

Chronobiologie

Wie erkennt der innere Monatskalender von Tieren die richtige Mondphase?

ELMAR BEHRMANN¹, EVA WOLF²

¹ INSTITUT FÜR BIOCHEMIE, UNIVERSITÄT ZU KÖLN

² INSTITUT FÜR MOLEKULARE PHYSIOLOGIE, UNIVERSITÄT MAINZ

Many marine animals time their reproduction according to moon phases. The marine bristle worm *Platynereis dumerilii* has a light-sensitive cryptochrome, L-Cry, that enables the bristle worm to synchronize its reproduction to the full moon phase. We found that L-Cry can discriminate between moonlight and sunlight and between moon phases. Additionally, structures of dark-adapted and light-activated L-Cry provided insights into its light activation mechanism.

DOI: 10.1007/s12268-024-2337-0
© The Author(s) 2024

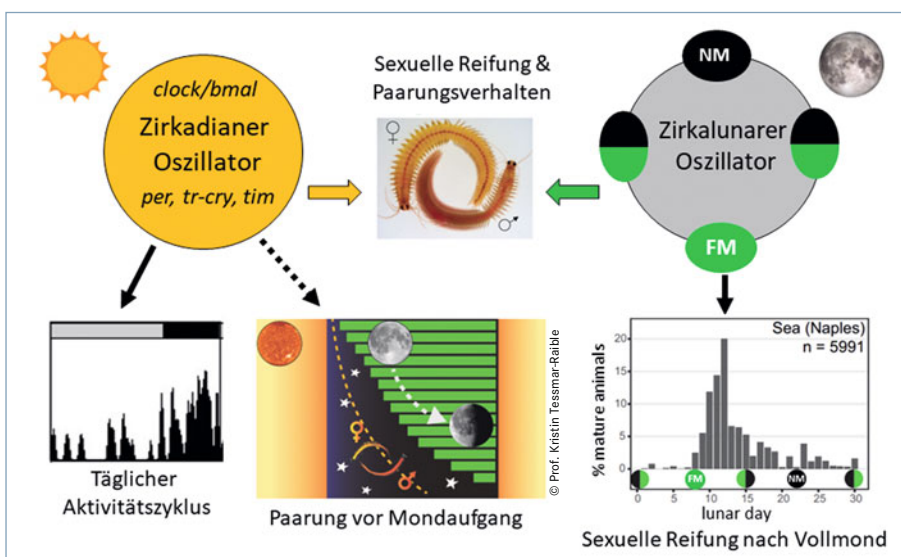
■ Bei vielen marinen Organismen spielt der Mond eine überlebenswichtige Rolle, da sie ihre Fortpflanzung zeitlich nach den Mondphasen ausrichten [1]. Damit wird auch in Ozeanen eine hinreichend hohe lokale Konzentration männlicher und weiblicher Keimzellen für eine effiziente Befruchtung gewährleistet. Leider werden diese Prozesse (z. B. bei Korallen) zunehmend durch nächtliche anthropogene Lichtverschmutzung

beeinträchtigt [2]. Es ist daher wichtig, die der Synchronisation mit dem Mondzyklus zugrunde liegenden molekularen Prozesse zu verstehen. Der marine Borstenwurm *Platynereis dumerilii* ist hierfür ein geeigneter Modellorganismus, da er sich im Labor züchten und genetisch verändern lässt. Er besitzt eine zirkadiane Uhr, welche seinen täglichen (24 h) Aktivitätszyklus steuert, sowie einen inneren Monatskalender (auch zirkalunare(r)

Oszillator/Uhr genannt), über den er seine Fortpflanzung mit dem Vollmond synchronisiert, sodass die meisten Borstenwürmer in den Nächten nach Vollmond geschlechtsreif werden [3, 4]. Zudem setzt die Paarung der Borstenwürmer in diesen Nächten während der dunklen Stunden vor Mondaufgang ein (Abb. 1, [5]).

Wie erkennt der marine Borstenwurm, wann Vollmond ist?

