

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Molekulare Charakterisierung von PGRL1
und seiner Rolle im zyklischen
Elektronentransport um Photosystem I
in *A. thaliana*



Alexander P. Hertle
München, Dezember 2011

Erstgutachter: Prof. Dr. Dario Leister

Zweitgutachter: Prof. Dr. Jürgen Soll

Tag der mündlichen Prüfung: 18.01.2012

Zusammenfassung

In photosynthetisch aktiven Eukaryoten setzt sich Photosynthese aus den in den Thylakoidmembranen lokalisierten Lichtreaktionen und der im Stroma ablaufenden Kohlenstofffixierung zusammen und findet in den Chloroplasten statt. Beim linearen Elektronentransport (LET) werden Elektronen aus der Spaltung von Wasser über zwei in Serie geschaltete Photosysteme (PS II und PS I) und den Cytochrom b_6f -Komplex auf NADP^+ übertragen. Die membrangebundene Elektronentransportkette (ETK) trägt dabei zur Generierung eines transmembranen Protonengradienten bei, der zur Bildung von ATP genutzt wird. Zyklischer Elektronentransport (ZET) involviert nur PSI und den Cyt b_6f -Komplex und bildet ATP aber kein NADPH. Hierbei werden Elektronen von reduzierten Elektronenakzeptoren des PSI in die ETK eingespeist, was zu einer Erhöhung des transmembranen Protonengradienten beiträgt. Bislang wurden zwei verschiedene ZET-Wege beschrieben: Der NDH-abhängige ZET und der Ferredoxin-abhängige ZET (Fd-ZET), der durch Antimycin A (AA) inhibiert werden kann und in dieser Arbeit untersucht wurde. Die beiden Proteine PGRL1 und PGR5 sind am Fd-ZET beteiligt und die Funktion von PGRL1 wurde auf molekularer Ebene charakterisiert. Eine Interaktion von PGR5 und Cytochrom b_6 mit PGRL1 wurde nachgewiesen und eine detaillierte Untersuchung der komplexen Cysteinstruktur von PGRL1 durchgeführt. Diese Cysteinstruktur ist an der Ausbildung von intra- und intermolekularen Disulfidbrücken, sowie der Koordination eines [4Fe-4S]-Clusters beteiligt. Die intermolekularen Disulfide bewirken die Homodimerisierung von PGRL1 und sind auch an der Heterodimerisierung mit PGR5 beteiligt. Über die Thioredoxin-vermittelte Monomerisierung von PGRL1-Dimeren erfolgt die Aktivierung von ZET. Durch *in vitro*-Untersuchungen mit heterolog exprimierten Cystein/Serin-Austauschvarianten von PGRL1 konnte die Reduktion intramolekularer Disulfide von PGRL1 durch Ferredoxin unter Bindung von PGR5 und der Assemblierung des [4Fe-4S]-Clusters gezeigt werden. Ausgehend von diesen Daten wird ein Oxidoreduktasemechanismus postuliert, der durch die Reoxidation der intramolekularen Disulfide von PGRL1 durch Plastochinon komplettiert wird. Unterstützt durch immunologisch nachweisbare Konformationsveränderungen *in vivo* wird daher für den PGRL1-Oxidoreduktasekomplex eine direkte Funktion als Ferredoxin-Plastochinon-Oxidoreduktase (FQR) vorgeschlagen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	S.1
1.1 Evolution und Photosynthese.....	S.1
1.2 Photosynthese.....	S.2
-Lichtreaktionen.....	S.3
-Calvin-Zyklus.....	S.4
1.3 Zyklischer Elektronentransport und seine physiologische Bedeutung.....	S.4
-zyklischer Elektronentransport im (Fließ)gleichgewicht der Photosynthese.....	S.5
-zyklischer Elektronentransport im Zusammenhang mit Photoprotektion.....	S.5
1.4 Zwei unabhängige Wege von zyklischem Elektronentransport....	S.6
-Der Antimycin A-sensitive ZET.....	S.6
-NDH-abhängiger zyklischer Elektronentransport (Antimycin A-insensitiv).....	S.7
1.5 Messungen von zyklischem Elektronentransport.....	S.8
1.5.1 Chlorophyll <i>a</i> -Fluoreszenzmessung.....	S.8
- <i>in vivo</i> : Transienter NPQ (Dunkel-Licht Übergang).....	S.8
- <i>in vitro</i> : Ferredoxin-vermittelte Reduktion von Plastochinon	S.9
1.5.2 Verwendung von Inhibitoren (Kopplung der Messmethoden mit Inhibitorbehandlung)	S.9
-Methylviologen.....	S.9
-DCMU und HQNO.....	S.9
-Antimycin A.....	S.10
1.6 Physiologische Relevanz der verschiedenen zyklischen Elektronentransportwege bei Betrachtung entsprechender Mutanten.....	S.10
1.7 Modelle für Antimycin A-sensitiven zyklischen Elektronentransport	S.13
1.8 Die Funktion von Cysteinen bei der Photosynthese.....	S.14
1.9 Ziel der Arbeit.....	S.15

2. Material und Methoden	S.16
2.1 Material.....	S.16
2.1.1 Chemikalien.....	S.16
2.1.2 Geräte.....	S.16
2.1.3 Pflanzenmaterial.....	S.17
2.1.4 Antikörper.....	S.18
2.1.5 Molekularmassenbestimmung von Proteinen.....	S.18
2.1.6 Molekularmassenbestimmung von DNA-Fragmenten.....	S.18
2.1.7 Protease-Inhibitoren.....	S.19
2.1.8 Antibiotika.....	S.19
2.1.9 Western Blot.....	S.20
2.2 Methoden.....	S.20
2.2.1 Pflanzenanzucht	S.20
-Erdkultur.....	S.20
-Sterilkultur.....	S.20
2.2.2 Nukleinsäureisolation.....	S.21
2.2.2.1 Genomische/plastomische DNA aus Pflanzen.....	S.21
2.2.2.2 RNA-Isolation.....	S.21
2.2.2.3 Plasmidisolation aus <i>E. coli</i>	S.22
2.2.2.4 cDNA-Synthese und PCR.....	S.23
2.2.3 Sequenzmutagenese und Klonierungsprimer.....	S.23
2.2.4 <i>E. coli</i> -Transformation	S.26
2.2.5 Agrobakterien Transformation	S.27
2.2.6 Pflanzentransformation	S.27
2.2.7 Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i>	S.28
2.2.8 Aufreinigung von heterolog exprimierten Proteinen	S.29
2.2.9 Proteinkonzentrierung.....	S.30
2.2.10 Thylakoidisolation.....	S.30
2.2.11 Chloroplastenisolation	S.31
2.2.12 Chloroplastenlyse.....	S.32
2.2.13 Chlorophyllbestimmung.....	S.32
2.2.14 Proteinbestimmung.....	S.33
2.2.15 UV/VIS-Spektroskopie	S.34
2.2.16 PAM-Fluorimetrie.....	S.34

2.2.16.1 Transienter NPQ (Dunkel-Licht Übergang)	S.34
2.2.16.2 Ferredoxin vermittelte Reduktion von Plastochinon <i>in vitro</i>	S.34
2.2.17 Redoxtitration.....	S.35
2.2.18 Eisennachweis	S.35
2.2.19 Sulfidnachweis.....	S.36
2.2.20 Vakuumfiltration.....	S.36
2.2.21 Thylakoidsolubilisierung mit Digitonin.....	S.37
2.2.22 Ko-Immunopräzipitation	S.38
-mit PGRL1-Antikörpern.....	S.38
-mit HA-Affinitymatrix.....	S.38
2.2.23 Massenspektrometrische Identifikation von Proteinen.....	S.39
2.2.24 Protein-Fällung.....	S.39
-TCA-Fällung.....	S.39
-Aceton-Fällung.....	S.40
-Modifizierte Aceton-Fällung.....	S.40
2.2.25 AMS-Labeling.....	S.40
2.2.26 Alkylierung von plastidären Proteinen mit N-Ethylmaleimide (NEM).....	S.41
2.2.27 SDS-PAGE	S.41
-Nicht reduzierende (nr) SDS-PAGE in der 1. Dimension.....	S.41
-Diagonal-SDS-PAGE	S.41
2.2.28 Tris-Tricine-PAGE	S.42
2.2.29 Western Blot.....	S.43
2.2.30 Proteinfärbungen	S.44
-kolloidales Coomassie	S.44
-Ponceau S.....	S.45
3. Ergebnisse.....	S.46
3.1 Proteinsequenzvergleich von PGRL1-Proteinen verschiedener Spezies.....	S.46
3.2 Charakterisierung der Cystein-basierten Tertiärstruktur von PGRL1 unter Verwendung von Diagonal-SDS-PAGE.....	S.48
3.3 Interaktionspartner von PGRL1.....	S.50
3.4 Disulfid-abhängige Interaktionen von PGRL1 mit PGR5	S.51

3.5 Homodimerisierung von PGRL1	S.53
3.6 Effekt des PGRL1-Redox-Status auf die Aktivität von zyklischem Elektronentransport <i>in vitro</i>	S.55
3.7 Bestimmung mittlerer Redoxpotenziale von PGRL1	S.58
3.8 Thioredoxin abhängige Regulation von PGRL1	S.61
-PGRL1-Thioredoxin-Interaktion.....	S.61
-Effekt von Thioredoxin auf den PGRL1-Thiol/Disulfidstatus....	S.62
-Effekt von Thioredoxinen auf den zyklischen Elektronentransport (<i>in vitro</i>).....	S.63
3.9 Aktivitätsmessungen von zyklischem Elektronentransport nach Cystein-Alkylierung.....	S.66
3.10 Cystein-Serine-Austauschmutanten von PGRL1 in <i>E. coli</i>	S.67
3.11 Kofaktor-Analyse von PGRL1	S.69
3.12 Einfluss von Cystein-Serin-Austauschen auf den PGRL1-Redoxzustand	S.72
3.13 Bestimmung der mittleren Redoxpotenziale von rekombinantem PGRL1 und Cystein-Serin-Austauschvarianten	S.73
3.14 Assemblierung von PGR5/PGRL1-Heterodimeren <i>in vitro</i>	S.75
3.15 Untersuchung des Einflusses von PGR5 auf die mittleren Redoxpotenziale von PGRL1 und auf die PGR5-Assemblierung.	S.77
-Koordination von PGR5 in PGR5/PGRL1-Heterodimeren.....	S.78
3.16 Rekonstitution von PGR5/PGRL1-abhängigem zyklischem Elektronentransport in <i>pgl1ab</i> -Mutanten unter Verwendung von PGR5/PGRL1-Heterodimeren.....	S.80
3.17 Rolle der FNR im zyklischen Elektronentransport.....	S.81
-Einfluss von FNR1 und FNR2 auf den zyklischen Elektronentransport	S.81
-Rekonstitution von zyklischem Elektronentransport durch Zugabe rekombinanter FNR.....	S.83
-Einfluss von PGR5 und PGRL1 auf die Abundanz der FNR in Thylakoidmembranen.....	S.84
3.18 Chinon-Reduktion mit einer Elektronentransportkette aus rekombinanten Proteinen.....	S.85
-PGRL1-abhängige Chinon-Reduktion.....	S.86

-PGRL1-abhängige Chinon-Reduktion in PGRL1 und Cystein-Serin-Austausch-Varianten sowie nach Zugabe von Antimycin A	S.87
-Chinonreduktion und PGRL1-Thiol/Disulfid-Status.....	S.89
-Ferredoxin-abhängige Reduktion von PGRL1 in Anwesenheit von PGR5.....	S.89
- Thiol/Disulfid-Status von PGR5/PGRL1-Heterodimeren nach Reduktion durch Ferredoxin.....	S.91
3.19 Dynamik des PGRL1 Thiol/Disulfid-Status <i>in vivo</i>	S.92
PGRL1 und Thioredoxin.....	S.94
-PGRL1 und die Rolle von PGR5.....	S.95
4. Diskussion.....	S.96
4.1 Interaktionspartner und Aufbau des PGR5/PGRL1-Komplexes.....	S.96
4.2 Die Bedeutung des Thiol/Disulfid-Status von PGRL1	S.97
4.3 PGRL1 ein Eisen-Schwefel-Protein.....	S.98
4.4 Der PGR5/PGRL1-Komplex als Oxidoreduktase im zyklischen Elektronentransport um Photosystem I.....	S.100
4.5 Die Rolle von PGR5/PGRL1-Komplexen und der Ferredoxin-NADP ⁺ - Oxidoreduktase (FNR) im zyklischen Elektronentransport.....	S.104
4.6 Dimerisierung von PGRL1 und Regulation von PGR5/PGRL1-abhängigem zyklischen Elektronentransport.....	S.106
4.7 Elektronen-Reinjektion in die Thylakoidmembran	S.108
5. Literaturverzeichnis.....	S.110
6. Danksagung	S.130
7. Publikationen	S.131
8. Eidesstattliche Versicherung.....	S.132

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Lokalisation und Modell der thyakoidmembrangebundenen Elektronentransportkette.....	S.2
Abb. 2: Schematische Modelle von PGR5/PGRL1-abhängigem zyklischen Elektronentransport.....	S.11
Tabelle 1: Verwendete Pflanzen.....	S.17
Tabelle 2: Primer und Mutagenese-Primer.....	S.23-24
Tabelle 3: Plasmide.....	S.25-26
Tabelle 4: Accesions-Nummern von PGRL1-Proteinen verschiedener Photosynthese betreibender Eukaryoten.....	S.46
Abb. 3: Der Proteinsequenzvergleich von PGRL1-Homologen verschiedener Spezies zeigt eine konservierte Cysteinverteilung.....	S.47
Abb. 4: PGRL1 zeigt die Bildung von intra- und intermolekularen Disulfiden nach Trennung von Thylakoidproteinen aus <i>A. thaliana</i> mittels Diagonal-SDS-PAGE..	S.49
Tabelle 5: Massenspektrometrische Identifikation von PGRL1 und Interaktionspartnern nach Ko-Immunopräzipitation unter Verwendung von PGRL1-Antikörpern.....	S.50
Abb. 5: PGR5 und Cytochrom b ₆ ko-immunopräzipitieren mit PGRL1.....	S.51
Abb. 6: Ko-Immunopräzipitationen mit PGRL1-Antikörpern unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen zeigen eine cysteinabhängige Interaktion von PGRL1 mit PGR5.....	S.52

Abb. 7: Nachweis von PGRL1-Homodimeren durch HA-getaggte PGRL1-Isoformen in Thylakoiden und Ko-Immunopräzipitationen von WT und WT/PGRL1A-HA-Mutanten.....S.54

Abb. 8: Die Modulation des Thiol/Disulfid-Status von PGRL1 durch DTT führt zu Aktivitätsveränderungen des zyklischen Elektronentransports.....S.56

Abb. 9: Durch Redoxtitrationen konnten zwei mittlere Redoxpotenziale für PGRL1 ermittelt werden.....S.59

Abb. 10: Vergleich der mittleren Redoxpotenziale von PGRL1 mit Redoxpotenzialen verschiedener plastidärer Redoxregulatorproteine sowie Elektronenüberträger.....S.60

Abb. 11: PGRL1 konnte durch Thioredoxin-Affinitätschromatographie aus solubilisierten Thylakoiden isoliert werden.....S.62

Abb. 12: Thioredoxin f und m bewirken die Reduktion von PGRL1-Dimeren zu Monomeren.....S.63

Abb. 13: Thioredoxin-abhängige Regulation der zyklischen Elektronentransportaktivität in WT und *pgr1ab*-Mutanten.....S.64

Abb. 14: Thioredoxin f und m bewirken in *crr2-1* Mutanten eine Steigerung des zyklischen Elektronentransports.....S.65

Abb. 15: Cystein-Alkylierung durch NEM führt zur Inhibition des transienten NPQ's, der Ferredoxin-vermittelten Plastochinonreduktion durch PGR5/PGRL1-abhängigen ZET und der Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken bei PGRL1.....S.66

Abb. 16: Heterologe Expression von WT und Cystein-Serin-Austausch-Varianten von PGRL1 in *E. coli*.....S.68

Abb. 17: CxxC-Motive von PGRL1 sind an der Koordination eines Eisen-Schwefel-Clusters beteiligt.....S.70

Abb. 18: Die Bildung von intra- und intermolekularen Disulfidbrücken bei PGRL1 hängt von Cystein A und B ab.....S.72

Abb. 19: Redoxtitration und Quantifizierung von PGRL1 in WT-Thylakoiden und rekombinanten PGRL1-Isoformen.....S.73-74

Abb. 20: Ko-Inkubationen von PGR5 und PGRL1 führen zu spontaner Rekonstitution von PGRL1/PGR5-Komplexen *in vitro*.....S.76

Abb. 21: Redoxpotentialverschiebungen von PGRL1 aus Thylakoiden und rekombinatem PGRL1 können durch PGR5-Zugabe aufgehoben werden.....S.77-78

Abb.22: Die spontane Rekonstitution von PGRL1/PGR5-Heterodimeren *in vitro* benötigt Anwesenheit beider CxxC-Motive von PGRL1.....S.79

Abb.23: ZET-Rekonstitution in *pgr1ab*-Mutanten durch Zugabe von PGR5, PGRL1 und PGRL1 Cystein/Serin-Austausch-Varianten.....S.80

Abb. 24: *In vivo*- und *in vitro*-Messungen der Aktivität von zyklischem Elektronentransport in WT sowie *fnr1*, *fnr2* und *pgr1ab*-Mutanten.....S.82

Abb. 25: Zyklischer Elektronentransport kann in *fnr1* jedoch nicht in *pgr1ab*-Mutanten durch exogene Zugabe von rekombinanter FNR1 rekonstituiert werden.....S.83

Abb. 26: Immunologischer Nachweis thylakoid-assoziiertes FNR1- und FNR2-Isoformen in WT, *pgr1ab* und *pgr5*.....S.84

Abb. 27: *In vitro*-Elektronentransport unter Verwendung von Komponenten des zyklischen Elektronentransports.....S.85

Abb. 28: Rekombinantes PGRL1 besitzt Chinonreduktase-Aktivität.....S.86

Abb. 29: DMBQ-Reduktionskinetik in Abhängigkeit von PGRL1.....S.88

Abb. 30: Die Thiol-vermittelte Reduktion von DMBQ führt zur Bildung von intramolekularen Disulfidbrücken bei PGRL1.....S.89

Abb. 31: PGRL1 kann in Anwesenheit von PGR5 durch Ferredoxin reduziert werdenS.90

Abb. 32: Die Ferredoxin-vermittelte Reduktion von PGRL1 führt zur Verlust der intramolekularen Disulfide von PGRL1.....S.91

Abb. 33: PGRL1-Redoxzustand in Abhängigkeit von unterschiedlicher Lichtquantität und –qualität.....S.93

Abb. 34: Veränderungen des PGRL1-Monomer/Dimer-Verhältnisses durch Hochlichtexposition.....S.94

Abb.35: in *pgr5* Mutanten akkumulieren PGRL1 Monomere vorwiegend oxidiert..S.95

Abb. 36: Thiol-Addition nach Michael (aus Li et al., 2005).....S.101

Abb. 37: Modell von PGR5/PGRL1-abhängigem zyklischen Elektronentransport um Photosystem I.....S.103

Abb. 38: Modell von PGR5 unabhängigen zyklischen Elektronentransport.....S.107

Abkürzungsverzeichnis

°C Grad Celsius
AA Antimycin A
AMS 4-Acetamido-4-Maleimidylstilben-2,2-Disulfonsäure
APS Ammoniumpersulfat
ATP Adenosin-Triphosphate
BN Gel Blue-Native-Gel
bP Basenpaar
C-terminal Carboxy-terminal
cDNA komplementäre Deoxyribonukleinsäure
Chl Chlorophyll
crr Chlororespiratory reduction
Ko-IP Ko-Immunopräzipitation
Col-0 *Arabidopsis* Ökotyp Columbia
Cyt b_6f -Komplex Cytochrom b_6f -Komplex
D Dunkel
Da Dalton
DCMU 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff
DOC Deoxycholat
DMBQ Dimethoxybenzochinon
DNA Deoxyribonukleinsäure
dNTP 3`-Deoxyribonucleotid-5`-Phosphat
DTT Dithiothreitol
EDTA Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGTA Ethylenglykol-Tetraessigsäure
ETK Elektronentransportkette
Fd Ferredoxin
FNR Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase
FQR Ferredoxin-Plastochinon-Oxidoreduktase
FR dunkelrotes Licht
HA Hämagglutinin
HCl Salzsäure
His Histidin
HL Hochlicht
g Gram
g Gravitationskonstante
HEPES 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethansulfonsäure
HQNO 2-Heptyl-4-Hydroxyquinolin
k Kilo
KCl Kalium-Chlorid
LET Linearer Elektronentransport
LHC Light harvesting complex
LL Low Light
μ Micro
m Meter
M Mol
min Minute
mol Mol
MS Mass spectrometry

