiden sich nur in einigen Basenpaaren stromaufwärts des Translationsstarts. Daher können *psbA2* und *psbA3* in einer *Northern*-Analyse nicht unterschieden werden. Da *psbA3* nur 10 % des Transkripts ausmacht, wäre eine induzierte Expression von *psbA3* durch eine *Northern*-Analyse kaum zu detektieren, da unter den wirksamsten *psbA* Expressionsbedingungen in der Summe beider Transkripte nur eine knapp fünffache Induktion zu erwarten wäre. Um eine Induktion von *psbA3* gut nachweisen zu können, wurde deshalb RT-PCR als Nachweisverfahren verwendet. Dies war möglich, weil sowohl von *psbA2* als auch von *psbA3* der Transkriptionsstart bestimmt worden war (Mohamed *et al.*, 1993). Der Transkriptionsstart für *psbA2* liegt –49 stromaufwärts von der kodierenden Region, der für *psbA3* an der Position –88. Somit konnte ein 5' primer gewählt werden, der spezifisch an die cDNA von *psbA3* bindet. Tatsächlich ist die Lichtinduktion des *psbA3* Gens in der *sll1629 (cry)* Mutante im Vergleich zum Wildtyp verändert. Insbesondere fehlt in der *sll1629* Mutante die starke Induktion im UV-A-Bereich (Kap. 3.1.5, Abb. 3.9). Im Blaulicht fand sich in der *cry* Mutante eine etwa um die Hälfte reduzierte Induktion im Vergleich zum Wildtyp. In diesem Bereich könnte *sll1629* mit anderen Photorezeptoren, wie z. B. den in *Synechocystis* gefundenen Phytochromen, zusammenarbeiten. Auch bei der Regulation von *psbA3* verhielt sich die *cry* Mutante im Rotlicht wie im Phototaxis-Versuch anders als der Wildtyp (Kap. 3.1.5, Abb. 3.9): Die Induktion im Rotlicht war reduziert, im Dunkelrot war sie leicht erhöht. In ersten Versuchen zum Nachweis einer direkten Interaktion von *Synechocystis cry* mit *cph1* durch *Yeast-two-hybrid*-Analysen ergab sich kein Hinweis für solch eine Interaktion (nicht gezeigte Daten). Dies heißt aber nicht, dass *cry* und *cph1* nicht funktionell zusammenwirken könnten. Chun *et al.* (2001) haben gezeigt, dass *Arabidopsis* Phytochrom A an der UV-A-, Blau-, Rot- und Dunkelrotlicht-induzierten *psbA* Transkription beteiligt ist. Die Autoren haben hier, wie für *Synechocystis* beschrieben, eine veränderte Transkriptinduktion in vielen Lichtqualitäten gefunden. Viele Gene werden durch mehr als einen Photorezeptor aktiviert (McCormac und Terry, 2002; Thum *et al.*, 2001; Wade *et al.*, 2001).

In *Synechocystis* gibt es neben ORF sll1629 noch andere ORFs, die für Blaulichtrezeptoren kodieren könnten. In dem phototrophen Proteobakterium *Rhodobacter sphaeroides* wurde das Protein AppA entdeckt, das für die Aktivierung von Photosynthese-Genen gebraucht wird (Gomelsky und Kaplan, 1995). Der N-Terminus dieses Proteins bindet nicht kovalent FAD (Gomelsky und Kaplan, 1998). Die vom *Synechocystis* ORF slr1694 abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt eine große Homologie zur FAD-Bindedomäne von AppA und zur Adenylyl-Cyclase aus *Euglena* (Iseki *et al.*, 2002).

Brudler *et al.* (2003) haben vor kurzem die Kristallstruktur von *Synechocystis cry* veröffentlicht und gezeigt, dass dem Protein wichtige Aminosäuren zur Katalyse der DNA-Reparatur fehlen. Tierische Cryptochrome können als Transkriptionsregulatoren von Uhrgenen fungieren (Kume *et al.*, 1999). Auch Brudler *et al.* haben untersucht, ob sll1629 in der transkriptionellen Regulation von *Synechocystis* eine Rolle spielt. Dazu verglichen sie mit Hilfe von DNA-*microarrays* die Expressionsprofile der sll1629 Mutante und des Wildtyps unter konstanten Wachstumsbedingungen ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, kontinuierliches Weißlicht). Sie fanden acht Gene, die in der Mutante ungefähr zweifach hochreguliert waren. Da die Standardfehler dieser Daten recht hoch waren und die Expressionsprofile nicht unter verschiedenen Lichtbedingungen analysiert wurden, muss offen bleiben, ob diese Daten für die Funktion von *Synechocystis cry* als Transkriptionsregulator und/oder Photorezeptor sprechen.

Hingegen kann aus den Daten der vorliegenden Arbeit geschlossen werden, dass sll1629 für ein Cryptochrom kodiert. Damit wurde erstmals der Beweis für die Existenz eines bakteriellen Cryptochroms erbracht.

4.2 Ein drittes Cryptochrom aus *Arabidopsis*?

Bisher wurden in *Arabidopsis* vier Mitglieder der Photolyase/Cryptochrom-Familie beschrieben und charakterisiert: CRY1, CRY2 (Übersichtsartikel: Lin, 2002), eine Klasse-II-CPD-Photolyase (Ahmad *et al.*, 1997; Kleiner *et al.*, 1999a) und eine (6-4) Photolyase (Nakajima *et al.*, 1997). 1998 gab es von Ahmad *et al.* (1998d) einen Eintrag einer weiteren Sequenz mit Ähnlichkeit zu Photolyase/Cryptochrom, PHR2, in das Plant Gene Register. Die Polypeptidsequenz dieses Proteins endet jedoch vor der putativen Flavin-Bindedomäne und der in Photolyasen und Cryptochromen vorkommenden „Signatur-Sequenz“ TGY/IP (Sancar, 1994). Daher ist es unwahrscheinlich, dass PHR2 Flavin bindet. Über eine Funktion dieses Proteins ist noch nichts bekannt. Die Suche nach weiteren, ähnlichen Sequenzen in der *Arabidopsis*-Datenbank (<http://mips.gsf.de/proj/thal/db/index.html>) führte zu zwei weiteren

Sequenzen: At4g25290 und At5g24850. Die Expression von At4g25290 ist durch das Vorhandensein von ESTs verifiziert; At4g25290 kodiert für ein Protein von 581 AS Länge. Dieses Protein besitzt eine Signalsequenz für die Lokalisation in Mitochondrien und eine putative Photolyasedomäne.

Besonders interessant ist die At5g24850-Sequenz. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist über einen Bereich von 400 AS zu über 50 % identisch mit *Synechocystis cry*. Die Expression des At5g24850 Gens ist verifiziert, und es kodiert für ein Protein einer Größe von 569 AS. Dieses Protein wurde kürzlich CRY DASH genannt (Brudler *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit wird es als At-CRY3 bezeichnet.

4.2.1 Das erste Photolyase/Cryptochrom-ähnliche Protein mit Lokalisation in Chloroplasten und Mitochondrien

At-CRY3 besitzt eine N-terminale Extension. Interessanterweise wurde von Datenbanken vorhergesagt, dass diese Extension mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Transitpeptid bzw. eine Präsequenz für den Import des Proteins in Chloroplasten (Predotar) bzw. Mitochondrien (TargetP, Mitoprot) ist. Zunehmend werden Proteine gefunden, die sowohl in Chloroplasten als auch Mitochondrien transportiert werden. Viele davon sind Aminoacyl-tRNA-Transferasen (Übersichtsartikel: Peeters und Small, 2001, Rudhe *et al.*, 2002). Peeters und Small (2001) haben 19 Sequenzen von Proteinen, von denen bekannt ist, dass sie sowohl in Chloroplasten als auch Mitochondrien transportiert werden, mit bekannten Datenbank-Programmen (TargetP, Mitoprot, Predotar) auf dualen Import untersucht. Sie kamen zu dem Schluss, dass Vorhersagen für dualen *targeting* sehr schwierig sind. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit experimentell überprüft, ob At-cry3 in Chloroplasten und/oder in Mitochondrien lokalisiert ist. Ein *in vitro* Import in isolierte Erbsenchloroplasten zeigte, dass *in vitro* transkribiertes/translatiertes Vollängen At-cry3 tatsächlich in Chloroplasten transportiert wird (3.2.2, Abb. 3.13). Da die *in vitro* Synthese des Proteins in Abwesenheit von FAD stattfand, wird der Chromophor offenbar für den Transport nicht benötigt. Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich auch freies FAD in dem Retikulozytenlysat befindet, welches an At-cry3 gebunden wurde. Der Import von At-cry3 in Chloroplasten wurde durch die Lokalisation von GFP-Fusionen, die transient in grünen *Arabidopsis*-Protoplasten exprimiert wurden, bestätigt (3.2.3, Abb. 3.14). Die Vorhersagen zur Länge der *Targeting*-Sequenz waren 39 AS (ChloroP) und 27 AS (MitoP). Daher wurden zusätzlich zum Vollängenkonstrukt ein Deletionskonstrukt ohne die ersten 40 AS als Negativkontrolle und ein Konstrukt mit den ersten 63 AS, das möglichst die ganze *Targeting*-Sequenz enthalten sollte, verwendet. Mit den gleichen Konstrukten und mit Mitotracker, einem fluoreszierenden

Vitalfarbstoff, der selektiv Mitochondrien markiert, wurde zudem die Lokalisation des GFP-Fusionsproteins in Mitochondrien beobachtet (Kap. 3.2.4, Abb. 3.15). Die Deletion des vorhergesagten N-terminalen Transportsignals verhinderte den Transport in beide Organellen. Im Gegensatz dazu führte die Fusion der *Targeting*-Sequenz mit GFP zu einem Transport in Mitochondrien und Chloroplasten. Daher kann angenommen werden, dass der Transport in beide Organellen spezifisch ist und hierfür die ersten 63 Aminosäuren ausreichen. Oft werden Lokalisationsanalysen in aus Tabak isolierten Protoplasten durchgeführt, da diese größer sind und deshalb die Beobachtung erleichtern. In der vorliegenden Arbeit wurden die *in vivo* Lokalisationsstudien im homologen System durchgeführt. Da diese Versuche mit überexprimierten GFP-Fusionen durchgeführt wurden, stellt sich die Frage, ob die Überexpression oder die Fusion mit GFP evtl. zu falschen Resultaten führen könnte. Laut Peeters und Small (2001) sind bisher bei Kontroll-GFP-Fusionen noch keine falschen Lokalisationen aufgetreten.

Es wurden keine *in vitro* Importstudien an isolierten Mitochondrien durchgeführt, da Cleary *et al.* (2002) gezeigt haben, dass isolierte Pflanzenmitochondrien Chloroplasten-Vorläuferproteine mit der gleichen Effizienz transportieren können wie Chloroplasten.

Mit den bisherigen Untersuchungen konnte noch nicht festgestellt werden, in welchem Kompartiment der Chloroplasten bzw. Mitochondrien At-cry3 lokalisiert ist. SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), ein Programm zur Vorhersage von Signalsequenzen für den sekretorischen Weg, kann auch Thylakoidsignale vorhersagen. In der Signalsequenz ist – nach diesem Programm zu urteilen – kein solches Signal vorhanden. Da At-cry3 DNA bindet, ist eine Nukleoid-Assoziierung in Mitochondrien und Chloroplasten möglich. Dafür müsste At-cry3 jeweils in der Matrix bzw. im Stroma lokalisiert sein.

Eisenberg und Mitarbeiter (Marcotte *et al.*, 2000) benutzen zur Vorhersage der Lokalisation eines Proteins interessanterweise eine Methode, die auf phylogenetischen Analysen beruht. Sie nehmen an, dass der endosymbiontische Ursprung der Proteine, die in Chloroplasten und Mitochondrien lokalisiert sind, im phylogenetischen Profil ihrer jeweiligen Gensequenzen reflektiert wird. D. h., dass Proteine, die verwandt sind zu Proteinen aus Bakterien wie *Rickettsia prowasekii*, die als Vorläufer der Mitochondrien gelten, mit hoher Wahrscheinlichkeit in Mitochondrien zu finden sein sollen, während Chloroplastenproteine am nächsten verwandt zu denen aus photosynthetischen Bakterien sein sollen. Mit über 50 % Identität des Chloroplasten-lokalisierten At-cry3 zu *Synechocystis cry* ist für At-cry3 eine solch hohe Verwandtschaft zu einem cyanobakteriellen Protein gegeben.

Frühere Studien zur intrazellulären Lokalisation von Cryptochromen in Pflanzen zeigten, dass *Arabidopsis cry2* überwiegend im Zellkern zu finden ist (Guo *et al.*, 1999, Kleiner *et al.*,

1999b). Die cry1-GUS-Fusion wurde in dunkel gewachsenen *Arabidopsis*-Pflanzen im Zellkern, im Licht aber im Cytosol gefunden (Yang *et al.*, 2000). Es wurde gezeigt, dass *Adiantum* CRY1, CRY2 und CRY5 cytosolisch und CRY3 und CRY4 nukleäre Proteine sind (Imaizumi *et al.*, 2000). Lokalisationsstudien an Maus cry1 zeigten, dass dieses Protein in den Zellkern und in Mitochondrien transportiert wird (Kobayashi *et al.*, 1998). Die Lokalisation eines Cryptochrom-ähnlichen Proteins in Chloroplasten und Mitochondrien, wie sie hier für At-cry3 gefunden wurde, ist bislang nicht beschrieben worden. Sollte der definitive Beweis geführt werden, dass At-cry3 für ein Cryptochrom kodiert, wäre dies der erste Nachweis eines Chloroplasten-lokalisiereten Cryptochroms.

Allen in dieser Arbeit untersuchten GFP-Konstrukten (Volllänge, N-terminale Deletion und *Targeting*-Sequenz) ist gemeinsam, dass sie auch im Zellkern zu finden waren (Kap. 3.2.4; Abb. 3.15 A für die Zellkern-Lokalisation von N-terminaler Deletion und *Targeting*-Sequenz). Im Falle der Fusion aus GFP mit der *Targeting*-Sequenz von At-cry3 könnte dies aufgrund der geringen Größe des Fusionsproteins mit Diffusion durch die Kernpore erklärt werden. Die beiden anderen Fusionsproteine sind jedoch zu groß, um auch hier mit Diffusion argumentieren zu können. Es ist schwierig, eine Vorhersage über eine putative Kernlokalisationssequenz in At-cry3 zu machen, da solche Sequenzen nicht streng konserviert sind. In der „predictNLS“-Datenbank (<http://cubic.bioc.columbia.edu/predictNLS>; Cokol *et al.*, 2000) konnte für At-cry3 keine Kernlokalisationssequenz gefunden werden. Die Aminosäuresequenz PKEKRHW im C-Terminus (AS 525-531) von At-CRY3 könnte jedoch eine Kernlokalisationssequenz sein.

