

FORSCHUNGSARTIKEL

OPEN ACCESS

Hot Paper

Reversible Lichtinduzierte Oligomerisierung von *Arabidopsis*-Cryptochrom 1 und Antagonismus durch BIC1: Einblicke durch Zeitaufgelöste Native Massenspektrometrie

Alicia Just¹  | Nils Niemann² | Petra Gnau³ | Dennis Kock²  | Thomas Heimerl⁴ | Stephan Kiontke^{2,4}  | Lars-Oliver Essen³  | Alfred Batschauer²  | Nina Morgner¹ ¹Institut Für Physikalische und Theoretische Chemie, Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt, am Main60438, Deutschland | ²Fachbereich Biologie, Philipps Universität, Marburg, Deutschland | ³Fachbereich Chemie, Philipps Universität, Marburg, Deutschland | ⁴SYNMIKRO Forschungszentrum und Fachbereich Chemie, Philipps Universität, Marburg, Deutschland**Korrespondenz:** Nina Morgner (morgner@chemie.uni-frankfurt.de)**Erhalten:** 21 November 2025 | **Überarbeitet:** 12 Januar 2026 | **Akzeptiert:** 11 März 2026**Schlüsselwörter:** Blaulicht-Inhibitoren von Cryptochromen | Cryptochrome | native Massenspektrometrie | Oligomerisierungsdynamik | Photorezeptor

ZUSAMMENFASSUNG

Cryptochrome sind Blaulicht-Photorezeptoren, die die lichtabhängige Signalübertragung in Pflanzen vermitteln. In dieser Arbeit klären wir den molekularen Mechanismus der Blaulichtaktivierung der Cryptochrom-1-Photolyase-Homologie-Region (CRY1-PHR) aus *Arabidopsis thaliana* auf. Hierzu kombinieren wir zeitaufgelöste native Massenspektrometrie mit kinetischer Modellierung. Dieser Ansatz ermöglicht die direkte Beobachtung der lichtgetriebenen Komplexbildung mit zeitlicher und molekularer Auflösung. Wir zeigen, dass die Blaulichtaktivierung von CRY1-PHR einem reversiblen Assemblierungsweg folgt, bei dem Monomere rasch Dimere bilden, die sich weiter zu Tetrameren zusammenlagern. Ein quantitatives zweistufiges kinetisches Modell erfasst das dynamische Zusammenspiel zwischen lichtinduzierter Oligomerisierung und thermischem Zerfall. ATP beschleunigt die Tetramerbildung und stabilisiert Oligomere, indem es die zugrunde liegende Photochemie des FAD-Chromophors moduliert. Im Gegensatz dazu wirkt der Blaulicht-Inhibitor von Cryptochromen 1 (engl. *Blue-light Inhibitor of Cryptochromes 1*, BIC1) als potenter Antagonist. BIC1 bindet selbst im Dunkeln an CRY1-PHR, wobei die Affinität unter Blaulichtbedingungen deutlich erhöht ist. Dadurch wird die Oligomerisierung gehemmt und bereits gebildete Tetramere aktiv disassembliert. Dieser Prozess ist unabhängig von den Lichtbedingungen und findet unabhängig vom Redoxzustand des CRYs statt. Zusammenfassend liefern diese Erkenntnisse ein kinetisches und mechanistisches Modell für die reversible Blaulicht-vermittelte Signalübertragung durch pflanzliche CRYs und verdeutlichen, wie gegensätzlich wirkende Regulatoren die Aktivierung von Photorezeptoren auf molekularer Ebene präzise steuern.

1 | Einleitung

Pflanzen nutzen Licht nicht nur als Energiequelle, sondern auch als entscheidendes Umweltsignal, das nahezu alle Aspekte ihres Wachstums und ihrer Entwicklung steuert [1–3]. Um Lichtinformationen über das gesamte Spektrum hinweg wahrzunehmen und zu verarbeiten, haben Pflanzen ein komplexes Netzwerk

von Photorezeptoren entwickelt, darunter Phytochrome, Phototropine, den UV-B-Photorezeptor UVR8 und Cryptochrome (CRYs) [1, 4–6]. CRYs sind evolutionär konservierte Flavoproteine, die blaues und Ultraviolett-A-Licht über einen Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)-Chromophor absorbieren, der nicht-kovalent innerhalb der Photolyase-Homologie-Region (PHR)-Domäne gebunden ist [7–10]. Die PHR-Domäne wird durch

Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der [Creative Commons Attribution License](#), die jede Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.

© 2026 Die Autoren. *Angewandte Chemie* veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH

die C-terminale Erweiterung von Cryptochromen (engl. *Cryptochrom CRYs C-terminal Extension*, CCE) ergänzt, die wesentlich weniger konserviert ist und in Länge und Sequenz variiert [11]. In *Arabidopsis thaliana* operieren zwei CRYs, CRY1 und CRY2, in teilweise überlappenden, aber unterschiedlichen physiologischen Kontexten [12]. CRY1 steuert vorwiegend die frühe Keimlingsphase, indem es die Hypokotyl-Streckung hemmt, während CRY2 als photoperiodischer Sensor die Blütezeit reguliert [12–16]. Die Aktivierung pflanzlicher CRYs wird durch die lichtgetriebene Photoreduktion von FAD eingeleitet [17, 18], wodurch Konformationsänderungen induziert werden, welche wiederum die Oligomerisierung [19–22] und die Bindung an nachgeschaltete Signalpartner fördern [23]. Obwohl CRY1 und CRY2 strukturell verwandt sind [24], deutet ihre funktionelle Spezialisierung darauf hin, dass sie sich in Aktivierungsdynamik, Signalinteraktionen und Regulationsmechanismen unterscheiden. Strukturuntersuchungen haben gezeigt, dass sowohl CRY1 als auch CRY2 eine Blaulicht-induzierte Oligomerisierung durchlaufen [13, 15–17], wobei für CRY2 tetramere Komplexe mit der Signalaktivität in Verbindung gebracht wurden [25]. CRY1 bildet ebenfalls lichtinduzierte Oligomere [26], doch die Dynamik und Regulation dieses Prozesses sind noch unzureichend verstanden. Während die Oligomerisierung durch die PHR-Domäne vermittelt wird, ist die CCE an der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung (engl. *liquid-liquid phase separation*, LLPS) beteiligt [11]. Um die spezifische Oligomerisierung dynamischer, größenvariabler Kondensate zu unterscheiden, sind In-vitro-Studien der isolierten PHR-Domäne entscheidend, da sie den intrinsischen Mechanismus der CRY-Oligomerisierung ohne Einfluss von LLPS beleuchten. Insbesondere sind der molekulare Mechanismus der CRY1-Oligomerisierung sowie der Einfluss zellulärer Cofaktoren oder inhibitorischer Proteine auf diesen Prozess weitgehend unerforscht.

Eine wichtige Klasse negativer Regulatoren von CRYs sind die Blaulicht-Inhibitoren von Cryptochromen (engl. *Blue-light Inhibitors of Cryptochromes*, BICs) [27]. BICs interagieren mit CRY2 in der PHR-Domäne und blockieren effizient die Tetramerbildung, wodurch die Signalübertragung gehemmt wird [21, 24]. CRY1 wurde ebenfalls als Ziel von BIC1 identifiziert [21, 25–27], doch die mechanistischen Details dieser Hemmung sind bislang ungeklärt. Frühere Studien haben gezeigt, dass BIC1 sowohl unter Dunkel- als auch unter Lichtbedingungen an CRY1 binden kann [28]. Dies wirft die Frage auf, ob BIC1 primär die Oligomerbildung verhindert oder bereits gebildete CRY1-Komplexe aktiv disassemblieren kann.

Eine weitere potenzielle Regulationsebene stellen zelluläre Metabolite dar [29–31]. Es ist bekannt, dass ATP an die PHR-Domäne pflanzlicher CRYs bindet [17, 18]. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass ATP die Photoreduktion von FAD beschleunigt und die reduzierten Zustände stabilisiert [30, 32–34]. Ob ATP jedoch direkt die Oligomerisierungsdynamik von CRY1 beeinflusst, ist bislang ungeklärt.

Aufbauend auf unserer vorherigen Arbeit, in der wir zeitaufgelöste lichtinduzierte Konformationsänderungen des monomeren, tierähnlichen CRY aus *Chlamydomonas reinhardtii* (CraCRY) demonstrierten [35], gehen wir nun einen Schritt weiter und untersuchen den Oligomerisierungsmechanismus, der auf die Photoaktivierung von CRY1 aus *A.*

thaliana folgt. Wir kombinieren verschiedene native Massenspektrometrie-Methoden, Absorptionsspektroskopie und Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM), um die lichtinduzierte Assemblierung und Regulation der PHR-Domäne von *Arabidopsis* CRY1 in vitro aufzuklären. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die CRY1-Oligomerisierung über einen sequenziellen Monomer → Dimer → Tetramer Weg verläuft, der durch ein reversibles zweistufiges kinetisches Modell quantitativ beschrieben werden kann. ATP beschleunigt diesen Prozess, indem es die Oligomerisierungsraten erhöht und die oligomeren Zustände stabilisiert. Darüber hinaus zeigen wir, dass BIC1 sowohl im Dunkeln als auch unter Blaulicht an CRY1 bindet, wobei sich die Affinitäten signifikant unterscheiden. BIC1 verhindert nicht nur die Tetramerbildung, sondern baut auch bereits gebildete CRY1-Oligomere ab. Diese Fähigkeit erstreckt sich auch auf die konstitutiv als Tetramer vorliegende Mutante CRY1 L407F [36, 37]. Schließlich zeigen wir, dass die inhibitorische Wirkung von BIC1 nicht auf der Hemmung der Photoreduktion des FAD-Chromophors beruht. Dies deutet darauf hin, dass BIC1 CRY1 über direkte Konkurrenz mit CRY1-CRY1-Interaktionen reguliert, anstatt die Photochemie des Chromophors zu beeinflussen.