MW Molekulargewicht
N-terminal Amino-terminal
NADP(H) Nicotinamid Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaOH Natronlauge
NaCl Natrium-Chlorid
NEM N-Ethylmaleimid
NDH-Komplex NAD(P)H dehydrogenase complex
nm Nanometer
NPQ Non-photochemical quenching
P700 Reaktionszentrum von PSI
PAGE Polyacrylamid Gel Elektrophorese
PAM Puls Amplituden Modulation
PBS Phosphat gepufferte Saline
PCR Polymerase Kettenreaktion
PGR5 Proton gradient regulation 5
PGRL1 PGR5 like 1
PMSF Phenylmethanesulphonylfluoride
PSI Photosystem I
PSII Photosystem II
PQ Plastochinon
PQH2 Plastochinol
PVDF Polyvinylidene difluoride
qE Δ pH-dependent NPQ
qP Photochemical quenching
RNA Ribonukleinsäure
Rubisco Ribulose Biphosphat Carboxylase/ Oxygenase
r.E. relative Einheiten
S²⁻ Sulfid
s Sekunden
Std. Stunden
SDS Sodium Dodecyl Sulphate
TEMED N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin
TBST Tris gepufferte Saline mit Tween
TCA Trichloressigsäure
Tris Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm Umdrehungen pro Minute
v/v Volumen pro Volumen
w/v Gewicht pro Volumen
WS *Arabidopsis* ecotype wassilewskija
WT Wild-Typ
ZET zyklischer Elektronentransport

1. Einleitung

1.1 Evolution und Photosynthese

Photosynthese ist der Motor für den energetischen Kreislauf, auf dem Leben auf der Erde basiert. Ursprünglich entstand Leben in einer sauerstoffarmen Atmosphäre. Dabei erfolgte durch lichtabhängige Spaltung anorganischer Verbindungen bei der anoxygenen Photosynthese die Synthese energiereicher Kohlenstoffverbindungen und Schwefel. Die lichtabhängige Spaltung von Wasser führte dagegen zur Freisetzung von molekularem Sauerstoff (oxygene Photosynthese). Im Laufe der Evolution löste die oxygene Photosynthese die anoxygene Variante ab und die zunehmende Anreicherung der Erdatmosphäre mit Sauerstoff bedingte die Entstehung von Atmung. Diese stellt die Energiegewinnung durch Oxidation energiereicher Kohlenstoffverbindungen unter Freisetzung von CO₂ und H₂O dar. Die Inkorporation respirierender und/oder oxygene Photosynthese betreibender Prokaryoten in eine eukaryotische Wirtszelle, ermöglichte die synergistische Nutzung der metabolischen Prozesse, der Endosymbionten und der Wirtszelle. Die daraus resultierende gegenseitige Abhängigkeit führte zu einer sukzessiven Reduktion zu Mitochondrien und Chloroplasten. Trotz Aufrechterhaltung der Kompartimentierung erfolgte eine massive Translokation des genetischen Materials der Endosymbionten in den Nukleus der Wirtszelle. Zur Koordination der inter- und intra-organellären Kommunikation sowie der Optimierung metabolischer Prozesse entstanden neue eukaryoten-spezifische Gene (zusammengefasst von Hohmann-Marriott und Blankenship, 2011). Bei *PGRL1a* und *PGRL1b* handelt es sich um evolutiv junge Gene die in Folge der Endosymbiose entstanden. PGRL1-Proteine erfüllen eine Funktion in der Optimierung der Photosynthese.

1.2 Photosynthese

Chloroplasten stellen den Ort der Photosynthese bei photosynthetischen Eukaryoten dar. Der Chloroplast wird von zwei Hüllmembranen umschlossen. Dabei ist die innere Hüllmembran cyanobakteriellen, die äußere eukaryotischen Ursprungs. Der umschlossene Raum wird als Stroma bezeichnet und beinhaltet das flächenmäßig größte Membransystem photosynthetischer Organismen, die Thylakoide. Die räumliche Organisation der Thylakoide ist heterogen und weist neben gestapelten (Grana) auch lamelläre Substrukturen auf (Stromathylakoide). Photosynthese kann in zwei Teilreaktionen gegliedert werden. Die membrangebundene Umwandlung von Licht in chemische Energie (Lichtreaktionen) erfolgt in Thylakoiden. Der Prozess der Kohlenstofffixierung (Calvin-Zyklus) hingegen läuft unter Verwendung der in den Lichtreaktionen generierten Reduktions- und Energieäquivalente im Stroma ab.

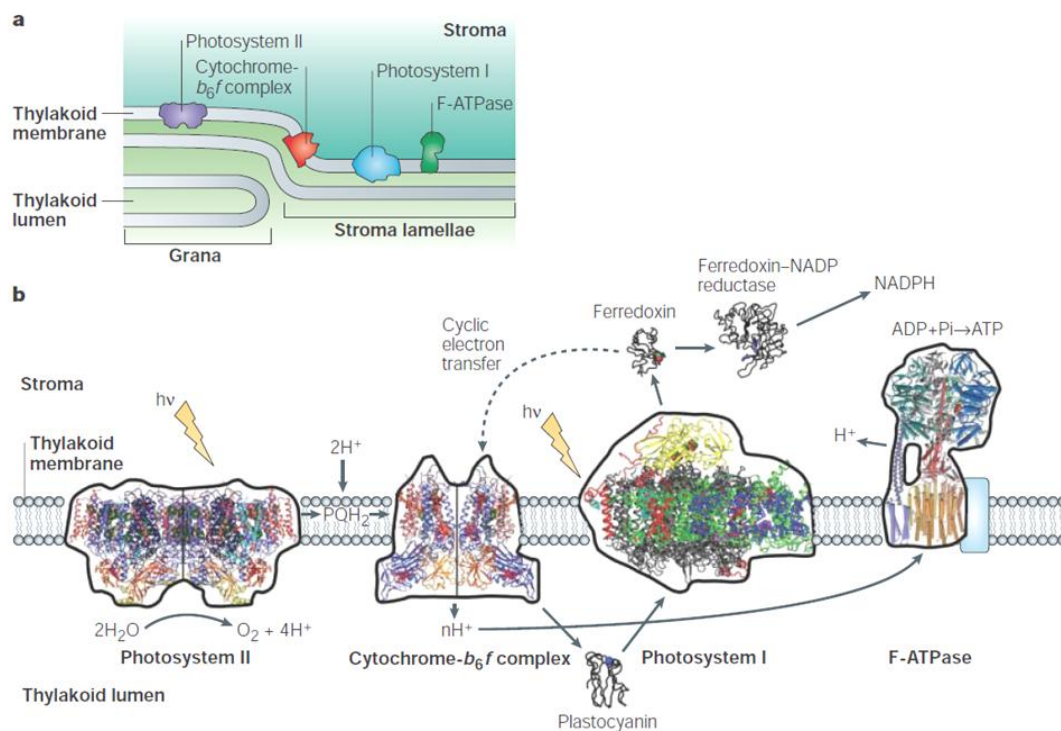


Abb.1: Lokalisation und Modell der thyakoidmembrangebundenen Elektronentransportkette

Hochmolekulare Membranproteinkomplexe, Photosystem II, der Cytochrom b_6/f -Komplex, Photosystem I und die ATP-Synthase (F-ATPase) sowie mobile Elektronenüberträger, Plastocyanin (PQH₂) und Plastocyanin, Ferredoxin, Ferredoxin-NADP-Reduktase und NADP⁺ bilden eine membranassoziierte Elektronentransportkette in Thylakoidmembranen von Chloroplasten.

(Quelle: Nelsen und Ben-Shem, Molecular Cell Biology, 2004)

-Lichtreaktionen:

Die Lichtreaktionen erfolgen in einer membrangebundenen Elektronentransportkette welche sich aus drei hochmolekularen Proteinkomplexen, dem Photosystem I (PSI), dem Photosystem II (PSII), dem Cytochrom b_6f -Komplex (Cyt b_6f -Komplex) sowie zwischen den Komplexen agierenden mobilen Elektronenüberträgern zusammensetzt. Die Energiegewinnung wird durch die ATP-Synthase bewerkstelligt (ATPase). Dabei wird die Dynamik der Elektronentransportkette durch die lichtgetriebenen Oxidoreduktasen PS II und PS I erzeugt. Durch Absorption von Photonen generieren die Photosysteme Elektronen zur Reduktion des finalen stromalen Elektronenakzeptors $NADP^+$. Beginnend mit der Reduktion des membranintegralen Phenols Plastochinon (PQ) durch Licht an PS II diffundiert reduziertes Chinon (Chinol) in die Thylakoidmembran und überträgt zwei Elektronen und zwei Protonen an die luminal Seite der Membran (Renger und Govindjee, 1977). Elektronendefizite des PS II werden durch die oxidative Spaltung von Wasser auf der luminalen Seite der Thylakoidmembran kompensiert, wodurch Protonen sowie Sauerstoff im Lumen freigesetzt werden (siehe Abb. 1). Während die Protonen von Plastochinol im Thylakoidlumen freigesetzt werden, dienen die Elektronen vermittelt über das Rieske-Protein des Cyt b_6f -Komplexes der Reduktion von luminal lokalisierten Cyt b_6f -Untereinheiten Cytochrom c und Cytochrom b_6 . Innerhalb der Cytochrom b_6 -Untereinheit erfolgt durch endogenen Elektronentransport (Q-Zyklus) sowohl die Elektronen- als auch Protonenaufnahme durch Plastochinon oder Semichinon unter Beteiligung von Häm-Ko-Faktoren (Joliot und Joliot, 1994). Dadurch können pro Elektron mehr Protonen über die Membran transportiert werden. Reduziertes Cytochrom-c überträgt seine Elektronen über das luminal lösliche Protein Plastocyanin (PC) auf PS I. Analog zu PS II erfolgt am PS I durch Absorption von Photonen die Reduktion des stromal lokalisierten Elektronenüberträgers Ferredoxin (Fd). Katalysiert durch die Ferredoxin- $NADP^+$ -Reduktase (FNR) werden Elektronen von Fd sowie Protonen der stromalen Seite der Thylakoidmembran in Form von $NADPH$ fixiert. Die Reaktionskette, beginnend von der oxidativen Wasserspaltung bis zur Reduktion von $NADP^+$, wird als linearer Elektronentransport bezeichnet (LET). Die Protonentranslokation über die Membran führt zur Ausbildung eines Protonengradienten. Die über die Thylakoidmembran in Form eines Protonengradienten konservierte Energie, wird von der ATP-Synthase zur Phosphorylierung von ADP zu ATP genutzt.

-Calvin-Zyklus:

Die bei den Lichtreaktionen gebildeten NADPH- und ATP-Moleküle werden bei der im Stroma ablaufenden Fixierung von CO_2 umgesetzt (Calvin-Zyklus). Dieser Prozess besteht im Wesentlichen aus drei Teilschritten. 1. Der Fixierung von CO_2 an Ribulose-1,5-Bisphosphat (RuBP_2), 2. der Reduktion des primären Produktes 3-Phosphoglycerat (3-PG) und 3. der Regeneration des Akzeptors, Ribulose-1,5-Bisphosphat (RuBP_2). Der endergone Prozess benötigt ATP sowie die Reduktionsäquivalente NADPH in einem stöchiometrischen Verhältnis von 3:2 pro Neusynthese eines energiereichen Triose-Phosphats (Glycerinaldehyd-3-Phosphat, GAP). Da im Zuge der linearen Elektronentransportkette ATP und NADPH/H^+ (pro 2 gespaltenen Molekülen H_2O) in einem Verhältnis von 9:7 gebildet wird, erfolgt in der Summe zu wenig ATP-Bildung zur Generierung eines energiereichen Triose-Phosphats. Die Ursache dafür liegt in der Anzahl von Protonen, die zur Generierung von ATP benötigt werden. Zur Bewerkstelligung eines 3:2 Verhältnisses von ATP und NADPH bedarf es deshalb eines Mechanismus zur spezifischen Erhöhung des transmembranen Protonengradienten.

1.3 Zyklischer Elektronentransport und seine physiologische Bedeutung

Zyklischer Elektronentransport (ZET) ist als Mechanismus zur Modulation des ATP/NADPH-Verhältnisses bekannt (Heber et al., 1978, Furbank et al., 1987). Bislang wurden zwei Wege von zyklischem Elektronentransport beschrieben: der Antimycin A-sensitive, der die Proteine PGR5 und PGRL1 benötigt (Munekage et al., 2002, DalCorso et al., 2008), sowie der zyklische Elektronentransport unter Beteiligung des plastidären NAD(P)H-Dehydrogenase (NDH)-Komplexes (Tagawa et al., 1963, Endo et al., 1998).

In beiden Prozessen erfolgt durch Reoxidation stromaler PSI-Akzeptoren sowie Reinjektion von Elektronen in die lineare Elektronentransportkette eine gesteigerte Protonentranslokation über die Thylakoidmembran. Infolgedessen kommt es bei Antimycin A-sensitivem ZET, ausgehend von reduziertem Ferredoxin, durch eine Steigerung des transmembranen Protonengradienten zu einer erhöhten ATP-Produktion ohne NADP^+ -Reduktion. Regulatorische Prozesse, welche von der Ansäuerung des Thylakoidlumens oder dem Protonengradienten abhängen, können

somit ebenfalls durch ZET beeinflusst werden (Makino et al., 2002, Endo et al., 1999). Demnach trägt ZET im Übergang von Dunkelheit zum Licht zur Umwandlung von überschüssiger Lichtenergie in Wärme bei, da der photoprotektive Mechanismus vom Grad der luminalen Ansäuerung abhängt.

-Zyklischer Elektronentransport im (Fließ)gleichgewicht der Photosynthese

Die lineare Korrelation der Quantenausbeute von PS II und PS I während der Kohlenstofffixierung wurde dahingehend gedeutet, dass ZET während der Photosynthese im (Fließ)gleichgewicht einen geringen Beitrag leistet (Harbinson et al., 1989). Zudem sollte ein flexibles Organell, wie ein Chloroplast, ein Defizit bei der ATP/NADPH-Bilanz über eine Vielzahl von Mechanismen ausgleichen können.

Dennoch benötigt die Kohlenstofffixierung während der Belichtungsperiode ein distinktes Verhältnis von ATP zu NADPH, welches nicht durch LET alleine bereitgestellt werden kann. Simultan zum Calvin-Zyklus ablaufende Prozesse wie Nitrat-Assimilation und Photorespiration führen zusätzlich zum Verbrauch von ATP (Campbell et al., 1990, Weger et al., 1989). Da zusätzliches ATP durch ZET bereitgestellt werden kann, wird eine permanente Notwendigkeit von ZET während der Belichtungsperiode angenommen (Heber et al., 1978, Furbank et al., 1987). Eine verringerte ATP-Produktion sowie Defizite beim Calvin-Zyklus durch Defekte im ZET bestätigen diese Annahme (Munekage et al., 2008).

-Zyklischer Elektronentransport im Zusammenhang mit Photoprotektion

Neben der Funktion während der Photosynthese im (Fließ)gleichgewicht, wird ZET eine entscheidende Rolle bei der Photoprotektion unter Hochlicht und fluktuierenden Lichtbedingungen zugeschrieben (Endo et al., 2005, Shikanai et al., 1999, Munekage et al., 2002). Innerhalb der ersten Minuten der Belichtungsphase sind sowohl die Schlüsselenzyme des Calvin-Zyklus als auch die plastidäre ATP-Synthase inaktiv. Eine verstärkte Reduktion der Elektronentransportkette und der stromalen PS I-Akzeptoren ist die Folge. In dieser Situation können verschiedene Prozesse zur Reoxidation der stromalen PS I-Akzeptoren beitragen. Der Wasser-Wasser-Zyklus (Mehler Reaktion) bezeichnet die Photoreduktion von Sauerstoff an PS I mit Elektronen aus der Wasserspaltung an PS II unter Bildung von H_2O_2 , welches dann in O_2 und H_2O umgesetzt wird (Asada et al., 1999, Asada et al., 2000, Foyer et al., 2000, Osmond et al., 1997, Osmond et al., 1995). Auch der ZET um PS I führt bei Dunkel-Licht-Übergängen zur Regeneration oxidierter PS I-Akzeptoren. Der Wasser-

Wasser-Zyklus und der zyklische Elektronentransport um PS I tragen gleichzeitig zur Generierung des Protonengradienten über die Thylakoidmembran bei, ohne dass reduzierte PS I-Akzeptoren akkumulieren. Ein analoger Elektronentransport existiert innerhalb von PS II (Miyake et al. 2001, Miyake et al 2002).

Der Aufbau des Protonengradienten führt durch Ansäuerung des Lumens zur Aktivierung des sogenannten nicht photochemischen Quenching (NPQ), der Abstrahlung überschüssiger Exzitationsenergie als Wärme (Makino et al. 2002).

1.4 Zwei unabhängige Wege von zyklischem Elektronentransport

-Der Antimycin A-sensitive ZET

Mittels isolierter Chloroplasten konnte die lichtabhängige Generierung von ATP (Photophosphorylierung) auch nach Inhibierung von PS II gezeigt werden. Die Inhibition von PS II erfolgte durch das Herbizid 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (DCMU) und führte im Jahr 1966 zur Erstbeschreibung eines alternativen Elektronentransportweges, der sogenannten zyklischen Photophosphorylierung (Tsujiimoto et al., 1966). In Folgearbeiten wurde reduziertes Ferredoxin als Elektronendonator für die PS II unabhängige Photophosphorylierung identifiziert (Bothe, 1969). Auf der Basis dieser Untersuchungen wurde ein enzymatischer Mechanismus postuliert, welcher Elektronen von reduziertem Ferredoxin zurück in die Elektronentransportkette überträgt. Die beobachtete ATP-Bildung zeigte eine Kopplung von Elektronenreinjektion mit Protonentranslokation an. Da die Zugabe des Chinonderivates Vitamin K zu einer erhöhten ATP-Bildung beitrug, wurde der Plastochinonpool als Ort der Reinjektion beschrieben (Arnon et al., 1963). Das bis dahin nicht identifizierte Enzym, welches den Prozess katalysiert, wurde Ferredoxin-Plastochinon-Reduktase (FQR) genannt. Da Chinon in der Thylakoidmembran sowohl frei (Plastochinonpool) als auch gebunden an den Cytochrom b_6f -Komplex (Q-Zyklus) vorliegt, ist der genaue Ort der Elektronenreinjektion umstritten. Zumindest die Behandlung mit 2-Heptyl-4-Hydroxyquinolin (HQNO), einem Inhibitor der stromalen Chinonbindestelle des Cyt b_6f -Komplexes hatte keinen Effekt auf die zyklische Photophosphorylierung, wodurch diese als Reinjektionsstelle ausgeschlossen werden kann. Der Plastochinonpool wird folglich als Ort der Elektronenreinjektion angenommen (Okegawa et al. 2005). Da zyklische Photophosphorylierung durch das Chinon-Analogon Antimycin A (AA)

inhibiert werden konnte, wurde der als zyklischer Elektronentransport um Photosystem I (ZETPSI) bekannte Elektronentransport auch als "Antimycin A-sensitiver" ZET beschrieben (Moss und Bendall, 1984, Bendall und Manasse, 1995). Im Gegensatz dazu wird der NDH-abhängige ZET als "Antimycin A-insensitiver ZET um Photosystem I" bezeichnet (Tagawa et al., 1963, Endo et al., 1998).