Wir haben gezeigt, dass ein lichtsensitives Cryptochrom-Protein, L-Cry, den Borstenwürmern ermöglicht, zwischen Sonnenlicht und Mondlicht sowie zwischen Vollmond und anderen Mondphasen zu unterscheiden [4, 5]. Um die Reaktionen von L-Cry auf Mond- und Sonnenlicht molekular-mechanistisch zu untersuchen, haben wir das L-Cry-Protein rekombinant exprimiert, aufgereinigt und mit speziellen „naturalistischen“ Lichtquellen bestrahlt, deren Intensität und spektrale Zusammensetzung mit dem Mond- und Sonnenlicht im natürlichen Lebensraum der Borstenwürmer übereinstimmt [4]. Mittels UV/VIS-Spektroskopie und Größenausschluss-Chromatografie (SEC) konnten wir zeigen, dass L-Cry drei Zustände einnehmen kann: einen Sonnenlicht-, einen Mondlicht- und einen Dunkelzustand. Bei Dunkelheit bildet das L-Cry-Protein Homodimere mit einem komplett oxidierten Flavin-Adenin-Dinukleotid(FAD_{ox})-Kofaktor, der ein Absorptionsmaximum bei 450 nm besitzt (Dunkelzustand; Abb. 2A–E). Beleuchtung mit naturalistischem Sonnenlicht führt innerhalb von Minuten zur vollständigen Photoreduktion von FAD_{ox} zu dem anionischen FAD^{o-}-Radikal, wobei die Absorption bei 450 nm abnimmt und bei 405 und 370 nm zunimmt (Sonnenlichtzustand; Abb. 2A, C, E). Außerdem wird das L-Cry-Dimer bei Licht in Monomere gespalten (SEC, Abb. 2D). Hingegen wird der Mondlichtzustand von L-Cry erst nach mindestens sechs Stunden Mondlichtbestrahlung erreicht, wobei nur etwa die Hälfte der FAD-Moleküle zu FAD^{o-} reduziert werden (Abb. 2B). Wir vermuten, dass die beiden Flavin-Kofaktoren im L-Cry-Dimer



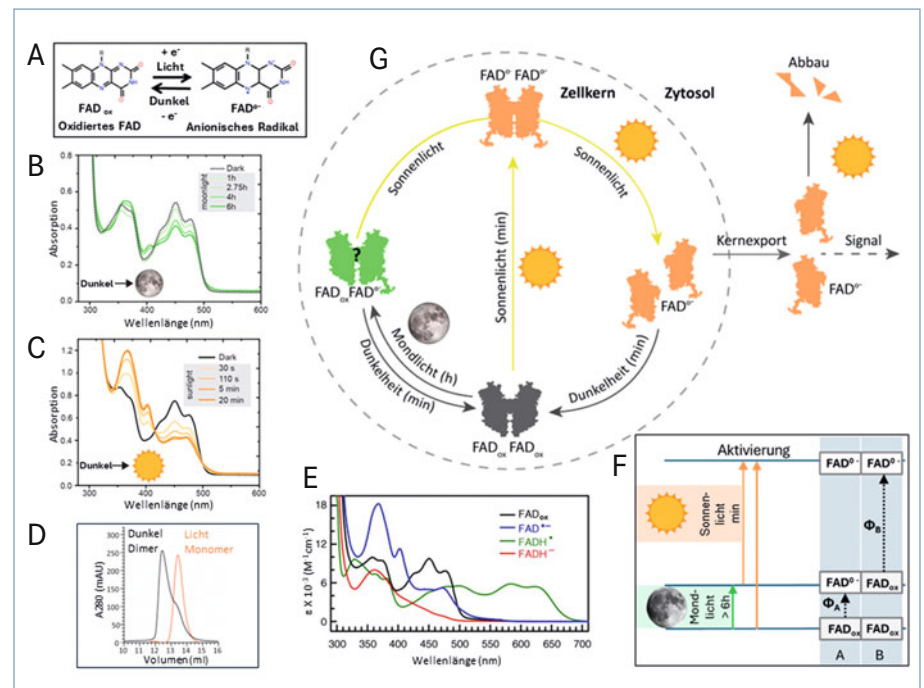
▲ **Abb. 1:** Zirkadiane und zirkalunare Uhren/Oszillatoren in *Platynereis dumerilii* regulieren den täglichen Aktivitätszyklus, die monatliche sexuelle Reifung nach dem Vollmond (FM) und den Paarungsbeginn vor Mondaufgang [3–5]. Die zirkadiane Uhr enthält die Uhrenproteine Period (Per), Timeless (Tim), Cryptochrom (tr-Cry) sowie Clock/Bmal.

unterschiedliche Quantenausbeuten Φ für die FAD-Photoreduktion besitzen (**Abb. 2F**). Dabei würde eines der Monomere („A“) mit einer hohen Quantenausbeute Φ_A als Schwachlichtsensor für das sehr schwache Mondlicht fungieren, während das zweite Monomer („B“) mit einer geringeren Quantenausbeute Φ_B nur durch das 10^5 - bis 10^6 -mal stärkere Sonnenlicht aktiviert werden kann. Da der Vollmond am längsten am Nachthimmel zu sehen ist und die höchste Mondlichtintensität aufweist, kann der Mondlichtzustand von L-Cry nur in Vollmondnächten erreicht werden, in denen der Mond mindestens 6 h scheint. Dadurch wird eine Unterscheidung zwischen Vollmond und den anderen Mondphasen ermöglicht. Interessanterweise benötigen auch die Borsenwürmer ca. 6 h nächtliches Licht, um ihre Fortpflanzung mit dem Vollmond zu synchronisieren [6].