Zusammen etablieren unsere Ergebnisse ein quantitatives kinetisches Modell für die Oligomerisierung von pflanzlichem CRY1 und zeigen zwei regulatorische Hebel auf: ATP als gebundener Cofaktor und die aktive Dissoziation durch BIC1. Diese Ergebnisse decken grundlegende Prinzipien der CRY1-Regulation auf, die CRY1 von CRY2 unterscheiden. Sie verdeutlichen wie Pflanzenzellen Cofaktor-Bindung und inhibitorische Proteine kombinieren, um die CRY-Signalübertragung präzise abzustimmen.

2 | Ergebnisse und Diskussion

2.1 | Oligomerisierungsmechanismus von *Arabidopsis* CRY1

Um mechanistische Einblicke in die Oligomerisierung von *Arabidopsis* CRY1 zu gewinnen, untersuchten wir die oligomeren Zustände der rekombinanten CRY1-PHR-Domäne (CRY1-PHR), im Folgenden als CRY1 bezeichnet, in vitro mittels Nano-Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (nESI-MS). Für diese Experimente wurde das nESI-Setup mit einer Blaulicht-LED ausgestattet, die während der Messung direkt auf die Probe gerichtet wurde (Abbildung S1a). In Übereinstimmung mit früheren Studien [26] liegt CRY1 im Dunkeln überwiegend als Monomer vor ($m/z = 3500\text{--}4800$, Abbildung 1a), wobei nur ein kleiner Anteil als Dimer ($m/z = 5000\text{--}5700$) vorhanden ist. Die Bestrahlung mit Blaulicht fördert die Oligomerisierung und führt zur Bildung von Tetrameren ($m/z = 6000\text{--}8500$) (Abbildung 1b).

Um den zugrunde liegenden Mechanismus dieser lichtinduzierten Oligomerisierung aufzuklären, untersuchten wir als Nächstes, ob die Tetramerbildung ausschließlich über Dimer-Intermediate erfolgt oder ob trimere Zwischenstufen beteiligt sind. Zu diesem Zweck führten wir bei Raumtemperatur zeitaufgelöste Massenspektrometrie durch, mit der wir transiente oligomere Zustände unter Blaulichtbedingungen nachweisen und quantifizieren konnten (Abbildung S2). Die zeitaufgelösten Daten zeigen einen klar definierten kinetischen Verlauf der

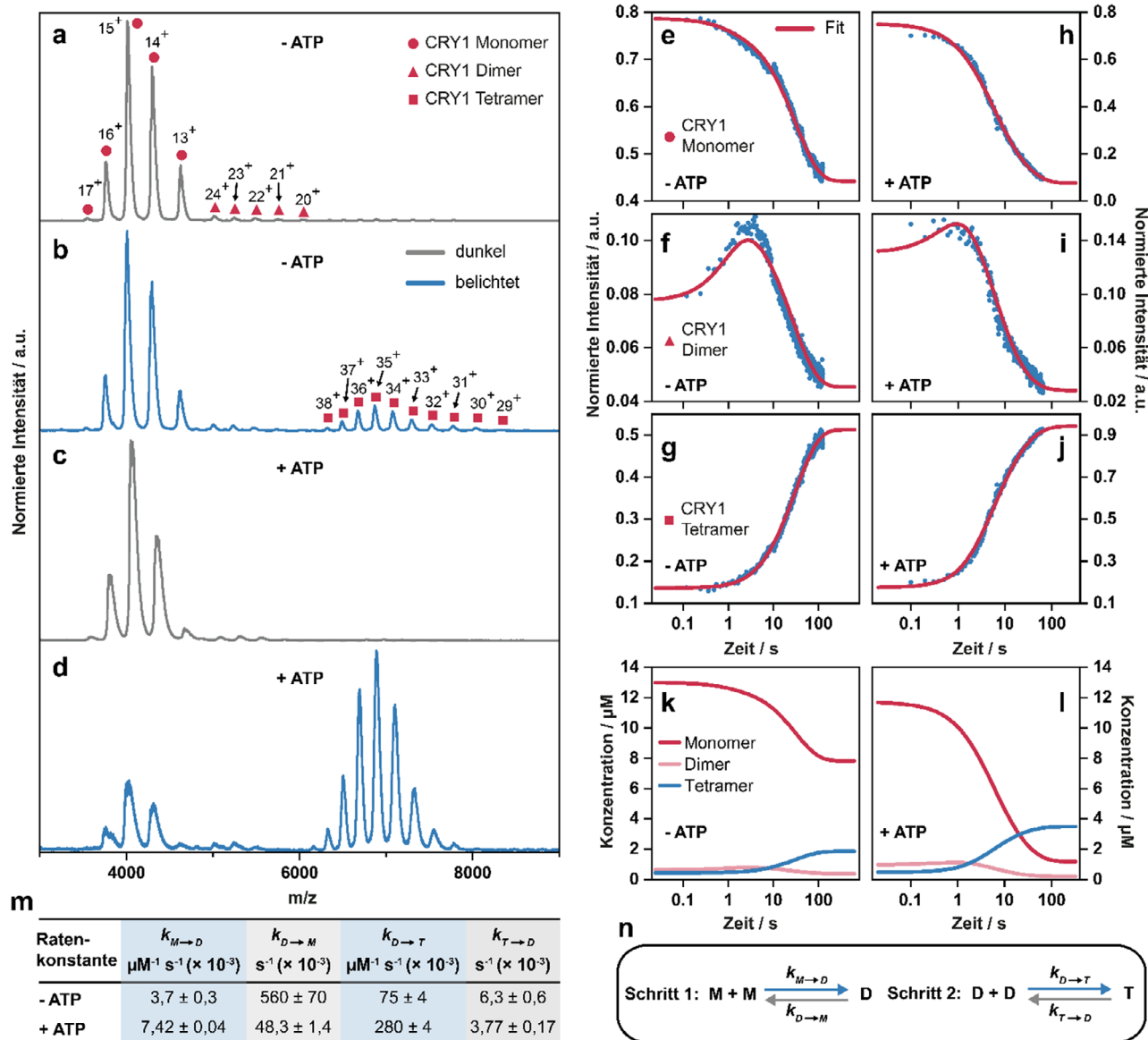


ABBILDUNG 1 | Oligomerisierungskinetik von CRY1 unter Blaulicht und der Einfluss von ATP. nESI-MS-Spektren von CRY1 im Dunkeln (graue Linie) (a, c) und unter Blaulichtbestrahlung (blaue Linie) (b, d) in Abwesenheit (a, b) und in Anwesenheit von 100 μM ATP (c, d). Die Bestrahlung mit blauem Licht führt zur Oligomerisierung von CRY1. Die Zugabe von ATP fördert diesen Prozess. Zeitaufgelöste Massenspektrometrie-Messungen des CRY1-Monomers (e), Dimers (f) und Tetramers (g) in Abwesenheit und Anwesenheit (h–j) von ATP sowie die kinetische Anpassung in pink. Die Zeitachse ist logarithmisch skaliert, um die frühen kinetischen Übergänge besser aufzulösen. (k) Konzentrationsprofil von CRY1-Monomer, -Dimer und -Tetramer in Abwesenheit (k) und Anwesenheit (l) von 100 μM ATP während der Bestrahlung mit blauem Licht. Die Konzentrationsprofile wurden aus der Anpassung des zweistufigen reversiblen kinetischen Modells (n) erhalten. (m) Assoziations- (blau hervorgehoben) und Dissoziationsraten (grau hervorgehoben), die aus der kinetischen Modellierung in Anwesenheit und Abwesenheit von 100 μM ATP erhalten wurden. Die Raten stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen dar ($n = 3$); die Fehlerabschätzungen wurden aus der Anpassung des kinetischen Modells abgeleitet.

CRY1-Oligomerisierung (Abbildungen 1e–g, S3a–c). Im dunkeladaptierten Zustand liegt das CRY überwiegend als Monomer vor (Abbildungen 1a,e, S3a). Die Bestrahlung mit Blaulicht führt zu einer raschen Abnahme des Monomeranteils (Abbildungen 1e, S3a), begleitet vom Auftreten von Dimeren (Abbildungen 1f, S3b). Nach einer kurzen Verzögerung bilden sich Tetramere, was den Verlauf eines schrittweisen Assemblierungswegs widerspiegelt (Abbildungen 1g, S3c). Der Dimer-Anteil erreicht nach etwa 3 Sekunden sein Maximum (Abbildungen 1f, S3b), während die Akkumulation der Tetramere langsamer voranschreitet und nach 120 Sekunden ein stationäres Plateau erreicht (Abbildungen 1g, S3c).