-NDH-abhängiger zyklischer Elektronentransport (Antimycin A-insensitiv)

Die Reinjektion von Elektronen reduzierter PSI-Akzeptoren (Ferredoxin oder NADPH) in die Elektronentransportkette wird durch den plastidären NDH-Komplex katalysiert, der ein funktionelles und strukturelles Homolog zu bakteriellen NADH-Dehydrogenasen und mitochondriellen NADH:Ubichinon-Oxidoreduktasen darstellt, (Endo et al., 1982). Die Elektronen werden dabei durch den NDH-Komplex in den Plastochinonpool eingespeist. Die Reoxidation von Plastochinon durch die plastidäre terminale Oxidase (PTOX) führt zu einem Elektronenabfluss, der als "Chlororespiration" bezeichnet wird (Bennoun et al., 2002, Peltier et al., 1987, Lejko et al., 1997, Büchel et al., 1995). Die Bezeichnung "Chlororespiration" beruht auf dem Verbrauch von NAD(P)H und Sauerstoff analog zur Atmungskette in den Mitochondrien (Scherer et al., 1990). Der NDH-Multiproteinkomplex besteht aus mindestens 39 Untereinheiten. Davon stellen 11 Untereinheiten Homologe des mitochondriellen Komplexes I dar, die plastidär kodiert sind. Die übrigen Untereinheiten sind im Nukleus kodiert (Kofer et al., 1998, Suorsa et al., 2009, Rumeau et al., 2007, Ifuku et al., 2011). Interessanter Weise handelt es sich bei den nicht konservierten Untereinheiten nicht um die katalytisch aktiven und substratbindenden Untereinheiten des mitochondriellen Komplexes I. Die Untereinheit CRR31 beispielsweise weist eine starke Homologie zu der Ferredoxin bindenden Photosystem I-Untereinheit PsaE auf, was auf Ferredoxin als Elektronendonator hindeutet (Yamamoto et al., 2011). Anfänglich wurde eine Aktivität des NDH-Komplexes im Dunkeln postuliert. Indizien weisen jedoch darauf hin, dass der NDH-Komplex zusammen mit dem Photosystem I einen Superkomplex ausbildet und augenscheinlich Ferredoxin als Elektronendonator nutzt. Dies lässt vermuten, dass auch im Licht Elektronen von PSI direkt an den NDH-Komplex weitergeleitet werden (Yamamoto et al., 2011, Peng et al., 2008).

1.5 Messungen von zyklischem Elektronentransport

Eine Schwierigkeit hinsichtlich der Charakterisierung von ZET stellt der physiologische Nachweis des Prozesses dar. Auf Grund der Beteiligung mehrerer Komponenten des linearen Elektronentransports kann eine Charakterisierung des Gesamtprozesses nur durch chemische bzw. physikalische Manipulation oder durch den Nachweis von Teilreaktionen erfolgen. Unterschiedliche Optionen werden im Folgenden genauer dargestellt.

1.5.1 Chlorophyll a-Fluoreszenzmessung

Lichtenergie wird in der Thylakoidmembran einerseits dazu genutzt, Elektronen für den photochemischen Prozess zu generieren, andererseits wird sie aber auch ungenutzt als Wärme oder Fluoreszenz abgestrahlt. Unter Verwendung eines Puls-Amplituden-Modulations (PAM)-Fluorimeters, kann die Chlorophyll *a* (Chl *a*)-Fluoreszenz bestimmt werden. Der Anteil der Fluoreszenzemission lässt Rückschlüsse auf die effektive Photosyntheseleistung, die Wärmeumwandlung und den Reduktionsstatus von Elektronenakzeptoren zu (Schreiber *et al.*, 1986). Um Defekte im ZET zu bestimmen, wurden innerhalb dieser Arbeit zwei verschiedene Messmethoden angewandt.

-in vivo: Transienter NPQ (Dunkel-Licht-Übergang)

Zur Charakterisierung von zyklischem Elektronentransport *in vivo*, wurde eine indirekte Messmethode verwendet (Messung des *transienten Non Photochemical Quenchings* (tNPQ)) (DalCorso *et al.*, 2008). Hierbei wird beim Übergang vom Dunkeln zum Licht der Anteil an absorbiertener Lichtenergie gemessen, der in Wärmestrahlung umgewandelt wird. Dieser verhält sich proportional zum Ansäuerungsgrad des Lumens. Da innerhalb der ersten Belichtungsminute ein maßgeblicher Anteil der Ansäuerung durch ZET bedingt ist, kann eine Reduktion in der Wärmeabstrahlung auf einen Defekt im ZET zurückgeführt werden (siehe auch Abschnitt 1.3).

-in vitro: Ferredoxin-vermittelte Reduktion von Plastochinon

Eine weitere Option, die *in vitro*-Messung von zyklischem Elektronentransport, besteht in der Verwendung von osmotisch aufgebrochenen Chloroplasten. Dabei wird die Reduktion von Plastochinon in Form eines Chlorophyllfluoreszenzanstiegs nach Zugabe von NADPH und Ferredoxin unter extremen Schwachlicht ($1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) gemessen. Unter diesen Lichtbedingungen korreliert die Zunahme an Chl *a*-Fluoreszenz mit einer Ferredoxin-abhängigen Reduktion von Plastochinon (Munekage *et al.*, 2002).

1.5.2 Verwendung von Inhibitoren (Kopplung der Messmethoden mit Inhibitorbehandlung)

- Methylviologen

Methylviologen (MV) ist als ein artifizieller Elektronenakzeptor des PS I bekannt. Eine direkte Elektronenaufnahme durch MV von der PS I-Untereinheit PsaC verhindert im weiteren Verlauf eine Reduktion von Ferredoxin. Eine MV-Behandlung von Thylakoiden führt daher ausschließlich zu LET von H₂O zu MV (Joliot *et al.*, 2005, Ivanov *et al.* 2007, Castelo-Branco *et al.* 2008). Effekte von MV auf die PS II-Photochemie können jedoch nicht ausgeschlossen werden (Fan *et al.*, 2009).

-DCMU und HQNO

Bei DCMU handelt es sich um einen Inhibitor, der an die Chinonbindestelle Q_b des Photosystems II bindet. Bei Verwendung von DCMU wird daher die PS II-abhängige Reduktion von Plastochinon unterbunden. Zur Bestimmung der Reinjektionsstelle von Elektronen beim zyklischen Elektronentransport (PQ oder Cyt *b*₆f-Komplex) wurde neben DCMU auch der Inhibitor HQNO verwendet. Dieser führt zur Blockade der Chinonbindestelle von Cytochrom *b* (Halestrap, 1982, Yamashita *et al.* 2007). Da durch Verwendung von HQNO keine Aktivitätsveränderungen beim zyklischen Elektronentransport nachgewiesen wurden, wurde PQ als Reinjektionsort postuliert (Bendall und Manasse, 1995)

-Antimycin A

Antimycin A ist als Inhibitor des von Arnon beschriebenen zyklischen Elektronentransports um Photosystem I bekannt (Moss und Bendall, 1984, Bendall und Manasse, 1995). Beim mitochondrialen Cytochrom bc₁-Komplex fungiert Antimycin A als Inhibitor der Qi-Chinonbindestelle der Cytochrom b-Untereinheit und verhindert dadurch die Reduktion des Chinons oder Semichinons durch Häm b_L im Q-Zyklus (Ransac et al., 2010). Eine analoge Funktion beim plastidären Cytochrom b₆f-Komplex wurde widerlegt (Bendall und Manasse, 1995).

1.6 Physiologische Relevanz der verschiedenen zyklischen Elektronentransportwege bei Betrachtung entsprechender Mutanten

Mittels Mutantanalyse wurde die physiologische Funktion der beiden zyklischen Elektronentransportketten analysiert. Die Charakterisierung des Proteins PGR5 (Proton Gradient Regulation 5) und einer Mutante des entsprechenden Gens von *Arabidopsis thaliana* zeigte, dass dieses Protein eine wichtige Komponente des AA-sensitiven ZET darstellt (Munekage et al., 2002). Die *pgr5*-Mutante weist eine verminderte Fähigkeit auf, einen transmembranen Protonengradienten aufzubauen (Munekage et al., (2002). Die Abwesenheit von PGR5 führt zu einer verringerten Reduktion von Plastochinon bei der in Absatz 1.5.1 beschriebenen *in vitro*-Fluoreszenzmessung an aufgebrochenen Chloroplasten. Zudem weist die *pgr5*-Mutante einen verminderten Elektronentransport an der Akzeptorseite des PS I auf. PGRL1 wurde als weitere Komponente des PGR5-abhängigen zyklischen Elektronentransports beschrieben. PGRL1 wird in *Arabidopsis* durch zwei paraloge Gene kodiert; folglich existieren zwei Isoformen (PGRL1a und PGRL1b). Bei *Arabidopsis-pgr1ab*-Doppelmutanten konnte neben einem Verlust von PGRL1 auch die Abwesenheit von PGR5 beobachtet werden (DalCorso et al., 2008). Daraus wurde gefolgert, dass das Membranprotein PGRL1 als Andockstelle für das membranassoziierte Protein PGR5 fungiert. Mittels Yeast-Two-Hybrid (YTH)- und Split-Ubiquitin-Analysen (SU) konnten weitere potenzielle Interaktionspartner identifiziert werden, woraus ein vorläufiges Model für den AA-sensitiven zyklischen Elektronentransport abgeleitet wurde (DalCorso et al., 2008) (Abb.3).

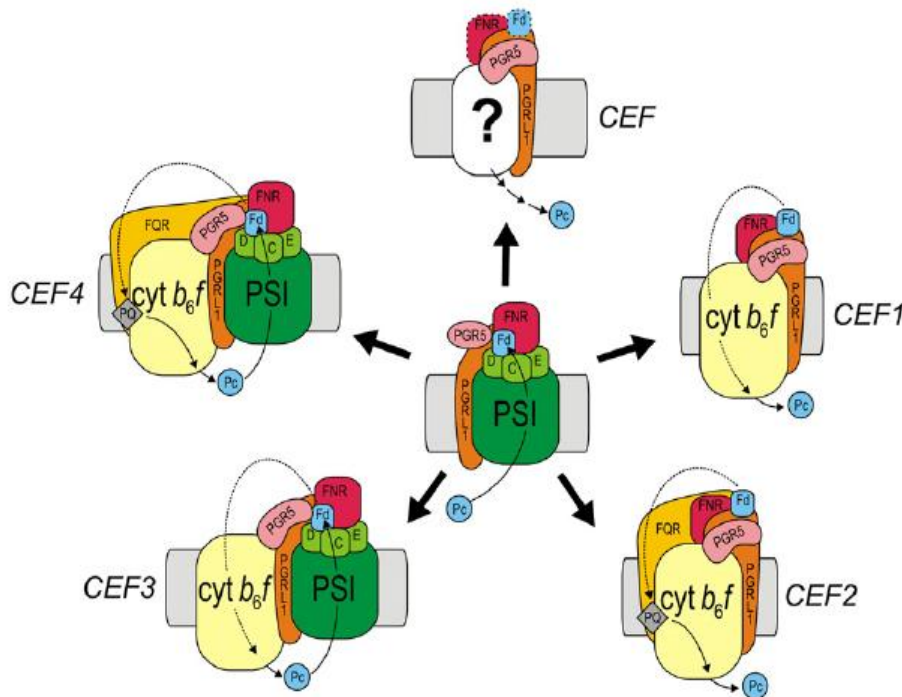


Abb. 2: Schematische Modelle von PGR5/PGRL1-abhängigem zyklischen Elektronentransport

PGRL1 und PGR5 werden in verschiedenen Assemblagen gezeigt, dabei immer zusammen mit der FNR und Fd. Eine zusätzliche Interaktion mit unbekanntem Proteinen sowie einer FQR ist möglich (CEF, CEF2, CEF4). Zudem erfolgt die Assemblierung mit dem Cyt b_6f -Komplex oder Photosystem I in einem Shuttle-Mechanismus (CEF1, CEF2 oder zentrale Darstellung) oder beiden Komplexen gleichzeitig unter Bildung eines Superkomplexes (CEF3, CEF4). Eine zusätzliche Beteiligung der FQR ist möglich (CEF2, CEF4). Eine direkte Elektronenreinjektion in den Cyt b_6f -Komplex (CEF1, CEF3) oder Cyt b_6f gebundenes Plastochinon (CEF2, CEF4) ist denkbar (aus DalCorso et al., 2008).

In den Modellen, welche in Abb. 2 gezeigt werden, agiert der PGR5/PGRL1-Komplex zusammen mit FNR und Ferredoxin entweder permanent assoziiert mit PS I oder als mobiler Membranproteinkomplex zwischen PS I und dem Cyt b_6f -Komplex (Modell, Mitte, CEF1 und CEF2). Eine zusätzliche Assemblierung mit der Ferredoxin-Plastochinon-Reduktase (FQR) (CEF2) oder einem bislang unbeschriebenen Interaktionspartner (CEF) ist nicht auszuschließen. Eine Assemblierung zu einem PGR5/PGRL1/PS I/ Cyt b_6f -Superkomplex (mit oder ohne FQR) ist ebenfalls denkbar (CEF3, CEF4). Funktionell könnten PGR5/PGRL1-Komplexe jedoch auch die Funktion der FNR ersetzen oder sogar die FQR selbst darstellen (CEF2, CEF3).

Ein Fehlen von PGR5 führt zur Verschiebung des stromalen ATP/NADPH-Verhältnisses von 1.6 zu 1.3 und zu einer verstärkten Akkumulation von reduziertem Ferredoxin (Munekage et al., 2008). Ferredoxin-abhängige Prozesse werden dadurch verstärkt. Beispielsweise konnte eine Steigerung der von Ferredoxin-abhängigen Wasserstoffproduktion in *C. reinhardtii* in einer entsprechenden *pgr11-*

Mutante nachgewiesen werden (Tolte et al., 2011). Desweiteren kann eine Akkumulation von reduziertem Ferredoxin auch zu einer veränderten Redoxregulation plastidärer Enzyme beitragen, da Ferredoxin einen Elektronendonator für entsprechend wirksame Thioredoxine darstellt. Die plastidäre ATP-Synthase stellt einen solchen Thioredoxin aktivierten Proteinkomplex dar (Stumpp et al., 1999). Durch Messungen des elektrochromen Shifts konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von PGR5 zu einer verstärkten Aktivität der plastidären ATP-Synthase beiträgt. Die höhere Aktivität der ATP-Synthase verstärkt also die verringerte Fähigkeit von *pgr5*- und *pgr11ab*-Mutanten, einen transmembranen Protonengradienten aufzubauen (Zhang et al., 2009).

Im Gegensatz zum PGR5/PGRL1-abhängigem zyklischen Elektronentransport scheint der zyklische Elektronentransport über den NDH-Komplex in der C₃-Photosynthese überwiegend unter Stressbedingungen Relevanz zu besitzen (Endo et al., 1999, Takabayashi et al., 2002, Horvath et al., 2000, Wang et al., 2006). Das wird durch Mutanten des NDH-vermittelten zyklischen Elektronentransportes unterstrichen, die im Gegensatz zu *pgr5*- und *pgr11ab*-Mutanten unter kontrollierten Anzuchtbedingungen keine Wachstumsphänotypen aufweisen (Munekage et al., 2002, Dalscorso et al., 2008). Eine physiologische Relevanz von zyklischem Elektronentransport und die Redundanz beider Elektronentransportwege zeigt sich bei den Doppelmутanten beider Elektronentransportwege. Diese zeigen unter kontrollierten Wachstumsbedingungen ein stark verringertes Wachstum (Munekage et al., 2004).

1.7 Modelle für Antimycin A-sensitiven zyklischen Elektronentransport

Es existieren insgesamt vier teilweise redundante Modelle für den zyklischen Elektronentransport (Munekage et al., 2002, Lintala et al., 2007, Lintala et al., 2009, Joliot et al., 2002, Iwai et al., 2010, Herbert et al., 1990).

I: Das Modell der "lateralen Heterogenität" berücksichtigt die begrenzte Diffusion von Plastochinon und die laterale Heterogenität der Verteilung der photosynthetischen Membranproteinkomplexe. PS II ist vorwiegend in den gestapelten Granathylakoiden lokalisiert, während PS I und die ATP-Synthase dagegen ausschließlich in den nicht gestapelten Stromathylakoiden vorzufinden sind. Der Cyt b_6f -Komplex zeigt dagegen eine homogene Verteilung auf beide Thylakoidfraktionen. Diese räumliche Aufteilung ermöglicht eine Abgrenzung von linearem Elektronentransport (PSII zu Cyt b_6f) in den Granathylakoiden und zyklischem Elektronentransport (Fd zu Cyt b_6f) in den Stromalamellen (Albertsson, 2001, Breyton et al., 2006).

II: Das "Superkomplex Modell" beschreibt zyklischen Elektronentransport in einem Cytochrom- b_6f -Komplex/Photosystem I-Superkomplex. Dieses Modell konnte für *Chlamydomonas reinhardtii* experimentell durch die Isolation dieses Superkomplexes bestätigt werden (Iwai et al., 2010). Bei höheren Pflanzen konnte ein derartiger Superkomplex bislang nicht nachgewiesen werden. Die duale Lokalisation der FNR, die sowohl an PSI als auch am Cyt b_6f -Komplex gebunden vorkommt, kann als Indiz für einen solchen Superkomplex gewertet werden (Joliot et al., 2006, Breyton et al., 2006, Lintala et al., 2009,).

III: Auf Grund der Ko-Migration der FNR mit dem Cyt b_6f -Komplex in BN-Gelen wurde der Cytochrom b_6f -Komplex als Ort der Elektronenreinjektion postuliert. Basierend auf dem "FNR-Modell" wurde postuliert, dass reduziertes Ferredoxin Elektronen direkt an Cyt b_6f gebundene FNR überträgt, die diese wiederum in den Q-Zyklus einspeist (Breyton et al., 2006, Zhang et al., 2001, Joliot et al., 2005, Forti et al., 1983, Scheller et al., 2001). Dieses Modell wird durch die verschiedenen Plastochinon-Redoxzustände in FNR-freien und FNR-gebundenen Cytochrom b_6f -Komplexen unterstützt (Szymanska et al., 2011).

IV: Im "Kompetitionsmodell" wird eine Konkurrenz von linearem und zyklischem Elektronentransport um reduziertes Ferredoxin diskutiert. Unter "steady state"-Lichtbedingungen findet aufgrund einer stärkeren Substrataffinität von FNR zu

Ferredoxin vorwiegend linearer Elektronentransport statt. Lediglich bei Bedingungen, bei denen eine gesteigerte Ferredoxin-Reduktion auftritt, kann zyklischer Elektronentransport mit der favorisierten NADP^+ -Reduktion konkurrieren (Joliot et al., 2005, Breyton et al. 2006).

1.8 Die Funktion von Cysteinen bei der Photosynthese

In Plastiden erfüllt die Thiol-Redoxregulation von Proteinen in verschiedenen Prozessen eine wichtige Funktion (Buchanan und Balmer, 2005). Der Redoxzustand des Stromas reguliert über die Ausbildung und Reduktion von Disulfidbrücken viele plastidäre Prozesse. Veränderungen des Thiol/Disulfid-Status von Proteinen werden dabei vorwiegend von Mitgliedern der Thioredoxinfamilie katalysiert (Motohashi et al. 2001). Bis zum heutigen Tag wurden fünf verschiedene Thioredoxinfamilien beschrieben (Buchanan und Balmer, 2005). Der generelle Regulationsmechanismus basiert auf Thiol/Disulfid-Austauschreaktionen.

Bei der Photosynthese spielen über Cysteine koordinierte Ko-Faktoren eine essentielle Rolle. Ferredoxin, das Rieske-Protein des Cyt b_6f -Komplexes, sowie das Photosystem I transportieren Elektronen mittels Eisen-Schwefel-Clustern, die ebenfalls über Cysteine koordiniert werden (Droux et al. 1987, Tagawa et al., 1963, Jagannathan et al., 2009). Reine Thiol/Disulfid-Elektronentransportketten sind auch aus anderen Kompartimenten bekannt. Ein Disulfid-Relay, basierend auf intermolekularem Elektronentransport, stellt die Basis für Proteinfaltung am endoplasmatischen Retikulum dar (Bien et al., 2010). Disulfid-Oxidoreduktasen, wie DsbB und eine Vielzahl von anderen löslichen und membran-assoziierten Redoxsensoren oder Redoxtranslokatoren wie CcdA, wurden inzwischen beschrieben (Nagahara et al., 2011, Motohashi et al., 2010). Die starke Anfälligkeit von Thiolen gegenüber Oxidation bedingt die Kontrolle des Thiol/Disulfidstatus durch Thiol/Disulfid-Regulatorproteine (Deneke et al., 2000). Die oxidative Inaktivierung von Proteinen unter Ausbildung von Sulfen- oder Sulfonat-Gruppen kann dagegen durch Vertreter der Peroxiredoxine kompensiert werden (Dietz et al., 2006). Cysteine können dabei innerhalb von Proteinen in vielfältiger Weise angeordnet sein. So zeichnen sich Thioredoxine und Thioredoxin-ähnliche Proteine durch charakteristische CxxC-Motive aus (Cain et al., 2009). CxxC-Motive sind jedoch auch als Liganden bei Metalloproteinen wie Transkriptionsfaktoren oder Eisenspeicherproteinen bekannt (Leòn et al., 2003, Frauer et al., 2003). Eine Vielzahl

von Thiol-abhängigen Prozessen erfolgt auch über Cysteine, die nicht einem charakteristischen Motiv innerhalb der Aminosäuresequenz zugeordnet werden können.