4.2.2 Wie kodiert ein *At-CRY3*-Transkript für Proteine mit zwei unterschiedlichen Lokalisationen?

Es gibt im Wesentlichen zwei Möglichkeiten, wie ein einziges Gen für ein Protein kodieren kann, das in zwei Kompartimente transportiert wird. Die erste Möglichkeit ist das Vorkommen eines Zwillingssignalpeptids. Bei dieser Möglichkeit werden alternative Transkriptions- oder Translationsstarts oder alternatives Exonsplicing benutzt. So entstehen zwei Proteine mit unterschiedlichen Signalpeptiden, die dann entweder in Mitochondrien oder in Chloroplasten transportiert werden. Alternatives Exonsplicing kann für At-cry3 ausgeschlossen werden, da die ersten 63 AS für einen Import sowohl in Chloroplasten als auch Mitochondrien ausreichen und sich innerhalb dieser ersten 63 AS kein Intron befindet. *At-CRY3* wurde durch RT-PCR kloniert; dabei entstand nur ein DNA-Produkt. Auch bei der *in vitro* Synthese des At-cry3 Proteins wurde nur ein Produkt detektiert. Zudem gibt es erst an AS-Position 44 ein zweites mögliches Start-Methionin. Obwohl ein Mechanismus wie eben geschildert nicht

vollständig ausgeschlossen werden kann, könnte in diesem Fall eher die zweite Möglichkeit, nämlich das Vorhandensein einer zweideutigen *Targeting*-Sequenz, zutreffen. Diese Sequenzen besitzen eine Mischung aus Signalen und werden als Importsignal von Chloroplasten- und Mitochondrien-Importmaschinerien erkannt. In Peeters und Small (2001) sind etwa 20 Beispiele solcher Gene beschrieben. Die Analyse solcher Sequenzen hat ergeben, dass diese Sequenzen meist wenig negative Aminosäuren (Aspartat, D und Glutamat, E), viele Arginine und Serine und gehäuft Phenylalanine oder Leucine besitzen. Diese Merkmale treffen auf die N-terminale *Targeting*-Sequenz von *At-cry3* zu.

4.2.3 *At-cry3* ist ein Flavoprotein

Alle bisher identifizierten Blaulichtrezeptoren aus Pflanzen sind Flavoproteine, die entweder FAD (Cryptochrome) oder FMN (Phototropine) als Chromophor tragen (Übersichtsartikel: Fankhauser und Staiger, 2002; Quail, 2002). Heterolog in *E. coli* exprimiertes *At-cry3* bindet ebenfalls FAD als Chromophor (Kap. 3.2.5, Abb. 3.17 und Abb. 3.19). Wie für das *Synechocystis* Cryptochrom (Hitomi *et al.*, 2000; Brudler *et al.*, 2003) wurde kein zweiter Chromophor gefunden. Dies könnte daran liegen, dass ein möglicher zweiter Chromophor nicht in *E. coli* synthetisiert wird oder dass er während der Aufreinigung verloren gegangen ist. Für Cryptochrome aus *Arabidopsis* (Malhotra *et al.*, 1995) und Mensch (Hsu *et al.*, 1996; Özgür und Sancar, 2003) wurde gezeigt, dass sie MTHF als zweiten Kofaktor binden. MTHF kann in *E. coli* synthetisiert werden, und Malhotra *et al.* (1995) konnten durch heterologe Expression in *E. coli* auch MTHF als zweiten Kofaktor in *Arabidopsis cry1* und *Sinapis alba cry* nachweisen. Für die heterolog in *E. coli* exprimierte *Arabidopsis* Klasse-II-CPD-Photolyase wurde ebenso kein zweiter Kofaktor gefunden. Aufgereinigt aus *Arabidopsis*-Blättern trägt diese Photolyase jedoch MTHF als zweiten Kofaktor (Waterworth *et al.*, 2002). *Synechocystis cry* und *At-cry3* besitzen nur fünf der zwölf Aminosäuren, die an der 8-HDF-Bindung in der *Synechococcus* Photolyase (Tamada *et al.*, 1997) beteiligt sind, und eine von sieben Aminosäuren, die an der MTHF-Bindung in der *E. coli* Photolyase (Park *et al.*, 1995) beteiligt sind. Dies legt nahe, dass *At-cry3* und *Synechocystis cry* einen anderen zweiten Kofaktor tragen, oder in diesen Cryptochromen ein zweiter Kofaktor fehlt, obwohl die Struktur von *Synechocystis* Cryptochrom ausreichend Platz für die Bindung eines zweiten Chromophors lässt. Die Frage nach einem zweiten Chromophor kann letztlich nur durch Aufreinigung von *At-cry3* aus *Arabidopsis* geklärt werden.

4.2.4 *At-CRY3* kodiert keine Photolyase

Aus der Aminosäuresequenz von *At-CRY3* kann nicht eindeutig geschlossen werden, ob es sich um eine Photolyase oder um ein Cryptochrom handelt. Das Fehlen einer C-terminalen Domäne ist kein starkes Argument gegen eine Cryptochromfunktion, da dem Farn-Cryptochrom *AcCRY5* (Imaizumi *et al.*, 2000) auch eine C-terminale Extension fehlt. Auch gibt es ein Protein aus Senf, das Homologie zu Photolyase/Cryptochrom besitzt (Batschauer, 1993), aber keine Photolyase kodiert (Malhotra *et al.*, 1995) und dem die C-terminale Extension fehlt. Klasse-I-CPD-Photolyasen wurden intensiv untersucht, und einige Aminosäuren wurden identifiziert, die entweder für die Katalyse oder die Kofaktor-Aktivierung essenziell sind (Übersichtsartikel: Sancar, 2000). *At-cry3* besitzt einige dieser Aminosäuren (z. B. Trp306, Trp359, Trp382; Nummerierung nach den Positionen in der *Saccharomyces cerevisiae* Photolyase). Jedoch erlaubt die Anwesenheit dieser „Signatur“-Aminosäuren keine Vorhersage der Photolyasefunktion wie aus Sequenzvergleichen der Photolyase/Cryptochrom-Familie hervorgeht (Yasui und Eker, 1998; Kobayashi *et al.*, 2000). Durch Lösung der Struktur von *Synechocystis cry* (Brudler *et al.*, 2003) und vorhandener Klasse-I-CPD-Photolyasestrukturen (Komori *et al.*, 2001; Park *et al.*, 1995; Tamada *et al.*, 1997) konnten strukturelle Unterschiede zwischen Photolyasen und Cryptochromen festgestellt werden. So ist z. B. im *Synechocystis cry* das Trp384 der Photolyasen durch Tyr398 ersetzt. Dadurch sind potenzielle Van-der-Waals-Interaktionen mit einem Photodimer reduziert. Die funktionelle Bedeutung des Trp384 wurde durch 100fachen Aktivitätsverlust der Photoproduktreparatur infolge einer niedrigeren Aktivität zum Substrat in einer *E. coli* W384F Mutante unterstrichen (Li *et al.*, 1991). Auch in *At-CRY3*, wie in den Cryptochromen aus *Arabidopsis*, *Adiantum* und Tomate, ist Trp384 durch ein Tyr ersetzt. Das kann, muss aber nicht, auf fehlende Photolyasefunktion hindeuten.

At-cry3 wurde in zwei verschiedenen Versuchsansätzen auf Photolyasefunktion *in vitro* und *in vivo* getestet. Die Daten aus Kap. 3.2.6, Abb. 3.21 und Abb. 3.22 sprechen stark gegen eine Photolyasefunktion von *At-cry3*. CPDs im Zellkern und in Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* können effizient repariert werden (Prakash, 1975), und in den Chloroplasten von *Chlamydomonas* findet Photoreaktivierung statt (Small und Greimann, 1977). Jedoch konnte Photolyaseaktivität bisher nicht in Chloroplasten dikotyler Pflanzen detektiert werden (Hada *et al.*, 2000); Britt und Mitarbeiter konnten weder in Mitochondrien noch in Chloroplasten von *Arabidopsis*-Keimlingen signifikante CPD-Reparatur detektieren (Chen *et al.*, 1996). Deshalb wird keine Photolyase in *Arabidopsis*-Mitochondrien oder -Chloroplasten erwartet. Hitomi *et al.* (2001) haben in einer (6-4)-Photolyase gezielt hochkonservierte Aminosäuren ausgetauscht. Ein L355A-Austausch hatte eine niedrigere

Affinität zum (6-4)-Photoprodukt, und H354A- und H358A-Mutationen resultierten in einem Verlust der Reparaturaktivität. Sowohl His354, Leu355 und His358 sind in der At-CRY3 AS-Sequenz nicht konserviert. Auf einen *in vitro* Assay für (6-4)-Photolyaseaktivität wurde aufgrund dieser Datenlage verzichtet.

4.2.5 At-cry3 bindet DNA

Neben dem Transport in Organellen und der FAD-Bindung konnte in der vorliegenden Arbeit auch gezeigt werden, dass At-cry3 DNA bindet (Kap. 3.2.7, Abb. 3.23). Interessanterweise wurde für cry2 aus Maus (Kobayashi *et al.*, 1998) und kürzlich für cry aus *Synechocystis* (Brudler *et al.*, 2003) und cry2 aus dem Menschen (Özgür und Sancar, 2003) ebenfalls DNA-Bindung nachgewiesen. Dies lässt vermuten, dass die DNA-Bindung ein wichtiges konserviertes Merkmal in Cryptochromen von Organismen aus allen Reichen ist. Außerdem ist das Binden der Cryptochrome an DNA nicht sequenzspezifisch, wie für At-cry3 (Kap. 3.2.7, Abb. 3.23), *Synechocystis cry* (Brudler *et al.*, 2003), Maus cry2 (Kobayashi *et al.*, 1998) und Mensch cry2 (Özgür und Sancar, 2003) gezeigt wurde. Photolyasen besitzen neben ihrer hohen Affinität zu UV-B-Photoprodukten eine niedrigere Affinität zu ungeschädigter DNA, die sequenzunspezifisch ist (Li und Sancar, 1990). Es scheint, dass dieses letztere Merkmal der DNA-Photolyasen in den verwandten Cryptochromen konserviert ist. Brudler *et al.* (2003) haben für die DNA-Bindung von *Synechocystis cry* eine ähnliche Dissoziationskonstante gefunden wie die der *E. coli* Photolyase an ungeschädigte DNA (Li und Sancar, 1990). Photolyasen ohne FAD-Kofaktor sind nicht mehr fähig, geschädigte DNA zu binden (Übersichtsartikel: Sancar, 1994; Sancar, 2000). Auch wenn Photolyasen offensichtlich ohne den FAD-Kofaktor unspezifisch DNA binden können (Malhotra *et al.*, 1992), wurde das für den Nachweis der At-cry3-DNA-Bindung benötigte At-cry3 in Anwesenheit von FAD synthetisiert. Aufgrund der geringen Mengen des Translationsprodukts konnte eine Bindung von FAD an das Protein nicht nachgewiesen werden. So ist bisher nicht bekannt, ob FAD für die At-cry3-DNA-Bindung benötigt wird. Die DNA-Bindung von At-cry3 wurde deshalb mit *in vitro* transkribiertem/translatiertem At-cry3 Protein durchgeführt, weil At-cry3 bislang nicht bis zur Homogenität gereinigt werden konnte und bei Lagerung ausfiel.

4.2.6 Die *Arabidopsis* Cryptochrome: Ein Beispiel für dualen horizontalen Gentransfer

Cryptochrome wurden in Pflanzen (Übersichtsartikel: Lin, 2002), in Tieren einschließlich Mensch (Übersichtsartikel: van Gelder, 2002) und in Cyanobakterien (eigene Daten; Brudler *et al.*, 2003) gefunden. Sequenzvergleiche haben gezeigt, dass die Pflanzencryptochrome mit den Klasse-I-CPD-Photolyasen am nächsten verwandt sind, hingegen tierische Cryptochrome enger mit (6-4)-Photolyasen gruppieren. Dies führte zu der Vorstellung, dass sich Pflanzen- und Tiercryptochrome unabhängig voneinander entwickelt haben könnten (Cashmore *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 2000). Cashmore und Mitarbeiter vermuten auch, dass sich die Cryptochrome erst nach Erscheinen der Eukaryoten entwickelten. Kanai *et al.* (1997) hingegen schlossen aus Sequenzvergleichen von Photolyasen und Cryptochromen, dass sich Cryptochrome von Photolyasen vor der Entstehung der Eukaryoten getrennt haben könnten. Die Entdeckung des bakteriellen Cryptochroms aus *Synechocystis* (Brudler *et al.*, 2003) stützt letztere These. Brudler *et al.* (2003) gruppieren das *Synechocystis* cry in eine neue Cryptochrom-Klasse (CRY DASH), die Mitglieder aus *Drosophila*, *Arabidopsis* (At-CRY3), *Synechocystis* und Mensch (*Homo sapiens*) enthält. Unsere Hypothese jedoch ist, dass Pflanzen ihre Cryptochrome durch einen dualen horizontalen Gentransfer von erstens einem Cyanobakterium-ähnlichen Endosymbionten, aus dem sich später Chloroplasten entwickelt haben (Übersichtsartikel: Cavalier-Smith, 2002; McFadden, 2001), und zweitens von α -Proteobakterien, die als Vorläufer der Mitochondrien gesehen werden (Übersichtsartikel: Gray, 2001), erhalten haben. Ein horizontaler Gentransfer wurde z. B. auch für Phytochrome vorgeschlagen, da verwandte Photorezeptoren in Cyanobakterien wie *Synechocystis* entdeckt wurden (Hughes *et al.*, 1997; Yeh *et al.*, 1997). *Arabidopsis* CRY1 und CRY2 haben nur 20 % Identität mit *Synechocystis* CRY, At-CRY3 mit *Synechocystis* CRY aber ca. 50 % Identität. Ein phylogenetischer Baum, der etwa 70 Photolyase/Cryptochrom-Sequenzen von Spezies aus allen Reichen einschließt (Kap. 3.2.9, Abb. 3.26), zeigt deutlich diese Distanz. Unsere Analyse gibt keine Evidenz dafür, CRY1 und CRY2 mit *Synechocystis* Cryptochrom zu gruppieren, im Gegensatz zu At-CRY3. Es ist deshalb unwahrscheinlich, dass CRY1 und CRY2 aus CRY3 oder von einem cyanobakteriellen Vorläufer entstanden sind, oder dass sich CRY3 aus CRY1 oder CRY2 entwickelt hat. Unser Stammbaum legt nahe, dass pflanzliche Cryptochrome der CRY1/CRY2-Familie mit Sequenzen aus α -Proteobakterien am nächsten verwandt sind. Da α -Proteobakterien, wie oben schon angesprochen, als Vorläufer der Mitochondrien angesehen werden (Gray *et al.*, 2001), kann vermutet werden, dass Pflanzen ihre Cryptochrome durch horizontalen Gentransfer zweier unabhängiger Ereignisse erhalten

haben: die eine Klasse (*CRY1* und *CRY2*) von α -Proteobakterien, die andere Klasse (*CRY3*) von Cyanobakterien.