Bemerkenswerterweise verschwindet die monomere Spezies nicht vollständig (Abbildungen 1b,e, S3a), was darauf hinweist, dass der Oligomerisierung gleichzeitig ein thermischer Dissoziationsprozess entgegenwirkt. Diese Beobachtung verdeutlicht, dass selbst unter anhaltender Lichtaktivierung Oligomerbildung und -abbau in kinetischer Konkurrenz zueinander stehen.

Um den Oligomerisierungsmechanismus quantitativ zu beschreiben, stellten wir ein reversibles kinetisches Modell auf, bestehend aus zwei Schritten (Abbildung 1n). Dieses Modell basiert auf

einer sequenziellen Assemblierung vom Monomer über das Dimer zum Tetramer ($M \rightarrow D \rightarrow T$), ohne direkte Umwandlung vom Monomer zum Tetramer und ohne Trimere als Zwischenstufen. Die Anpassung unserer Daten an dieses Modell (Abbildungen 1e–g, S3a–c) ergibt die in Abbildung 1m aufgeführten Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten. Das Modell beschreibt die zeitlichen Verläufe aller drei oligomeren Zustände genau (Abbildung 1k). Die relativ niedrige Rate für die Monomer-Dimer-Umwandlung ($k_{M \rightarrow D} = (3,7 \pm 0,3) \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) deutet auf eine langsame Dimerisierung hin, während die höhere Rate für die Dimer-Tetramer-Umwandlung, $k_{D \rightarrow T} = (75 \pm 4) \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, zeigt, dass die Tetramerisierung effizient abläuft, sobald Dimere gebildet sind. Auch die Dissoziationsraten unterscheiden sich deutlich: Dimere dissoziieren schnell ($k_{D \rightarrow M} = (560 \pm 70) \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$), während Tetramere stabiler sind ($k_{T \rightarrow D} = (6,3 \pm 0,6) \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$). Zusammen erklären diese Geschwindigkeitskonstanten sowohl die Anreicherung von Tetrameren als auch das Fortbestehen von Monomeren in einem dynamischen, lichtinduzierten stationären Zustand. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die experimentell beobachtete Oligomerisierungsdynamik von CRY1 effektiv durch ein zweistufiges Modell reversibler Reaktionen beschrieben werden kann, wobei die Dimerbildung als geschwindigkeitsbestimmender Schritt bei der CRY1-Aktivierung identifiziert wird. Im Vergleich dazu erfolgt die FAD-Photoreduktion innerhalb von Mikrosekunden [38] und damit wesentlich schneller als die Oligomerisierung. Dies zeigt, dass die lichtinduzierte Aktivierung des Flavins-Cofaktors keine nennenswerte kinetische Verzögerung verursacht. Die relative Stabilität der Oligomere unterscheidet sich erheblich: Während Dimere sehr kurzlebig sind, weisen Tetramere eine deutlich höhere Stabilität auf. Diese lichtabhängigen Gleichgewichtszustände deuten darauf hin, dass die CRY1-Signalübertragung ein hochdynamischer Prozess ist und nicht einem einfachen Ein-Aus-Prinzip folgt. Um unsere In-vitro-Oligomerisierungskinetik direkt mit den In-vivo-Beobachtungen von Liu et al. [22], zu vergleichen, passten wir die Daten der Tetramerbildung mit einem einfachen exponentiellen Modell an und bestimmten eine Halbwertszeit von etwa $t_{1/2} = 18 \text{ s}$ (Abbildung S4). In vivo ist die entsprechende Halbwertszeit bei einer Fluenzrate von $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ etwa fünfmal länger, was zusätzliche zelluläre Faktoren wie regulatorische Wechselwirkungen (z. B. BIC1-Hemmung), Metabolite, eine andere reduzierende Umgebung, Temperaturunterschiede und abweichende Proteinkonzentrationen widerspiegelt. Trotz dieser Unterschiede liegen die Zeitskalen in derselben Größenordnung, was die physiologische Relevanz des durch zeitaufgelöste Massenspektrometrie erfassten Oligomerisierungsprozesses unterstreicht. Unser In-vitro-Ansatz ermöglicht es, die Einflüsse einzelner Faktoren zu entkoppeln, die im zellulären Kontext nur schwer zu unterscheiden sind, und bietet somit eine sinnvolle Ergänzung zu In-vivo-Messungen. Obwohl die kinetischen Parameter für CRY1-PHR bestimmt wurden, ist das zugrunde liegende sequenzielle Monomer-Dimer-Tetramer-Assemblierungsschema wahrscheinlich bei allen pflanzlichen CRYs konserviert. In Übereinstimmung mit Ähnlichkeiten in der Photorezeptorregulation, dürfte die Unterscheidung zwischen schneller lichtinduzierter Oligomerisierung und langsamerer thermischer Disassemblierung auch für CRY2 gelten. Über die biologische Relevanz hinaus eröffnet eine derart detaillierte kinetische Analyse zudem neue Möglichkeiten zur Entwicklung von CRY1-basierten optogenetischen Werkzeugen mit fein justierbarer zeit-

licher Präzision, die bestehende CRY2-basierte Systeme ergänzen [39–43].

2.2 | ATP fördert die Bildung von CRY1-Oligomeren

Angesichts früherer Berichte, wonach ATP die Kinetik der FAD-Photoreduktion von CRYs beeinflusst [30, 32–34], untersuchten wir, ob ATP auch die lichtinduzierte Oligomerisierung von CRY1 moduliert. Unter identischen Bedingungen in Anwesenheit und Abwesenheit von ATP zeigt sich eine deutliche ATP-abhängige Zunahme der Tetramerbildung (Abbildung 1c,d). In Gegenwart von $100 \mu\text{M}$ ATP, was im Bereich der geschätzten physiologischen ATP-Konzentrationen in Pflanzenzellen liegt [44], bildet CRY1 effizienter Tetramere und erreicht unter Blaulichtbestrahlung deutlich höhere Tetramerkonzentrationen (Abbildung 1d). Die kinetische Modellierung zeigt, dass ATP sowohl die Assoziations- als auch die Dissoziationsschritte der CRY1-Oligomerisierung beeinflusst. Während ATP die Assoziation von Monomeren zu Dimeren um etwa das Zweifache beschleunigt, verlangsamt es die umgekehrte Dimer-Dissoziation um fast eine Größenordnung, was zu einer ausgeprägten Stabilisierung des dimeren Zwischenprodukts führt (Abbildung 1m). Darüber hinaus erhöht ATP die Dimer-Tetramer-Assoziation um den Faktor vier, während es die thermische Dissoziation der Tetramere um etwa das Zweifache verlangsamt (Abbildungen 1h–j,m, SI-Abbildung S3d–f). In der Summe verschieben diese Effekte das stationäre Gleichgewicht deutlich in Richtung der Tetramere, die unter kontinuierlicher Beleuchtung zur dominanten Spezies werden (Abbildung 1l). Um die Konzentrationsabhängigkeit weiter zu untersuchen, analysierten wir auch Proben mit $200 \mu\text{M}$ ATP. Unter diesen Bedingungen zeigt sich bereits im Dunkeln eine erhöhte Dimerpopulation im Vergleich zu Proben ohne ATP oder mit $100 \mu\text{M}$ ATP (Abbildung S5a–c). Dies deutet darauf hin, dass höhere ATP-Konzentrationen die Dimerbildung auch ohne Blaulicht fördern oder stabilisieren können. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass ATP insbesondere die Dimerbildung verstärkt und stabilisiert. Diese haben wir als den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Tetramerbildung unter Blaulichtbedingungen identifiziert. Dadurch nimmt ATP eine zentrale regulatorische Rolle bei der Steuerung der Oligomerisierungsdynamik von CRY1 ein. In Übereinstimmung zu früheren Studien, zeigen UV/Vis-Absorptionsspektren zudem einen verstärkenden Effekt von ATP auf die Kinetik der FAD-Photoreduktion [30, 32–34]. In unseren Messungen beschleunigt ATP die Photoreduktion von FAD_{ox} zu FADH° um etwa 12%, während der thermische Zerfall von FADH° zurück zu FAD_{ox} um nahezu 60% verlangsamt wird (Abbildung S5d–h). Obwohl die Beschleunigung der Photoreduktion gering ist und physiologisch vermutlich keine große Bedeutung hat, stützen unsere Daten insgesamt die Annahme, dass ATP als Cofaktor wirkt, der oligomere Zustände stabilisiert und die für deren Bildung erforderlichen Konformationsänderungen begünstigt.