Die Arbeitsgruppe von Kristin Tessmar-Raible konnte zeigen, dass L-Cry im Mondlicht und bei Dunkelheit überwiegend im Zellkern lokalisiert ist, während es nach Sonnenlichteinstrahlung in das Zytoplasma verschoben und nach einiger Zeit abgebaut wird (**Abb. 2G**, [4]). Somit ist zu erwarten, dass Mondlicht-aktivierte Signalwege überwiegend im Zellkern stattfinden, während Sonnenlicht-aktivierte Signalwege im Zytoplasma ablaufen. Außerdem postulieren wir, dass die Spaltung des Dimers durch Sonnenlicht eine Voraussetzung für den Kernexport darstellt.

Die Struktur von L-Cry erlaubt Einblicke in die lichtabhängige Spaltung des Dimers

Um die strukturellen Grundlagen der lichtabhängigen Spaltung des L-Cry-Dimers aufzuklären, haben wir gereinigtes L-Cry-Protein mithilfe der Kryoelektronenmikroskopie (Kryo-EM) im dunklen und im beleuchteten Zustand untersucht [7]. Hierbei wurde der Dunkelzustand unter tiefrotem Licht hergestellt, während der belichtete Zustand durch Beleuchtung mit intensivem blauem Licht erzeugt wurde. Die beleuchtete Probe zeigte ein monomeres L-Cry-Protein, welches jedoch aufgrund seiner geringen Größe nur bei mittlerer Auflösung sichtbar gemacht werden konnte. Dagegen konnten wir für das im Dunkeln vorliegende L-Cry-Homodimer aufgrund der besonders hohen Auflösung auch Aminosäure-Seitenketten sichtbar machen. Die Struktur des Dunkelzustands

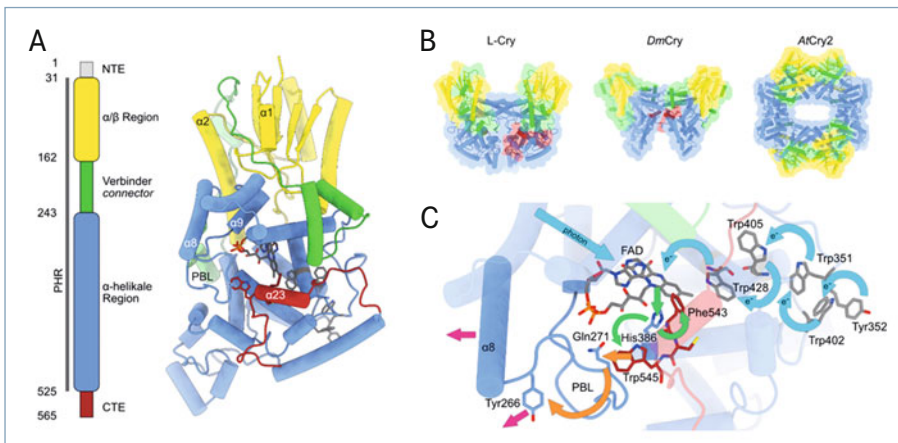


▲ **Abb. 2:** Regulation von L-Cry durch Mondlicht und Sonnenlicht. A-F beschreiben Lichtantworten des FAD Kofaktors (A-C,E,F) und des gereinigten L-Cry Proteins (D), G illustriert das Verhalten des L-Cry Proteins in der Zelle. **A**, Photoreaktion von L-Cry. **B**, Bildung des halb-reduzierten Mondlichtzustands und **C**, des vollständig reduzierten Sonnenlichtzustands [4]. **D**, SEC: L-Cry-Dimer im Dunkeln zerfällt bei Licht in Monomere. **E**, Absorptionsspektren von FAD_{ox}, FAD^{•-} (Anopheles gambiae CRY1), FAD^{•-}, FAD₂ (Escherichia coli-Photolyase) [11]. **F**, **G** Modelle für Mond- und Sonnenlichtaktivierung des FAD (adaptiert aus [4]) (**F**) und für Dunkel (grau)-, Mondlicht (grün), und Sonnenlichtzustand (orange) von L-Cry in der Zelle (**G**).