4.2.7 *At-cry3* kann die *Synechocystis cry* Mutante nicht komplementieren

In dem dargestellten Zusammenhang der Evolution pflanzlicher Cryptochrome wäre es interessant herauszufinden, ob *At-cry3* mit *Synechocystis cry* auch funktionell noch so nah verwandt ist, dass *Synechocystis cry* durch *At-cry3* ersetzt werden kann. Hierzu sollten Konstrukte hergestellt werden, die im *Synechocystis* Wildtyp die kodierende Region von *sll1629* bzw. in der *cry* Mutante die Kanamycin-Resistenzcassette mit der flankierenden *sll1629*-Sequenz durch entweder die kodierende Region von Vollängen *At-cry3* (AS 1-569) oder von *At-cry3* ohne Signalsequenz (AS 40-569) ersetzen (Kap. 3.2.8, Abb. 3.24). Diese Konstrukte sollten in *Synechocystis* Wildtyp und *cry* Mutante transformiert werden. Das erste Konstrukt wurde schon fertig gestellt und damit *cry* Mutante und Wildtyp transformiert. Eine Komplementation der Induzierbarkeit der *psbA3* Induktion in Antwort auf UV-A wurde bisher nur in der *cry* Mutante versucht (Kap. 3.2.8). Denn die Insertion der kodierenden Region für *At-cry3* ist zwar am richtigen Ort erfolgt, aber die Segregation war weder in der *cry* Mutante noch im Wildtyp vollständig durchgesetzt. Der Versuch der *cry*-Mutanten-Komplementation ist bislang nicht positiv verlaufen. Da zu erwarten wäre, dass in den segregierenden Linien *At-cry3* Protein gebildet wird, sollte dieses bei bestehender funktioneller Austauschbarkeit von *Synechocystis cry* und *At-cry3* die Induktion von *psbA3* vermitteln. Ein Nachweis der Expression von *At-cry3* in *Synechocystis* steht jedoch noch aus. Eine weitere Komplikation besteht darin, dass in dem bislang fertig gestellten Konstrukt die *Targeting*-Sequenz von *At-cry3* vorhanden ist, was zu einer fehlgeleiteten Lokalisation des Proteins führen könnte. Beispielsweise wurde ein Protein, das im Lumen von Höheren-Pflanzen-Plastiden vorkommt, in *Synechococcus* sp. PCC 7942 in der cytoplasmatischen Membran und in den Thylakoiden gefunden (Smith *et al.*, 1992). Mackle und Zilinskas (1994) haben festgestellt, dass die Transportmaschinerie der Zellhülle von Cyanobakterien viele Signalpeptide unterschiedlicher Länge und Sequenz erkennen kann.

4.2.8 Wozu ein drittes Cryptochrom in *Arabidopsis*?

Bislang ist noch kein direkter Beweis dafür erbracht worden, dass *At-cry3* ein Photorezeptor ist. Wegen der hohen Ähnlichkeit mit *Synechocystis sll1629*, für das wir und andere (Brudler *et al.*, 2003) Cryptochromfunktion gezeigt haben, der Anwesenheit von FAD als Chromophor (Kap. 3.2.5, Abb. 3.17 und Abb. 3.1.9) und der Abwesenheit von Photolyaseaktivität ist dies

aber wahrscheinlich. Arbeiten in dieser Richtung werden derzeit in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

Wie gezeigt, wird At-cry3 in Chloroplasten und Mitochondrien transportiert (Kap. 3.2.2, Abb. 3.13 und Kap. 3.2.3, Abb. 3.14 und Abb. 3.15). Wenn At-cry3 tatsächlich für ein Cryptochrom kodieren würde, welche Funktion könnte dieses Protein in *Arabidopsis*-Chloroplasten und -Mitochondrien ausüben?

Zunächst sollen einige Beispiele für noch nicht gänzlich aufgeklärte Lichteffekte auf den Chloroplasten bzw. die Chloroplasten-Genexpression genannt werden: Es wurde gezeigt, dass *Arabidopsis cry1* und *cry2* in der lichtregulierten Expression von Genen aus Chloroplasten involviert sind (Thum *et al.*, 2001). Die blaulichtaktivierte Transkriptionsaktivität war in der *cry1 cry2* Doppelmutante jedoch nicht vollständig blockiert. In *Arabidopsis*-Blättern sind Blaulicht und UV-A die dominanten Signale, die insbesondere die *psbA*, *rbcL* und 16S *rrn* Transkription aktivieren (Chun *et al.*, 2001). Die Signalwege sind bisher nur ansatzweise aufgeklärt. Phytochrome und Cryptochrome scheinen daran beteiligt. Es wäre interessant herauszufinden, ob At-cry3 hier ebenfalls eine Rolle spielt, zumal *Synechocystis cry* an der UV-A- und Blaulicht-regulierten *psbA* Induktion beteiligt ist (Kap. 3.1.5, Abb. 3.9). Weston *et al.* (2000) untersuchten den Effekt von Lichtquantität auf *Arabidopsis*-Blatzellen- und Chloroplasten-Entwicklung in Wildtyp, *cry1*, *cry2*, *cry1 cry2* und *nph1* Mutanten. Doch die getesteten Antworten, wie z. B. eine Vergrößerung des Palisadenparenchyms oder eine erhöhte Stärkeakkumulierung, weniger Grana-Thylakoide und eine Akkumulierung der Lhcb Polypeptide im Chloroplasten, zeigten in den Mutanten keinen Unterschied zum Wildtyp. Hier könnte die funktionelle Redundanz der Photorezeptoren und/oder At-cry3 eine Rolle spielen.

Somit gibt es zahlreiche Lichteffekte in Chloroplasten, an denen At-cry3 theoretisch beteiligt sein könnte. Doch welche Funktion könnte At-cry3 in Mitochondrien haben? In den Mitochondrien der meisten Eukaryoten wird NADH durch den rotenonsensitiven Komplex I der Atmungskette oxidiert. In Pflanzenmitochondrien kommen an der zur Matrix gerichteten inneren Mitochondrienmembran noch andere, rotenoninsensitive NADH- und NADPH-Dehydrogenasen vor (Rasmusson und Møller, 1991). Deren physiologische Funktionen sind zum größten Teil noch unbekannt. Svensson und Rasmusson (2001) haben gezeigt, dass die Expression einer rotenoninsensitiven NADH-Dehydrogenase aus der Kartoffel, Nad1, streng lichtreguliert ist. Außerdem wird Nad1 diurnally mit höchster Expression am Morgen exprimiert. Nad1 besitzt ein Homologes in *Arabidopsis* (At5g37510). Die lichtabhängige Expression wurde noch nicht daraufhin untersucht, welche Lichtqualitäten wirksam sind. Hier könnte ein UV-A/Blaulichtrezeptor eine Rolle spielen. Die alternative NADH-Dehydrogenase besitzt im Gegensatz zu Komplex I die Fähigkeit, Superoxid-Radikale (SOR) zu produzieren

(Fang und Beattie, 2002). Kürzlich wurde postuliert, dass durch eine NADPH-Oxidase aus *Arabidopsis* (At5g51060) produzierte reaktive Sauerstoffradikale (*reactive oxygen species*; ROS) für einen Ca^{2+} -Influx während des Wurzelhaarwachstums und für das Wachstum anderer Zelltypen notwendig sind, und somit diese NADPH-Oxidase das Zellwachstum reguliert (Foreman *et al.*, 2003). Es ist noch nichts über eine Lichtregulation dieses Gens bekannt.

Im Zusammenhang mit der At-cry3-Lokalisation ist die Signaltransduktion zwischen Chloroplast und Nukleus interessant (Übersichtsartikel: Surpin *et al.*, 2002). Diese scheint durch den Chlorophyll-Vorläufer Mg-Protoporphyrin IX (Mg-Proto) und seinem Monomethylester (Mg-ProtoMe) vermittelt zu werden (Kropat *et al.*, 1997). Mg-Proto und/oder Mg-ProtoMe werden lichtinduziert aus dem Chloroplasten transportiert und könnten durch *cis*-Elemente die Transkription von Zellkern-Genen aktivieren (Kropat *et al.*, 2000). Möglich wäre eine Beteiligung von At-cry3 an der Lichtsignaltransduktion zwischen Chloroplast und Zellkern. Zusätzlich zur Chloroplasten- und Mitochondrienlokalisierung konnte die At-cry3-GFP-Fusion auch im Zellkern beobachtet werden (Kap. 3.2.4; Abb. 3.15 A für die Zellkern-Lokalisation des N-terminalen At-cry3-Deletionsproteins). Ma *et al.* (2001) haben die durch Cryptochrome regulierte Genexpression in *Arabidopsis* mit DNA-*microarrays* untersucht. 28 % der untersuchten ESTs sind in Antwort auf Blaulicht entweder hoch- oder runterreguliert. 37 % der 28 % sind durch eine *cry1 cry2* Mutation oder eine *cry1*-Überexpression beeinflusst. Es ist möglich, dass die restlichen zwei Drittel der Gene, deren Expression durch Blaulicht beeinflusst ist, redundant durch Cryptochrome, Phototropine und Phytochrome reguliert sind, oder dass At-cry3 hier eine zusätzliche Rolle spielt.

Zusammengefasst zeigen diese Beispiele, dass es zahlreiche Blaulicht-gesteuerte Prozesse in Pflanzen gibt, die noch nicht restlos aufgeklärt sind, und an denen At-cry3 als Photorezeptor beteiligt sein könnte.

5 Ausblick

Die Charakterisierung cyanobakterieller Cryptochrome steht mit den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen und denen von Brudler *et al.* (2003) erst am Anfang. Vermutlich arbeiten cyanobakterielle Cryptochrome in Analogie zu pflanzlichen Cryptochromen mit anderen Photorezeptoren, insbesondere Rotlichtrezeptoren, zusammen. Entsprechend sollten zukünftige Arbeiten verstärkt Analysen der Interaktion dieser Photorezeptoren einschließen. Es ist möglich, dass in Cyanobakterien neben den Cryptochromen weitere Blaulichtrezeptoren existieren. Da insbesondere *Synechocystis* ein idealer Organismus für gezielte Mutagenese ist, könnten ORFs, die für putative Blaulichtrezeptoren kodieren, unterbrochen und die Funktion der durch diese ORFs kodierten Proteine, wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, aufgeklärt werden.

Bisher wurden in *Arabidopsis* vier Mitglieder der Photolyase/Cryptochrom-Familie beschrieben und charakterisiert: CRY1, CRY2 (Übersichtsartikel: Lin, 2002), eine Klasse-II-CPD-Photolyase (Ahmad *et al.*, 1997; Kleiner *et al.*, 1999a) und eine (6-4)-Photolyase (Nakajima *et al.*, 1997). Bei dem in dieser Arbeit und in der daraus entstandenen Veröffentlichung (Kleine *et al.*, 2003, Plant Journal, akzeptiert) beschriebenen At-cry3 handelt es sich auch deshalb um ein ungewöhnliches Cryptochrom, weil es in Organellen lokalisiert ist. In künftigen Arbeiten sollte geklärt werden, wo in den Organellen At-cry3 lokalisiert ist. Dies könnte Hinweise auf dessen Funktion liefern. Die nach *particle gun* Beschuss von Blättern beobachtete Lokalisation des At-cry3-GFP in Organellen und dem Zellkern sollte hinsichtlich der Kernlokalisierung durch immunologische Nachweisverfahren abgesichert werden. Bei Bestätigung einer zusätzlichen Kernlokalisierung von At-cry3 sollte dessen dortige Funktion geklärt werden, z. B. durch gerichtete Mutagenese der NLS, die zuvor durch weitere At-cry3-GFP-Kokolokalisationsstudien identifiziert werden müsste.

Derzeit wird in unserer AG die organspezifische und lichtabhängige Expression von At-cry3 auf RNA-Ebene analysiert. Diese Untersuchungen sollten auf Proteinebene ausgeweitet werden. Auch diese Daten könnten weitere Hinweise auf die Funktion von At-cry3 liefern.

Sowohl in *E. coli* heterolog exprimiertes *Synechocystis* cry als auch At-cry3 tragen FAD als nicht kovalent gebundenen Kofaktor. Ein zweiter Kofaktor konnte bei beiden Proteinen bislang nicht detektiert werden. Da für Cryptochrome ein zweiter Kofaktor beschrieben wurde, sollte die Kofaktor-Analyse der hier beschriebenen Cryptochrome zusätzlich an Proteinen durchgeführt werden, die im homologen System exprimiert wurden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass At-cry3 sequenzunspezifisch doppel- und einzelsträngige DNA binden kann. Die At-cry3 DNA-Bindung sollte in weitergehenden Experimenten untersucht werden. Um erste Ereignisse der Cryptochrom-Signaltransduktion aufzuklären, wäre es z. B. sinnvoll zu klären, ob die DNA-Bindung lichtgesteuert ist.

At-cry3 kann in relativ großer Menge in *E. coli* produziert werden. Da zudem die Aufreinigung des heterolog exprimierten At-cry3 über Affinitätschromatographie möglich ist, gibt dies Anlass zur Hoffnung, dass auch pflanzliche Cryptochrome strukturellen Analysen auf atomarer Ebene zugänglich sind. *Adiantum* CRY5 (Imaizumi *et al.*, 2000) und *Sinapis* cry (Batschauer, 1993) besitzen keinen C-Terminus. Es wurde aber gezeigt, dass der C-Terminus eine wichtige Funktion in der Signaltransduktion pflanzlicher Cryptochrome hat (Ahmad *et al.*, 1998b; Jarillo *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001, Yang *et al.*, 2000). Bislang wurden für das *Adiantum* und das *Sinapis* Protein noch keine Funktionen beschrieben. Domänenfusionen aus At-cry3 und aus C-Termini charakterisierter Cryptochrome könnten darüber Auskunft geben, wie das im N-terminalen Bereich empfangene Lichtsignal auf den C-Terminus übertragen wird.

Wegen der fehlenden Photolyasefunktion von At-cry3 ist es wahrscheinlich, dass es ein weiteres Cryptochrom in *Arabidopsis* darstellt. Die nicht vorhandene C-terminale Extension kann nicht als Argument gegen eine Cryptochromfunktion gewertet werden, da auch dem zu At-cry3 homologen *Synechocystis* cry (diese Arbeit; Brudler *et al.*, 2003) eine C-terminale Extension fehlt. Dennoch ist der Nachweis einer Cryptochromfunktion von At-cry3 bisher noch nicht erbracht. Die Funktionsaufklärung von At-cry3 könnte durch die in unserer AG bereits begonnenen Analysen von T-DNA getaggen Linien und reverse genetische Ansätze gelingen. Die hohe Sequenzähnlichkeit von At-cry3 und *Synechocystis* cry lässt vermuten, dass beide eine ähnliche Funktion haben könnten. Um dies herauszufinden, sollte die Möglichkeit einer Komplementation der *Synechocystis* cry Mutante durch At-cry3 weiter verfolgt werden.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Photolyase/Cryptochrom-homologe Proteine (*cry* und *phr*) aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 und ein neues Cryptochrom (*At-cry3*) aus der Höheren Pflanze *Arabidopsis thaliana* charakterisiert.

Synechocystis CRY liegt mit ORF sll1628 und ORF sll1630 in einem Operon. Die durch sll1628 kodierte Aminosäuresequenz besitzt eine schwache Homologie zu einem TPR (*tetratricopeptide repeat*)-Domänen Protein; die sll1630 Aminosäuresequenz ist zu keinem bekannten Protein homolog. Für das in *E. coli* heterolog exprimierte *Synechocystis cry* konnte nachgewiesen werden, dass es nicht kovalent FAD bindet. Die *phr* und *cry* Mutanten zeigten hinsichtlich Wachstum und Pigmentzusammensetzung weder unter photoautotrophen und heterotrophen Wachstumsbedingungen noch im Dauer-Blau- oder -Rotlicht einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp.