2.3 | BIC1 bindet CRY1 sowohl im dunkeln als auch unter blauem Licht

Obwohl bekannt ist, dass BIC1 an CRY1 bindet, ist bislang unklar, ob diese Wechselwirkung die Oligomerisierung hemmt oder sogar bereits bestehende Komplexe auflöst. Um den

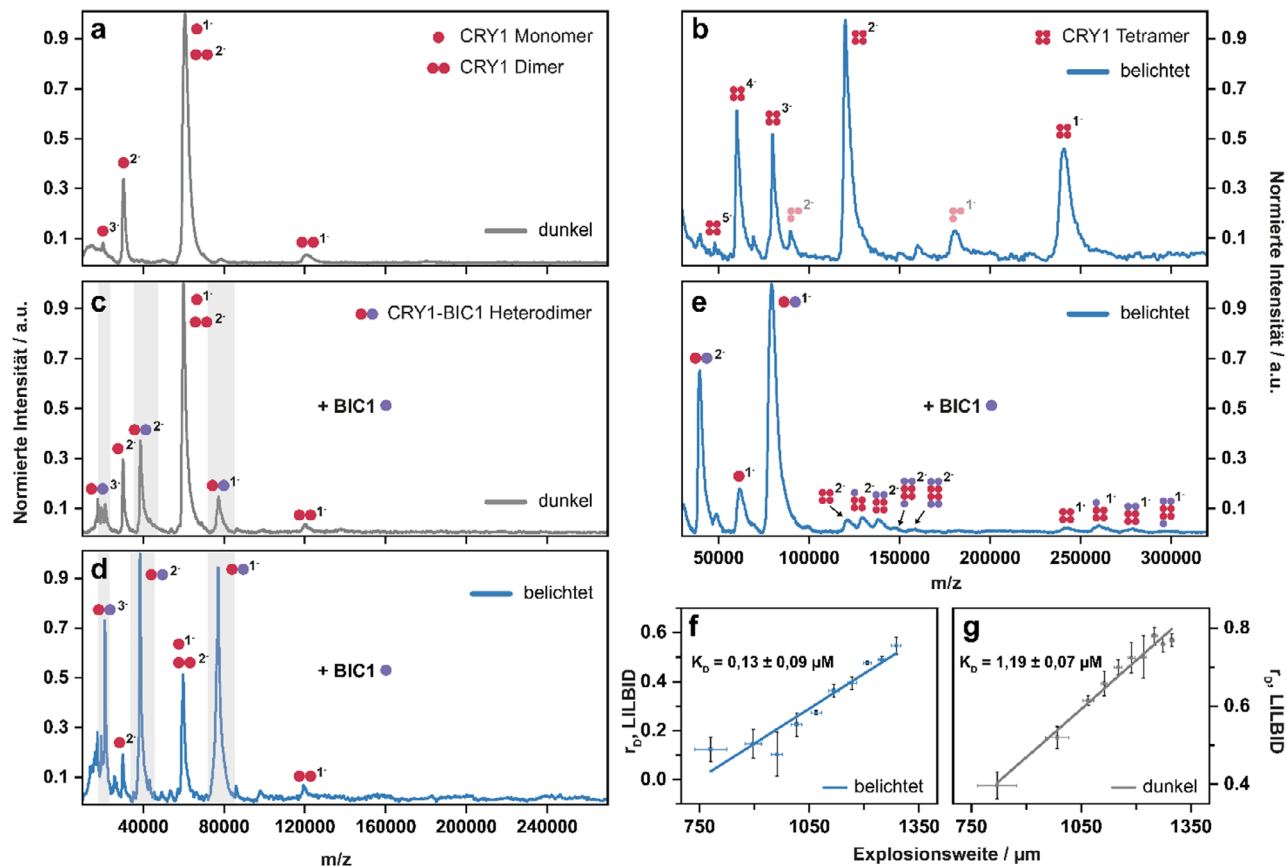


ABBILDUNG 2 | BIC1 inhibiert die Oligomerisierung von CRY1 sowohl bei Dunkelheit als auch unter Blaulicht, wobei BIC1 unter Blaulicht eine höhere Affinität zu CRY1 aufweist. Das LILBID-MS-Spektrum von CRY1 zeigt ein Monomer (theoretische molare Masse: 59,2 kDa, experimentelle molare Masse: 59,9 kDa) (a) im Dunkeln, welches bei Bestrahlung mit blauem Licht Tetramere bildet (b). CRY1-Trimere entstehen durch Laserdissoziation. (c) Die Inkubation von CRY1-Monomer und BIC1 (theoretische molare Masse: 18,9 kDa, experimentelle molare Masse: 17,5 kDa) im äquimolaren Verhältnis im Dunkeln führt zu einer Mischung aus CRY1-BIC1-Heterodimer und CRY1-Monomer. (d) Bei Bestrahlung mit blauem Licht verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten des CRY1-BIC1-Heterodimers im Verhältnis zum CRY1-Monomer (grau hervorgehoben). (e) Unter Blaulichtbedingungen führt die Zugabe von BIC1 zum CRY1-Tetramer zur Bindung an jedes Protomer, wodurch das Tetramer in CRY1-BIC1-Heterodimere dissoziiert. (f) qLILBID-MS-Analysen zeigen, dass das CRY1-BIC1-Heterodimer unter Blaulicht eine zehnfach höhere Affinität aufweist als im Dunkelzustand (g). Die angegebenen K_D -Werte stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen dar ($n = 3$).

Mechanismus der CRY1-Hemmung durch BIC1 direkt zu untersuchen, setzten wir Laser-Induced Liquid Bead Ion Desorption-Massenspektrometrie (LILBID-MS) ein [45]. Zur Echtzeitbeobachtung lichtabhängiger Effekte wurde das LILBID-MS-Setup mit einer Blaulicht-LED ausgestattet, durch die es möglich ist, die Probe während der gesamten Messung zu beleuchten (Abbildung S1b). In Übereinstimmung mit den nESI-MS-Daten zeigte die LILBID-MS-Analyse, dass CRY1 im Dunkeln überwiegend als Monomer (~60 kDa) vorliegt, während nur eine geringe Dimerpopulation (~120 kDa) nachweisbar ist (Abbildung 2a). Unter Blaulicht verschiebt sich die Oligomerverteilung rasch in Richtung von Tetrameren (~240 kDa) (Abbildung 2b). Darüber hinaus wurde ein kleiner Anteil von CRY1-Trimern detektiert, der auf eine teilweise Dissoziation der Tetramere durch den Energieeintrag während der LILBID-MS-Analyse zurückzuführen ist (Abbildung S6a). Nach Zugabe von BIC1 (~20 kDa) lässt sich sowohl im Dunkeln als auch unter Blaulicht eine Ladungsverteilung beobachten, die der Masse des CRY1-BIC1-Heterodimers (~80 kDa) entspricht. Dies deutet auf eine direkte Bindung zwischen den beiden Proteinen hin (Abbildung 2c,d). Während die Bindung im Dunkeln schwächer ausgeprägt ist (Abbildung 2c),

nimmt der Anteil des CRY1-BIC1-Heterodimers unter Blaulicht deutlich zu (Abbildung 2d). Bemerkenswerterweise ist in den belichteten Proben kein Signal für CRY1-Tetramere mehr nachweisbar, was darauf hindeutet, dass die Bindung von BIC1 die Oligomerbildung effektiv unterdrückt. Zur quantitativen Bestimmung der Interaktionsstärke des CRY1-BIC1-Heterodimers bei unterschiedlichen Lichtbedingungen, setzten wir quantitative LILBID-MS (qLILBID-MS) ein. qLILBID-MS ist eine Label-freie Methode, die die Bestimmung von Dissoziationskonstanten unter den erforderlichen Pufferbedingungen erlaubt [46–48]. Im Dunkeln bindet BIC1 mit moderater Affinität an CRY1 ($K_D \approx 1,2 \mu\text{M}$) (Abbildung 2g), während die Wechselwirkung unter Blaulicht deutlich verstärkt ist ($K_D \approx 0,13 \mu\text{M}$) (Abbildung 2f). Diese etwa zehnfache Affinitätssteigerung deutet darauf hin, dass lichtinduzierte Konformationsänderungen in CRY1 dessen Erkennung durch BIC1 begünstigen. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass BIC1 sowohl an den inaktiven als auch an den lichtaktivierten Zustand von CRY1 bindet, jedoch mit klarer Präferenz für die aktive Form. Dies spricht für einen Mechanismus, bei dem BIC1 selektiv photoaktiviertes CRY1 hemmt.

2.4 | BIC1 löst CRY1-Oligomere auf

CRY1 bildet bei Bestrahlung mit blauem Licht Tetramere (Abbildung 2b), und BIC1 bindet unter diesen Bedingungen mit hoher Affinität (Abbildung 2d). Dabei stellt sich die Frage, ob BIC1 lediglich die Tetramerbildung blockiert oder sogar bereits vorhandene CRY1-Oligomere aktiv auflösen kann, wie dies für CRY2 und BICs gezeigt wurde [21, 24]. Um dies zu untersuchen, gaben wir BIC1 zu lichtinduziertem CRY1-Tetramer unter konstanten Blaulichtbedingungen hinzu. Die Massenspektren zeigen, dass BIC1 schrittweise an einzelne CRY1-Protomere innerhalb des Tetramers (~260–320 kDa) bindet (Abbildung 2e), diese aus dem Komplex verdrängt und ein dominantes BIC1-CRY1-Heterodimer (~80 kDa) bildet. Diese Beobachtungen belegen, dass BIC1 nicht nur die Tetramerbildung blockiert, sondern bereits bestehende CRY1-Tetramere aktiv zerlegt, indem es sukzessive alle Untereinheiten besetzt. Die direkte Beobachtung der BIC1-induzierten CRY1-Dissoziation mittels nativer Massenspektrometrie liefert mechanistische Einblicke auf molekularer Ebene und unterstützt einen allgemeinen Mechanismus der BIC-vermittelten Hemmung pflanzlicher CRYs. Damit erweitern unsere Ergebnisse frühere, mit orthogonalen Methoden gewonnenen Befunde zu CRY2.