zeigte, dass L-Cry eine Photolyase-Homologie-Region (PHR) mit der typischen, den DNA-reparierenden Photolyasen ähnlichen Faltung besitzt sowie eine C-terminale Extension (CTE), welche durch eine C-terminale Helix ($\alpha 23$) auf der PHR-Oberfläche verankert ist (**Abb. 3A**). Zudem weist das L-Cry-Homodimer eine unerwartete Anordnung der L-Cry-Untereinheiten auf, bei der der Kontaktbereich vor allem durch die Helices $\alpha 8$ sowie Teile des Phosphat-Bindungs-Loops (PBL) und des connectors ausgebildet wird. Das verwandte DmCry-Protein aus der Taufliege *Drosophila melanogaster* [8] zeigte im Kristall eine andere, jedoch physiologisch vermutlich nicht relevante, dimere Anordnung der Proteinuntereinheiten [9]. Für die weniger verwandten Cryptochrome aus Pflanzen (*AtCry2*) wurden Dimere aus Dimeren publiziert [10], welche ebenfalls zu L-Cry unterschiedliche Kontaktbereiche zwischen den Untereinheiten aufweisen (**Abb. 3B**).

Die Anordnung der beiden L-Cry-Untereinheiten ermöglicht ein molekulares Netzwerk zwischen dem „Lichtempfänger“ FAD, der C-terminalen Helix $\alpha 23$ sowie Helix $\alpha 8$ und dem PBL, das erklären könnte, warum L-Cry

bei intensiver Beleuchtung in seine Monomere aufspaltet (**Abb. 3C**). Die Absorption eines Photons durch das FAD sorgt für die Bildung eines Radikalpaars zwischen FAD, welches vom neutralen, oxidierten Zustand zum negativen Semichinon reduziert wird, und einem Oberflächen-exponiertem Tryptophan oder Tyrosin (blaue Pfeile). Die negative Ladung am Isoalloxazin-Ring von FAD verändert die Konformation des nahegelegenen Histidins 386, was wiederum die Bindung der C-terminalen Helix $\alpha 23$ destabilisiert (grüne Pfeile). Die Destabilisierung von Tryptophan 545 der Helix $\alpha 23$ verändert die räumliche Lage von Glutamin 271 des PBL (orange Pfeile). Dadurch könnte der Status der $\alpha 23$ -Helix Einfluss auf den Kontaktbereich im Dimer nehmen, insbesondere über Tyrosin 266 (PBL), welches sehr wichtig für die Stabilisierung des Dimers ist (pinke Pfeile). Unsere Mutagenese von zwei die $\alpha 23$ -Helix verankernden Aminosäuren, Phe543 und Trp545, zeigt, dass eine Destabilisierung der CTE direkt Einfluss auf die Stabilität des Dimers nehmen kann, da L-Cry mit F543A- oder W545A-Mutationen auch im Dunkeln als Monomer vorliegt [7].



▲ Abb. 3: Strukturelle Merkmale und Besonderheiten von L-Cry. **A**, L-Cry zeigt eine typische Photolyase-ähnliche Faltung (PDB-ID 8P4X), und ist im Dunkelzustand ein Dimer (**B**), bei dem sich die Anordnung der Untereinheiten vom kristallinen *DmCry* Dimer (PDB-ID 4JZY) und vom *AtCry2*-Tetramer (PDB-ID 6M79) unterscheidet. **C**, Hypothese für die Licht-induzierte Monomerisierung des L-Cry-Dimers. **C**, Hypothese für die Licht-induzierte Monomerisierung des L-Cry-Dimers. Die Absorption eines Photons durch das FAD sorgt für die Bildung eines Radikalpaars zwischen FAD, welches vom neutralen, oxidierten Zustand zum negativen Semichinon reduziert wird, und einem Oberflächen-exponiertem Tryptophan oder Tyrosin, welche zur entsprechenden Radikal-Spezies umgewandelt werden (blaue Pfeile). Die negative Ladung am Isoalloxazine-Ring von FAD verändert die Konformation des nahegelegenen Histidins 386, was wiederum die Bindung der C-terminalen Helix $\alpha 23$ destabilisiert (grüne Pfeile). Die Destabilisierung von Tryptophan 545 der Helix $\alpha 23$ verändert die räumliche Lage von Glutamin 271 des PBL (orange Pfeile). Diese Bewegung im PBL destabilisiert das Dimer durch Veränderung der Positionen von Tyrosin 266 sowie der Helix $\alpha 8$.