Im UV-B ist in der *cry* Mutante im Gegensatz zur *phr* Mutante und dem Wildtyp die *de novo* Synthese für das D1 Protein des Photosystem II nicht induziert. In der *cry* Mutante ist ferner die Phototaxis zum Rot- und Dunkelrotlicht reduziert. Mittels quantitativer RT-PCR-Analysen wurde die lichtabhängige Induktion der Transkription des *psbA3* Gens, das für das Photosystem II D1 Protein kodiert, über einen großen Spektralbereich und beim Wechsel von niedriger zu hoher Fluenzrate untersucht. Unter den gewählten Lichtbedingungen ist mit Ausnahme von Dunkelrot in der *cry* Mutante die *psbA3* Induktion abgeschwächt, besonders drastisch im UV-A-Bereich. Somit wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass sll1629 für ein Cryptochrom kodiert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Protein At5g24850 (*At-cry3*) aus *Arabidopsis thaliana* untersucht. *At-cry3* ist 569 Aminosäuren groß und besitzt über einen Bereich von 400 Aminosäuren ca. 50 % Identität zu *Synechocystis cry*. Durch *in vitro* Import und GFP-Lokalisationsstudien wurde nachgewiesen, dass die N-terminalen 63 Aminosäuren von *At-cry3* notwendig und hinreichend für den Import dieses Proteins sowohl in Mitochondrien als auch in Chloroplasten sind. *At-cry3* wurde als His-tag-Fusion heterolog in *E. coli* überexprimiert. Spektroskopische Analysen zeigten, dass *At-cry3* nicht kovalent FAD bindet. Weder spektroskopisch noch mit Dünnschichtchromatographie konnte ein zweiter Kofaktor nachgewiesen werden. Durch Expression von *At-cry3* in einem Photolyase-defizienten *E.-coli*-Stamm und *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass *At-cry3* keine Photolyaseaktivität besitzt. Ferner zeigten *in vitro* DNA-Bindungsstudien, dass *At-cry3* sequenzunspezifisch an einzel- und doppelsträngige DNA bindet. Die Frage, ob *At-cry3* eine

Mutation in *Synechocystis cry* komplementieren kann, kann mit den vorliegenden Daten noch nicht abschließend beantwortet werden. In Zusammenarbeit mit unserer AG hat Peter Lockhart, Massey University, New Zealand, einen Stammbaum mit über 70 Mitgliedern der Photolyase/Cryptochrom-Familie erstellt. Dieser deutet an, dass Pflanzen ihre Cryptochrome durch einen dualen horizontalen Gentransfer erhalten haben könnten: das *CRY3* Gen von Cyanobakterien, den Vorläufern der Plastiden, Gene der *CRY1/CRY2*-Familie von α -Proteobakterien, den Vorläufern heutiger Mitochondrien.

7 Literaturverzeichnis

Ahmad, M. (1999) Seeing the world in red and blue: insight into plant vision and photoreceptors. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 230-235.

Ahmad, M. und Cashmore, A. R. (1996) Seeing blue: the discovery of cryptochrome. *Plant Mol Biol* **30**, 851-861.

Ahmad, M. und Cashmore, A.R. (1997) The blue-light receptor cryptochrome 1 shows functional dependence on phytochrome A or phytochrome B in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **11**, 421-427.

Ahmad, M. und Cashmore, M. (1993) *HY4* gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* **366**, 162-166.

Ahmad, M., Jarillo, J. A. , Klimczak, L. J., Landry, L. G., Peng, T., Last, R. L. und Cashmore, A. R. (1997) An enzyme similar to animal type II photolyases mediates photoreactivation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **9**, 199-207.

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

Ahmad, M., Jarillo, J.A. und Cashmore, A.R. (1998b) Chimeric proteins between cry1 and cry2 *Arabidopsis* blue-light photoreceptors indicate overlapping functions and varying protein stability. *Plant Cell* **10**, 197-207.

Ahmad, M., Jarillo, J.A., Smirnova, O. und Cashmore, A.R. (1998c) The CRY1 blue light photoreceptor of *Arabidopsis* interacts with phytochrome A *in vitro*. *Mol. Cell* **1**, 939-948.

Ahmad, M., Jarillo, J.A. und Cashmore, A.R. (1998d) PHR2: A Novel *Arabidopsis* Gene Related To The Blue-light Photoreceptor/Photolyase Family (Accession No. AF053366). (PGR98-096) *Plant Physiol.* **117**, 718.

Ahmad, M., Lin, C. und Cashmore, A.R. (1995) Mutations throughout an *Arabidopsis* blue-light photoreceptor impair blue-light-responsive anthocyanin accumulation and inhibition of hypocotyl elongation. *Plant J.* **8**, 653-658.

Akasaka, S. und Yamamoto, K. (1991) Construction of *Escherichia coli* K12 phr deletion and insertion mutants by gene replacement. *Mutat. Res.* **254**, 27-35.

Alfonso, M., Perewoska I., Kirilovsky D. (2000). Redox control of *psbA* gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. Involvement of the cytochrome b(6)/f complex. *Plant Physiol* **122**(2), 505-516.

Altmann, T., Damm, B., Halfter, U., Willmitzer, L. and Morris, P.-C. (1992) Protoplast transformation and methods to create specific mutants in *Arabidopsis thaliana*. In *Methods in Arabidopsis Research* (Koncz, Cs., Chua, N.-H. and Schell, J., eds.). Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., pp. 310-330.

- Anderson, S. L. und McIntosh, L. (1991) Light-activated heterotrophic Growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803: a blue-light-requiring process. *J Bacteriol* **173** (9), 2761-2767.
- Antony, J., Medvedev, D.M. und Stuchebrukhov, A.A. (2000) Theoretical study of electron transfer between the photolyase catalytic cofactor FADH⁻ and DNA thymine dimer. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 1057-1065.
- Aschoff, J. (1979) Circadian rhythms: influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. *Z. Tierpsychol.* **49**, 225-249.
- Ataka, K., Hegemann, P. und Heberle J. (2003) Vibrational Spectroscopy of an Algal Phot-LOV1 Domain Probes the Molecular Changes Associated with Blue-Light Reception. *Biophys J* **84**(1), 466-474.
- Aubert, C., Vos, M.H., Mathis, P., Eker, A.P.M. und Brettel, K. (2000) Intraprotein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase. *Nature* **405**, 586-590.
- Baer, M.E. und Sancar, G.B. (1993) The role of conserved amino acids in substrate binding and discrimination by photolyase. *J Biol Chem* **268**(22), 16717-16724.
- Bagnall, D.J., King, R.W. und Hangarter, R.P. (1996) Blue-light promotion of flowering is absent in *hy4* mutants of *Arabidopsis*. *Planta* **200**, 278-280.
- Batschauer, A. (1993) A plant gene for photolyase: An enzyme catalyzing the repair of UV-light-induced DNA damage. *Plant J.* **4**:705-709.
- Batschauer, A. (1998) Photoreceptors of higher plants. *Planta* **206**, 479-492.
- Batschauer, A. (1999) Light perception in higher plants. *Cell Mol Life Sci* **55** (2),153-166.
- Batschauer, A., Ehmann, B. und Schäfer, E. (1991) Cloning and characterization of a chalcone synthase gene from mustard and its light-dependent expression. *Plant Mol Biol* **16**(2), 175-185.
- Bell-Pedersen, D., Crosthwaite, S.K., Lakin-Thomas, P.L., Merrow, M. und Okland, M. (2001) The *Neurospora* circadian clock: simple or complex? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**(1415), 1697-1709.
- Bhaya, D., Takahashi, A. und Grossman, A.R. (2001) Light regulation of type IV pilus-dependent motility by chemosensor-like elements in *Synechocystis* PCC6803. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(13), 7540-7545.
- Bhaya, D., Vulot, D., Amin, P., Takahashi, A.W., Grossman, A.R. (2000) Isolation of regulated genes of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by differential display. *J Bacteriol* **182**(20): 5692-9.
- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc Acids Res* **7**, 1513-1522.

- Botto, J.F., Sanchez, R.A., Whitelam, G.C. und Casal, J.J. (1996) Phytochrome A mediates the promotion of seed germination by very low fluences of light and canopy shade light in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **110**, 439-444.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Briggs, W.R. und Christie, J.M. (2002) Phototropins 1 and 2: versatile plant blue light receptors. *Trends Plant Sci* **7**, 204-210.
- Briggs, W.R. und Huala, E. (1999) Blue-light photoreceptors in higher plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 33-62.
- Briggs, W.R., Beck, C.F., Cashmore, A.R., Christie, J.M., Hughes, J., Jarillo, J.A., Kagawa, T., Kanegae, H., Liscum, E., Nagatani, A., Okada, K., Salomon, M., Rudiger, W., Sakai, T., Takano, M., Wada, M. und Watson, J.C. (2001) The phototropin family of photoreceptors. *Plant Cell* **13**(5), 993-7.
- Briggs, W.R., Olney, M.A. (2001) Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date. five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin, and one superchrome. *Plant Physiol.* **125**(1), 85-88.
- Britt, A.B. (1999) Molecular genetics of DNA repair in higher plants. *Trends Plant Sci* **4**(1), 20-25.
- Brudler, R., Hitomi, K., Daiyasu, H., Toh, H., Kucho, K., Ishiura, M., Kanehisa, M., Roberts, V.A., Todo, T., Trainer, A. and Getzoff, E.D. (2003) Identification of a new cryptochrome class: structure, function, and evolution. *Mol. Cell* **11**, 59-67.
- Butenandt, J., Burgdorf, L. und Carell, T. (1999) Photodamaged DNA-RNA duplexes are poor substrates for photoreactivating DNA-repair enzymes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **38**, 708-711.
- Campuzano, V., Galland, P., Alvarez, M. I. und Eslava, A. P. (1996) Blue light requirement for gravitropism, autochemotropism and ethylene response in *Phycomyces*. *Photochem Photobiol* **63** (5), 686-694.
- Carell, T. und Epple, R. (1998) Repair of UV light induced DNA lesions: A comparative study with model compounds. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 1245-1258.
- Carell, T., Burgdorf, L.T., Kundu, L.M. und Cichon, M. (2001) The mechanism of action of DNA photolyases. *Curr Opin Chem Biol* **5**(5), 491-498.
- Casal, J. J. (2000) Phytochromes, cryptochromes, phototropin: photoreceptor interactions in plants. *Photochem. Photobiol.* **71**, 1-11.
- Cashmore, A.R., Jarillo, J.A., Wu, Y.J. and Liu, D. (1999) Cryptochromes: Blue light receptors for plants and animals. *Science* **284**, 760-765.

- Castets, A.-M., Houmard, J. und Tandeau de Marsac, N. (1986) Is cell motility a plasmid-encoded function in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803 ? *FEMS Microbiol Lett* **37**, 277-281.
- Cavalier-Smith, T. (2002) Chloroplast evolution: secondary symbiogenesis and multiple losses. *Curr Biol.* **12**, R62-R64.
- Ceriani, M.F., Darlington, T.K., Staknis, D., Más, P., Petti, A.A., Weitz, C.J. und Kay, S.A. (1999) Light-dependent sequestration of timeless by cryptochrome. *Science* **285**, 553-556.
- Chen, J.-J., Jiang, C.Z. und Britt, A.B. (1996) Little or no repair of cyclobutyl pyrimidine dimers is observed in the organellar genomes of the young *Arabidopsis* seedling. *Plant Physiol.* **111**, 19-23.
- Cho, M.H. und Spalding, E.P. (1996) An anion channel in *Arabidopsis* hypocotyls activated by blue light. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(15), 8134-8138.
- Choi, J. S., Y. H. Chung, *et al.* (1999) Photomovement of the gliding cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photochem Photobiol* **70**(1):, 95-102.
- Christie, J. M. und Jenkins G. I. (1996) Distinct UV-B and UV-A/blue light signal transduction pathways induce chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell* **8**, 1555-1567.
- Christie, J.M., Salomon, M., Nozue, K., Wada, M. und Briggs, W.R. (1999) LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (*nph1*): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8779-8783.
- Chun, L., Kawakami, A. und Christopher, D.A. (2001) Phytochrome A mediates blue light and UV-A-dependent chloroplast gene transcription in green leaves. *Plant Physiol* **125**(4), 1957-1966.
- Churin, Y. N., Shalak, I. N., Börner, T. und Shestakov, S. V. (1995) Physical and genetic map of the chromosome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* **177** (11), 3337-3343.
- Clack, T. Mathews, S. und Sharrock, R.A. (1994) The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of *PHYD* and *PHYE*. *Plant Mol Biol* **25**, 413-427.
- Cleary, S. P., Tan, F.C., Nakrieko, K. A., Thompson, S. J., Mullineaux, P. M., Creissen, G. P., von Stedingk, E., Glaser, E., Smith, A. G., Robinson, C. (2002) Isolated plant mitochondria import chloroplast precursor proteins *in vitro* with the same efficiency as chloroplasts. *J Biol Chem* **277**(7), 5562-5569.
- Cokol, M., Nair, R. und Rost, B. (2000) Finding nuclear localization signals. *EMBO reports* **1**(5), 411-415.

- Corchnoy, S.B., Swartz, T.E., Lewis, J.W., Szundi, I., Briggs, W.R. und Bogomolni, R.A. (2002) Intramolecular proton transfers and structural changes during the photocycle of the LOV2 domain of phototropin 1. *J Biol Chem* Oct 30 (epub ahead of print).
- Coupland G. (1995) Genetic and environmental control of flowering time in *Arabidopsis*. *Trends Genet* **11**(10), 393-397.
- Crosio, C., Cermakian, N., Allis, C.D. und Sassone-Corsi, P. (2000) Light induces chromatin modification in cells of the mammalian circadian clock. *Nat Neurosci* **3**(12), 1241-1247.
- 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**, 2995-3000.
- Crosson, S., Rajagopal, S. und Moffat, K. (2003) The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry* **42**(1), 2-10.
- Cutler, S.R., Ehrhardt, D.W., Griffiths, J.S. und Somerville, C.R. (2000) Random GFP::cDNA fusions enable visualisation of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at a high frequency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3718-3723.
- 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.
- Das, A.K., Cohen, P.W., und Barford, D. (1998) The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J* **17**, 1192-1199.
- Davis, S.J., Vener, A.V. und Vierstra, R.D. (1999) Bacteriophytochromes: phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic bacteria. *Science* **286**, 2517-2520.
- Deisenhofer, J. (2000) DNA photolyases and cryptochromes. *Mutat Res* **460**, 143-149.
- Deng, X.-W. und Quail, P.H. (1999) Signaling in light-controlled development. *Semin Cell Dev Biol* **10**, 121-129.
- 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**, 2499-2509.
- Devlin, P.F., Halliday, K.J., Harberd, N.P. und Whitelam, G.C. (1996) The rosette habit of *Arabidopsis thaliana* is dependent upon phytochrome action: novel phytochromes control internode elongation and flowering time. *Plant J.* **10**(6):1127-34.
- Devlin, P.F., Patel, S.R. und Whitelam, G.C. (1998) Phytochrome E influences internode elongation and flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1479-1488.
- Devlin, P.F., Robson, P.R., Patel, S.R., Goosey, L., Sharrock, R.A. und Whitelam, G.C. (1999) Phytochrome D acts in the shade avoidance syndrome in *Arabidopsis* by controlling elongation growth and flowering time. *Plant Physiol.* **119**, 909-915.