Die Negativkontrast-TEM bestätigt die massenspektrometrischen Daten. In belichteten Proben bildet CRY1 ringförmige Strukturen, die in dunkeladaptierten Proben fehlen (Abbildung 3a–c,e,f) und mit der Bildung tetramerer Anordnungen übereinstimmt. Die Zugabe von BIC1 reduziert die Häufigkeit dieser oligomeren Partikel deutlich. Selbst nach 30-minütiger Beleuchtung zeigen die mit BIC1 inkubierten Proben nur noch wenige ringförmige Strukturen (Abbildung 3d,h). Darüber hinaus zerfallen die CRY1-Oligomere nach der Überführung ins Dunkle in Gegenwart von BIC1 deutlich schneller. Bereits zum frühesten Zeitpunkt kann eine nahezu vollständige Monomerisierung beobachtet werden (Abbildung 3g).

2.5 | BIC1 bewirkt eine lichtunabhängige Disassemblierung von CRY1-Tetrameren

Um zu prüfen, ob die BIC1-vermittelte Hemmung von CRY1-Tetrameren eine Lichtaktivierung erfordert, analysierten wir die Mutante CRY1^{L407F}, die als hyperaktiv gilt und zu einem konstitutiven photomorphogenetischen Phänotyp führt [36, 37]. Die analytische Größenausschlusschromatographie (SEC) zeigt, dass CRY1^{L407F} im Vergleich zum Wildtyp bereits im Dunkeln eine Retentionszeit aufweist, die einem Tetramer entspricht (Abbildung 4d). LILBID-MS bestätigt ebenfalls das Vorhandensein von Tetrameren im Dunkeln (Abbildung 4a), während UV/Vis-Absorptionsspektroskopie zeigt, dass der Austausch von Leucin gegen Phenylalanin an Position 407 die Photoreduktion des FAD-Chromophors nicht beeinträchtigt (Abbildung 4h).

Nach Zugabe von BIC1 werden die CRY1^{L407F}-Tetramere effizient in BIC1-CRY1^{L407F}-Heterodimere zerlegt (Abbildungen 4b, S6b). Im Gegensatz zum Wildtyp-CRY1 (Abbildung 2c,d) verstärkt Blaulichtbestrahlung die Bildung des CRY1^{L407F}-BIC1-Heterodimers nicht weiter (Abbildung 4c) und hat auch keine anderen signifikanten Auswirkungen auf die beobachteten Komplexe. qLILBID-Messungen zeigen, dass BIC1 unabhängig

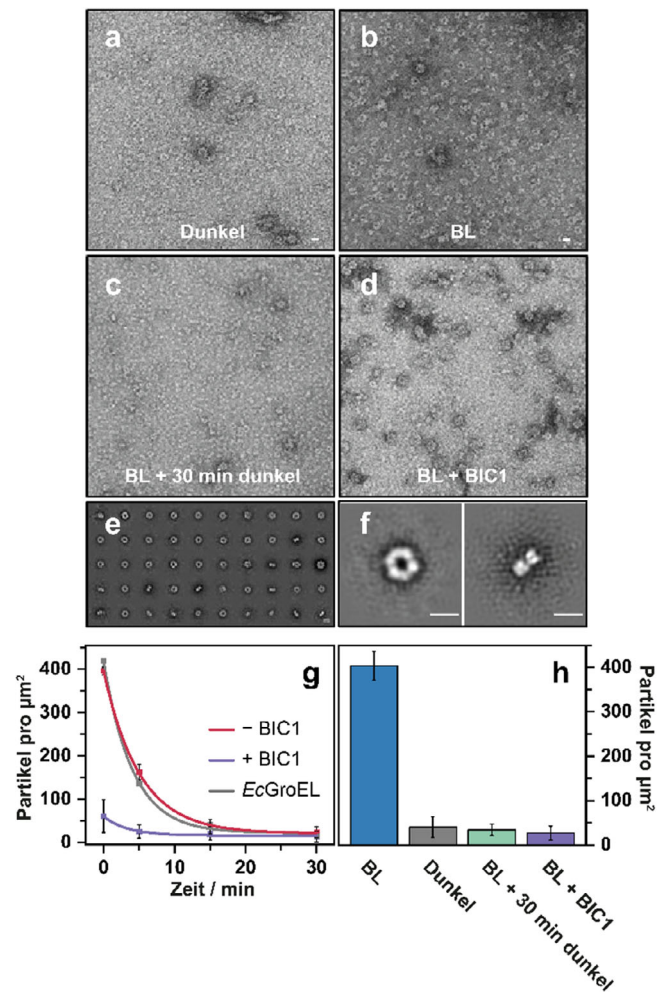


ABBILDUNG 3 | Durch Blaulicht induzierte Ringbildung und Monomerisierungsdynamik von CRY1. TEM-Aufnahmen von CRY1-PHR zeigen im Dunkeln einen überwiegend diffusen Proteinhintergrund (a), während die Bestrahlung mit Blaulicht die quantitative Bildung von ringförmigen Strukturen induziert (b). (c) CRY1-PHR nach Blaulichtbestrahlung, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation im Dunkeln. (d) CRY1-PHR unter Blaulichtbestrahlung in Gegenwart von BIC1. (e) Repräsentative 2D-Klassen der durch Blaulicht induzierten CRY1-PHR-Ringstrukturen; insgesamt wurden 6734 Partikel ausgewählt. (f) Draufsicht und Seitenansicht des ringförmigen Tetramers, gemittelt aus 176 bzw. 150 Partikeln. Maßstabsbalken: 10 nm. Die Blaulichtbehandlung erfolgte bei 450–465 nm für 20 min mit einer Fluenzrate von $115 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. (g) Kinetik der CRY1-PHR-Monomerisierung nach der Überführung der Probe von Blaulicht in Dunkelheit in Abwesenheit oder Anwesenheit von BIC1 oder *E. coli* GroEL als Negativkontrolle ($n = 3 \pm \text{SD}$). (h) Quantifizierung des Einflusses von BIC1 auf den Rückgang der Anzahl an CRY1-PHR-Partikeln ($n = 3 \pm \text{SD}$).

von der Beleuchtung mit hoher Affinität ($K_D = 0,10 \pm 0,03 \mu\text{M}$) an CRY1^{L407F} bindet, vergleichbar mit der Affinität von BIC1 für das lichtaktivierte Wildtyp-CRY1 ($K_D = 0,13 \pm 0,09 \mu\text{M}$). Dies deutet darauf hin, dass die L407F-Mutation eine Konformationsänderung in CRY1 hervorruft, die dessen lichtaktivierten Zustand hinsichtlich der BIC1-Erkennung nachahmt. Insgesamt legen diese Ergebnisse nahe, dass BIC1 die Oligomerisierung von CRY1 stört, indem es an einzelne CRY1-Protomere mit einer höheren