1.9 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollte unter Verwendung von genetischen und biochemischen Methoden eine funktionelle Charakterisierung von PGR5 und PGRL1 im Zusammenhang mit dem zyklischen Elektronentransport um PS I untersucht werden. Insbesondere sollte untersucht werden, ob PGR5 und PGRL1 als akzessorische Proteine beim Fd-abhängigen ZET beteiligt sind oder eine direkte Funktion im zyklischen Elektronentransport im Sinne einer Oxidoreduktase oder Ferredoxin-Plastochinon-Reduktase (FQR)-Untereinheit aufweisen

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von p.A.-Qualität und wurden, wenn nicht anders beschrieben, von Roth bezogen.

2.1.2 Geräte

Blot-Apperatur	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad
Elektrophoreseapparaturen	Thermo Scientific Owl P10DS Dual Gel System
Fluoreszenzscanner	Thyphoon 8600, GE Healthcare
Heizblock	Peqlab
Zentrifugen	Eppendorf Mikro-Kühlzentrifuge 5415R, Beckmann Avanti J26-XP
Spannungsgeräte	Amersham, Consort
Thermoschüttler	Eppendorf
Mixer	Warring
Photometer	Shimadzu, UV-2401 PC
pH-Meter	Knick pH Meter 766 Calimatic
Inkubatoren	Infors HT, Heraeus
Sterilbänke	Thermo Scientific, Hera Safe

Lichtschranke	Eigenanfertigung
Feinwaage	Kern ALJ120-4
Magnetrührer	VELB scientifica
Rotationsschüttler	Wise Shake StR2d
Massenspektrometer	Thermo Fisher Scientific LTQ-Orbitrap
Microplattenleser	Tecan Safire

2.1.3 Pflanzenmaterial

Name	Genotyp	Mutations-Typ	Quelle
WT	Columbia 0	---	LMU, München, Dario Leister
<i>fnr1</i>	Columbia 0	tDNA	Turku, Finnland Eva-Mari Aro
<i>fnr2</i>	Columbia 0	RNAi	Turku, Finnland Eva-Mari Aro
<i>pgr5</i>	gl	ems	Kyoto, Japan Toshiharu Shikanai
<i>pgr1a</i>	Columbia 0	tDNA	LMU, München Darion Leister
<i>pgr1b</i>	Columbia 0	tDNA	LMU, München Dario Leister
<i>pgr1ab</i>	Columbia 0	tDNA	LMU, München Dario Leister
<i>crr2</i>	gl	ems	Kyoto, Japan Toshiharu Shikanai
<i>PGRL1A-HA</i>	Columbia 0	tDNA	LMU, München Darion Leister

Tabelle 1:verwendete Pflanzen

2.1.4 Antikörper

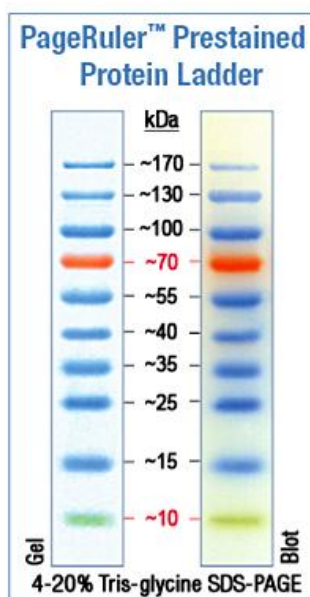
PGRL1-Antikörper wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit rekombinantem PGRL1 Protein selbst hergestellt. PGR5-Antikörper wurde von T. Shikanai zur Verfügung gestellt.

Alle anderen primären Antikörper wurden von Agrisera bezogen. Mit alkalischer Phosphatase gekoppelte His-Antikörper stammten von KPL und wurden kolorimetrisch detektiert.

Als sekundärer Antikörper wurde Rabbit IgG, horse radish peroxidase-linked F(ab')₂ fragment (from donkey) von Amersham verwendet.

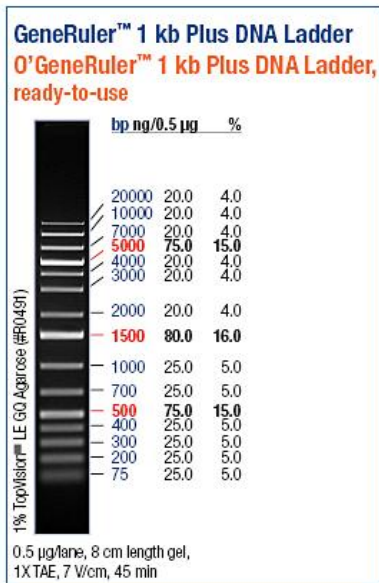
2.1.5 Molekularmassenbestimmung von Proteinen

Die Molekularmassenbestimmung erfolgte bei der SDS-PAGE-Gelelektrophorese über Standard-Proteine. Der Molekularmassenmarker wurde von Fermentas bezogen.



2.1.6 Molekularmassenbestimmung von DNA-Fragmenten

Die Molekularmassenbestimmung erfolgte in 1%-Agarose Gelen über Standard-DNA-Fragmente. Der Molekularmassenmarker wurde von Fermentas bezogen.



2.1.7 Protease-Inhibitoren

-Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid (PMSF)

100 mM in Ethanol (0.2 mM Endkonzentration)

-Benzamidin/HCl:

100 mM in HEPES pH 7,5 (mit NaOH) (1 mM Endkonzentration)

-ε-Aminocapronsäure (ACA):

500 mM in ddH₂O (1 mM Endkonzentration)

2.1.8 Antibiotika

Ampicillin 100 mg/ml in H₂O

Carbenicillin 50 mg/ml in H₂O

Gentamycin 25 mg/ml in H₂O

Kanamycin 50 mg/ml in H₂O

Rifampicin 100 mg/ml in Dimethyl Sulfoxid (DMSO)

Spectinomycin 75 mg/ml in H₂O

Hygromycin B 20 mg/ml in H₂O

Alle Antibiotika-Lösungen wurden in einer 1:1000-Verdünnung zur Selektion von Pflanzen oder Bakterien verwendet.

2.2.2 Nukleinsäureisolation

2.2.2.1 Genomische/plastomische DNA aus Pflanzen

Gewebe von 20-50 mg Blättern wurde in 400 µl DNA-Extraktionspuffer aufgenommen und zusammen mit zwei Metalkugeln für 3 min bei 3000 Upm in einem Gewebehomogenisator aufgeschlossen. Die Proben wurden bei RT bei 16.100 x g für 10 min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lösung wurde mit 0.8 Volumen Isopropanol versetzt, die Lösung wurde gemischt und die Nukleinsäuren bei RT für 10 min gefällt. Die Proben wurden erneut bei 16100 x g und RT für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 70% Ethanol resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C und 16100 x g für 10 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet für 10 min an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde in RNase-haltigem ddH₂O über Nacht bei 4°C rückgelöst.

Lösungen:

Extraktionspuffer: 100 mM TRIS pH 7.5 (mit HCl)
 100 mM NaCl
 50 mM EDTA pH 8.0
 2% SDS (w/v)

Isopropanol

70% Ethanol

ddH₂O + RNase (10 µg/ml)

2.2.2.2 RNA-Isolation

50-100 mg Blattgewebe wurden in einem 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß in flüssigem N₂ gefroren. Der Gewebeaufschluss erfolgte mittels Vortexen des gefrorenen Materials. Das Gewebepulver wurde in 1 ml Trizol®-Reagenz (Invitrogen) resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Der Suspension wurden 200 µl Chloroform zugesetzt und für 15 sec gevortext. Anschließend erfolgte eine 10-

minütige Inkubation bei RT mit erneutem 15-sekündigen Vortexen alle 5 min. Die Proben wurden bei 4°C und 12000 x g für 10 min abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit 0.6 Volumen Isopropanol versetzt. Nach mehrmaligem Mischen wurden die Nukleinsäuren auf Eis für 10 min gefällt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 12000 x g wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 75% Ethanol resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C, 12000 x g für 10 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei RT für 10 min getrocknet. Das Pellet wurde in DEPC-behandeltem ddH₂O, welches mit RNase Inhibitor versetzt war, rückgelöst. Um mögliche DANN-Kontaminationen zu entfernen, wurde die Lösung mit DNase (Roche) nach Anleitung des Herstellers verdaut und anschließend bei -80°C eingefroren.

Lösungen:

TRIZOL® Reagenz

Chloroform

Isopropanol

75% Ethanol

Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltes ddH₂O (Roth)

RNase Inhibitor (Amersham)

DNase (Roche)

10x DNase Puffer (Roche)

2.2.2.3 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Die Isolation erfolgte mittels QIAGEN Plasmid Mini Kit nach Anleitung des Herstellers aus pelletierten Bakterien von 5 ml Übernachtskultur.

2.2.2.4 cDNA-Synthese und PCR

1-3 µg DNA-freie RNA wurde pro Reaktion eingesetzt und mittels SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen) und Oligo-dT-Primern in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Synthesen erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

2.2.3 Sequenzmutagenese und Klonierungsprimer

Sequenzmutagenese wurde nach dem Prinzip von Higuchi et al., (1988) durchgeführt. Es wurden jeweils überlappende Fragmente der zu mutagenisierenden Sequenz mittels PCR und mutagenisierten Primern hergestellt. Durch Verwendung von *in silico*-Basenaustausch vor der Primersynthese konnte somit das zu mutierende Nukleotid in die Überlappungssequenz gelegt werden. Nach Aufreinigung der Fragmente wurden diese zusammengemischt, denaturiert und aneinandergelagert. Unter Verwendung von zwei weiteren Primern des 5` und 3` Endes der Sequenz wurde mittels PCR die mutagenisierte Sequenz amplifiziert.

Tabelle 2: Primer und Mutagenese-Primer

Primer Name	5`→3
PGRL1A	
PGRL1aF:	CACCATGGGTAGCAAGATGTTGTTTAG
PGRL1aR:	TTAAGCTTGGCTTCCTTCTGG
FNR1	
FNR1F:	CACC GAGTCTAA GAAACAGGAA GAAGG
FNR1R:	TTAGTAGACTTCAACATTCCACTG
PGR5	
PGR5F:	CACC ATGGCTGCTG CTTGATTTTC TG
PGR5R:	CTAAGCAAGGAAACCAAGCCT
Ferredoxin	
FerredoxinF:	CACC GCGAATTCTGGTG GTGCTACGAT
FerredoxinR:	TTAGAAGAGTTCAGTTTCCTTGTG
Thioredoxin m	
Thioredoxin mF:	CAA C AT G GC CG C CGC CGT CGA AGT A
Thioredoxin mR:	TTA CTC GAC CAA GAA TCT TTC TAT AGT TTT CT

Thioredoxin f	
Thioredoxin fF:	CAA C AT G TG TAG CTT A GA AAC CGT TA A
Thioredoxin fR:	TCA TCC GGA AGC AGC AGA CCT CGC T
Thioredoxin h	
Thioredoxin hF:	CACCGAAAACCATAGATGGGTCTG
Thioredoxin hR:	TCAAGATTCCGAGGATGTATATTTGAGAA
Mutagenese Primer:	
C81S PGRL1a	
C1F	TGTTTTGCCCTATAGTAGCATCAACAAGG
C1R	CCTTGTTGATGCTACTATAGGGCAAACA
C181S PGRL1a	
PGRL1aF:	CACCATGGGTAGCAAGATGTTGTTTAG
PGRL1aR:	TTAAGCTTGGCTTCCTTCTGG
C2F	GCGAGGGTCCAAGAAGCAGTCTCCGTA
C2R	TACGGAGACTGCTTCTTGGACCCTCGC
C272S PGRL1a	
L1Cys3F	AAGGGTCCTAGTCCGAATTGT
L1Cys3R	ACAATTCGGACTAGGACCCTT
C275S PGRL1a	
L1Cys4F	TGTCCGAATAGTGGAACGGA
L1Cys4R	TCCGTTCCACTATTCGGACA
C272, 275S PGRL1a	
L1Cys3+4F	GTCCTAGTCCGAATAGTGGAA
L1Cys3+4R	TTCCACTATTCGGACTAGGAC
C300S PGRL1a	
L1Cys5F	ACTGTCAAAAGCACCAACTGC
L1Cys5R	GCAGTTGGTGCTTTTGACAGT
C303S PGRL1a	
L1Cys6F	GCACCAACAGCGGAACCGC
L1Cys6R	GCGGTTCCGCTGTTGGTGC
C300, 303S PGRL1a	
L1Cys5+6F	TCAAAAGCACCAACAGCGGAA
L1Cys5+6R	TTCCGCTGTTGGTGCTTTTGA

ΔThioredoxin m	
Δ2CysThioredoxin mF:	GGCAC CATGGTGTGG ACCTAGCC
Δ2CysThioredoxin mR:	GGCTAGGTCCACACCATGGTGCC
ΔThioredoxin f	
Δ2CysThioredoxin fF:	GGCTAGGTCCACACCATGGTGCC
Δ2CysThioredoxin fR:	TACTTGGACCACACCATTGAGTG
ΔThioredoxin h	
Δ2CysThioredoxin hF:	ATGTGGGAGTAGTAAATACATAG
Δ2CysThioredoxin hR:	CTATGTATTTACTACTCCCACAT

Die Mutagenese zur Generierung von C_{81,181}S PGRL1a, C_{275,300}S PGRL1a, C_{275,303}S PGRL1a, C_{272,275,300,303}S PGRL1a und C_{81,181,272,275,300,303}S PGRL1a erfolgte durch sequenzielle Mutagenese unter Verwendung oben aufgeführter Primerkombinationen. Die Mutagenese erfolgte unter Verwendung der “Proofreading Taq Polymerase Phusion“ (New England Biolabs) nach Anleitung des Herstellers. Durch Klonierung der Amplifikationsprodukte wurden folgende Plasmide hergestellt.

Tabelle 3: Plasmide

Transgen	Genotyp	Organismus	Vektor
PGRL1a-HA	WT	<i>A. thaliana</i>	pPCV812ΔNot-Pily
C ₈₁ ΔS-PGRL1a	DE3.0pLysS	<i>E. coli</i>	pET151/D-TOPO
C ₁₈₁ ΔS-PGRL1a	DE3.0pLysS	<i>E. coli</i>	pET151/D-TOPO
C ₂₇₂ ΔS-PGRL1a	DE3.0pLysS	<i>E. coli</i>	pET151/D-TOPO
C ₂₇₅ ΔS-PGRL1a	DE3.0pLysS	<i>E. coli</i>	pET151/D-TOPO
C ₃₀₀ ΔS-PGRL1a	DE3.0pLysS	<i>E. coli</i>	pET151/D-TOPO
C ₃₀₃ ΔS-PGRL1a	DE3.0pLysS	<i>E. coli</i>	pET151/D-TOPO
C _{81,181} ΔS-PGRL1a	DE3.0pLysS	<i>E. coli</i>	pET151/D-TOPO
C _{272,275} ΔS-PGRL1a	DE3.0pLysS	<i>E. coli</i>	pET151/D-TOPO
C _{300,303} ΔS-PGRL1a	DE3.0pLysS	<i>E. coli</i>	pET151/D-TOPO
C _{275,303} ΔS-PGRL1a	DE3.0pLysS	<i>E. coli</i>	pET151/D-TOPO
C _{275,300} ΔS-PGRL1a	DE3.0pLysS	<i>E. coli</i>	pET151/D-TOPO
C _{272,275,300,303} ΔS-PGRL1a	DE3.0pLysS	<i>E. coli</i>	pET151/D-TOPO

C _{81, 181, 272, 275, 300, 303} ΔS-PGRL1a	DE3.0pLysS	<i>E. coli</i>	pET151/D-TOPO
PGRL1a-His	DE3.0pLysS	<i>E. coli</i>	pET151/D-TOPO
PGR5-His	DE3.0pLysS	<i>E. coli</i>	pET151/D-TOPO
FNR1-His	DE3.0pLysS	<i>E. coli</i>	pET151/D-TOPO
Trx m-His	DE3.0	<i>E. coli</i>	pET151/D-TOPO
ΔTrx m-His	DE3.0	<i>E. coli</i>	pET151/D-TOPO
Trx f-His	DE3.0	<i>E. coli</i>	pET151/D-TOPO
ΔTrx f-His	DE3.0	<i>E. coli</i>	pET151/D-TOPO
Rup.PGRL1a-His	DE3.0	<i>E. coli</i>	pET151/D-TOPO
Trx h-His	DE3.0pLysS	<i>E. coli</i>	pET151/D-TOPO
ΔTrx h-His	DE3.0pLysS	<i>E. coli</i>	pET151/D-TOPO
Ferredoxin-His	DE3.0	<i>E. coli</i>	pET151/D-TOPO

Alle Pflanzenlinien wurden über die Antibiotikaresistenz gegen Hygromycin B selektiert.

Alle bakteriellen Transformanten wurden durch eine Antibiotikaresistenz gegen Ampicillin selektiert.

2.2.4 E. coli-Transformation

Kompetente *E.-coli* Zellen (50 µl) wurden mit 40 ng Plasmid für 20 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte durch einen Hitzeschock 40 sec bei 42 °C. Nach 2 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen in 250 µl SOC-Medium resuspendiert und für 1 h bei 37°C mit 180 Upm geschüttelt. Die Bakterien wurden auf Antibiotika-haltigen Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Inkubator selektiert.

Lösungen:

SOC-Medium: 2% Pepton/Trypton (w/v)
 0,5 % Hefe-Extrakt (w/v)
 0,05 % NaCl (w/v)
 2,5 mM KCl
 20 mM Glucose
 pH 7,0 (mit NaOH)

LB-Platten (+ Antibiotika): 1% Pepton/Trypton (w/v)
0,5 % Hefe-Extrakt (w/v)
1 % NaCl (w/v)
1,5% Agarose (w/v)

2.2.5 Transformation von Agrobakterien

Elektrokompetente *Agrobacterium tumefaciens* (100 µl) wurden für 5 min auf Eis mit 100 ng Plamid inkubiert und anschließend in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Bakterien wurden mit 20 ng Plamid transformiert und in SOC-Medium resuspendiert und 1h bei 28 °C im Inkubator bei 180 rpm geschüttelt. Die Suspension wurde auf einer antibiotikahaltigen Platte ausgestrichen und die positiven Transformanten für zwei Tage bei 28 °C im Inkubator selektiert.

Lösungen:

SOC-Medium: 2% Pepton/Trypton (w/v)
0,5 % Hefe-Extrakt (w/v)
0,05 % NaCl (w/v)
2,5 mM KCl
20 mM Glucose
pH 7,0 (mit NaOH)

YEB-Agar-Platten: 0,5 % Fleischextrakt (w/v)
0,1 % Hefe-Extrakt (w/v)
0,5 % Pepton/Trypton (w/v)
0,5 % Saccharose (w/v)
2 mM MgSO₄
1,5 % Agarose (w/v)

2.2.6 Pflanzentransformation

Die Pflanzentransformation erfolgte durch florale Transformation mit *Agrobacterium tumefaciens*. Dazu wurden mit binären Vektoren transformierte Agrobakterien in einem Kulturvolumen von 500 ml bis zu einer OD von 0,8 bei 28°C unter Schütteln

angezogen. Die Kultur wurde abzentrifugiert und in 1L 0,5 % Saccharose-Lösung (w/v) resuspendiert und zur Transformation verwendet. Die Transformation erfolgte durch 1-minütiges Dippen von Inluoreszenzen in die Bakteriensuspension. Zur besseren Benetzung der Blüten wurde 0,01% Silwet (v/v) zugesetzt. Die Pflanzen wurden anschließend in 1 cm hoch stehendes Wasser gestellt und für zwei Tage mit einer Plastikhaube zugedeckt. Die Haube wurde entfernt und die Pflanzen für weitere zwei Wochen kultiviert. Nach dem Trockenfallen der Erdkultur wurden die Samen geerntet und in Sterilkultur mittels Antibiotikaresistenz selektiert.

Lösungen:

YEB Medium: 0,5 % Fleischextrakt (w/v)
 0,1 % Hefe-Extrakt (w/v)
 0,5 % Pepton/Trypton (w/v)
 0,5 % Saccharose (w/v)
 2 mM MgSO₄

0,5 % Saccharose-Lösung (w/v)

Silwet L-77

2.2.7 Heterologe Proteinexpression in *E. coli*

50 µl kompetente *E. coli*-Zellen (DE3.0 pLysS,RIPL) wurden mit dem gewünschten Plasmid transformiert, 1h bei 37 °C schüttelnd inkubiert und anschließend in 100 ml YT-Medium mit Antibiotika über Nacht bei 37°C und 180 Upm angezogen. Die erhaltene Kultur wurde in 900 ml YT-Medium überführt und bei 37 °C und 180 Upm bis zu einer OD von 1.0 hochgezogen. Nach Induktion der Expression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration von 0,5 mM) wurde die Kultur zur Expression für 3h bei 30 °C und 180 Upm inkubiert. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation bei 4°C und 4000xg für 30 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet zunächst in flüssigem N₂ und anschließend bei -80°C bis zur Proteinaufreinigung eingefroren.