- Egan, E.S., Franklin, T.M., Hildebrand-Chae, M.J., McNeil, G.P., Roberts, M.A., Schroeder, A.J., Zhang, X. und Jackson, F.R. (1999) An extraretinally expressed insect cryptochrome with similarity to the blue light photoreceptors of mammals and plants. *J. Neurosci.* **19**, 3665-3673.
- 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 Photobiol* **33**(1), 65-72.
- El Bissati, K. und Kirilovsky, D. (2001) Regulation of *psbA* and *psaE* expression by light quality in *Synechocystis species PCC 6803*. A redox control mechanism. *Plant Physiol* **125**(4), 1988-2000.
- El-Din El-Assal, S., Alonso-Blanco, C., Peeters, A.J., Raz, V., and Koornneef, M. (2001). A QTL for flowering time in *Arabidopsis* reveals a novel allele of CRY2. *Natl. Genet* **29**, 435–440.
- Elich, T.D. und Lagarias, J.C. (1989) Formation of a photoreversible phycocyanobilin-apophytochrome adduct in vitro. *J Biol Chem* **264**(22), 12902-12908.
- Emery, P.T., So, W.V., Kaneko, M., Hall, J.C. und Rosbash, M. (1998). CRY, a *Drosophila* clock and light regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* **95**, 669–679.
- Emery, P.T., Stanewsky, R., Helfrich-Förster, C., Emery-Le, M., Hall, J.C. und Rosbash, M. (2000) *Drosophila* CRY is a deep brain circadian photoreceptor. *Neuron* **26**, 493-504.
- Fang, J. und Beattie, D.S. (2002) Rotenone-insensitive NADH dehydrogenase is a potential source of superoxide in procyclic *Trypanosoma brucei* mitochondria. *Mol Biochem Parasitol* **123**(2), 135-142.
- Fankhauser, C. (2001) The phytochromes, a family of red/far-red absorbing photoreceptors. *J. Biol. Chem.* **276**, 11453-11456.
- Fankhauser, C. und Chory, J. (1997) Light control of plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 203-229.
- 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.
- Fankhauser, C., Yeh, K.C., Lagarias, J.C., Zhang, H., Elich, T.D. und Chory, J. (1999) PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in *Arabidopsis*. *Science* **284**, 1539-1541.
- Fedorov, R., Schlichting, I., Hartmann, E., Domratcheva, T., Fuhrmann, M. und Hegemann, P. (2003) Crystal Structures and Molecular Mechanism of a Light-Induced Signaling Switch: The Phot-LOV1 Domain from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biophys J* **84** (4), 2474-2482.

- Folta, K.M. und Spalding, E.P. (2001a) Opposing roles of phytochrome A and phytochrome B in early cryptochrome-mediated growth inhibition. *Plant J* **28**(3), 333-340.
- Folta, K.M. und Spalding, E.P. (2001b) Unexpected roles for cryptochrome 2 and phototropin revealed by high-resolution analysis of blue light-mediated hypocotyl growth inhibition. *Plant J* **26**(5), 471-478.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J.D., Davies, J.M. und Dolan, L. (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* **422**(6930), 442-446.
- Furuya, M. und Schäfer, E. (1996) Photoperception and signalling of induction reactions by different phytochromes. *Trends Plant Sci.* **1**, 301-307.
- Furuya, M. und Song, P.-S. (1994) Assembly and properties of holophytochrome. In: *Photomorphogenesis in Plants*. 2nd edition, S. 105-140, R.E. Kendrick, G.H.M. Kronenberg (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Galland, P. und Lipson, E.D. (1987) Blue-light reception in *Phycomyces* phototropism: evidence for two photosystems operating in low- and high-intensity ranges. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(1), 104-108.
- Galperin, M.Y., Nikolskaya, A.N. und Koonin, E.V. (2001) Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol Lett* **203**(1), 11-21.
- Garcia-Dominguez, M., Reyes, J.C., Florencio, F.J. (2000) NtcA represses transcription of gifA and gifB, genes that encode inhibitors of glutamine synthetase type I from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Microbiol* **35**(5), 1192-1201.
- Gelvin, S.B. (2003) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**(1), 16-37.
- Giacometti, G. M., Barbato, R., Chiaramonte, S., Fiso, G. und Rigoni, F. (1996) Effects of ultraviolet-B radiation on photosystem II of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur J Biochem* **242**, 799-806.
- Gil, P., Kircher, S., Ádám, É., Bury, E., Kozma-Bognár, L., Schäfer, E. und Nagy, F. (2000) Photocontrol of subcellular partitioning of phytochrome B-GFP fusion protein in tobacco seedlings. *Plant J.* **22**, 135-146.
- Golden, S. (1994) Light-responsive gene expression and the biochemistry of the photosystem ii reaction center. In *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Bryant, D. A. (ed.). The Netherlands: Kluwer, S. 91-118.
- Gomelsky, M. und Kaplan, S. (1998) AppA, a redox regulator of photosystem formation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 is a flavoprotein. Identification of a novel FAD binding domain. *J Biol Chem* **273**, 35319-35325.
- Gomelsky, M. und Klug, G. (2002) BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms. *Trends Biochem Sci* **27**(10):497-500.

- Goosey, L., Palecanda, L. und Sharrock, R.A. (1997) Differential patterns of expression of the *Arabidopsis* *PHYB*, *PHYD*, and *PHYE* phytochrome genes. *Plant Physiol.* **115**, 959-969.
- Gray, M.W., Burger, G. and Lang, B.F. (2001) The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol.* **2**, reviews 1018.1–1018.5.
- Greenberg, B. M., Gaba, V., Canaani, O., Malkin, S., Mattoo, A. K. und Edelman, M. (1989) Separate photosensitizers mediate degradation of the 32-kDa photosystem II reaction centre protein in visible and UV spectral regions. *PNAS USA* **86**, 6617-6620.
- Gressel, J. (1979) Blue light photoreception. *Photochem Photobiol* **30**, 749-754.
- Grigorieva, G. and Shestakov, S. (1982) Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiol Letters* **13**, 367-370.
- Guo H., Mockler, T., Duong, H. und Lin, C. (2001) SUB1, an *Arabidopsis* Ca²⁺-binding protein involved in cyrcryptochrome and phytochrome coaction. *Science* **291**, 487-490.
- 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**, 279-287.
- Guo, H., Yang, H., Mockler, T. und Lin, C. (1998) Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science* **279**, 1360-1363.
- Hada, M., Hino, K., Buchholz, G., Goss, J., Wellmann, E. and Shin, M. (2000) Assay of DNA photolyase activity in spinach leaves in relation to cell compartmentation-evidence for lack of DNA photolyase in chloroplasts. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**, 1288-1291.
- Hahn, J., Michel-Beyerle, M.E. und Rösch, N. (1999) Binding of pyrimidine model dimers to the photolyase enzyme: a molecular dynamics study. *J. Phys. Chem. B* **103**, 2001-2007.
- Hamazato, F., Shinomura, T., Hanzawa, H., Chory, J. und Furuya M. (1997) Fluence and wavelength requirements for *Arabidopsis* CAB gene induction by different phytochromes. *Plant Physiol* **115**(4), 1533-1540.
- Hardie, D.G. (1999) Plant protein serine/threonine kinases: classification and functions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**, 97-131.
- Harmer, S.L., Hogenesch, J.B., Straume, M., Chang, H.-S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J.A., Kay, S.A. (2000) Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* **210**, 2110-2113.
- Hayama, R. und Coupland, G. (2003) Shedding light on the circadian clock and the photoperiodic control of flowering. *Curr Opin Plant Biol* **6**(1), 13-19.
- Hearst, J. E. (1995) The structure of photolyase: using photon energy for DNA repair. *Science* **268**, 1858 – 1859.

- Hendricks, J.C. (2003) Genetic Models in Applied Physiology: Invited Review: Sleeping flies don't lie: the use of *Drosophila melanogaster* to study sleep and circadian rhythms. *J Appl Physiol* **94**(4), 1660-1672.
- Hennig, L., Funk, M., Whitelam, G.C. and Schaefer, E. (1999) Functional interaction of cryptochrome 1 and phytochrome D. *Plant J.* **20**, 289–294.
- Hennig, L., Stoddart, W.M., Dieterle, M., Whitelam, G.C., Schafer, E. (2002) Phytochrome E controls light-induced germination of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **128**(1), 194-200.
- Herranen, M., Aro, E. M., Tyystjarvi, T. (2001) Two distinct mechanisms regulate the transcription of photosystem II genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Physiol Plant* **112**(4), 531-39.
- Hihara, Y., Kamei, A., Kanehisa, M., Kaplan, A., Ikeuchi, M. (2001). DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light. *Plant Cell* **13**(4), 793-806.
- Hirayama, J., Fukuda, I., Ishikawa, T., Kobayashi, Y. und Todo, T. (2003) New role of zCRY und zPER2 as regulators of sub-cellular distributions of zCLOCK and zBMAL proteins. *Nucleic Acids Res* **31** (3), 935-943.
- Hirschfeld, M., Tepperman, J.M., Clack, T., Quail, P.H. und Sharrock, R.A. (1998) Coordination of phytochrome levels in phyB mutants of *Arabidopsis* as revealed by apoprotein-specific monoclonal antibodies. *Genetics* **149**, 523-535.
- Hitomi, K., Okamoto, K., Daiyasu, H., Miyashita, H., Iwai, S., Toh, H., Ishiura, M. und Todo, T. (2000) Bacterial cryptochrome and photolyase: characterization of two photolyase-like genes of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Nucleic Acids Res* **28**, 2353-2362.
- Hoffer, P.H. und Christopher, D.A. (1997) Structure and blue-light-responsive transcription of a chloroplast *psbD* promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **115**(1), 213-222.
- 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**, 259-265.
- Holmes, D. S., Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analyt Biochem* **114**, 193-197.
- 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**, 13871-13877.
- 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.
- Hübschmann, T., Börner, T., Hartmann, E. und Tilman Lamparter (2001) Characterization of the Cph1 holo-phytochrome from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur J Biochem* **268**, 2055-2063.

- Hughes, J., Lamparter, T. (1999) Prokaryotes and phytochrome. The connection to chromophores and signaling. *Plant Physiol* **121**(4), 1059-1068.
- Hughes, J., Lamparter, T., Mittmann, F., Hartmann, E., Gärtner, W., Wilde, A. und Börner, T. (1997) A prokaryotic phytochrome. *Nature* **386**, 663.
- Husain, I., Sancar, G.B., Holbrook, S.R. und Sancar, A. (1987) Mechanism of damage recognition by *Escherichia coli* DNA photolyase. *J Biol Chem* **262**(27), 13188-13197.
- Hwang, G.-S., Kim, J.-K. und Choi, B.-S. (1996) NMR structural studies of DNA decamer duplex containing the Dewar photoproduct of thymidyl(3'→5')thymidine. Conformational changes of the oligonucleotide duplex by photoconversion of a (6-4) adduct to its Dewar valence isomer. *Eur. J. Biochem.* **235**, 359-365.
- 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.
- 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**, 81-95.
- Imaizumi, T., Kiyosue, T., Kanegae, T. und Wada, M. (1999) Cloning of the cDNA encoding the blue-light photoreceptor (cryptochrome) from the moss *Physcomitrella patens* (Accession No. AB027528). (PGR99-110) *Plant Physiol* **120**, 1205.
- Iseki, M., Matsunaga, S., Murakami, A., Ohno, K., Shiga, K., Yoshida, K., Sugai, M., Takahashi, T., Hori, T. und Watanabe, M. (2002) A blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in *Euglena gracilis*. *Nature* **415**(6875), 1047-1051.
- Iwata, T., tokutomi, S. und Kandori, H. (2002) Photoreaction of the Cysteine S-H Group in the LOV2 Domain of *Adiantum* Phytochrome3. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 11840-11841.
- Iwatsuki, N., Joe, C.O. und Werbin, H. (1980) Evidence that deoxyribonucleic acid photolyase from baker's yeast is a flavoprotein. *Biochemistry* **19**(6), 1172-1176.
- Jackson, J.A. und Jenkins, G.I. (1995) Extension-growth responses and expression of flavonoid biosynthesis genes in the *Arabidopsis hy4* mutant. *Planta* **197**, 233-239.
- Jansson, C., Debus, R. J., Osiewacz, H. D., Gurevitz, M., McIntosh, L. (1987) Construction of an obligate photoheterotrophic mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Physiol.* **85**, 1021-1025.
- Jarillo, J.A., Ahmad, M. und Cashmore, A.R. (1998) NPL1 (Accession No. AF053941): A second member of the NPH serine/threonine kinase family of *Arabidopsis*. (PGR98-100) *Plant Physiol* **117**, 719.
- 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**, 487-490.

- 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.
- Jiang, Z., Swem, L.R., Rushing, B.G., Devanathan, S., Tollin, G. und Bauer, C.E. (1999) Bacterial photoreceptor with similarity to photoactive yellow protein and plant phytochromes. *Science* **285**, 406-409.
- Johnson, E., Bradley, M., Harberd, N.P. und Whitelam, G.C. (1994) Photoresponses of light-grown phyA mutants of *Arabidopsis* (Phytochrome A Is Required for the Perception of Daylength Extensions). *Plant Physiol* **105**, 141-149.
- Johnson, J.L., Hamm-Alvarez, S., Payne, G., Sancar, G.B., Rajagopalan, K.V. und Sancar, A. (1988) Identification of the second chromophore of *Escherichia coli* and yeast DNA photolyases as 5,10-methenyltetrahydrofolate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 2046-2050.
- Jorns, M.S., Sancar, G.B. und Sancar, A. (1984) Identification of a neutral flavin radical and characterisation of a second chromophore in *Escherichia coli* photolyase. *Biochemistry* **23**, 2673-2679.
- Jorns, M.S., Wang, B. und Jordan, S.P. (1987) DNA repair catalyzed by *Escherichia coli* DNA photolyase containing only reduced flavin: elimination of the enzyme's second chromophore by reduction with sodium borohydride. *Biochemistry* **26**(21), 6810-6816.
- Kagawa, T. (2003) The phototropin family as photoreceptors for blue light-induced chloroplast relocation. *J Plant Res* **116**, 77-82.
- 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**, 2138-2141.
- Kanai, S., Kikuno, R., Toh, H., Ryo, H. und Todo, T. (1997) Molecular evolution of the photolyase-blue-light photoreceptor family. *J Mol Evol* **45**, 535-548.
- Kanegae, H., Tahir, M., Savazzini, F., Yamamoto, K., Yano, M., Sasaki, T., Kanegae, T., Wada, M. und Takano, M. (2000) Rice NPH1 homologues, OsNPH1a and OsNPH1b, are differently photoregulated. *Plant Cell Physiol* **41**, 415-423.
- 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**, 345-353.
- Kaneko, T. *et al.* (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions (Supplement). *DNA Res* **3**, 185-209.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. und Tabata, S. (1996) Sequence analysis of the genome of the