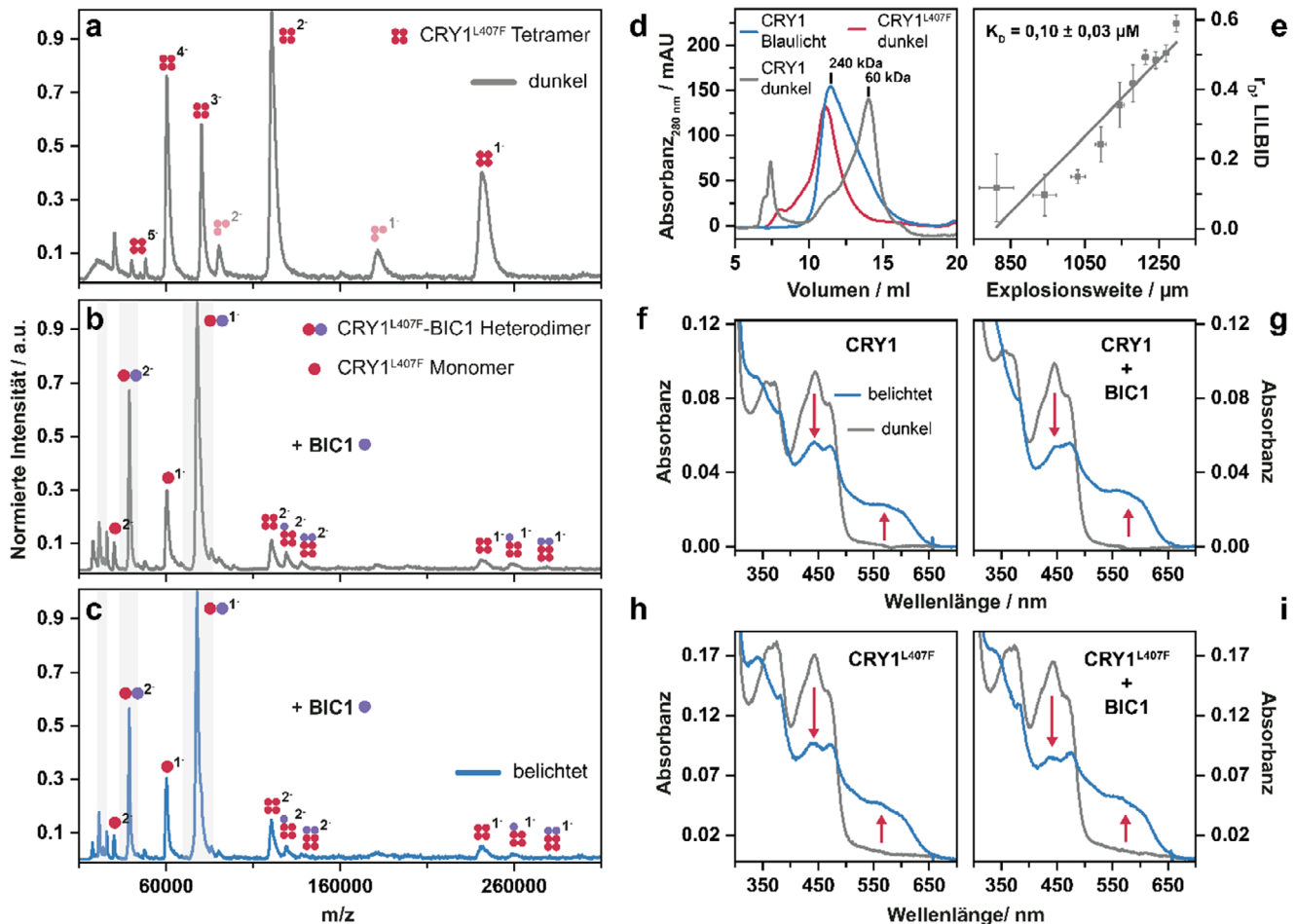


ABBILDUNG 4 | BIC1 inhibiert konstitutiv aktive CRY1^{L407F}-Tetramere ohne dabei die Photoreduktion des FAD-Cofaktors zu hemmen. (a) Das LILBID-MS-Spektrum der konstitutiv aktiven CRY1^{L407F}-Mutante zeigt im Dunkeln ein Tetramer (theoretische molare Masse: 236,8 kDa, experimentelle molare Masse: 241,4 kDa). CRY1^{L407F}-Trimere entstehen durch Laserdissoziation. (b) Die Zugabe von BIC1 zu CRY1^{L407F} im äquimolaren Verhältnis im Dunkeln führt zur Bindung an jedes Protomer, wodurch das CRY1^{L407F}-Tetramer in ein CRY1^{L407F}-BIC1-Heterodimer und monomeres CRY1^{L407F} dissoziiert. (c) Die Bestrahlung mit blauem Licht verschiebt das Gleichgewicht nicht in Richtung des CRY1^{L407F}-BIC1-Heterodimers, wie dies für Wildtyp-CRY1 gezeigt wurde. (d) SEC-Elutionsprofile von Wildtyp-CRY1, das im Dunkeln aufbewahrt oder mit blauem Licht bestrahlt wurde, sowie von der hyperaktiven CRY1^{L407F}-Mutante im Dunkeln. Das verbreiterte Elutionsprofil von CRY1 im dunklen Zustand deutet auf einen gewissen Anteil an oligomeren Zuständen bereits unter diesen Versuchsbedingungen hin. (e) qLILBID-MS-Messungen des CRY1^{L407F}-BIC1-Heterodimers unter dunklen Bedingungen ergab, dass BIC1 mit hoher Affinität an CRY1^{L407F} bindet ($n = 3$). (f) Die Absorptionsspektren von Wildtyp-CRY1 vor und nach der Bestrahlung mit blauem Licht weisen auf eine FAD-Photoreduktion hin, mit einer Abnahme des FAD_{ox}-Peaks bei 450 nm und dem Auftreten einer breiten Bande bei 550–600 nm, das charakteristisch für das FADH[•]-Semichinon ist. (g) Die Zugabe von BIC1 zu Wildtyp-CRY1 hemmt die Photoreduktion des FAD-Chromophors von CRY nicht. (h) Die Absorptionsspektren der CRY1^{L407F}-Mutante zeigen, dass die Mutation keinen Einfluss auf die Photoreduktion des Chromophors hat. (i) Die Zugabe von BIC1 zu CRY1^{L407F} hemmt die Photoreduktion des FAD-Chromophors nicht.

Affinität bindet als die CRY1-Protomere zueinander. Hierdurch können die CRY1-CRY1-Wechselwirkungen unabhängig vom Photoreduktionszustand des Chromophors effektiv überwunden werden.

2.6 | BIC1 hat keinen Einfluss auf die Photoreduktionskinetik des FAD-Cofaktors

Die verbleibende offene Frage ist, ob BIC1 die CRY1-Oligomerisierung unterdrückt, indem es dessen Photoaktivierung stört, wie dies zuvor für die Hemmung von CRY2 durch BIC2 gezeigt wurde [24]. Um dies zu prüfen, bestimmten wir den Photoreduktionszustand des

FAD-Chromophors in Anwesenheit und Abwesenheit von BIC1. Die UV/Vis-Absorptionsspektren von gereinigtem CRY1 vor und nach Blaulichtbestrahlung zeigen die erwarteten spektralen Veränderungen, die mit der FAD-Photoreduktion einhergehen (Abbildungen 4f, S5d,e). Im dunkeladaptierten Zustand zeigt CRY1 charakteristische Absorptionsmaxima für oxidiertes Flavin (FAD_{ox}) bei 450 nm und eine Schulter nahe 480 nm. Bei Bestrahlung mit blauem Licht nimmt die Intensität dieser Peaks ab, begleitet vom Auftreten einer breiten Bande zwischen 550 und 600 nm, was der Bildung des neutralen Semichinonradikals (FADH[•]) entspricht [17, 18, 49]. Diese spektralen Veränderungen spiegeln den lichtgetriebenen Redoxübergang des CRY1-Chromophors wider. Identische spektrale Merkmale werden beobachtet, wenn CRY1 oder

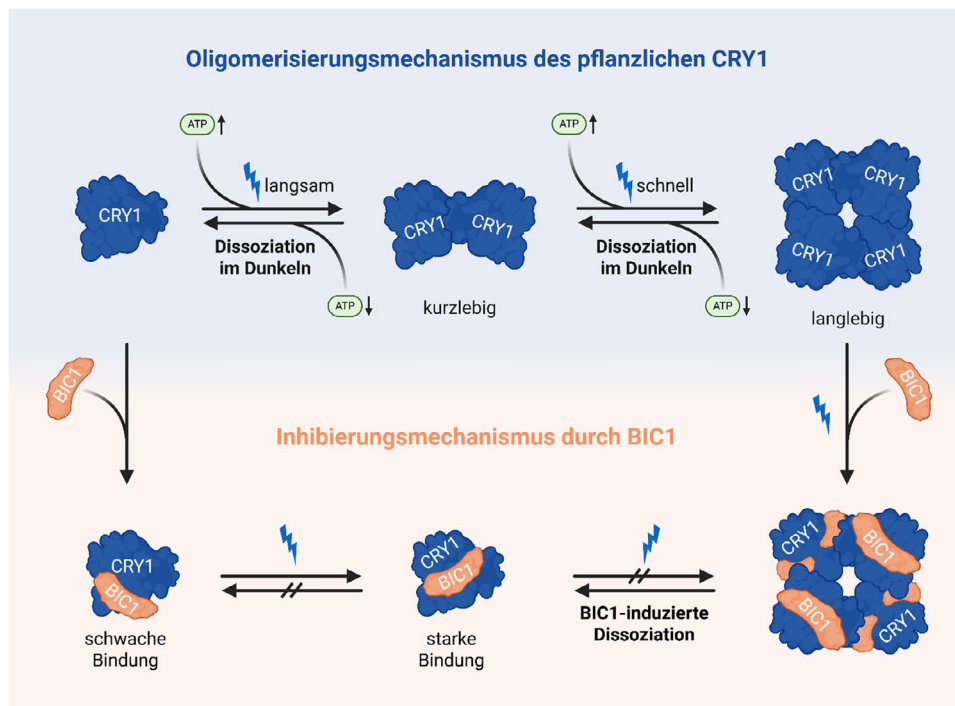


ABBILDUNG 5 | Schematische Darstellung der Oligomerisierungsdynamik von pflanzlichem CRY, der ATP-Modulation und der BIC1-vermittelten Inhibition. Bei Bestrahlung mit blauem Licht geht CRY1 über ein kurzlebiges dimeres Intermediat von einem monomeren in einen tetrameren Zustand über. Diese Oligomerisierung folgt einem zweistufigen, reversiblen Mechanismus. ATP erhöht die Assoziationsraten für die Dimer- und Tetramerbildung, während es gleichzeitig die Dissoziationsraten dieser Oligomere verlangsamt. BIC1 bindet CRY1 sowohl unter Dunkel- als auch unter Lichtbedingungen, wobei die Affinität zur lichtaktivierten Konformation deutlich höher ist. BIC1 verhindert die CRY1-Oligomerbildung und baut bereits gebildete Tetramere aktiv ab, indem es an einzelne CRY1-Protomere bindet. Die Messung erfolgte unter kontinuierlicher Blaulichtbestrahlung, um eine thermische Dissoziation auszuschließen. Die Abbildung wurde mit Biorender.com erstellt.

CRY1^{L407F} unter denselben Bedingungen mit BIC1 inkubiert wird (Abbildungen 4g,i, SI S7a–c), was darauf schließen lässt, dass BIC1 den lichtinduzierten Redoxübergang von FAD_{ox} zu FADH[•] nicht beeinträchtigt und den initialen Photoaktivierungsschritt von CRY1 nicht stört. Stattdessen wirkt es abseits der Photoreduktion und zielt auf die lichtinduzierten oligomeren Zustände von CRY1 ab. Diese Ergebnisse legen nahe, dass sich die Inhibitionsmechanismen von CRY1 und CRY2 unterscheiden. Dies stützt die Annahme, dass CRYs zwar einen konservierten photochemischen Aktivierungsschritt teilen, ihre nachgeschaltete Regulation jedoch variieren kann, wodurch eine funktionelle Spezifität ermöglicht wird.