Lösungen:

1M IPTG-Lösung

YT-Medium: 0,8% Bacto-tryptone (w/v)
 0,5% Bacto-yeast extract (w/v)
 0,5% NaCl (w/v)

2.2.8 Aufreinigung von heterolog exprimierten Proteinen

Das Bakterienpellet wurde auf Eis für 30 min aufgetaut und pro g Pellet in 5 ml Isolationspuffer aufgenommen. Pro 10 ml wurden 10 mg Lysozym sowie 100 U DNAse zugesetzt. Zur vollständigen Lyse erfolgte eine 1-stündige Inkubation auf Eis. Anschließend wurde die Lysereaktion 2x für 10 min. in flüssigem N₂ eingefroren und auf Eis aufgetaut. Danach wurde die Lösung 10x für je 1 min bei 30 V auf Eis sonifiziert. Zwischen jedem Sonifizierungsschritt erfolgte eine fünfminütige Inkubation auf Eis. Die sonifizierte Lösung wurde für 30 min bei 4°C mit 16100xg zentrifugiert. Der Überstand wurde zur nativen Proteinaufreinigung verwendet.

Native Aufreinigung: Pro 10 ml Lysat wurden 0,75 ml Ni-NTA verwendet. Die Ni-NTA wurde im 10 fachen Volumen ddH₂O aufgenommen und sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Säulenmaterial im 10-fachen Volumen Lysepuffer dreimal gewaschen. Anschließend wurde die auf diese Weise äquilibrierte Ni-NTA dem Bakterienlysat zugesetzt und für 1 h bei 4°C und 200 Upm inkubiert.

Lösungen:

Lysepuffer: 50 mM NaH₂PO₄
 300 mM NaCl
 10 mM Imidazole
 pH 8.0 (mit NaOH)
 1mM DTT (Fluka)
 2% Triton X-100 (Amersham) (v/v)

Waschpuffer: 50 mM NaH₂PO₄
 300 mM NaCl
 20 mM Imidazole

pH 8.0 (mit NaOH)
0,2% Triton X-100 (Amersham) (v/v)

Elutionspuffer: 50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
250 mM Imidazole
pH 8.0 (mit NaOH)
0,2% Triton X-100 (Amersham) (v/v)

Lysozym (1mg/ml Endkonzentration) (Fluka)

DNAse (5 µg/ml (100u gesamt)) (Roche)

2.2.9 Proteinkonzentrierung

Die Konzentrierung von Proteinlösungen erfolgte unter Verwendung von Amicon Zentrikons (Millipore) mit geeigneter Ausschlussgröße und Zentrifugation nach Angabe des Herstellers.

2.2.10 Thylakoidisolation

Ca. 25 g Blätter von 4 Wochen alten Pflanzen wurden mit Hilfe eines Mixers in 35 ml Isolationspuffer dreimal für je 3 sec homogenisiert und anschließend durch zwei Lagen Nylongaze (100 µM) filtriert. Das Filtrat wurde für 10 min bei 1400xg und 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment (Chloroplasten/Thylakoide) wurde in Lysepuffer resuspendiert und zur Lyse der Chloroplasten für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension erneut für 10 min bei 10000xg und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in TMK Puffer resuspendiert.

Lösungen:

Isolations-Puffer: 0,4 M Sorbit
0,1 M Tricin/KOH pH 7.8
0,5% Magermilchpulver (w/v)

Lyse-Puffer: 20 mM HEPES/KOH pH 7,5
 10 mM EDTA

TMK-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 6.8
 10 mM MgCl₂
 20 mM KCl

2.2.11 Chloroplastenisolation

Ca. 50 g Blätter von vier Wochen alten Pflanzen wurden in 300 ml Isolationsmedium aufgenommen und neunmal für je 1 sec in einem Mixer aufgeschlossen. Das Homogenat wurde über vier Lagen Mull sowie zwei Lagen Nylongaze (100 µM) in 500 ml Zentrifugationsbecher filtriert. Die Suspension wurde für 5 min bei 4°C und 1000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in Resuspensionspuffer aufgenommen. Die Suspension wurde auf einen 40% (v/v)/80% (v/v) Percoll-Stufengradienten geschichtet und für 5 min bei 4°C mit 3000xg zentrifugiert. Die intakten Chloroplasten, welche sich in der Interphase zwischen 40 und 80%igem Percoll befanden, wurden abgenommen und in Isolationspuffer aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 1000xg wurde der Überstand verworfen und das Pellet in Isolationspuffer aufgenommen.

Lösungen:

Isolationspuffer: 330 mM Sorbitol
 20 mM Tricine (pH 7.6) (mit NaOH)
 5 mM EGTA
 5 mM EDTA
 10 mM NaCO₃
 0.1% (w/v) BSA
 330 mg/L Ascorbat

Resuspensionspuffer: 300 mM Sorbitol
 20 mM HEPES (pH 7.6) (mit KOH)
 5 mM MgCl₂

2.5 mM EDTA

Percoll 40: 300 mM Sorbitol
20 mM HEPES (pH 7,6) (mit KOH)
5 mM MgCl₂
2,5 mM EDTA
40 % Percoll™ (v/v)

Percoll 80: 300 mM Sorbitol
20 mM HEPES (pH 7,6) (mit KOH)
5 mM MgCl₂
2,5 mM EDTA
80 % Percoll™ (v/v)

2.2.12 Chloroplastenlyse

Chloroplastensuspensionen wurden 1:100 mit Lysepuffer verdünnt und für 30 min auf Eis inkubiert.

Lösungen:

Lysepuffer: 50 mM HEPES (pH 7.6) (mit NaOH)
7 mM MgCl₂
1mM MnCl₂
2 mM EDTA
30 mM KCl
0,25 mM KH₂PO₄

2.2.13 Chlorophyllbestimmung

Aliquots von 1-5 µL von Chloroplasten oder Thylakoiden wurden in 1 ml 80%-igem Aceton, welches mit Natriumcarbonat gesättigt war, aufgenommen. Nach 10 min. Inkubation auf Eis mit zweimaligem Mixen wurden die präzipitierten Proteine durch 10-minütige Zentrifugation (16100xg bei 4°C) aus der Lösung pelletiert. Der Überstand wurde zur Chlorophyllmessung verwendet. Die Menge an Chlorophyll wurde photometrisch bei den Wellenlängen von 663 nm und 645 nm bestimmt. Als

Kontrollwert wurde die Absorption bei 750 nm gemessen. Als Referenzwert wurde 80%iges Acteon verwendet. Die Menge an Chlorophyll wurde unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors mit folgender Formel errechnet;

Formel:

$$\text{Chl a + b} = (17,7 \times A_{646,6} + 7,43 \times A_{663,6}) / (\text{Probe } \mu\text{l} / 1000 \mu\text{l Aceton})$$

Lösungen:

80% Aceton (v/v)

NaCO₃

2.2.14 Proteinbestimmung:

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Amidoschwarz.

1-5 µl der zu bestimmenden Proteinlösung wurden mit ddH₂O auf ein Volumen von 200 µl verdünnt und mit 800 µl Färbelösung versetzt. Nach 6-maligem mischen wurden die Proben für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 13000xg für 12 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Die Färbelösung wurde durch Waschlösung ersetzt, und die Proben erneut bei 13000xg für 12 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Die Waschlösung wurde abdekantiert und das Pellet bei Raumtemperatur für 10 min getrocknet. Anschließend wurde das Pellet durch Zugabe von 1M NaOH rückgelöst und die Absorption bei 615 nm gegen 1M NaOH bestimmt.

Zur Errechnung der Proteinkonzentration wurde eine Eichgerade mit BSA erstellt. Die Steigung der Gerade diente unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors als Berechnungsfaktor für die Proteinkonzentration in folgender Formel.

Formel:

$$\text{Proteinmenge in } \mu\text{g}/\mu\text{l} = (\text{Absorption} / 0,00294) / \mu\text{l eingesetzt}$$

Lösungen:

Färbelösung: 10% Essigsäure (v/v)

90% Methanol (v/v)

1 Spatelspitze Amidoschwarz

Waschlösung: 10 % Essigsäure (v/v)
90% Methanol (v/v)

0,2 M NaOH

2.2.15 UV/VIS-Spektroskopie

Die Bestimmung von Absorptionsspektren erfolgte mittels eines Photometers (Shimadzu) und einer Ulbrichtkugel. Die Absorption wurde in Wellenlängenbereichen von 190-800 nm bestimmt. Als Referenz dienten Lösungsmittel oder verwendete Puffer. Es wurden ausschließlich Quarzküvetten verwendet (Schott).

2.2.16 PAM-Fluorimetrie

2.2.16.1 Transienter NPQ (Dunkel-Licht Übergang)

In vivo wurde die Chlorophyll a Fluoreszenz an einzelnen Blättern mit einem Puls-Amplituden-Modulations-Fluorimeter 101/103 (PAM 101/103) ermittelt. Vor der Messung wurden die Pflanzen für mindesten 10 min dunkeladaptiert, bevor die minimale Fluoreszenz (F_0) bestimmt wurde. Nach einem Lichtpuls (0.8 s) ($5000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) wurde die maximale Fluoreszenz (F_m) sowie die maximale Quantenausbeute von PS II als $(F_m - F_0)/F_m = F_v/F_m$ berechnet. Nach Belichtung mit aktinischem Licht ($80 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) erfolgte der Elektronentransfer von PS II zu PS I. Danach wurde die steady state-Fluoreszenz (F_s) sowie nach weiteren Lichtpulsen (0.8 s, $5000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) F_m' die effektive Quantenausbeute von PS II (Φ_{II}) als $(F_m' - F_s)/F_m'$ berechnet. Nicht photochemisches Quenching (NPQ) wurde als $(F_m - F_m')/F_m'$, photochemisches Quenching (qP) als $(F_m' - F_s)/(F_m' - F_0)$ berechnet nach jedem Lichtpuls gemessen.

2.2.16.2 Ferredoxin-vermittelte Reduktion von Plastochinon *in vitro*

Die Ferredoxin-abhängige Plastochinonreduktion wurde an lysierten Chloroplasten gemessen (siehe Abschnitt 2.2.13). Die Messungen der Chlorophyllfluoreszenz erfolgte mit einem PAM Fluorimeter 101/103 (Walz, Germany). Der Anstieg der

Chlorophyllfluoreszenz nach Zugabe von 5 μM Spinat-Ferredoxin (Sigma) oder heterolog exprimiertem Ferredoxin (0.25 mM) und NADPH (Sigma) wurde unter Messlicht einer Intensität von 1 $\mu\text{mol Photonen} \times \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ analysiert.

2.2.17 Redox Titration

Die Bestimmung mittlerer Redoxpotenziale erfolgte unter Verwendung von Dithiothreitol (DTT_{red}) und 1,2-Dihydroxy-4,5-*trans*-Dithiane (DTT_{ox}). Rekombinante PGRL1-Proteine wurden in einer Endkonzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$, Thylakoide zu 35 $\mu\text{g Chl/ml}$ eingesetzt. Die verwendete DTT-Gesamtmenge lag bei 20 mM. Die Titration erfolgte bei einem pH-Wert von 7,0 in 50 mM MOPS-Puffer. Die Äquilibrierungszeit betrug 2h bei Raumtemperatur. Die Proteine wurden bei verschiedenen Redoxpotenzialen, d.h. unterschiedlichen Verhältnissen von $\text{DTT}_{\text{red}}/\text{DTT}_{\text{ox}}$ inkubiert. Um Redoxzustände zu konservieren, wurden die Proteine nach Äquilibrierung mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt und azetyliert. Bei Monomer/Dimer-Titrationsen erfolgte die Azetylierung mittels 100 mM Iodacetamid bei pH 7.0. Bei Titrationsen auf der Basis von PGRL1-Monomeren erfolgte die Azetylierung mit 10 mM 4-Acetamido-40-Maleimidylstilbene-2,20-Sisulfonsäure (AMS) in 2xLämmli-Puffer bei pH 7.0. Die Azetylierung erfolgte stets im Dunkeln für 30 min bei 25°C auf einem Thermoschüttler bei 1400 Upm.

Lösungen:

50 mM 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure/NaOH pH 7.0 (MOPS)

10 mM 4-Acetamido-40-Maleimidylstilbene-2,20-Disulfonsäure (AMS) in 2x Lämmli-Puffer

100 mM 1,2-Dihydroxy-4,5-*trans*-Dithian (DTT_{ox}) in ddH₂O

100 mM Dithiothreitol (DTT_{red}) in ddH₂O

50% Trichloressigsäure (TCA) (w/v)

2.2.18 Eisennachweis

Um Eisenbindung von PGRL1 nachzuweisen, wurden Proteinlösungen welche natives PGRL1 enthielten, in Ferrozin-Lösung aufgenommen und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Die Anwesenheit von Eisen zeigte einen

Farbumschlag von gelb nach violett. Die genaue Quantifizierung erfolgte unter Verwendung von Eichlösungen. Die Konzentration wurde dabei spektroskopisch durch die Absorption der Fe^{2+} -Ferrozin-Komplexen bei 615 nm bestimmt.

Lösungen:

Ferrozin-Lösung: 50 mM HEPES pH 7,5 (mit NaOH)
 200 mM Ferrozin
Eichlösung: 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ in ddH₂O

2.2.19 Sulfidnachweis

Um Sulfid (S^{2-}) in Lösungen nachzuweisen, wurde Proteinlösungen (1 μmol), welche natives PGRL1 enthielten, Dimethylphenylenediamin (DMPD) (2 mM) zugesetzt und diese bei Raumtemperatur für 10 min. inkubiert. Bei Anwesenheit von Sulfid wurde ein Farbumschlag von rosa nach blau, durch die Bildung von Methylenblau beobachtet. Die genaue Quantifizierung erfolgte unter Verwendung von Eichlösungen (LiS). Die Konzentration wurde dabei spektroskopisch durch die Absorption von gebildetem Methylenblau bei 690 nm bestimmt.

Lösungen:

Dimethylphenylenediamin-Lösung: 100 mM Dimethylphenylenediamin
 in 100% Ethanol (p.A.)
Eichlösung: 10 mM LiS in ddH₂O

2.2.20 Vakuuminfiltration

10 Blätter von 4 Wochen alten Pflanzen wurden in 25 ml Wasser (mit und ohne 100 mM N-Ethylmaleimid (NEM) Endkonzentration) bei Raumtemperatur in eine Waschflasche gegeben. Die Waschflasche wurde über eine Schlauchverbindung mit einer Vakuumpumpe verbunden und die Öffnung der Waschflasche mit einem Gummistopfen verschlossen. Nach Aktivierung der Pumpe wurde ein Unterdruck erzeugt, welcher nach Erreichen von 10 bar durch Entfernen des Gummistopfens aufgehoben wurde. Der Vorgang wurde so oft wiederholt bis das Aerenchym des

Blattmaterials vollständig mit Flüssigkeit gefüllt war. Anschließend wurden die Blätter für 10 min bei Schwachlicht ($10 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) schüttelnd inkubiert.

Lösungen:

Infiltrationslösung: 100 mM N-Ethylmaleimid in ddH₂O

2.2.21 Thylakoidsolubilisierung mit Digitonin

Thylakoide einer Chlorophyllkonzentration von 1mg/ml wurden 3x in TMK-Puffer auf Eis resuspendiert und anschließend bei 5000 rpm für jeweils 3 min bei 4°C abzentrifugiert, wobei der Überstand jeweils verworfen wurde. Das erhaltene Membranpellet wurde pro mg Chl in 600 μl ACA-Puffer resuspendiert und durch Zusatz von 300 μl 5%igem Digitonin solubilisiert. Die Solubilisierung erfolgte für 60 min bei 4°C bei leichtem Schütteln. Anschließend wurden die nichtsolubilisierten Membranen durch Zentrifugation bei 16,100 x g und 4°C für 70 min pelletiert. Der erhaltene Überstand wurde mit Hilfe einer Hamilton-Spritze abgenommen und für weitere Experimente verwendet.

Lösungen:

TMK-Puffer: 10 mM TRIS pH 6.8 (mit HCl)
 10 mM MgCl₂
 20 mM KCl

ACA-Puffer: 750 mM ϵ -Aminocapronsäure
 50 mM Bis-Tris
 5 mM EDTA
 50 mM NaCl

5% Digitonin (Serva) (w/v)

2.2.22 Ko-Immunopräzipitation

-mit PGRL1-Antikörpern

Thylakoide (1 mg/ml Chl) wurden in *Phosphate Buffered Saline* (PBS) mit 20 µl PGRL1-Antikörper und 0,1 % Natriumazid für 16 h bei 4°C schüttelnd (100 Upm) inkubiert. Anschließend wurden die Thylakoide durch dreimalige Zentrifugation (5000 Upm) und Resuspension in 1xPBS gewaschen. Die Thylakoide wurden dann mit 1,5% Digitonin (siehe Thylakoidsolubilisierung mit Digitonin, 2.2.22) solubilisiert. Währenddessen wurde Protein A-Sepharose durch 5-malige Zentrifugation (0,8 x g, 1 min) und Resuspension in PBS mit 0,1 % Digitonin äquilibriert. Der Überstand der solubilisierten Membranen wurde durch Zugabe von Protein A-Sepharose und PBS mit Digitonin auf eine Konzentration von 0,1 mg/ml Chl gebracht und erneut für 16 h bei 4 °C schüttelnd bei 100 Upm inkubiert. Danach wurde die Protein A-Sepharose mit gebundenen PGRL1-Antikörpern und Antigenen durch 5-malige Zentrifugation (0,8 x g, 1 min.) und Resuspension in PBS mit Digitonin gewaschen. Das Ganze wurde weitere fünfmal mit PBS ohne Digitonin wiederholt. Anschließend wurden die gebundenen Proteine durch Inkubation der festen Phase in 2xLämmli-Puffer (ohne DTT) eluiert. Zur Kontrolle wurde das gleiche Experiment mit Thylakoiden von *pgr1ab*-Mutanten durchgeführt.

Phosphate Buffered Saline (PBS): 10 mM Na₂HPO₄
 1,76 mM KH₂PO₄
 2,7 mM KCl
 137 mM NaCl

-mit HA-Affinitätsmatrix

Um HA-konjugierte Proteine immunologisch aufzureinigen, wurde Sepharose verwendet, an welche HA-Antikörper immobilisiert waren. Vor der Verwendung der HA-Affinitätsmatrix (Roche) wurde diese in Äquilibrierungspuffer dreimal durch Resuspendierung und Zentrifugation bei 4°C, 800xg für 1 min gewaschen. Die Matrix wurde nach der Solubilisierung der Thylakoide zugesetzt und nach Inkubation bei 4°C über Nacht bei 100 Upm 10 Mal mit dem 10-fachen Matrixvolumen an Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die gebundenen Proteine durch Inkubation der festen Phase in 2xLämmli-Puffer (ohne DTT) eluiert. Als Kontrolle

wurde das gleiche Experiment mit Thylakoiden von WT und *pgr11ab*-Mutanten durchgeführt.

Lösungen:

Äquilibrierungspuffer:	20 mM TRIS, pH 7.5 (mit HCl) 0.1 M NaCl 0.1 mM EDTA
Waschpuffer:	20 mM TRIS, pH 7.5 (mit HCl) 0.1 M NaCl 0.1 mM EDTA; 0.1% Digitonin (w/v)

2.2.23 Massenspektrometrische Identifikation von Proteinen

Zur massenspektrometrischen Identifikation von Proteinen wurde die Proben mittels SDS-PAGE getrennt und anschließend die zu analysierenden Proteine aus dem Gel ausgeschnitten. Die Gelstücke mit den enthaltenen Proteinen wurden an die LMU-Service Unit (Massenspektrometrie) weitergeleitet und dort analysiert.

2.2.24 Protein-Fällung

-TCA-Fällung

TCA-Fällungen wurden durchgeführt um Thiol/Disulfid-Austauschreaktionen zu stoppen. Dazu wurden Proteinlösungen mit 20% TCA versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die präzipitierten Proteine durch Zentrifugation bei 16.100 x g und 4°C pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 80%igem Aceton durch Zentrifugation (16.100 x g, 4°C, 10 min) und Resuspension dreimal gewaschen und an Luft getrocknet.