- unicellular Cyanobacterium *Synechocystis sp.* strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* **3**, 109-136.
- Kardailsky, I., Shukla, V.K., Ahn, J. H., Dagenais, N., Christensen, S.K.; Nguyen, J.T., Chory, J., Harrison, M. J. und Weigel, D. (1999) Activation tagging of the floral inducer FT. *Science* **286**, 1962-1965.
- Kato, R., Hasegawa, K., Hidaka, Y., Kuramitsu, S. und Hoshino, T. (1997) Characterization of a thermostable DNA photolyase from an extremely thermophile bacterium, *Thermus thermophilus* HB27. *J Bacteriol* **179**, 6499-6503.
- Kay, C.W., Schleicher, E., Kuppig, A., Hofner, H., Rudiger, W., Schleicher, I., Fischer, M., Bacher, A., Weber, S. und Richter, G. (2003) Blue light perception in plants. Detection and characterization of a light-induced neutral flavin radical in a C450A mutant phototropin. *J Biol Chem* Jan 13 (epub ahead of print).
- Kehoe, D.M. und Grossmann, A.R. (1996) Similarity of a chromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors. *Science* **273**, 1409-1412.
- Kennis, J.T., Crosson, S., Gauden, M., Van Stokkum, I.H., Moffat, K. und Van Grondelle, R. (2003) Primary Reactions of the LOV2 Domain of Phototropin, a Plant Blue-Light Photoreceptor. *Biochemistry* **42** (12), 3385-3392.
- Kevei, É., Nagy, F. (2003) Phytochrome controlled signalling cascades in higher plants. *Physiologia Plantarum* **117**, 305-313.
- Kim, J.-I., Kozhukh, G.V. und Song, P.-S. (2002) Phytochrome-mediated signal transduction pathways in plants.
- Kim, L., Kircher, S., Toth, R., Ádám, É., Schäfer, E. und Nagy, F. (2000) Light-induced nuclear import of phytochrome A-GFP fusion proteins is differentially regulated in transgenic tobacco and *Arabidopsis*. *Plant J* **22**, 125-134.
- Kim, S.-T., Li, Y.F. und Sancar, A. (1992) The third chromophore of DNA photolyase: Trp-277 of *Escherichia coli* DNA photolyase repairs thymine dimers by direct electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 900-904.
- Kim, S.-T., Malhotra, K., Ryo, H., Sancar, A. und Todo, T. (1996) Purification and characterization of *Drosophila melanogaster* photolyase. *Mutat. Res.* **363**, 97-104.
- Kim, S.-T., Malhotra, K., Smith, C.A., Taylor, J.S. und Sancar, A. (1994) Characterization of (6-4) photoproduct photolyase. *J. Biol. Chem.* **269**, 8535-8540.
- 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), 5548-5558.
- Kinoshita, T., Doi, M., Suetsugu, N., Kagawa, T., Wada, M. und Shimazaki, K. (2001) Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* **414**(6864), 656-660.

- Kircher, S., Kozma-Bognár, L., Kim, L., Ádám, É., Harter, K., Schäfer, E. und Nagy, F. (1999) Light quality-dependent nuclear import of the plant photoreceptors phytochrome A and B. *Plant Cell* **11**, 1445-1456.
- Kiyosue, T. und Wada, M. (2000) LKP1 (LOV kelch protein 1): a factor involved in the regulation of flowering time in *Arabidopsis*. *Plant J* **23**, 807-815.
- Kleiner, O., Butenandt, J., Carell, T. und Batschauer, A. (1999a) Class II DNA photolyase from *Arabidopsis* contains FAD as a cofactor. *Eur. J. Biochem.* **264**, 161-167.
- Kleiner, O., Kircher, S., Harter, K. und Batschauer, A. (1999b) Nuclear localization of the *Arabidopsis* blue light receptor cryptochrome 2. *Plant J.* **19**, 289-296.
- Knippers, R. (1997) Molekulare Genetik. 7. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart; New York.
- Kobayashi, K., Kanno, S.-I., Smit, B., van der Horst, G.T.J., Takao, M. und Yasui, A. (1998) Characterization of photolyase/blue-light receptor homologs in mouse and human cells. *Nucleic Acids Res* **26**, 5086-5092.
- 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**, 725-738.
- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M. und Araki, T. (1999) A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* **268**, 1960-1962.
- Kolukisaoglu, H.U., Marx S., Wiegmann, C., Hanelt, S. und Schneider-Poetsch, H.A. (1995) Divergence of the phytochrome gene family predates angiosperm evolution and suggests that *Selaginella* and *Equisetum* arose prior to *Psilotum*. *J Mol Evol* **41**(3), 329-337.
- Komori, H., Masui, R., Kuramitsu, S., Yokoyama, S., Shibata, T., Inoue, Y. und Miki, K. (2001) Crystal structure of thermostable DNA photolyase: pyrimidine-dimer recognition mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24), 13560-13565.
- Kondo, T. und Ishiura, M. (2000) The circadian clock of cyanobacteria. *Bioessays* **22**(1), 10-15.
- Kong, R.; Xu, X., Hu, Z. (2003) A TPR-family membrane protein gene is required for light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiol Letters* **219**, 75-79.
- Koornneef, M., Hahart, 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**, 57-66.
- 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.

- Kottke, T., Heberle, J., Hehn, D., Dick, B. und Hegemann, P. (2003) Phot-LOV1: Photocycle of a Blue-Licht Receptor domain from the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biophys J* **84**(2), 1192-1201.
- Koziol, J. (1971) Fluorometric Analyses of Riboflavin and Its Coenzymes. *Methods Enzymol* **18**, 385-398.
- Krishnan, B., Levine, J.D., Lynch, M.K.S., Dowse, H.B., Funes, P., Hall, J.C., Hardin, P.E. und Dryer, S.E. (2001) A new role for cryptochrome in a *Drosophila* circadian oscillator. *Nature* **411**, 313-317.
- Kropat, J., Oster, U., Rudiger, W. und Beck, C. F. (1997) Chlorophyll precursors are signals of chloroplast origin involved in light induction of nuclear heat-shock genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 14268-14172.
- Kropat, J., Oster, U., Rudiger, W. und Beck, C. F. (2000) Chloroplast signaling in the light induction of nuclear *HSP70* genes requires the accumulation of chlorophyll precursors and their accessibility to the cytoplasm/nucleus. *Plant J* **24**, 523-531.
- Kume, K., Zylka, M.J., Sriram, S., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H. und Reppert, S.M. (1999) mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* **98**, 193-205.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lagarias, D.M., Wu, S.H. und Lagarias, J.C. (1995) Atypical phytochrome gene structure in the green alga *Mesotaenium caldariorum*. *Plant Mol Biol* **29**(6), 1127-1142.
- 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**, 4821-4828.
- Lamparter, T., Esteban, B. und Hughes, J. (2001) Phytochrome Cph1 from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. Purification, assembly, and quaternary structure. *Eur J Biochem* **268**, 4720-4730.
- Landry, L.G., Stapleton, A.E., Lim, J., Hoffman, P., Hays, J.B., Walbot, V. und Last, R.L. (1997) An *Arabidopsis* photolyase mutant is hypersensitive to ultraviolet-B radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**, 328-332.
- Li, H., Sherman, L. A. (2000). A redox-responsive regulator of photosynthesis gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803." *J Bacteriol* **182**(15), 4268-77.
- Li, Y.F. und Sancar, A. (1990) Active site of *Escherichia coli* DNA photolyase: mutations at Trp277 alter the selectivity of the enzyme without affecting the quantum yield of photorepair. *Biochemistry* **29**, 5698-5706.

- 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), 6322-6329.
- Li, Y.F., Kim, S.-T. und Sancar, A. (1993) Evidence for lack of DNA photoreactivating enzyme in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **90**, 4389-4393.
- Lin, C. (2000a) Plant blue light receptors. *Trends Plant Sci* **5**, 337-342.
- Lin, C. (2000b) Photoreceptors and regulation of flowering time. *Plant Physiol* **123**, 39-50.
- Lin, C. (2002) Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell* **14 Suppl.**, S207-S225.
- 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 J* **10**, 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). (PGR96-001) *Plant Physiol* **110**, 1047.
- Lin, C., Ahmad, M., Gordon, D. und Cashmore, A.R. (1995a) Expression of the *Arabidopsis* cryptochrome gene in transgenic tobacco results in hypersensitivity to blue, UV-A, and green light. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**, 8423-8427.
- Lin, C., Robertson, D.E., Ahmad, M. Raibekas, A.A., Jorns, M.S., Dutton, P.L. und Cashmore, A.R. (1995b) Association of flavin adenine dinucleotide with the *Arabidopsis* blue light receptor CRY1. *Science* **269**, 968-970.
- Lin, C., Yang, H., Guo, H., Mockler, T. Chen, J. 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**, 2686-2690.
- Liscum, E. und Briggs, W.R. (1995) Mutations in the *NPH1* locus of *Arabidopsis* disrupt the perception of phototropic stimuli. *Plant Cell* **7**, 473-485.
- Long, J.C. und Jenkins, G.I. (1998) Involvement of plasma membrane redox activity and calcium homeostasis in the UV-B and UV-A/blue light induction of gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**(12), 2077-2086.
- Losi, A., Polverini, E., Quest, B. und Gärtner, W. (2002) First evidence for phototropin-related blue-light receptors in prokaryotes. *Biophys J* **82**, 2627-2634.
- Ma, L., Li, J., Qu, L., Hager, J., Chen, Z., Zhao, H. und Deng, X.W. (2001) Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant* **13**(12), 2589-2607.
- Mackle, M.M. und Zilinskas, B.A. (1994) Role of signal peptides in targeting of proteins in cyanobacteria. *J Bacteriol* **176**(7), 1857-1864.

- 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), 2909-2914.
- 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**, 6892-6899.
- Marcotte, E.M., Xenarios, I., van Der Blik, A.M. und Eisenberg, D. (2000) Localizing proteins in the cell from their phylogenetic profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(22), 12115-1220.
- Martínez-García, J.F., Huq, E. und Quail, P.H. (2000) Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* **288**, 859-863.
- Más, P., Devlin, P.F., Panda, S. und Kay, S.A. (2000) Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature* **408**, 207-211.
- Máté, Z., Sass, L., Szekeres, M., Vass, I., Nagy, F. (1998) UV-B-induced differential transcription of *psbA* genes encoding the D1 protein of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *J Biol Chem* **273** (28): 17439-44.
- Mathews, S. und Donoghue, M.J. (1999) The root of angiosperm phylogeny inferred from duplicate phytochrome genes. *Science* **286**, 947-950.
- Mathews, S. und Sharrock, R.A. (1997) Phytochrome gene diversity. *Plant Cell Environ.* **20**, 666-671.
- Matters, G. L. und Beale, S. I. (1995) Blue-Light-Regulated Expression of Genes for Two Early Steps of Chlorophyll Biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **109**(2), 471-479.
- Mazzella, M.A., Cerdan, P.D., Staneloni, R.J. und Casal, J.J. (2001) Hierarchical coupling of phytochromes and cryptochromes reconciles stability and light modulation of *Arabidopsis* development. *Development* **128**(12), 2291-2299.
- McCormac, A. C., Terry, M. J. (2002) Light-signalling pathways leading to the co-ordinated expression of HEMA1 und Lhcb during chloroplast development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **32**(4), 549-559.
- McFadden, G.I. (2001) Chloroplast origin and integration. *Plant Physiol* **125**(1), 50-53.
- Medvedev, D. und Stuchebrukhov, A.A. (2001) DNA repair mechanism by photolyase: electron transfer path from the photolyase catalytic cofactor FADH⁻ to DNA thymine dimer. *J Theor Biol* **210**, 237-248.
- Melis, A., Nemson, J. A. und Harrison, M. A. (1992) Damage to functional components and partial degradation of photosystem II reaction center D1-protein induced by UVB irradiation in isolated thylakoids. Identification and characterization of C- and N-terminal breakdown products. *Biochim Biophys Acta* **1184**, 78-84.

- Miyamoto, Y. und Sancar, A. (1998) Vitamin B₂-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**, 6097-6102.
- Mockler, T., Yang, H., Yu, X., Parikh, D., Cheng, Y.-C., Dolan, S. und Lin, C. (2003) Regulation of photoperiodic flowering by *Arabidopsis* photoreceptors. *PNAS* **100**(4), 2140-2145.
- Mockler, T.C., Guo, H., Yang, H., Duong, H. und Lin, C. (1999) Antagonistic actions of *Arabidopsis* cryptochromes and phytochrome B in the regulation of floral induction. *Development* **126**, 2073-2082.
- Mohamed, A. and Jansson, C. (1989) Influence of light on accumulation of photosynthesis-specific transcripts in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Mol Biol* **13**, 693-700.
- Mohamed, A., Eriksson, J., Osiewacz, H.D. und Jansson, C. (1993) Differential expression of the *psbA* genes in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Mol Gen Genet* **238**(1-2), 161-168.
- Mohamed, A., Jansson, C. (1991) Photosynthetic electron transport controls degradation but not production of *psbA* transcripts in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Mol Biol* **16**(5): 891-7.
- Mohr, H. (1994) Coactions between pigment systems. In: *Photomorphogenesis in Plants*. 2nd edition, pp. 353-372, R.E. Kendrick, G.H.M. Kronenberg (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Møller, S.G., Ingles, P.J., Whitelam, G. (2002) The cell biology of phytochrome signalling. *New Phytologist* **154**, 553-590.
- Montgomery, B.L. und Lagarias J.C. (2002) Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. *Trends Plant Sci* **7**(8), 357-366.
- Moreno, M. *et al.* (1985) Silverstaining of proteins in polyacrylamide gels: increased sensitivity through a combined Coomassie Blue-Silver stain procedure. *Anal Biochem* **141**, 311-315.
- Mrosovsky, N., Salmon, P.A., Foster, R.G. und McCall, M.A. (2000) Responses to light after retinal degeneration. *Vision Res.* **40**, 575-578.
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction.. *Methods in Enzymol* **155**, 335.
- Mulo, P., Laakso, S., Maenpaa, P., Aro, E.M. (1998) Stepwise photoinhibition of photosystem II. Studies with *Synechocystis* species PCC 6803 mutants with a modified D-E loop of the reaction center polypeptide D1. *Plant Physiol* **117**(2): 483-90.
- Nagatani, A., Reed, J.W., und Chory, J. (1993) Isolation and Initial Characterization of *Arabidopsis* Mutants That Are Deficient in Phytochrome A. *Plant Physiol* **102**(1), 269-277.