3 | Schlussfolgerung

Die Lichtwahrnehmung bei Pflanzen ist ein dynamischer Prozess, der von zahlreichen molekularen Faktoren beeinflusst wird. Unsere kinetische Analyse des pflanzlichen CRY1 zeigt, dass die Oligomerisierung in diskreten Assemblierungsschritten erfolgt und sowohl durch Cofaktoren als auch durch inhibitorische Wechselwirkungen moduliert wird. Dies deutet darauf hin, dass die CRY1-Aktivität flexibel an sich ändernde Bedingungen angepasst werden kann, wodurch eine fein abgestimmte Regulation der lichtinduzierten Signalübertragung ermöglicht wird. Zeitaufgelöste native Massenspektrometrie liefert einen klaren kinetischen Ablauf der CRY-Oligomerisierung in Pflanzen, hier am Beispiel von *Arabidopsis* CRY1 (Abbildung 5). Der schritt-

weise Aufbau von Monomer zu Dimer zu Tetramer stimmt mit einem zweistufigen reversiblen kinetischen Modell überein. Über die intrinsische Kinetik hinaus verdeutlichen unsere Ergebnisse, wie ATP die CRY1-Aktivität beeinflusst. Es stabilisiert oligomere Zwischenprodukte und fördert die Assemblierung höherer Oligomere, wodurch das Gleichgewicht in Richtung der Tetramere verschoben wird. Dies ist besonders spannend, da ATP nicht nur ein universeller Energieträger ist, sondern auch an die PHR-Domäne pflanzlicher CRYs bindet [21, 28] und die Kinetik der FAD-Photoreduktion beeinflusst [30, 32–34].

Unsere Daten beleuchten die inhibitorische Rolle von BIC1 genauer und offenbaren einen eleganten Regulationsmechanismus (Abbildung 5). BIC1 bindet sowohl unter Dunkel- als auch unter Lichtbedingungen an CRY1, wobei die Affinität zur lichtaktivierten Form deutlich erhöht ist. Dieser lichtabhängige Anstieg der Bindungsstärke bietet einen Mechanismus für die selektive Hemmung von lichtaktiviertem CRY1. Darüber hinaus liefern wir eindeutige Belege dafür, dass BIC1 ein aktiver Inhibitor von CRY1-Oligomeren ist und nicht lediglich als passiver Konkurrent wirkt. Die starke Interaktion von BIC1 mit der konstitutiv aktiven CRY1^{L407F}-Mutante, die den tetrameren, lichtaktivierten Zustand nachahmt, deutet darauf hin, dass BIC1 eine spezifische Konformationsform erkennt, die unabhängig vom FAD-Redoxzustand ist. Bemerkenswerterweise beeinträchtigt BIC1 die FAD-Photoreduktion nicht, was im Gegensatz zu jüngsten Studien über die CRY2-BIC2-Wechselwirkung steht [24]. Zusammenfassend etabliert unsere Arbeit ein quantitatives

kinetisches Modell für die CRY1-Oligomerisierung. Indem wir zeigen, dass ATP die Oligomerbildung beschleunigt, während BIC1 aktiv Tetramere abbaut, gewinnen wir ein differenzierteres Verständnis der Regulation von CRY1 über die einfache Lichtwahrnehmung hinaus. Diese Erkenntnisse liefern nicht nur Einblicke in die funktionelle Spezialisierung von CRY1, sondern verdeutlichen auch ein allgemeines Prinzip pflanzlicher Signalübertragung, bei dem die Aktivität eines Photorezeptors durch das komplexe Zusammenspiel von Licht, Cofaktoren und spezifischen Regulatoren fein abgestimmt wird.

Danksagungen

Wir danken Konstantinos Stamatakis für seine Unterstützung und die konstruktiven Diskussionen während der kinetischen Modellierung sowie Josef Wachtveitl für die Bereitstellung des Absorptionsspektrometers. Unser Dank gilt auch Dimitri Kozlov für die Expression und Aufreinigung von CRY1, das in den ersten Experimenten verwendet wurde, sowie Jeanette Schermuly für die technische Unterstützung. Die Finanzierung erfolgte durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG): A.J. wurde durch den Sonderforschungsbereich SFB 1507 „Membrane-Associated Protein Assemblies, Machineries and Supercomplexes“ gefördert, N.M. durch den DFG-Förderantrag 557111829, L.-O.E. durch den DFG-Förderantrag ES152/18 und A.B. durch den DFG-Förderantrag BA985/15-1.

Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte bestehen.

Erklärung zur Datenverfügbarkeit

Die Daten, die den Ergebnissen dieser Studie zugrunde liegen, sind auf Anfrage beim korrespondierenden Autor erhältlich.

Referenzen

1. K. A. Franklin, V. S. Lerner, and G. C. Whitelam, “The Signal Transducing Photoreceptors of Plants,” *International Journal of Developmental Biology* 49 (2005): 653–664, <https://doi.org/10.1387/ijdb.051989kf>.
2. K. J. Halliday, J. F. Martínez-García, and E.-M. Josse, “Integration of Light and Auxin Signaling,” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1 (2009): a001586.
3. M. Heijde and R. Ulm, “UV-B Photoreceptor-Mediated Signalling in Plants,” *Trends in Plant Science* 17 (2012): 230–237, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.01.007>.
4. C. Fankhauser, “The Phytochromes, a Family of Red/Far-red Absorbing Photoreceptors,” *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001): 11453–11456, <https://doi.org/10.1074/jbc.R100006200>.
5. J. M. Christie and W. R. Briggs, “Blue Light Sensing in Higher Plants,” *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001): 11457–11460, <https://doi.org/10.1074/jbc.R100004200>.
6. A. Yadav, D. Singh, M. Lingwan, P. Yadukrishnan, S. K. Masakapalli, and S. Datta, “Light Signaling And UV-B-Mediated Plant Growth Regulation,” *Journal of Integrative Plant Biology* 62 (2020): 1270–1292, <https://doi.org/10.1111/jipb.12932>.
7. C. Lin, D. E. Robertson, M. Ahmad, et al., “Association of Flavin Adenine Dinucleotide With The Arabidopsis Blue Light Receptor CRY1,” *Science* 269 (1995): 968–970, <https://doi.org/10.1126/science.7638620>.

8. K. Malhotra, S.-T. Kim, A. Batschauer, L. Dawut, and A. Sancar, “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 (1995): 6892–6899, <https://doi.org/10.1021/bi00020a037>.
9. C. A. Brautigam, B. S. Smith, and Z. Ma, “Structure of the Photolyase-Like Domain of Cryptochrome 1 From *Arabidopsis thaliana*,” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, no. 33 (2004): 12142–12147, <https://doi.org/10.1073/pnas.0404851101>.
10. M. Hanić, L. M. Antill, A. S. Gehrckens, et al., “Dimerization of European Robin Cryptochrome 4a,” *Journal of Physical Chemistry B* 127 (2023): 6251–6264.
11. X. Wang and C. Lin, “The Two Action Mechanisms of Plant Cryptochromes,” *Trends in Plant Science* 30 (2025): 775–791, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2024.12.001>.
12. Z. Yang, B. Liu, J. Su, J. Liao, C. Lin, and Y. Oka, “Cryptochromes Orchestrate Transcription Regulation of Diverse Blue Light Responses in Plants,” *Photochemistry and Photobiology* 93 (2017): 112–127, <https://doi.org/10.1111/php.12663>.
13. M. Ahmad and A. R. Cashmore, “HY4 Gene of *A. thaliana* Encodes a Protein With Characteristics of a Blue-Light Photoreceptor,” *Nature* 366 (1993): 162–166, <https://doi.org/10.1038/366162a0>.
14. H. Guo, H. Yang, T. C. Mockler, and C. Lin, “Regulation of Flowering Time by Arabidopsis Photoreceptors,” *Science* 279 (1998): 1360–1363, <https://doi.org/10.1126/science.279.5355.1360>.
15. J. Wang, X. Du, W. Pan, X. Wang, and W. Wu, “Photoactivation of the Cryptochrome/Photolyase Superfamily,” *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 22 (2015): 84–102, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2014.12.001>.
16. Q. Wang and C. Lin, “Mechanisms of Cryptochrome-Mediated Photoresponses in Plants,” *Annual Review of Plant Biology* 71 (2020): 103–129, <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100300>.
17. J.-P. Bouly, E. Schleicher, M. Dionisio-Sese, et al., “Cryptochrome Blue Light Photoreceptors Are Activated Through Interconversion of Flavin Redox States,” *Journal of Biological Chemistry* 282 (2007): 9383–9391, <https://doi.org/10.1074/jbc.M609842200>.
18. R. Banerjee, E. Schleicher, S. Meier, et al., “The Signaling State of Arabidopsis Cryptochrome 2 Contains Flavin Semiquinone,” *Journal of Biological Chemistry* 282 (2007): 14916–14922, <https://doi.org/10.1074/jbc.M700616200>.
19. Y. Sang, Q.-H. Li, V. Rubio, et al., “N-Terminal Domain-Mediated Homodimerization Is Required for Photoreceptor Activity of Arabidopsis CRYPTOCHROME 1,” *Plant Cell* 17 (2005): 1569–1584, <https://doi.org/10.1105/tpc.104.029645>.
20. G. Rosenfeldt, R. M. Viana, H. D. Mootz, A. G. von Arnim, and A. Batschauer, “Chemically Induced and Light-Independent Cryptochrome Photoreceptor Activation,” *Molecular Plant* 1 (2008): 4–14, <https://doi.org/10.1093/mp/ssp002>.
21. Q. Wang, Z. Zuo, X. Wang, et al., “Photoactivation and Inactivation of Arabidopsis Cryptochrome 2,” *Science* 354 (2016): 343–347, <https://doi.org/10.1126/science.aaf9030>.
22. Q. Liu, T. Su, W. He, et al., “Photooligomerization Determines Photosensitivity and Photoreactivity of Plant Cryptochromes,” *Molecular Plant* 13 (2020): 398–413, <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.01.002>.
23. J. Ponnu and U. Hoecker, “Signaling Mechanisms by Arabidopsis Cryptochromes,” *Frontiers in Plant Science* 13 (2022): 844714.
24. L. Ma, X. Wang, Z. Guan, et al., “Structural Insights Into BIC-mediated Inactivation of Arabidopsis Cryptochrome 2,” *Nature Structural & Molecular Biology* 27 (2020): 472–479, <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0410-z>.
25. M. Palayam, J. Ganapathy, A. M. Guercio, L. Tal, S. L. Deck, and N. Shabek, “Structural Insights Into Photoactivation of Plant Cryptochrome-