Lösungen:

50% Trichloressigsäure (TCA) (w/v)

80% Aceton (gesättigt mit NaCO₃) (v/v)

-Aceton-Fällung

Proteinlösungen wurde 100%iges Aceton zugesetzt, sodass eine Endkonzentration von 80% erreicht wurde. Anschließend wurden die präzipitierten Proteine bei 16.100xg und 4°C für 10 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Proteinpellet wurde an Luft getrocknet.

Lösungen:

100% Aceton (gesättigt mit NaCO₃)

-Modifizierte Aceton-Fällung

Die zu fällenden Proteine wurden in Lösung mit 0,01% Desoxycholat (w/v) für 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde HCl (37% (w/v)) (bis zu einer Konzentration von 0,1 M) zugesetzt und die Proteine für 2 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 100% Aceton bis zu einer Konzentration von 80% erfolgte die Fällung bei -20°C für mindestens 1 h. Nach Zentrifugation bei 16,000xg für 3 min bei 4°C wurde der Überstand abgenommen und das Proteinpellet für 2 min getrocknet. Anschließend wurden die Proteine in 2xLämmli-Puffer für mindesten 30 min bei Raumtemperatur solubilisiert.

Lösungen:

100% Aceton

10% Desoxycholat in ddH₂O (w/v)

37% HCl (w/v)

2.2.25 AMS-Markierung

AMS wurde in 2x Lämmli-Puffer zu einer Endkonzentration von 10-20 mM gelöst und TCA-präzipitierten Proteinen zugesetzt. Die Proteine wurden bei 30°C unter Schütteln (1400 Upm) für 30 min azetyliert.

2.2.26 Alkylierung von plastidären Proteinen mit N-Ethylmaleimide (NEM)

NEM gelöst in ddH₂O wurde zu Chloroplasten in einer Endkonzentration von 100 mM zugesetzt. Die Suspension wurde für mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.27 SDS-PAGE

Die Trennung von Proteinen erfolgte nach dem von Lämmli (1970) entwickelten Prinzip, in welchem mit Sodiumdodecylsulfat (SDS) solubilisierte Proteine nach ihrem Molekulargewicht in Polyacrylamidgelen getrennt wurden. Bei der Trennung von Membranproteinen mittels SDS-PAGE wurden drei verschiedene Versuchsansätze verfolgt.

1. SDS-PAGE in der 1. Dimension

Proteine wurden in 2x Lämmli-Puffer für 45 min bei Raumtemperatur solubilisiert. Die Proteine wurden anschließend bei 72 °C für 1 min inkubiert, wodurch die enthaltenen Membranproteine hitzedenaturiert und in Lösung gebracht wurden. Durch eine anschließende Zentrifugation bei 16.100 x g für 1 min wurden die nicht löslichen Bestandteile abzentrifugiert. Der Überstand wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das verwendete Polyacrylamidgel bestand aus einem kontinuierlichen Trenngel (15%), sowie einem 4%igen Sammelgel. Die Proteinlösungen wurden in die Probentaschen überführt und mit Hilfe mit einer Stromstärke von 6 mA getrennt.

2. Nicht-reduzierende (nr) SDS-PAGE in der 1. Dimension

Nicht reduzierende SDS-PAGE unterschied sich von SDS-PAGE dadurch, dass keinerlei Sulfhydrylreagenzien (DTT) bei der Solubilisierung verwendet wurden, wodurch die Reduktion von Disulfiden zu Thiolen vermieden wurde.

3. Diagonal-SDS-PAGE

Thylakoide oder Chloroplasten (1mg/ml) wurden zur Disulfidoxidation mit 200 mM Diamide für 30 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben durch Zugabe von 2xLämmli-Puffer ohne DTT solubilisiert und mittels SDS-PAGE getrennt. Die getrennte Spur wurde ausgeschnitten und die enthaltenen Proteine in 2xLämmli-Puffer, welcher zur Reduktion von Disulfiden 100 mM DTT enthielt, für 30 min bei 25

°C inkubiert. Anschließend wurde der Streifen auf ein neues SDS-Gel aufgebracht und mit 0,8%ige Agarose (w/v) fixiert und in der 2.-Dimension mittels SDS-PAGE getrennt.

Lösungen:

Sammelgel:	4 % (v/v) Polyacrylamid (Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1) 125 mM TRIS (pH 6,8) (mit HCl) 0,05 % (w/v) APS 0,015 % (v/v) TEMED
Trenngel:	15 % (v/v) Polyacrylamid (Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1) 3,75 mM TRIS (pH 8,8) (mit HCl) 0,016 % (w/v) APS 0,05 % (v/v) TEMED
2x Lämmli-Puffer:	4 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Glycerin 100 mM TRIS (pH 6.8) (mit HCl) 0,09 % (w/v) Bromphenolblau 100 mM DTT (wurde für nr-SDS-PAGE weggelassen)
Laufpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS

2.2.28 Tris-Tricine-PAGE

Die Trennung basierte auf der von Schägger (2003) beschriebenen Methode für die Trennung von Proteinen und Peptiden mit einer Molekularmasse von weniger als 10 kDa. Das verwendete Polyacrylamidgel bestand aus einem Trenngel, und einem darüber befindlichen 4%igen Sammelgel.

Lösungen:

Sammelgel:	4 % (v/v) Polyacrylamid (Acrylamid/Bisacrylamid 49,5:1) 7,5 mM TRIS (pH 8,45) (mit HCl)
------------	--

	0,075 % (w/v) APS
	0,075 % (v/v) TEMED
Trenngel:	15 % (v/v) Polyacrylamid (Acrylamid/Bisacrylamid 49,5:1)
	10 mM TRIS (pH 8,45) (mit HCl)
	0,03 % (w/v) APS
	0,03 % (v/v) TEMED
Kathodenpuffer:	100 mM TRIS
	100 mM Tricin
	1 % (w/v) SDS
Anodenpuffer:	100 mM TRIS (pH 8,8) (mit HCl)
2x Lämmli-Puffer:	4 % (w/v) SDS
	20 % (v/v) Glycerin
	100 mM TRIS (pH 6.8) (mit HCl)
	0,09 % (w/v) Bromphenolblau
	100 mM DTT (wurde für nr-SDS-PAGE weggelassen)

2.2.29 Western Blot

Acrylamidgele wurden für 20 min in Kathodenpuffer schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Die verwendete PVDF-Membran wurde für 30 sec in Methanol aktiviert und dann ebenfalls für 20 min in Anodenpuffer II schüttelnd inkubiert. Nach der Äquilibrierung wurden 4 Lagen Whatmanpapier mit Anodenpuffer I vollgesaugt und auf die Anode des Blotters gelegt. Darauf wurden zwei Lagen mit Anodenpuffer II getränktes Whatmanpapier gelegt, worauf wiederum die Membran aufgelegt wurde. Als nächstes wurde das Gel auf die Membran gelegt und mit 6 Lagen mit Kathodenpuffer getränktes Whatmanpapier bedeckt. Die Kathode wurde aufgelegt und die Proteine mit einer Stromstärke, welche sich aus Länge x Breite x Dicke des Gels errechnete ($L \times B \times D = \text{Anzahl an mA}$) für 1h 30 min aus dem Gel auf die Membran übertragen. Nach Beendigung wurde die Membran getrocknet.

Lösungen:

Methanol

Kathodenpuffer: 25 mM TRIS
40 mM Glycin
10% (v/v) Methanol

Anodenpuffer I: 300 mM TRIS, pH 10.4 (mit HCl)
10% (v/v) Methanol

Anodenpuffer II: 25 mM TRIS
10% (v/v) Methanol

2.2.30 Proteinfärbungen

Die Visualisierung von Proteinen erfolgte in Acrylamidgelen mittels kolloidaler Coomassiefärbung, auf Membranen mittels Ponceau S.

-Kolloidales Coomassie

Acrylamidgele wurde in Fixierlösung für 30 min bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Währenddessen wurde Coomassiefärbelösung mit 100%igem Ethanol im Verhältnis 1:4 gemischt und nach Entfernen der Fixierlösung auf die Gele gegeben. Nach 16h Inkubation unter Schütteln bei Raumtemperatur wurde die Färbelösung entfernt und die Gele durch Inkubation in ddH₂O entfärbt bis der Hintergrund farblos war.

Lösungen:

Fixierlösung: 40% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure

Färbelösung: 10 % (w/v) Ammoniumsulfat
0,1% (v/v) Coomassie G-250
3% (v/v) *ortho*-Phosphorsäure

Ethanol: 100%

-Ponceau S

Gebloottete PVDF-Membranen wurden in Methanol für 1 min aktiviert. Anschließend wurden die Membranen für 3 min in Ponceau S-Färbelösung schüttelnd inkubiert. Die Lösung wurde abgekippt und der Hintergrund der Membranen mit ddH₂O entfärbt. Eine Entfärbung der visualisierten Proteinbanden erfolgte durch Inkubation in *Tris Buffered Saline* mit Tween-20 (TBST).

Lösungen:

Methanol

Färbelösung: 2% (w/v) Ponceau S
 30% (w/v) Trichloressigsäure
 30% (w/v) Sulfosalicylsäure

TBST: 10 mM TRIS pH 8.0 (mit HCl)
 150 mM NaCl
 0.05% (v/v) Tween 20

3. Ergebnisse

3.1 Proteinsequenzvergleich von PGRL1-Proteinen verschiedener Spezies

Orthologe von PGRL1 existieren ausschließlich in photosynthetisch aktiven Eukaryoten. Bei *Arabidopsis thaliana* kodieren zwei Gene, At4g11690 und At4g22890, für PGRL1-Proteine, PGRL1a und PGRL1b. Als Ausgangspunkt für eine funktionelle Charakterisierung von PGRL1 wurden beide Homologe auf Basis ihrer Proteinsequenzen mit einer Auswahl von PGRL1-Orthologen anderer Spezies verglichen. Auf diese Weise sollten Sequenzmotive und deren Konservierung innerhalb der Photosynthese betreibenden Eukaryoten ermittelt werden (siehe Tabelle 4). Es wurde dafür auf Datenbanksequenzen (NCBI/BlastP) zurückgegriffen.

Spezies	Klasse	Anzahl der Homologe	Accessions-Nummer
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Dicotyledonae	2	GI:18416029 GI:42566515
<i>Populus trichocarpa</i>	Dicotyledonae	1	GI:118487360
<i>Vitis vinifera</i>	Dicotyledonae	1	GI:297742627
<i>Zea mays</i>	Monocotyledonae	2	GI:166158579 GI:163527027
<i>Oryza sativa</i>	Monocotyledonae	2	GI:115477403 GI:115456709
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Algae	1	GI:159468702

Tabelle 4: Accessions-Nummern von PGRL1-Proteinen verschiedener Photosynthese betreibender Eukaryoten

Accessions-Nummern und Anzahl von PGRL1-Homologen verschiedener Spezies, die für *in silico*-Analysen mittels NCBI Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) herangezogen wurden. Aminosäuresequenz von PGRL1a und PGRL1b aus *Arabidopsis thaliana* (Quelle:Tair).

In der PGRL1-Proteinsequenz konnte kein bereits annotiertes bzw. konserviertes Sequenzmotiv gefunden werden (DalCorso et al., 2008). Bei detaillierter Betrachtung

3.2 Charakterisierung der Cystein-basierten Tertiärstruktur von PGRL1 unter Verwendung von Diagonal-SDS-PAGE

Cystein-Schwefel liegt entweder "reduziert" als freies Thiol bzw. Thiolat-Anion, oder oxidiert in Form von Disulfidbrücken und Sulfoxiden vor. Disulfidbrücken innerhalb von Proteinen sind an der Ausbildung der tertiären Proteinstruktur beteiligt und werden als intramolekulare Disulfide bezeichnet. Disulfidbrücken, die Proteine kovalent miteinander verbinden, bezeichnet man dagegen als gemischte oder intermolekulare Disulfide. Unter der Verwendung eines zweidimensionalen denaturierenden Trennsystems wie der Diagonal-SDS-PAGE kann zwischen inter- und intramolekularen Disulfidbrücken unterschieden werden. Etwaige intra- und/oder intermolekulare Disulfidbrücken können in Proteinen nach vorangegangener Cysteinoxidation oder Disulfidreduktion in der 1. Dimension an Hand von verändertem Molekularmassenlaufverhalten in einem reduzierenden Gelsystem in der 2. Dimension nachgewiesen werden (Winger *et al.* 2007). Da die Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken meist zu einer kompakteren Struktur der Proteine beiträgt, weisen diese Proteine bei der Trennung mittels nicht reduzierender SDS-PAGE eine höhere Mobilität auf. Proteine mit intermolekularen Disulfiden zeigen dagegen auf Grund des zusätzlichen Molekulargewichts des interagierenden Proteins eine Molekularmassenzunahme. Proteine ohne tertiäre Cysteinstruktur bilden dabei eine prominente Proteindiagonale. Proteine mit intramolekularen Disulfiden liegen meist rechts von der Proteindiagonale (Stroeher *et al.* 2009) wohingegen Proteine, welche intermolekulare Disulfidbrücken ausbilden, links von der Proteindiagonale migrieren. Die Konformation der PGRL1-Cysteine sollte unter Verwendung von Diagonal-PAGE untersucht werden. Dafür wurden WT-Thylakoide mit dem Thiol oxidierenden Reagenz Diamid oder mit dem Disulfid reduzierenden Reagenz DTT inkubiert. Nach der Behandlung wurden die Proteine mittels Diagonal-SDS-PAGE getrennt und das Migrationsverhalten von PGRL1-Proteinen nach Westerntransfer unter Verwendung von PGRL1-spezifischen Antikörpern detektiert (Abb. 4).

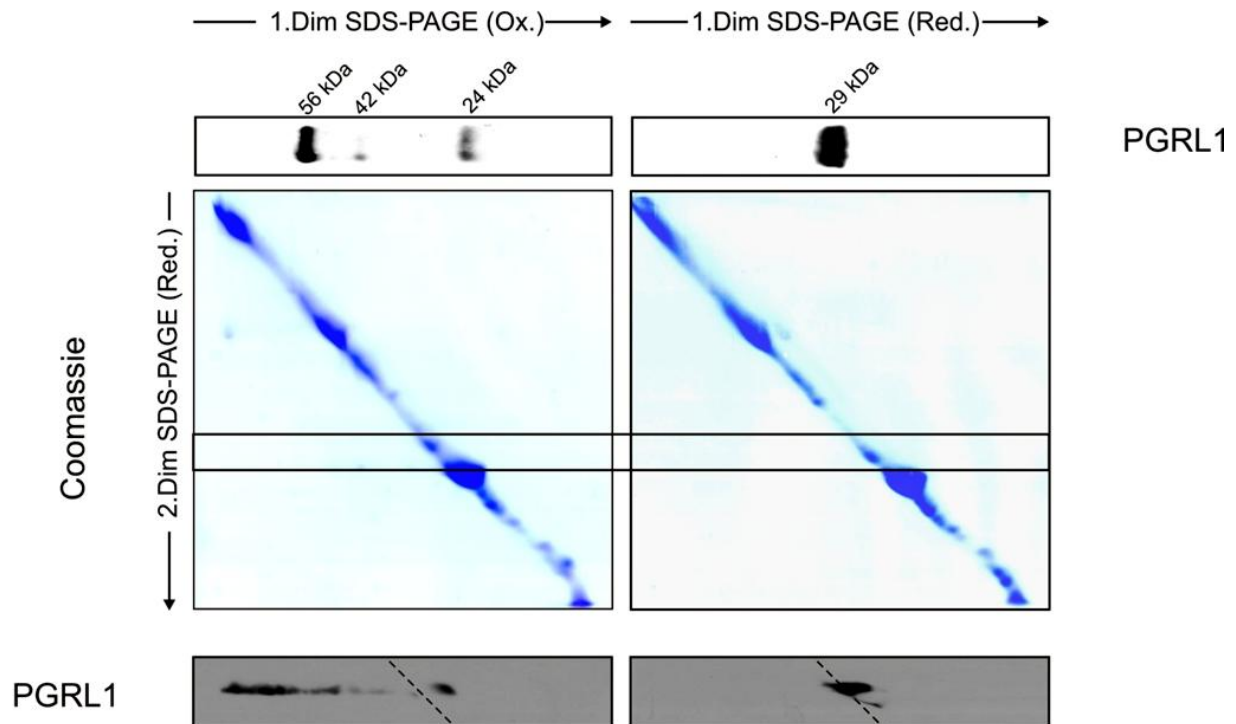


Abb. 4: PGRL1 zeigt die Bildung von intra- und intermolekularen Disulfiden nach Trennung von Thylakoidproteinen aus *A. thaliana* mittels Diagonal-SDS-PAGE

100 μ l Chloroplastensuspension entsprechend einer Chlorophyllkonzentration von 1mg/ml wurden für oxidierende Bedingungen mit 200 mM Diamid und für reduzierende Bedingungen mit 20 mM DTT für 30 min bei RT inkubiert. Nach anschließender Solubilisierung mit 2x Lämmli-Puffer ohne DTT wurden die Proteine in der 1. Dimension mittels SDS-PAGE (1.Dim SDS-PAGE (Ox.)=oxidierend, 1.Dim SDS-PAGE (Red.)=reduzierend) getrennt. Die erhaltenen Trennsuren wurden anschließend in 2x Lämmli-Puffer mit 20 mM DTT solubilisiert und reduziert und in der 2. Dimension mittels SDS-PAGE (2.Dim SDS-PAGE (Red.)) aufgetrennt. Nach Western Transfer erfolgte die Detektion von PGRL1 mittels spezifischen Antikörpern. Zur Darstellung der prominenten Proteindiagonale erfolgte eine Coomassiefärbung. Die Position von PGRL1 innerhalb der Coomassiefärbung wird durch einen Rahmen angedeutet. Im der darunter dargestellten Immunodetektion von PGRL1 wird die Proteindiagonale durch eine unterbrochene Linie gekennzeichnet (- - -).

PGRL1 wurde nach erfolgter Diagonal-SDS-PAGE sowohl rechter- als auch linker - hand von der Proteindiagonale detektiert (Abb. 4, links unten), wodurch die Ausbildung inter- und intramolekularer Disulfidbrücken für PGRL1-Proteine gezeigt werden konnte. Die Mehrheit der PGRL1-Proteine konnte unter Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken unterhalb der Proteindiagonale nachgewiesen werden. Nach Cysteinreduktion unter Verwendung von DTT lagen die PGRL1-Proteine auf der Proteindiagonale (Abb.4 rechts unten).

Unter Verwendung von Proteinpräparationen, nach deren Cysteinoxidation oder Cysteinreduktion, sowie deren Trennung in der 1. Dimension SDS-PAGE konnten den PGRL1-Proteinen distinkte Molekulargewichte zugeordnet werden. Unter oxidierenden Bedingungen betragen diese 24, 42, und 56 kDa (Abb. 4, links oben). Unter reduzierenden Bedingungen wies PGRL1 ein apparentes Molekulargewicht

von 29 kDa auf (Abb. 4, rechts oben). Molekularmassenveränderungen von >29 bzw. >13 kDa wurden im Weiteren auf eine disulfidabhängige Protein-Protein-Interaktion hin untersucht.

3.3 Interaktionspartner von PGRL1

Um Interaktionspartner von PGRL1 zu identifizieren, wurden PGRL1-Proteine und ihre gebundenen Interaktionspartner unter Verwendung von PGRL1-spezifischen Antikörpern und Protein-A-Sepharose aus solubilisierten Thylakoidmembranen präzipitiert. PGRL1 und ko-präzipitierte Proteine wurden anschließend massenspektrometrisch nachgewiesen (Tabelle 5). Als Kontrolle wurde derselbe Versuch mit Thylakoiden von *pgr1ab*-Mutanten durchgeführt.

Tabelle 5: Massenspektrometrische Identifikation von PGRL1 und Interaktionspartnern nach Ko-Immunopräzipitation unter Verwendung von PGRL1-Antikörpern

Ko-immunpräzipitierte Proteine wurden tryptisch verdaut und mittels ESI-LC-MS analysiert. Die Peptide wurden an Hand von Datenbankabgleich über "peptide mass fingerprints" identifiziert. (AGI-Nummer=Gennummer in *A. thaliana*).