- Nagy, F. und Schäfer, E. (2000) Control of nuclear import and phytochromes. *Curr Opin Plant Biol.* **3**(6), 450-454.
- Nagy, F. und Schäfer, E. (2002) Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 329-355.
- Nagy, F., Kircher, S. und Schäfer, E. (2001) Intracellular trafficking of photoreceptors during light-induced signal transduction in plants. *J. Cell Sci.* **114**, 475-480.
- Nakajima, S., Sugiyama, M., Iwai, S., Hitomi, K., Otsoshi, E., Kim, S.T., Jiang, C.Z., Todo, T., Britt, A.B. und Yamamoto, K. (1998) Cloning and characterization of a gene (UVR3) required for photorepair of (6-4) photoproducts in *Arabidopsis thaliana*. *Nucl Acids Res* **26**, 638-644.
- 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.
- Negrutiu, I., Cattoir-Reynaerts, A., Jacobs, M. (1978) Selection and characterization of cell lines of *Arabidopsis thaliana* resistant to amino acid analogs. *Arch Int Physiol Biochim* **86**(2), 442-3.
- Nelson, D.C., Lasswell, J., Rogg, L.E., Cohen, M.A. und Bartel, B. (2000) *FKF1*, a clock controlled gene that regulates the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Cell* **101**, 331-340.
- Ng, W.O. and Pakrasi, H.B. (2001) DNA photolyase homologs are the major UV resistance factors in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Gen Genet* **264**, 924-930.
- Ng, W.-O., Grossman, A. R. und Bhaya, D. (2003) Multiple Light Inputs Control Phototaxis in *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. *J. Bacteriol.* **185** (5), 1599-1607.
- Ni, M., Tepperman, J.M. und Quail, P. (1998) PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell* **95**, 657-667.
- Ni, M., Tepperman, J.M. und Quail, P.H. (1999) Binding of phytochrome B to its nuclear signaling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature* **400**, 781-784.
- 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**, 551-556.
- Nishizaki, Y. (1995) Blue light pulse-induced transient changes of electric potential and turgor pressure in the motor cells of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Cell Physiol* **29** (6), 1041-1046.
- Nozue, K., Christie, J.M., Kiyosue, T., Briggs, W.R. und Wada, M. (2000) Isolation and characterization of a fern phototropin (Accession No. AB037188), a putative blue-light photoreceptor for phototropism. (PGR00-039) *Plant Physiol* **122**, 1457.
- 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**, 15826-15830.

- O'Brien, P. A. und Houghton, J. A.. (1982) Photoreactivation and excision repair of UV induced pyrimidine dimers in the unicellular cyanobacterium *Gloecopsa alpicola* (*Synechocystis* PCC 6803). *Photochem Photobiol* **35** , 359-364.
- O'Conner, K.A., McBride, M.J., West, M., Yu, H., Trinh, L., Yuan, K., Lee, T. und Zusman, D.R. (1996) Photolyase of *Myxococcus xanthus*, a Gram-negative eubacterium, is more similar to photolyases found in Archae and 'higher' eucaryotes than to photolyases of other eubacteria. *J Biol Chem* **271**, 6252-6359.
- Onouchi, H., Igeno, M.I., Perilleux, C., Graves, K. und Coupland, G. (2000) Mutagenesis of plants overexpressing CONSTANS demonstrates novel interactions among *Arabidopsis* flowering-time genes. *Plant Cell* **12**, 885-900.
- Osterlund, M.T., Ang, L.H. und Deng, X.W. (1999) The role of COP1 in repression of *Arabidopsis* photomorphogenic development. *Trends Cell Biol* **9**(3), 113-118.
- Osterlund, M.T., Wei, N. und Deng, X.-W. (2000) The roles of photoreceptor systems and the COP1-targeted destabilization of HY5 in light control of *Arabidopsis* seedling development. *Plant Physiol* **124**, 1520-1524.
- Özgür, S. und Sancar, A. (2003) Purification and properties of human blue-light photoreceptor cryptochrome 2. *Biochemistry* **42**(10), 2926-2932.
- Park, C.-M., Shim, J.-Y., Yang, S.-S., Kang, J.-G., Kim, J.I., Luka, Z. und Son, P.S. (2000) Chromophore-Apoprotein Interactions in *Synechocystis* sp. PCC 6803 Phytochrome Cph1. *Biochemistry* **39**, 6349-6356.
- 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**, 5706-5711.
- Pearn, M.T., Randall, L.L., Shortridge, R.D., Burg, M.G. und Pak, W.L. (1996) Molecular, biochemical, and electrophysiological characterization of *Drosophila norpA* mutants. *J Biol Chem* **71**(9), 4937-4945.
- Peeters, N. and Small, I. (2001) Dual targeting to mitochondria and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **1541**, 54-63.
- Perman, B., Srajer, V., Ren, Z., Teng, T., Pradervand, C., Ursby, T., Bourgeois, D., Schotte, F., Wulff, M., Kort, R., Hellingwerf, K. und Moffat, K. (1998) Energy transduction on the nanosecond time scale: early structural events in a xanthopsin photocycle. *Science* **279**(5358), 1946-1950.
- 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**, 765-773.

- Perrotta, G., Yahoubyan, G., Nebuloso, E., Renzi, L., und Giuliano, G. (2001). Tomato and barley contain duplicated copies of cryptochrome 1. *Plant Cell Environ* **24**, 991–997.
- Perry, S.E., Buvinger, W.E., Bennett, J. und Keegstra, K. (1991) Synthetic analogues of a transit peptide inhibit binding or translocation of chloroplastic precursor proteins. *J Biol Chem* **266**(18), 11882-11889.
- Petersen, J.L., Lang, D.W. und Small, G.D. (1999) Cloning and characterization of a class II DNA photolyase from *Chlamydomonas*. *Plant Mol Biol* **40**, 1063-1071.
- Piggins, H.D. (2002) Human clock genes. *Ann Med* **34**(5), 394-400.
- Ponting, C.P. und Aravind, L. (1997) PAS: a multifunctional domain family comes to light. *Curr Biol* **7**(11), R674-R677.
- Popov, N., Schmitt, S. und Matthies, H. (1975), Eine störungsfreie Mikromethode zur Bestimmung des Proteingehaltes in Gewebehomogenaten. *Acta Biol Germ* **34**, 1441-1446.
- Prakash, L. (1975) Repair of pyrimidine dimers in nuclear and mitochondrial DNA of yeast irradiated with low doses of ultraviolet light. *J Mol Biol* **98**(4), 781-795.
- Prentki, P. and Krisch, H.M. (1984) *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**, 303-313.
- Prussak *et al.* (1989):Peptide production from proteins separated by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* **178**, 233-238.
- Quail, P.H. (2002) Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Curr Opin Cell Biol* **14**(2), 180-188.
- Quail, P.H., Boylan, M.T., Parks, B.M., Short, T.W., Xu, Y. und Wagner, D. (1995) Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science* **268**, 675-680.
- Quail, P.H., Briggs, W.R., Chory, J., Hangarter, R.P., Harberd, N.P., Kendrick, R.E., Koornneef, M., Parks, B., Sharrock, R.A., Schäfer, E., Thompson, W.F. und Whitelam, G.C. (1994) Spotlight on phytochrome nomenclature. *Plant Cell* **6**, 468-471.
- Rasmusson, A.G. und Møller, I.M. (1991) Effect of calcium ions and inhibitors on internal NAD(P)H dehydrogenases in plant mitochondria. *Eur J Biochem* **202**(2), 617-623.
- Reed, J.W., Nagpal, P., Poole, D.S., Furuya, M. und Chory, J. (1993) Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and responses throughout *Arabidopsis* development. *Plant Cell* **5**, 147-157.
- Reppert, S.M. und Weaver, D.R. (2001) Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu. Rev. Physiol.* **63**, 647-676.
- Reppert, S.M. und Weaver, D.R. (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* **418**(6901), 935-941.

- Rippka, R. (1988) Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods Enzymol* **167**, 3-27.
- Robson, P., Whitlam, G.C. und Smith H. (1993) Selected Components of the Shade-Avoidance Syndrome Are Displayed in a Normal Manner in Mutants of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica rapa* Deficient in Phytochrome B. *Plant Physiol* **102**(4):1179-1184.
- 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), 909-917.
- Ross, P., Mayer, R. und Benziman, M. (1991) Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol Rev* **55**(1), 35-58.
- Rudhe, C., Chew, O., Whelan, J. und Glaser, E. (2002) A novel in vitro system for simultaneous import of precursor proteins into mitochondria and chloroplasts. *Plant J* **30**(2), 213-220.
- Rüdiger, W. und Thümmler, F. (1994) The phytochrome chromophore. In: *Photomorphogenesis in Plants*. 2nd edition, pp. 51-69, R.E. Kendrick, G.H.M. Kronenberg (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T.E., Christie, J.M., Briggs, W.R., Wada, M. und Okada, K. (2001) *Arabidopsis* nph1 und npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6969-6974.
- Sakamoto, K. und Briggs, W.R. (2002) Cellular and subcellular localization of phototropin1. *Plant Cell* **14** (8), 1723-1735.
- Salomon, M., Christie, J.M., Knieb, E., Lempert, U. und Briggs, W.R. (2000) Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin. *Biochemistry* **39**, 9401-9410.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sancar, A. (1994) Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry* **33**, 2-9.
- Sancar, A. und Sancar, G.B. (1984) *Escherichia coli* DNA photolyase is a flavoprotein. *J Mol Biol* **172**(2), 223-227.
- Sancar, G.B. (1985) Sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* PHR1 gene and homology of the PHR1 photolyase to *E. coli* photolyase. *Nucleic Acids Res* **13**, 8231-8246.
- Sancar, G.B. (2000) Enzymatic photoreactivation: 50 years and counting. *Mutat Res* **451**, 25-37.
- Sanders, D.B. und Wiest, O. (1999) A model for the enzyme-substrate complex of DNA photolyase and photodamaged DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 5127-5134.

- Sass, L., Spetea, C., Maté, Z., Nagy, F. und Vass, I. (1997) Repair of UV-B induced damage of Photosystem II via de novo synthesis of the D1 and D2 reaction centre subunits in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynth Res* **54**, 55-62.
- Schäfer, E. und Bowler, C. (2002) Phytochrome-mediated photoperception and signal transduction in higher plants. *EMBO reports* **3**(11), 1042-1048.
- Schindler, C. und Soll, J. (1986) Protein transport in intact, purified pea etioplasts. *Arch Biochem Biophys* **247**(1), 211-220.
- Schmidt, W. and Galland, P. (1999) Light-induced absorbance changes in *Phycomyces*: evidence for cryptochrome-associated flavosemiquinones. *Planta* **208**, 274-282.
- Schmitz, O., Katayama, M., Williams, S.B., Kondo, T und Golden, S.S. (2000) CikA, a bacteriophytochrome that resets the cyanobacterial circadian clock. *Science* **289**, 765-768.
- Schneider-Poetsch, H.A., Braun, B., Marx, S. und Schaumburg, A. (1991) Phytochromes and bacterial sensor proteins are related by structural and functional homologies: hypothesis on phytochrome-mediated signal-transduction. *FEBS Lett* **281**, 245-249.
- Schultz, T.F., Kiyosue, T., Yanovsky, M., Wada, M. und Kay, S.A. (2001) A role for LKP2 in the circadian clock of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**(12), 2659-2670.
- Selby, C.P., Thompson, C., Schmitz, T.M., van Gelder, R.N. und Sancar, A. (2000) Functional redundancy of cryptochromes and classical photoreceptors for nonvisual ocular photoreception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14697-14702.
- 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), 763-767.
- Sharrock, R.A. und Clack, T. (2002) Patterns of expression and normalized levels of the five *Arabidopsis* phytochromes. *Plant Physiol* **130**(1), 442-456.
- Shearman, L.P., Sriram, S., Weaver, D.R., Maywood, E.S., Chaves, I., Zheng, B., Kume, K., Lee, C.C., van der Horst, G.T.J., Hastings, M.H. und Reppert, S.M. (2000) Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* **288**, 1013-1019.
- Shinomura, T., Nagatani, A., Hanzawa, H., Kubota, M., Watanabe, M. und Furuya, M. (1996) Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad. Sci. U S A* **93**, 8129-8133.
- Sineshchekov, V., Koppel, L., Esteban, B., Hughes, J. und Lamparter, T. (2002) Fluorescence investigation of the recombinant cyanobacterial phytochrome (Cph1) and its C-terminally truncated monomeric species (Cph1Delta2): implication for holoprotein assembly, chromophore-apoprotein interaction and photochemistry. *J Photochem Photobiol* **67** (1), 39-50.
- Singer, T. P., Salach, J., Hemmerich, P. und Ehrenberg, A. (1971) Flavin Peptides. *Methods Enzymol.* **18**, 416-427.

- Small, G.D. und Greimann, C.S. (1977) Photoreactivation and dark repair of ultraviolet light-induced pyrimidine dimers in chloroplast DNA. *Nucleic Acids Res* **4**(8), 2893-2902.
- 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**, 443-454.
- Smith, D., Bendall, D.S. und Howe, C.J. (1992) Occurrence of a Photosystem II polypeptide in non-photosynthetic membranes of cyanobacteria. *Mol Microbiol* **6**(13), 1821-1827.
- Smith, H. (2000) Phytochromes and light signal perception by plants – an emerging synthesis. *Nature* **407**, 585-591.
- Somers, D.E. und Quail, P.H. (1995) Phytochrome-mediated light regulation of *PHYA*- and *PHYB*-GUS transgenes in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiol.* **107**, 523-534.
- Somers, D.E., Devlin, P.F. und Kay, S.A. (1998) Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* **282**, 1488-1490.
- Somers, D.E., Schultz, T.F., Milnamow, M. und Kay, S. (2000) *ZEITLUPE* encodes a novel clock-associated PAS protein from *Arabidopsis*. *Cell* **101**, 319-329.
- Spalding, E.P. und Cosgrove, D.J. (1989) Large plasma-membrane depolarization precedes rapid blue-light-induced growth inhibition in cucumber. *Planta* **178**, 407-410.
- Sprenger, W.W., Hoff, W.D., Armitage, J.P. und Hellingwerf, K.J. (1993) The eubacterium *Ectothiorhodospira halophila* is negatively phototactic, with a wavelength dependence that fits the absorption spectrum of the photoactive yellow protein. *J Bacteriol* **175**(10), 3096-3104.
- Srinivasan, V., Schnitzlein, W.M. und Tripathy, D.N. (2001) *Fowlpox* virus encodes a novel DNA repair enzyme, CPD-photolyase, that restores infectivity of UV light-damaged virus. *J. Virol.* **75**, 1681-1688.
- Stanewsky, R., Kaneko, M., Emery, P., Beretta, B., Wager-Smith, K., Kay, S.A., Rosbash, M. und Hall, J.C. (1998). The *cry^b* mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell* **95**, 681-692.
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. und Cohen-Bazire, G. (1971) Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*). *Bacteriol. Rev.* **35**, 171 – 205.
- Suetsugu, N. und Wada, M. (2003) Cryptogam blue-light photoreceptors. *Curr Opin Plant Biol* **6**(1), 91-96.
- Surpin, M., Larkin, R. M. und Chory, J. (2002) Signal Transduction between the Chloroplast and the Nucleus. *The Plant Cell* **14 Suppl.**, S327-S338.
- Svensson, A.S. und Rasmusson, A.G. (2001) Light-dependent gene expression for proteins in the respiratory chain of potato leaves. *Plant J* **28**(1), 73-82.