- [6] Hauenchild C (1960) Lunar periodicity. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 25: 491–497
 [7] Vu HH, Behrmann H, Hanić M et al. (2023) A marine cryptochrome with an inverse photo-oligomerization mechanism. *Nat Commun* 14: 6918
 [8] Oliveri P, Fortunato AE, Petrone L et al. (2014). The Cryptochrome/Photolyase Family in aquatic organisms. *Marine Genom* 14: 23–37
 [9] Czarna A, Berndt A, Singh HR et al. (2013) Structures of *Drosophila* cryptochrome and mouse cryptochrome1 provide insight into circadian function. *Cell* 153: 1394–1405
 [10] Ma L, Guan Z, Wang Q et al. (2020) Structural insights into the photoactivation of Arabidopsis CRY2. *Nat Plant* 6: 1432–1438
 [11] Liu B, Liu H, Zhong D, Lin C (2010) Searching for a photocycle of the cryptochrome photoreceptors. *Curr Opin Plant Biol* 13: 578–586

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadressen:

Prof. Dr. Eva Wolf
 Johannes-Gutenberg Universität Mainz
 Institut für Molekulare Physiologie
 Hanns-Dieter-Hüsch-Weg 17
 D-55128 Mainz
 evawolf1@uni-mainz.de

Prof. Dr. Elmar Behrmann
 Universität zu Köln
 Institut für Biochemie
 Zülpicher Straße 47
 D-50674 Köln
 ebehrman@uni-koeln.de

Offene Fragen

Unsere Daten haben wichtige Einblicke in den molekularen Mechanismus der Sonnenlichtaktivierung von L-Cry erlaubt. Bei dem Mondlichtzustand vermuten wir, dass es sich um ein Dimer oder um ein aus mehreren L-Cry-Dimeren aufgebautes Oligomer handeln könnte, da nur etwa die Hälfte der FAD-Moleküle durch Mondlicht photoreduziert werden. Ein molekular-mechanistisches Verständnis dieses geheimnisvollen Mondlichtzustands erfordert jedoch weitergehende Studien. Auch ist unbekannt, wie L-Cry mit dem zirkalunaren Oszillator kommuniziert und wie der zirkalunare Oszillator selbst aufgebaut ist. Angesichts ihrer großen ökologischen Bedeutung ist es wichtig, diese molekularen Mechanismen weitergehend zu erforschen. ■

Literatur

- [1] Raible F, Takekata H, Tessmar-Raible K (2017) An Overview of Monthly Rhythms and Clocks. *Front Neurol* 8: 189
 [2] Davies TW, Levy O, Tidau S et al. (2023) Global disruption of coral broadcast spawning associated with artificial light at night. *Nat Commun* 14: 2511

- [3] Zantke J, Ishikawa-Fujiwara T, Arboleda E et al. (2013) Circadian and circalunar clock interactions in a marine annelid. *Cell Rep* 5: 99–113
 [4] Poehn B, Krishnan S, Zurl M et al. (2022) A Cryptochrome adopts distinct moon- and sunlight states and functions as sun- versus moonlight interpreter in monthly oscillator entrainment. *Nat Commun* 13: 5220
 [5] Zurl M, Poehn B, Rieger D et al. (2022) Two light sensors decode moonlight versus sunlight to adjust a plastic circadian/circalunidian clock to moon phase. *Proc Natl Acad Sci USA* 119: e2115725119

AUTORINNEN UND AUTOREN



Elmar Behrmann

2003–2008 Biochemiestudium an der Universität Bielefeld. 2012 Promotion am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund. 2012–2014 PostDoc am Institut für medizinische Physik und Biophysik der Charité Berlin. 2014–2020 Gruppenleiter am Forschungszentrum caesar in Bonn. Seit Ende 2017 Professor am Institut für Biochemie der Universität zu Köln.



Eva Wolf

1986–1992 Biologiestudium an der Universität Heidelberg. 1996 Promotion am EMBL Heidelberg. 1996–2000 PostDoc an der Rockefeller University, New York. 2000–2013 Gruppenleiterin am Max-Planck-Institut (MPI) für molekulare Physiologie Dortmund (bis 2009), Max-Planck-Institut für Biochemie Martinsried und LMU München. Seit 2013 Professorin für Strukturbiochemie an der Universität Mainz.