AGI-Nummer	Protein Name
AT4G22890	(PGR5-LIKE A) PGR5-LIKE A
AT1G61520	(LHCA3) LHCA3 (Photosystem I light harvesting complex gene 3)
AT1G31330	(PSAF) PSAF (photosystem I subunit F)
AT2G05620	(PGR5) PGR5 (PROTON GRADIENT REGULATION 5)
AT4G03280	(PGR1, PETC) PETC (PHOTOSYNTHETIC ELECTRON TRANSFER C)
ATCG00720	(PETB) Encodes the cytochrome b(6)

Durch Ko-Immunopräzipitation (Ko-IP) und massenspektrometrisch Analyse konnte PGR5 als Interaktionspartner von PGRL1 nachgewiesen werden. Bei den übrigen Proteinen handelte sich um Untereinheiten von Photosystem I (PSI) (PsaF, Lhca3) oder des Cytochrom (Cyt) b_6f -Komplexes (Cyt b_6 , Rieske). Dadurch konnte eine von DalCorso et al., 2008 postulierte Interaktion von PGRL1 mit dem PSI und dem Cyt b_6f -Komplex bestätigt werden. Weitere diskutierte Interaktionspartner von PGRL1 wie beispielsweise Ferredoxin, FNR1, FNR2 oder PsaD konnten dagegen im Immunpräzipitat nicht nachgewiesen werden. Falsch positive Interaktionspartner wurden mittels Ko-IP und entsprechenden Antikörpern ausgeschlossen (Abb. 5).

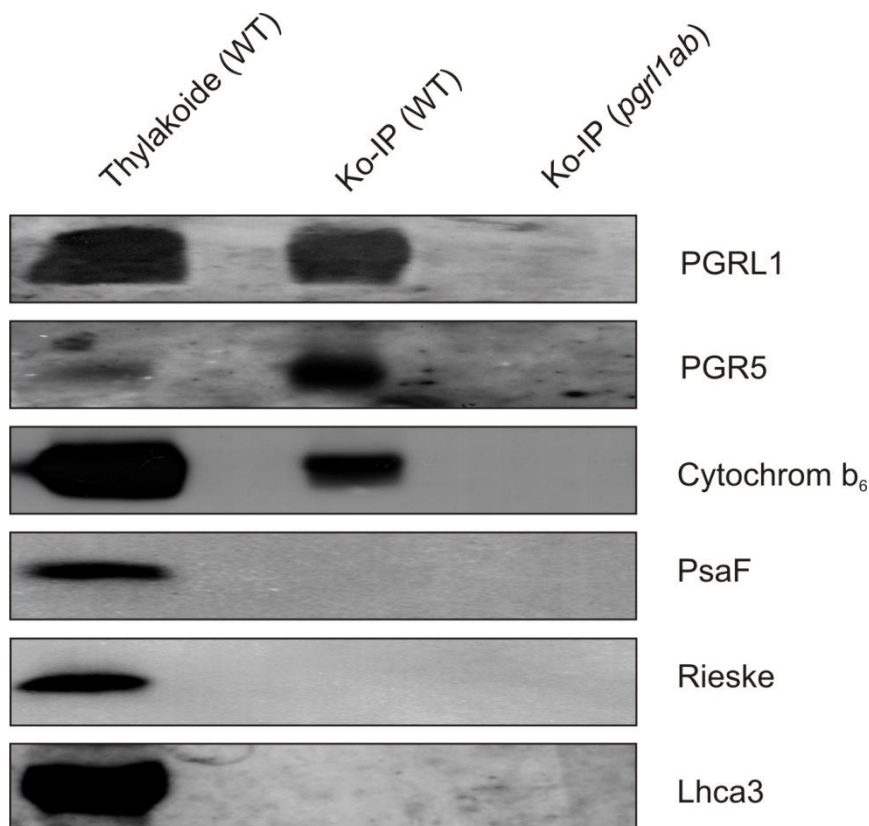


Abb. 5: PGR5 und Cyt b_6 ko-immunopräzipitieren mit PGRL1

100 μ l einer Thylakoidsuspension von WT-Pflanzen und *pgr1ab*-Mutanten entsprechend einer Chlorophyllkonzentration von 1mg/ml wurden zusammen mit PGRL1-Antikörpern über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend mit 1,5% (w/v) Digitonin solubilisiert. Die lösliche Fraktion wurde nach Zugabe von Protein A-gekoppelter Sepharose über Nacht inkubiert. Die über den Antikörper an Protein gebundenen Proteine wurden mit 2x Lämmli-Puffer eluiert und mittels SDS-PAGE getrennt (Ko-IP (WT), Ko-IP (*pgr1ab*)). Als Kontrolle wurden 3 μ l der WT-Thylakoidsuspension analysiert (Thylakoide (WT)). Die Detektion der Proteine erfolgte nach Westerntransfer mittels spezifischen Antikörpern.

Auf der Basis immunologischer Untersuchungen konnte lediglich für PGR5 und Cytochrom b_6 eine direkte Interaktion mit PGRL1 nachgewiesen werden (Abb. 5).

3.4 Disulfid-abhängige Interaktionen von PGRL1 mit PGR5

Um die Cysteinabhängigkeit der Interaktion von PGRL1 mit PGR5 und/oder Cyt b_6 zu analysieren, wurden PGRL1-Ko-Immunopräzipitationen aus Thylakoiden mit und ohne Verwendung von Reduktionsmitteln (DTT) durchgeführt. Nach deren Trennung mittels SDS-PAGE und Westerntransfer wurden diese immunologisch auf das Migrationsverhalten von PGR5 und Cyt b_6 hin untersucht. Als Kontrolle wurden Thylakoide von *pgr1ab*-Mutanten nach Reduktion durch DTT und ohne analysiert, um PGRL1-abhängige Mobilitätsveränderungen nachzuweisen (Abb. 6).

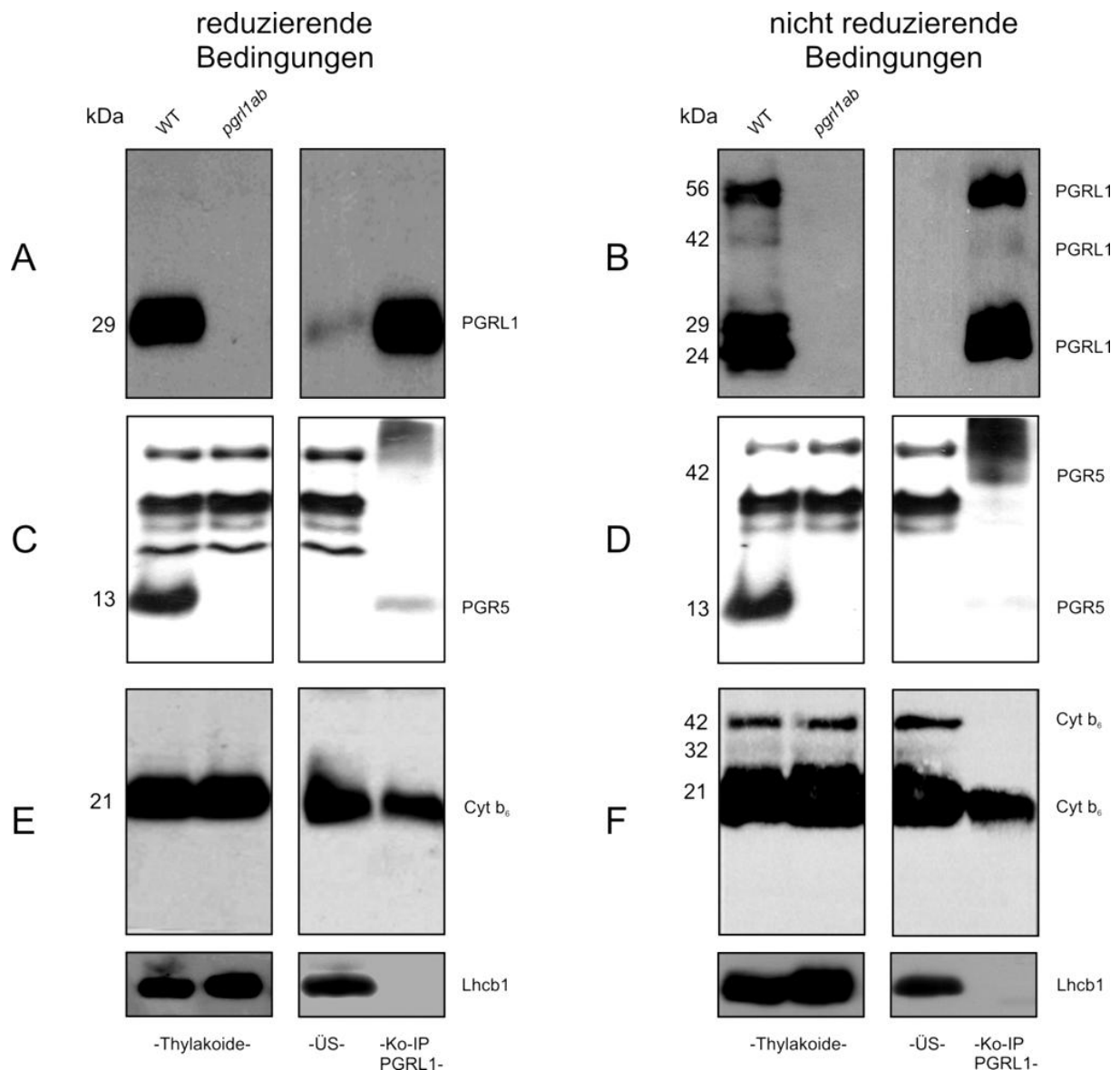


Abb. 6: Ko-Immunopräzipitationen mit PGRL1-Antikörpern unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen zeigen eine cysteinabhängige Interaktion von PGRL1 mit PGR5

100 µl einer Thylakoidsuspension von WT-Pflanzen und *pgr11ab*-Mutanten entsprechend einer Chlorophyllkonzentration von 1 mg/ml wurden zusammen mit PGRL1-Antikörpern über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend mit 1,5% Digitonin solubilisiert. Die lösliche Fraktion wurde mit Protein-A gekoppelter Sepharose über Nacht inkubiert. Die über den Antikörper an Protein-A gebundenen Proteine wurden mit 2X Lämmli-Puffer eluiert. Die Proteinelutionen (Ko-IP PGRL1) sowie Thylakoide von WT- und *pgr11ab*-Mutanten entsprechend 3 µg Chl, wurden mit (reduzierende Bedingungen) oder ohne (nicht reduzierende Bedingungen) DTT Zugabe mittels SDS-PAGE getrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte nach Westerntransfer mit Antikörpern. ÜS=Überstand der Ko-IP.

Unter oxidierenden Bedingungen konnte PGRL1 in Thylakoiden sowie in Ko-Immunopräzipitationen bei einem Molekulargewicht von 24, 29, 42 und 56 kDa detektiert werden (Abb. 6 B). Durch Cysteinreduktion mit DTT konnte PGRL1 ausschließlich als Monomer bei 29 kDa detektiert werden (Abb. 6 A). In Thylakoiden konnten, unter Verwendung von PGR5-Antikörpern, mehrere unspezifische Banden

detektiert werden (Abb. 6 D), da alle detektierten Signale ausgenommen dem PGR5 Monomer auch in *pgr11ab*-Mutanten detektiert wurden (Abb. 6 C, D, *pgr11ab*), die keine PGR5-Proteine akkumulieren können (DalCorso et al., 2008). Bei Ko-Immunopräzipitationen konnte unter Verwendung von PGR5-Antikörpern eine zusätzliche spezifische Bande bei 42 kDa nachgewiesen werden. Diese wurde ebenfalls mit PGRL1-Antikörpern detektiert und verschwand durch Reduktion mit DTT (siehe auch Abb. 4, nicht reduzierende Bedingungen, Abb. 6 B, D, Ko-IP-PGRL1). Gleichzeitig konnte eine Anreicherung von PGRL1- und PGR5-Monomeren beobachtet werden (Abb. 6 A, C, Ko-IP-PGRL1). Die Größe der Bande in kDa entsprach auf der Basis des Molekulargewichtes auch der Summe eines PGR5- (13 kDa) und PGRL1-Monomers (29 kDa).

Cyt b_6 konnte unter nicht reduzierenden Bedingungen bei einem Molekulargewicht von 21, 32 und 42 kDa detektiert werden (Abb. 6 F). Durch Zugabe von DTT konnte eine vollständige Monomerisierung erreicht werden (Abb. 6 E). Die unter nicht reduzierenden Bedingungen detektierten Signale können daher als thiolabhängig eingestuft werden. Da bei der Immunodetektion von Cyt b_6 sowohl in WT- als auch in *pgr11ab*-Thylakoiden identische Bandenmuster zu erkennen waren, konnte eine thiolabhängige Interaktion von PGRL1 und Cyt b_6 ausgeschlossen werden (Abb. 6 F, Thylakoide WT und *pgr11ab*).

3.5 Homodimerisierung von PGRL1

Die disulfidabhängige PGRL1-Variante bei einem Molekulargewicht von ungefähr 56 kDa könnte ein PGRL1-Homodimer von zwei PGRL1-Molekülen darstellen (2 x 29 kDa). Um diese Annahme zu untersuchen, wurde ein das Gen für ein PGRL1A:HA-Fusionsprotein (*PGRL1A:HA*) (29+5 kDa) in WT-Pflanzen unter Kontrolle des 35S:Promotors exprimiert (*PGRL1A:HA/PGRL1*). Zum Nachweis der Dimerisierung aus PGRL1 und PGRL1A-HA wurden Linien gewählt, deren PGRL1A-HA Expressionsstärke der von WT-PGRL1 entsprach. PGRL1-HA und dessen Interaktionspartner wurden mittels immobilisierter HA-Antikörper aus solubilisierten Thylakoiden der *PGRL1:HA*-Pflanzen isoliert. Zur Kontrolle wurde die Präzipitation mit HA-Antikörpern auch an WT und *pgr11ab*-Mutanten durchgeführt. Als Referenz wurden WT-, *PGRL1A:HA/PGRL1*- und *pgr11ab*-Thylakoide mit den Präzipitationen

aufgetragen und unter reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE getrennt (Abb. 7).

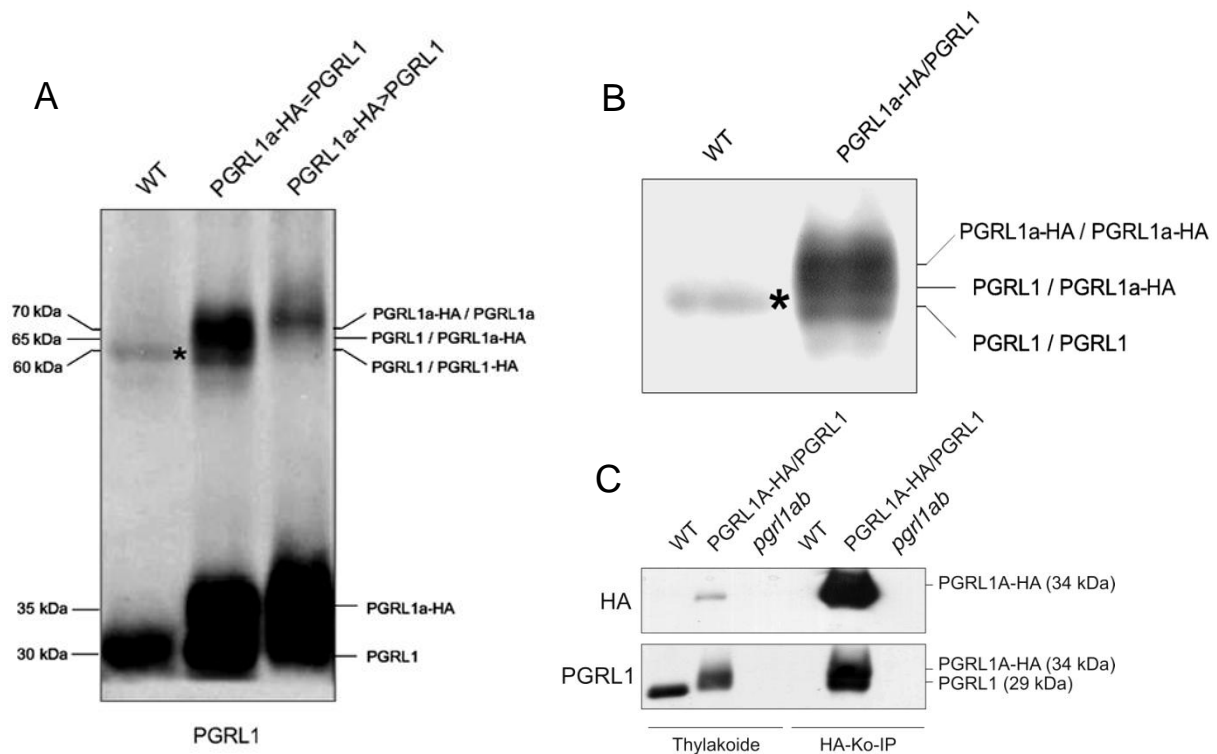


Abb. 7: Nachweis von PGRL1-Homodimeren durch HA-getagte PGRL1-Isoformen in Thylakoiden und Ko-Immunopräzipitationen von WT- und PGRL1A-HA/PGR1-Mutanten

3 μ l einer Thylakoidsuspension von WT- und PGRL1A-HA/PGR1-Pflanzen einer Chlorophyllkonzentration von 1mg/ml, wurden nach Solubilisierung in 2x Lämmli-Puffer ohne DTT mittels SDS-PAGE getrennt (nicht reduzierende Bedingungen). PGRL1 sowie PGRL1-HA wurden nach Immunoblotting mit PGRL1-Antikörpern nachgewiesen. (A)

Vermutlich homodimeres PGRL1 konnte in im Vergleich zu WT in drei Banden detektiert werden (B).

PGRL1-HA wurde aus 100 μ l Thylakoidsuspension von PGRL1A-HA/PGR1 einer Chlorophyllkonzentration von 1 mg/ml nach Solubilisierung mit 1,5% Digitonin mit HA-Antikörpern immunopräzipitiert (HA-Ko-IP). PGRL1A-HA wurde unter Verwendung von HA-Antikörpern detektiert (HA). Anschließend wurden PGRL1A-HA und PGRL1 mit PGRL1 spezifischen Antikörpern detektiert (PGRL1). Als Kontrolle wurde dasselbe Experiment mit *pgr11ab*-Mutanten und WT durchgeführt sowie jeweils 3 μ l der Thylakoidsuspension von WT und *pgr11ab* sowie 0,3 μ l von PGRL1A-HA/PGR1 mit analysiert (C).

Während sich PGRL1a-HA ausschließlich mit HA-Antikörpern detektieren ließ (Abb. 7, C) konnte sowohl PGRL1 (29 kDa) als auch PGRL1a-HA (34 kDa) mittels PGRL1-spezifischen Antikörpern detektiert werden (Abb. 7 C). Der immunologische Nachweis von PGRL1 und PGRL1A-HA nach Trennung mittels SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen zeigte die Bildung von drei Banden entsprechend PGRL1-PGRL1- (58 kDa), PGRL1-PGRL1A-HA- (63 kDa) und PGRL1A-HA-PGRL1A-HA-Dimeren (68 kDa) (Abb. 7 A, B). In PGRL1-PGRL1A-HA-Linien mit hoher PGRL1A-HA-Expression sowie WT konnte entweder eine 66 kDa (PGRL1A-HA-PGRL1A-HA) oder 56 kDa (PGRL1-PGRL1) große Bande detektiert werden.

Zusätzlich konnte PGRL1A-HA unter Verwendung von HA-Antikörpern, aus solubilisierten Thylakoidmembranen von PGRL1-PGRL1A-HA-Linien immunpräzipitiert werden (Abb. 7 C, PGRL1A-HA/PGRL1, HA-Ko-IP). In der Präzipitation konnte mit PGRL1-Antikörpern zudem das um 5 kDa kleinere PGRL1 detektiert werden (Abb. 7 C), wodurch eine Homodimerisierung von PGRL1 *in planta* bestätigt werden konnte.