- 2." *Communications Biology* 4 (2021): 28, <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01531-x>.
26. K. Shao, X. Zhang, X. Li, et al., "The Oligomeric Structures of Plant Cryptochromes," *Nature Structural & Molecular Biology* 27 (2020): 480–488, <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0420-x>.
27. X. Wang, Q. Wang, Y.-J. Han, et al., "A CRY—BIC Negative-Feedback Circuitry Regulating Blue Light Sensitivity of *Arabidopsis*," *Plant Journal* 92 (2017): 426–436, <https://doi.org/10.1111/tpj.13664>.
28. L. Miao, J. Zhao, G. Yang, et al., "Arabidopsis Cryptochrome 1 Undergoes COP1 and LRBs-Dependent Degradation in Response to High Blue Light," *New Phytologist* 234 (2022): 1347–1362, <https://doi.org/10.1111/nph.17695>.
29. M. El-Esawi, A. Glascoe, D. Engle, T. Ritz, J. Link, and M. Ahmad, "Cellular Metabolites Modulate In Vivo Signaling of Arabidopsis Cryptochrome-1," *Plant Signaling & Behavior* 10 (2015): e1063758, <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1063758>.
30. C. Engelhard, X. Wang, D. Robles, et al., "Cellular Metabolites Enhance the Light Sensitivity of Arabidopsis Cryptochrome Through Alternate Electron Transfer Pathways," *Plant Cell* 26 (2014): 4519–4531, <https://doi.org/10.1105/tpc.114.129809>.
31. X. Zhao, X. Yu, E. Foo, et al., "A Study of Gibberellin Homeostasis and Cryptochrome-Mediated Blue Light Inhibition of Hypocotyl Elongation," *Plant Physiology* 145 (2007): 106–118, <https://doi.org/10.1104/pp.107.099838>.
32. D. Immeln, R. Schlesinger, J. Heberle, and T. Kottke, "Blue Light Induces Radical Formation and Autophosphorylation in the Light-Sensitive Domain of Chlamydomonas Cryptochrome," *Journal of Biological Chemistry* 282 (2007): 21720–21728, <https://doi.org/10.1074/jbc.M700849200>.
33. P. Müller, J.-P. Bouly, K. Hitomi, et al., "ATP Binding Turns Plant Cryptochrome into an Efficient Natural Photoswitch," *Scientific Reports* 4 (2014): 5175.
34. M. Eckel, W. Steinchen, and A. Batschauer, "ATP Boosts Lit state Formation and Activity of Arabidopsis Cryptochrome 2," *Plant Journal* 96 (2018): 389–403, <https://doi.org/10.1111/tpj.14039>.
35. R. Zangl, S. Soravia, M. Saft, et al., "Time-Resolved Ion Mobility Mass Spectrometry to Solve Conformational Changes in a Cryptochrome," *Journal of the American Chemical Society* 146 (2024): 14468–14478, <https://doi.org/10.1021/jacs.3c13818>.
36. V. Exner, C. Alexandre, G. Rosenfeldt, et al., "A Gain-of-Function Mutation of Arabidopsis CRYPTOCHROME1 Promotes Flowering," *Plant Physiology* 154 (2010): 1633–1645, <https://doi.org/10.1104/pp.110.160895>.
37. C. Orth, N. Niemann, L. Hennig, L.-O. Essen, and A. Batschauer, "Hyperactivity of the Arabidopsis Cryptochrome (cry1) L407F Mutant Is Caused by a Structural Alteration Close to the cry1 ATP-Binding Site," *Journal of Biological Chemistry* 292 (2017): 12906–12920, <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.788869>.
38. T. Langenbacher, D. Immeln, B. Dick, and T. Kottke, "Microsecond Light-Induced Proton Transfer to Flavin in the Blue Light Sensor Plant Cryptochrome," *Journal of the American Chemical Society* 131 (2009): 14274–14280, <https://doi.org/10.1021/ja901628y>.
39. A. Taslimi, J. D. Vrana, D. Chen, et al., "An Optimized Optogenetic Clustering Tool for Probing Protein Interaction and Function," *Nature Communications* 5 (2014): 4925, <https://doi.org/10.1038/ncomms5925>.
40. D. L. Che, L. Duan, K. Zhang, and B. Cui, "The Dual Characteristics of Light-Induced Cryptochrome 2, Homo-Oligomerization and Heterodimerization, for Optogenetic Manipulation in Mammalian Cells," *ACS Synthetic Biology* 4 (2015): 1124–1135, <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00048>.
41. H. Park, N. Y. Kim, S. Lee, N. Kim, J. Kim, and W. D. Heo, "Optogenetic Protein Clustering Through Fluorescent Protein Tagging And Extension of CRY2," *Nature Communications* 8 (2017): 30, <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00060-2>.
42. R. A. Hallett, S. P. Zimmerman, H. Yumerefendi, J. E. Bear, and B. Kuhlman, "Correlating In Vitro and In Vivo Activities of Light-Inducible Dimers: A Cellular Optogenetics Guide," *ACS Synthetic Biology* 5 (2016): 53–64, <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00119>.
43. A. Losi, K. H. Gardner, and A. Möglich, "Blue-Light Receptors for Optogenetics," *Chemical Reviews* 118 (2018): 10659–10709, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00163>.
44. M. R. Blatt, "Electrical Characteristics of Stomatal Guard cells: The Contribution of ATP-Dependent, 'Electrogenic' Transport Revealed by Current-Voltage and Difference-Current-Voltage Analysis," *Journal of Membrane Biology* 98 (1987): 257–274, <https://doi.org/10.1007/BF01871188>.
45. O. Peetz, N. Hellwig, E. Henrich, et al., "LILBID and nESI: Different Native Mass Spectrometry Techniques as Tools in Structural Biology," *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 30 (2019): 181–191.
46. J. Schulte, J.-N. Tants, J. von Ehr, A. Schlundt, and N. Morgner, "Determination of Dissociation Constants Via Quantitative Mass Spectrometry" *Frontiers in Analytical Sciences* 3 (2023): 1119489, <https://doi.org/10.3389/frans.2023.1119489>.
47. P. Young, G. Hense, C. Immer, J. Wöhnert, and N. Morgner, "LILBID Laser Dissociation Curves: A Mass Spectrometry-Based Method For The Quantitative Assessment of dsDNA Binding Affinities," *Scientific Reports* 10 (2020): 20398, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76867-9>.
48. J. Schulte, E. Schwegler, U. A. Hellmich, and N. Morgner, "Quantification of Protein Homodimer Affinity Using Native Mass Spectrometry," preprint, arXiv, October 9, 2025, <https://doi.org/10.48550/arXiv.2510.08324>.
49. H. Liu, D. Zhong, and C. Lin, "Searching for a Photocycle of the Cryptochrome Photoreceptors," *Current Opinion in Plant Biology* 13 (2010): 578–586, <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.09.005>.
50. I. S. Camacho, A. Theisen, L. O. Johannissen, et al., "Native Mass Spectrometry Reveals the Conformational Diversity of the UVR8 Photoreceptor," *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (2019): 1116–1125, <https://doi.org/10.1073/pnas.1813254116>.
51. P. Kuzmic, "Program DYNAFIT for the Analysis of Enzyme Kinetic Data: Application to HIV Proteinase," *Analytical Biochemistry* 237 (1996): 260–273, <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0238>.
52. T. Grant, A. Rohou, and N. Grigorieff, "cisTEM, User-Friendly Software for Single-Particle Image Processing," *eLife* 7 (2018): e35383.

Unterstützende Informationen

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section.

Die Autoren haben in der Zusatzinformation (Supporting Information) weitere Referenzen angegeben [37, 45–48, 50–52].

Unterstützende Datei 1: ange72073-sup-0001-SuppMat.docx.