- 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**, 36493-36500.
- Swofford, D.L. (2001) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Tamada, T., Kitadokoro, K., Higuchi, Y., Inaka, K., Yasui, A., de Ruiter, P., Eker, A.P.M. und Miki, K. (1997) Crystal structure of DNA photolyase from *Anacystis nidulans*. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 887-891.
- Taylor, B.L. und Zhulin, I.B. (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 479-506.
- Taylor, L. a. und Rose, R. E. (1988) A correction in the nucleotide sequence of the Tn903 kanamycin resistance determinant in pUC4K. *Nucleic Acids Res* **16** (1), 358
- Taylor, R., Tobin, A. und Bray, C. (1996) Nucleotide sequence of an *Arabidopsis* cDNA At-phrII (Accession No. X99301) encoding a protein with high homology to the class II CPD photolyases present in higher eukaryotes. (PGR96-083) *Plant Physiol.* **112**, 862.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Thresher, R.J., Vitaterna, M.H., Miyamoto, Y., Kazantsev, A., Hsu, D.S., Petit, C., Selby, C.P., Dawut, L., Smithies, O., Takahashi, J. und Sancar, A. (1998) Role of mouse cryptochrome blue-light photoreceptor in circadian photoresponses. *Science* **282**, 1490-1494.
- Thum, K.E., Kim, M., Christopher, D.A. und Mullet, J.E. (2001) Cryptochrome 1, cryptochrome 2, and phytochrome a co-activate the chloroplast *psbD* blue light-responsive promoter. *Plant Cell* 2001 **13**(12), 2747-2760.
- Thummler, F., Algarra, P. und Fobo, G.M. (1995) Sequence similarities of phytochrome to protein kinases: implication for the structure, function and evolution of the phytochrome gene family. *FEBS Lett* **357**(2):149-155.
- Todo, T. (1999) Functional diversity of the DNA photolyase/blue light receptor family. *Mutat Res* **434**, 89-97.
- Todo, T., Kim, S.-T., Hitomi, K., Otoshi, E., Inui, T., Morioka, H., Kobayashi, H., Ohtsuka, E., Toh, H. und Ikenaga, M. (1997) Flavine adenine dinucleotide as a chromophore of the *Xenopus* (6-4) photolyase. *Nucl Acids Res* **25**, 764-768.
- Todo, T., Ryo, H., Yamamoto, K., Toh, H., Inui, T., Ayaki H., Nomura, T. und Ikenaga, M. (1996) Similarity among *Drosophila* (6-4) photolyase, a human photolyase homolog and the DNA photolyase-blue light photoreceptor family. *Science* **272**, 109-112.

- Todo, T., Takemori, H., Ryo, H., Ihara, M., Matsunaga, T., Nikaido, O. Sato, K. und Nomura, T. (1993) A new photoreactivating enzyme that specifically repairs ultraviolet light-induced (6-4) photoproducts. *Nature* **361**, 371-374.
- Tsinoremas, N. F., Kawakami, A. und Christopher, D. A. (1999) High-fluence blue light stimulates transcription from a higher plant chloroplast *psbA* promoter expressed in a cyanobacterium, *Synechococcus* (sp. strain PCC 7942). *Plant Cell Physiol* **40**, 448-452.
- Tsinoremas, N. F., Schaefer, M. R. und Golden, S. S. (1994) Blue and red light reversibly control *psbA* expression in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Biol Chem* **269**, 16143-16147.
- Tyystjärvi, T., Herranen, M., Aro, E.M. (2001) Regulation of translation elongation in cyanobacteria: membrane targeting of the ribosome nascent-chain complexes controls the synthesis of D1 protein. *Mol Microbiol* **40**(2), 476-84.
- Tyystjärvi, T., Tuominen, I., Herranen, M., Aro, E.M. and Tyystjärvi, E. (2002) Action spectrum of *psbA* gene transcription is similar to that of photoinhibition in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett.* **516**, 167-171.
- Tyystjärvi, T., Tyystjärvi, E., Ohad, I., Aro, E. M. (1998) Exposure of *Synechocystis* 6803 cells to series of single turnover flashes increases the *psbA* transcript level by activating transcription and down-regulating *psbA* mRNA degradation. *FEBS Lett* **436**(3), 483-487.
- van der Horst, G.T.J., Muijtjens, M., Kokayashi, K., Takano, R., Kanno, S.-I., Takao, M., de Witt, J., Verkerk, A., Eker, A.P.M., van Leenen, D., Buijs, R., Bootsma, D., Hoeijmakers und Yasui, A. (1999) Mammalian cry1 and cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* **398**, 627-630.
- van der Spek, P.J., Kobayashi, K., Bootsma, D., Takao, M., Eker, A.P.M. und Yasui, A. (1996) Cloning, tissue expression, and mapping of a human photolyase homolog with similarity to plant blue-light receptors. *Genomics* **37**, 177-182.
- Van Gelder, R.N. (2002) Tales from the crypt(ochromes). *J Biol Rhythms* **17**, 110-120.
- van Noort, J., Orsini, F., Eker, A.P.M., Wyman, C., de Grooth und Greve, J. (1999) DNA bending by photolyase in specific and non-specific complexes studied by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res.* **27**, 3875-3880.
- van Waasbergen, L. G., Dolganov, N. und Grossman, A. R. (2002) nblS, a Gene Involved in Controlling Photosynthesis-Related Gene Expression during High Light and Nutrient Stress in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J Bacteriol* **184**(9), 2481-2490.
- Vande Berg, B.J. und Sancar, G.B. (1998) Evidence for dinucleotide flipping by DNA photolyase. *J. Biol. Chem.* **273**, 20276-20284.
- Vass, I., Kirilovsky, D., Perewoska, I., Máté, Z., Nagy, F. und Etienne, A.-L. (2000) UV-B radiation induced exchange of the D1 reaction centre subunits produced from the *psbA2* and *psbA3* genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur. J. Biochem.* **267**, 2640-2648.

- Vierstra, R.D. und Davis, S.J. (2000) Bacteriophytochromes. new tools for understanding phytochrome signal transduction. *Sem Cell Dev Biol* **11**, 511-521
- Vioque, A. (1992) Analysis of the gene encoding the RNA subunit of ribonuclease P from cyanobacteria. *Nucleic Acids Res* **20**, 6331-6337.
- Vitaterna, M.H., Selby, C.P., Todo, T., Niwa, H., Thompson, C., Fruechte, E., Hitomi, K., Thresher, R.J., Ishikawa, T., Miyazaki, J., Takahashi, J.S. und Sancar, A. (1999) Differential regulation of mammalian *Period* genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**, 12114-12119.
- von Arnim, A.G. und Deng, X.-W. (1994) Light inactivation of *Arabidopsis* photomorphogenic repressor COP1 involves a cell-specific regulation of its nucleocytoplasmic partitioning. *Cell* **79**, 1035-1045.
- von Arnim, A.G. und Deng, X.-W. (1996) Light control of seedling development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 215-243.
- von Arnim, A.G., Osterlund, M.T., Kwok, S.F. und Deng, X.-W. (1997) Genetic and developmental control of nuclear accumulation of COP1, a repressor of photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **114**, 779-788.
- Wade, H.K., Bibikova, T.N., Valentine, W.J. und Jenkins, G.I. (2001) Interactions within a network of phytochrome, cryptochrome and UV-B phototransduction pathways regulate chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* leaf tissue. *Plant J* **25**(6), 675-685.
- 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**, 154–158.
- Wang, Z.Y. und Tobin, E.M. (1998) Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and supresses its own expression. *Cell* **93**, 1207-1217.
- Waterworth, W.M., Jiang, Q., West, C.E., Nikaido, M. und Bray, C.M. (2002) Characterization of *Arabidopsis* photolyase enzymes and analysis of their role in protection from ultraviolet-B radiation. *J Exp Bot* **53**(371), 1005-1015.
- Weller, J.L., Perrotta, G., Schreuder, M.E., van Tuinen, A., Koornneef, M., Giuliano, G. und Kendrick, R.E. (2001) Genetic dissection of blue-light sensing in tomato using mutants deficient in cryptochrome 1 and phytochromes A, B1 and B2. *Plant J* **25**(4), 427-440.
- Weston, E., Thorogood, K., Vinti, G. und López-Juez, E. (2000) Light quantity controls leaf-cell and chloroplast development in *Arabidopsis thaliana* wild type and blue-light-perception mutants. *Planta* **211**, 807-815.
- 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**, 757-768.

- Whitmore, D., Foulkes, N.S. und Sassone-Corsi, P. (2000) Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature* **404**, 87-91.
- Wilde, A., Fiedler, B. und Börner, T. (2002) The cyanobacterial phytochrome Cph2 inhibits phototaxis towards blue light. *Mo. Microbiol* **44**(4), 981-988.
- Wilde, A., Yuri, C., Schubert, H., Börner, T. (1997) Disruption of a *Synechocystis* sp. PCC 6803 gene with partial similarity to phytochrome genes alters growth under changing light qualities. *FEBS Letters* **406**, 89-92.
- Wu, S.H. und Lagarias, J.C. (2000) Defining the bilin lyase domain: lessons from the extended phytochrome superfamily. *Biochemistry* **39**, 13487-13495.
- Xue, Y. und Nicholson, W. L. (1996) The two major spore DNA repair pathways, nucleotide excision repair and spore photoproduct lyase, are sufficient for the resistance of *Bacillus subtilis* spores to artificial UV-C and UV-B but not to solar radiation. *Appl Env Microbiol* **62**(7), 2221-2227.
- 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**, 437-445.
- 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), 13-16.
- 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.
- Yang, H.-Q., Wu, Y.-J., Tang, R.-H., Liu, D., Liu, Y. und Cashmore, A.R. (2000) The C termini of *Arabidopsis* cryptochromes mediate a constitutive light response. *Cell* **103**, 815-827.
- Yanovsky, M.J. und Kay, S.A. (2002) Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature* **419**, 308-312.
- Yanovsky, M.J., Mazzella, M.A. und Casal, J.J. (2000) A quadrupole photoreceptor mutant still keeps track of time. *Curr Biol* **10**, 1013-1015.
- Yasuhira, S. und Yasui, A. (1992) Visible light-inducible photolyase gene from the goldfish *Carassius auratus*. *J Biol Chem* **267**, 25644-25647.
- Yasui, A. und Eker, A.P.M. (1998) DNA photolyases. In: *DNA damage and repair, Vol.2: DNA repair in higher eukaryotes*, pp. 9-32, J.A. Nickoloff, M.F. Hoekstra (eds.), Humana Press Inc., Totowa, N.J.
- Yasui, A., Eker, A.P.M., Yasuhira, S., Yajima, H., Kobayashi, T., Takao, M. und Oikawa A. (1994) A new class of DNA photolyases present in various organisms including aplacental mammals. *EMBO J* **13**, 6143-6151.

- Yatsunami, H., Wada, M. und Hashimoto, T. (1987) Dichroic orientation of phytochrome and blue-light photoreceptor in *Adiantum protonemata* as determined by chloroplast movement. *Acta Physiol Plant* **9**, 163-173.
- Yeh, K.C. und Lagarias, J.C. (1998) Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13976-13981.
- Yeh, K.C., Wu, S.H., Murphy, J.T. und Lagarias, J.C. (1997) A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science* **277**, 1505-1508.
- Yoshihara, S., Suzuki, F., Fujita, H. und Geng, X.X. und Ikeuchi, M. (2000) Novel putative photoreceptor and regulatory genes required for the positive phototactic movement of the unicellular motile cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol* **41**(12), 1299-1304.
- Zagotta, M.T., Hicks, K.A., Jacobs, C.I., Young, J.C., Hangarter, R.P. und Meeks-Wagner, D.R. (1996) The *Arabidopsis* *ELF3* gene regulates vegetative photomorphogenesis and the photoperiodic control of flowering. *Plant J* **10**, 691-702.
- Zhao, S. und Sancar, A. (1997) Human blue-light photoreceptor hCRY2 specifically interacts with protein serine/threonine phosphatase 5 and modulates its activity. *Photochem Photobiol* **66**, 727-731.
- Zhao, X., Liu, J., Hsu, D.S., Zhao, S., Taylor, J.S. und Sancar, A. (1997) Reaction mechanism of (6-4) photolyase. *J Biol Chem* **272**, 32580-32590.
- Zhong, H.H., Resnick, A.S., Straume, M., und Robertson McClung, C. (1997) Effects of synergistic signaling by phytochrome A and cryptochrome1 on circadian clock-regulated catalase expression. *Plant Cell* **9**(6), 947-955.
- Zhu, H. und Green C.B. (2001) Three cryptochromes are rhythmically expressed in *Xenopus laevis* retinal photoreceptors. *Mol Vis* **7**, 210-215.
- Zhu, Y., Tepperman, J.M., Fairchild, C.D. und Quail, P.H. (2000) Phytochrome B binds with greater apparent affinity than phytochrome A to the basic helix-loop-helix factor PIF3 in a reaction requiring the PAS domain of PIF3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13419-13424.

Anhang

A1. Lebenslauf

Tatjana Kleine, geboren am 15. April 1974 in Korbach

Werdegang

- 08. 1980 – 07. 1984 Besuch der Grundschule „Humboldt-Schule“ in Korbach
- 08. 1984 – 06. 1993 Besuch des Gymnasiums „Alte Landesschule“ in Korbach
- 06. 1993 Allgemeine Hochschulreife
- 10. 1993 – 06. 1999 Studium der Biologie und Mathematik für das Lehramt an Gymnasien an der Philipps-Universität in Marburg
- 06. 1999 Studienabschluss mit 1. Staatsexamen
- seit 07. 1999 Promotion in der Abteilung für Pflanzenphysiologie und Molekularbiologie der Pflanze am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter Anleitung von Prof. Dr. A. Batschauer.

A2. Danksagung

Meinem Doktorvater Professor Dr. A. Batschauer danke ich sehr herzlich für die intensive Förderung meiner Arbeit, die immer gewährte Unterstützung und die ständige Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft.

Speziell bedanken möchte ich mich bei Frau Oxana Panajotowa für die ausgezeichnete technische Assistenz und bei Frau Agnes Debelius für die tolle, engagierte Pflege der Zellkulturen.

Der AG Maier gilt für Allerlei mein Dank, besonders für die immer schnell durchgeführten Sequenzierungen, das Bereitstellen der *image station* und dafür, dass ich in ihrem Labor zusammen mit Julia Prechtl und Axinia Döring den Versuch zum *in vitro* Import in Chloroplasten durchführen durfte.

Prof. Dr. Thomas Börner, Dr. Annegret Wilde und Brita Fiedler danke ich dafür, dass sie mir die motilen *Synechocystis*-Linien zur Verfügung gestellt haben. Prof. Dr. Csaba Koncz und Dr. Aidyn Mouradov vom MPIZ Köln danke ich für die Bereitstellung der *Arabidopsis* Zellkulturen und Prof. Dr. Imre Vass aus Szeged, Ungarn, und Peter Lockhart, Palmerston North, Neuseeland, für die produktive Zusammenarbeit.

Dr. Franz Grolig und Markus Müller möchte ich ganz herzlich für die Einführung in die Benutzung des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops danken. Insbesondere danke ich Markus Müller für die ständige Hilfe bei Computer-Problemen.

Dr. Franz Grolig, Dr. Kerstin Stangier und Jörg Kleine danke ich für die kritischen Anmerkungen und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Allen weiteren, namentlich nicht weiter genannten Personen im Arbeitskreis Batschauer und auch Arbeitskreis Galland möchte ich für die gute und entspannte Atmosphäre im Labor danken.

Besonders möchte ich meiner Familie danken, die mir oft gute Ratschläge gegeben und nicht nur in dieser Zeit hinter mir gestanden und mich unterstützt hat.

A3. Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Thema „**Photolyase/Cryptochrom-Homologe aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 und *Arabidopsis thaliana* – Funktion, Lokalisation und biochemische Eigenschaften**“ 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, den 27. Mai 2003