3.6 Effekt des PGRL1-Redox-Status auf die Aktivität von zyklischem Elektronentransport *in vitro*

Unter extrem schwachen Lichtbedingungen kann der Reduktionszustand des Plastochinonpools an Hand der Chlorophyll-Fluoreszenz gemessen werden (Munekage et al. 2002). Dabei bewirkt die Zugabe von NADPH und Ferredoxin zu aufgebrochenen Chloroplasten einen Anstieg der Chlorophyll-Fluoreszenz. Dieser spiegelt die Aktivität des zyklischen Elektronentransports durch Ferredoxin-abhängige Reduktion von Plastochinon wieder (Munekage et al., 2002, 2004, DalCorso et al., 2008). Unter Verwendung dieser Messmethode wurde zunächst die Auswirkung von ansteigenden Mengen an DTT auf die Aktivität von zyklischem Elektronentransport untersucht, da unter diesen Bedingungen Veränderungen des PGRL1-Redoxzustandes zu erwarten sind. Da eine Vielzahl plastidärer Proteine über ihren Redoxzustand beeinflusst werden können, wurde als Kontrolle die gleiche Behandlung an Chloroplasten von *pgl1ab*-Mutanten durchgeführt. Um Veränderungen des Redoxzustandes von PGRL1 in Abhängigkeit von der DTT-Konzentration zu detektieren, wurden die aufgebrochenen Chloroplasten nach der Messung mittels nicht reduzierender SDS-PAGE getrennt und nach Westerntransfer PGRL1 mit spezifischen Antikörpern detektiert (Abb. 8, B). Um eine Korrelation zwischen der Aktivität von zyklischem Elektronentransport und der DTT-Konzentration bzw. der damit verbundenen Thiol/Disulfidveränderungen an PGRL1 zu demonstrieren, wurde die Aktivität des PGR5/PGRL1-abhängigen zyklischen Elektronentransports (=Endfluoreszenz-Fluoreszenz vor der Ferredoxin Zugabe) sowie die beobachteten Konformationsveränderungen von PGRL1 gegen ansteigende DTT-Konzentrationen aufgetragen.

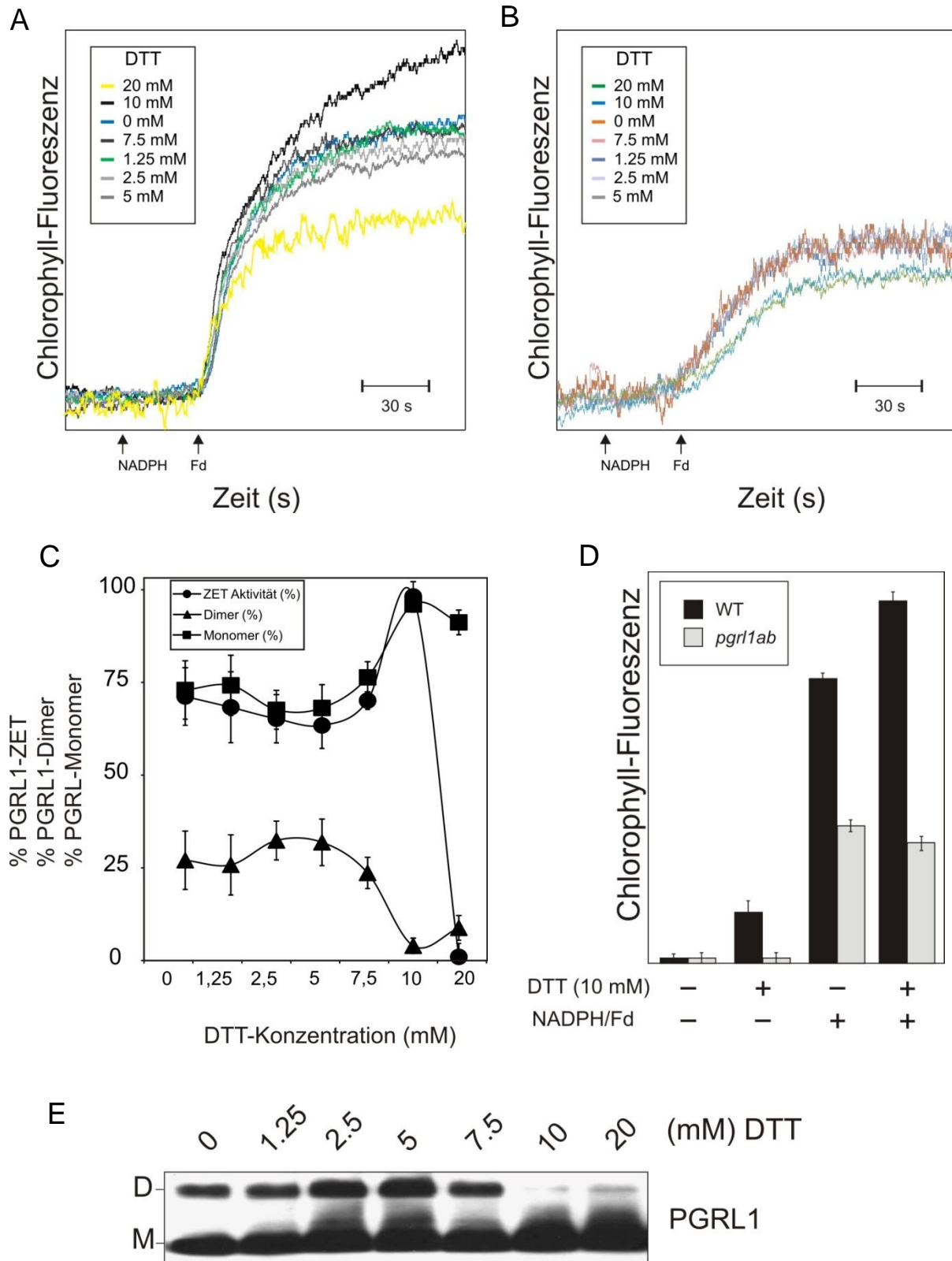


Abb. 8: Die Modulation des Thiol/Disulfid-Status von PGRL1 durch DTT führt zu Aktivitätsveränderungen des zyklischen Elektronentransports

200 μ l einer Suspension von lysierten Chloroplasten aus WT- (A) und *pgr1ab*-Mutanten (B), entsprechend einer Chlorophyllkonzentration von 50 μ g/ml, wurden mit steigenden Konzentrationen an DTT (1,25, 2,5, 5, 7,5, 10 und 20 mM) inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität des zyklischen Elektronentransportes nach Zugabe von NADPH und Ferredoxin an Hand der Chlorophyll-Fluoreszenz mit einem Puls-Amplituden-Modulator ermittelt. Parallel dazu wurden die mit DTT

behandelten Chloroplasten in 2x Lämmli-Puffer (-DTT) solubilisiert und mittels SDS-PAGE getrennt. Nach Westerntransfer auf PVDF-Membranen wurde der Redoxzustand von PGRL1 (D=Dimer, M=Monomer) mit Antikörpern detektiert (E). Die Veränderung der Aktivität des zyklischen Elektronentransportes sowie das Verhältnis von monomeren und dimeren PGRL1 wurde gegen die ansteigende DTT-Konzentration aufgetragen (C).

Durch Zugabe von 10 mM DTT konnte bereits ohne Zugabe von NADPH und Ferredoxin ein Anstieg der Chlorophyll-Fluoreszenz in WT-Plastiden gemessen werden (D).

Nach Zugabe von geringeren Mengen an DTT (1,25 - 5 mM) konnte bei WT-Plastiden eine leichte Aktivitätsabnahme von ZET beobachtet werden (Abb. 8 A, C). Durch Steigerung der DTT-Konzentration (7,5 bis zu 10 mM) konnte bei WT-Plastiden ein Aktivitätszunahme des ZET von bis zu 30% beobachtet werden (Abb. 8 A, C). Interessanter Weise bewirkte dabei der Zusatz von 10 mM DTT zu WT-Plastiden bereits ohne Zugabe von NADPH und Ferredoxin einen Anstieg in der Chlorophyll-Fluoreszenz (Abb. 8 D). Dennoch wurde, ausgehend von der bereits gesteigerten Fluoreszenz nach Applikation von NADPH und Fd ein im Vergleich zu unbehandelten WT-Plastiden erhöhter Anstieg der Chlorophyll -Fluoreszenz gemessen (Abb. 8 D).

Bei Zugabe von 20 mM DTT erfolgte ein nahezu vollständiger Aktivitätsverlust von PGR5/PGRL1-abhängigem ZET. Eine Residualaktivität von Ferredoxin-unabhängigem ZET konnte weiterhin gemessen werden (Abb. 8 A).

In *pgr1ab*-Mutanten führte die Zugabe von DTT ab einer Konzentration von 10 mM lediglich zu einer Aktivitätsabnahme (Abb. 8 B). Aktivierende Effekte konnten damit auf PGR5/PGRL1-abhängigen ZET rückgeführt werden. Inaktivierende Effekte konnten dagegen in beiden Genotypen festgestellt werden (Abb. 8 A, B, C).

Die immunologische Untersuchung des PGRL1-Proteins zeigte durch DTT-Behandlung lediglich eine Modulation des Dimer/Monomer-Verhältnisses an. Intramolekulare Disulfide in PGRL1-Monomeren wurden nicht beobachtet. Im Detail führte die Zugabe von DTT bis zu einer Konzentration von 5 mM zu einer Zunahme an PGRL1-Dimer. Eine nahezu vollständige Monomerisierung erfolgte dagegen nach Zugabe von mehr als 10 mM DTT (Abb. 8 E).

Unter ansteigender DTT-Konzentration konnte im Vergleich zwischen ZET-Aktivität und der Abundanz des PGRL1-Monomers eine direkte Korrelation mit dem PGRL1-Redox-Status festgestellt werden (Abb. 8, C). Dabei korrelierte die ZET-Aktivität positiv mit der Abundanz an PGRL1-Monomeren. Inaktivierende Effekte unter Steigerung der Dimermenge deuteten auf eine Inaktivierung von PGRL1 durch Dimerbildung hin. Dagegen konnte die beobachtete Ferredoxin-ZET-Inaktivierung bei

einer Konzentration von 20 mM DTT nicht durch den PGRL1-Redox-Status erklärt werden, da weiterhin alle PGRL1-Proteine als reduzierte Monomere vorlagen (Abb. 8, E).

3.7 Bestimmung mittlerer Redoxpotenziale von PGRL1

Aufgrund des DTT-Effektes auf den PGR5/PGRL1-ZET (siehe 3.6 und Abb. 8) wurden die Redoxpotenziale der PGRL1-Cysteinkonformationen nach einer von Motohashi und Hisabori, 2006, entwickelten Methode mittels Redoxtitration bestimmt. Dadurch sollten Informationen über mögliche Regulatorproteine des PGRL1-Redoxzustandes, sowie mögliche Elektronendonoren, -akzeptoren oder Kofaktoren durch einen Vergleich mit bereits bekannten mittleren Redoxpotenzialen potentieller Interaktionspartner gewonnen werden. Zur Bestimmung der Potenziale wurden aufgebrochene Chloroplasten auf verschiedene Redoxpotenziale eingestellt, indem mit reduziertem und oxidiertem DTT (DTT_{red.}/ DTT_{ox.}) inkubiert wurde. Die durch stärker elektronegative Redoxpotenziale reduzierten Cysteine (Thiole) wurden unter Verwendung von AMS alkyliert, wodurch eine Molekularmassenzunahme von 0,5 kDa pro reduziertem Cystein erzeugt wurde. Durch AMS-Bindung vermittelte Molekularmassenzunahmen wurden immunologisch visualisiert. Die prozentualen Anteile der PGRL1-Proteine eines jeden Potenzials verschieden reduzierter Fraktionen wurden semilogarithmisch gegen die mittels Nernst-Gleichung berechneten Redoxpotenziale aufgetragen. Das mittlere Redoxpotenzial bezeichnet dabei das Potenzial bei dem jeweils 50% des Proteins in oxidiertem und reduziertem Zustand vorliegen. (Abb. 9).

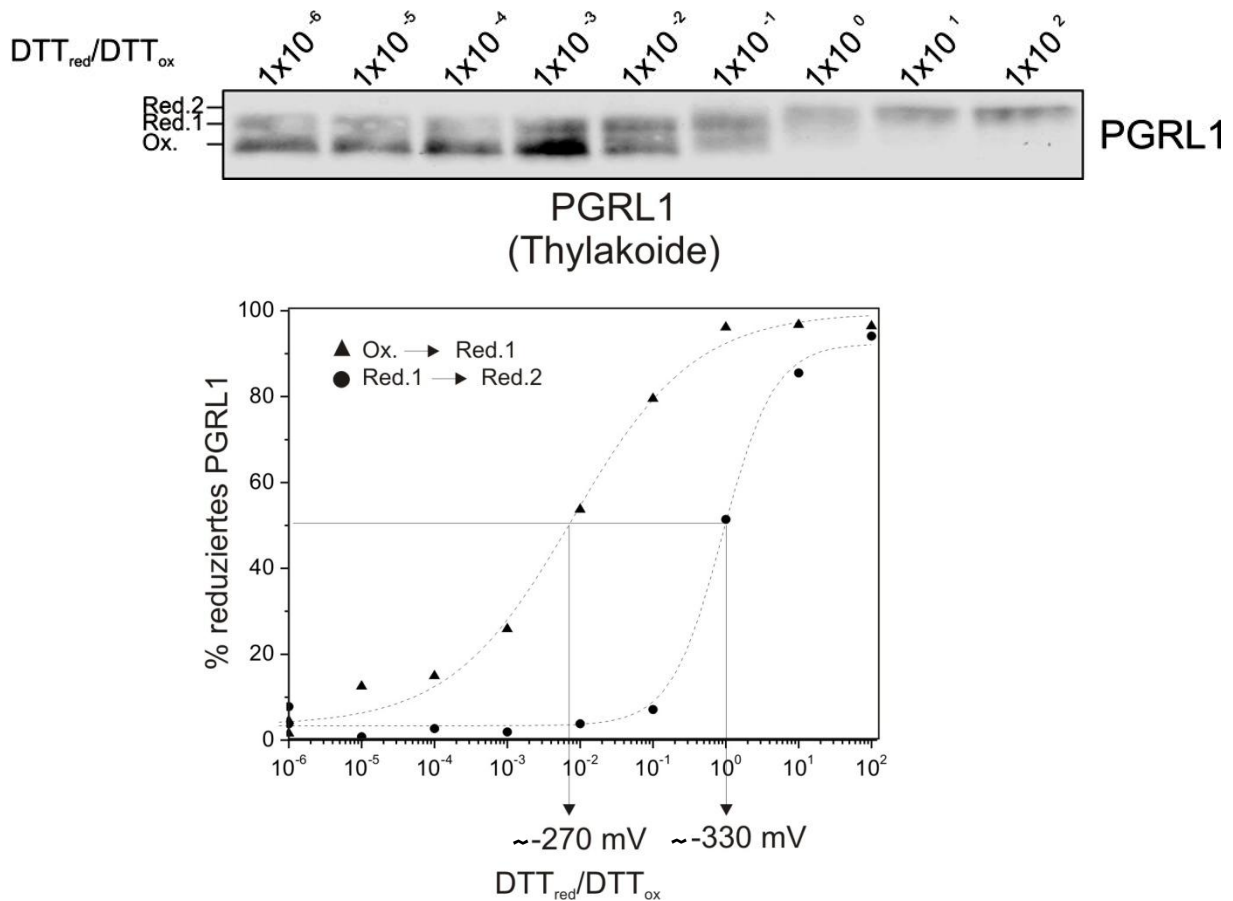


Abb. 9: Durch Redox-titrations konnten zwei mittlere Redoxpotenziale für PGRL1 ermittelt werden

Jeweils 100 µl einer WT-Chloroplastensuspension entsprechend einer Chlorophyllkonzentration von 35 µg/ml, wurden in Puffern inkubiert, welche durch Zugabe unterschiedlicher Verhältnisse von oxidiertem und reduziertem DTT (DTT_{red}/DTT_{ox}) ein distinktes Redoxpotenzial aufwiesen. Nach Äquilibrierung für 1 Std. bei Raumtemperatur wurde der erreichte Redoxzustand der Cysteine durch Präzipitation mit TCA (15%) stabilisiert und die Cysteine der Proteine durch anschließende Solubilisierung in 2x Lämmli-Puffer mit 10 mM AMS alkyliert. Die Proteine wurden durch Zugabe von 100 mM DTT vollständig reduziert. Die Proteine der jeweiligen Redoxpotenziale wurden mittels SDS-PAGE voneinander getrennt und der Redoxzustand von PGRL1 nach Western Transfer auf PVDF-Membranen mit PGRL1-Antikörpern detektiert. Das sich aus dem DTT_{red}/DTT_{ox} -Verhältnis ergebende Potential (in mV) wurde mittels Nernst'scher Gleichung errechnet. Die mittels AMS-unterstützter Molekularmassenzunahme visualisierten Redoxveränderungen von PGRL1 wurden gegen die entsprechenden Redoxpotenziale aufgetragen. Zur Ermittlung des mittleren Redoxpotenzials wurde auf Basis der Messdaten ein sigmoidales "Fitting" mit Origin7.0 durchgeführt. Ox.=oxidiertes PGRL1, Red.1= Erster Reduktionszustand, Red.2=Zweiter Reduktionszustand.

Insgesamt zwei Thiol/Disulfidübergänge konnten an Hand der Quantifizierung der Bandenintensitäten für PGRL1 immunologisch nachgewiesen werden (Abb. 9, ox. → red1. → red2.). Für beide Übergänge ließen sich durch Quantifizierung der Bandenverhältnisse und der Potenzialberechnung sigmoidale Redox-titrationskurven ermitteln. Die mittleren Redoxpotenziale für PGRL1 entsprachen ca. -270 mV (Ox.→Red.1 und -330 mV (für Red.1. → Red.2). Dabei wurde ein vollständiger Übergang von Ox. zu Red.1. bei einer Konzentration von etwa 10 mM DTT erreicht

(Abb. 10, 1×10^0), während ein vollständiger Übergang für Red.1 zu Red.2 bei einer Konzentration von etwa 20 mM DTT erlangt wurde (Abb. 9, 1×10^1).

Die mittleren Redoxpotenziale von PGRL1 wurden anschließend mit bekannten mittleren Redoxpotenzialen von Regulatorproteinen sowie putativen Elektronentransportern im zyklischen Elektronentransport auf der Basis ihres mittleren Redoxpotenzials aufgetragen (Johnson, 2003, Motohashi und Hisabori, 2006, Correl et al., 1993).

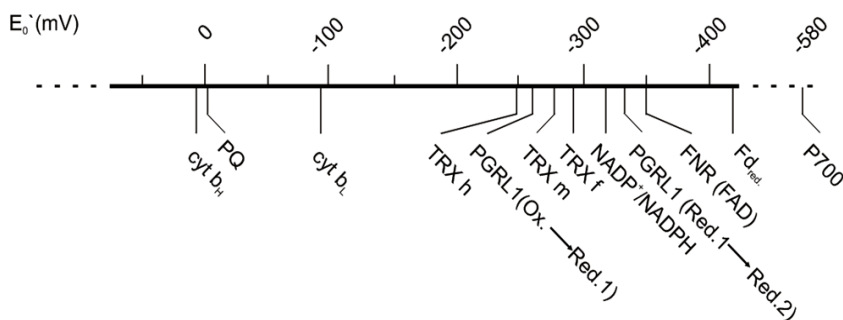


Abb. 10: Vergleich der mittleren Redoxpotenziale von PGRL1 mit Redoxpotenzialen verschiedener plastidärer Redoxregulatorproteine sowie Elektronenüberträger

(nach Johnson, 2003, Motohashi und Hisabori, 2006, Correl et al., 1993)

PQ=Plastochinon, $\text{cyt } b_H$ und $\text{cyt } b_L$ =Häm-Ko-Faktoren der Cytochrom b_6 Untereinheit des Cyt b_6f -Komplexes, TRX=Thioredoxin, Fd_{red} =reduziertes Ferredoxin, P700=reduziertes Photosystem I Zentrum, FNR (FAD)=reduzierte FNR.

Mit einem mittleren Redoxpotenzial von -270 mV (Abb. 10, PGRL1 (Ox. \rightarrow Red.1)) zeigt PGRL1 damit einen elektropositiveren Wert als Vertreter der Thiol/Disulfid-Regulatorproteine der Thioredoxin m- und f- Familie, wodurch eine Thioredoxin-vermittelte Reduktion dieser PGRL1-Cysteine möglich wäre (Abb. 10, TRX m, TRX f). Das mittlere Redoxpotenzial von Thioredoxin h (h-Familie) (Abb. 10, TRX h) wäre dafür jedoch zu elektropositiv. Das zweite PGRL1-Redoxpotenzial (Abb. 10, Red.1 \rightarrow Red.2) kommt auf Basis eines Wertes von -330 mV für eine Thioredoxin f- und m-abhängige Regulation nicht in Frage. Im Weiteren zeigen beide PGRL1-Potenziale elektropositivere Werte als das der FNR (Abb. 10, FNR (FAD)), von Ferredoxin (Abb.10, Fd_{red}) oder des PS I (Abb. 10, P700). Eine Reduktion der PGRL1-Cysteine, ausgehend von reduziertem Ferredoxin oder PS I, wäre folglich möglich. Zudem kommen Plastochinon sowie die beiden Häm-Kofaktoren der Cyt b_6f -Untereinheit des Cyt b_6f -Komplexes, Häm b_L und Häm b_H , bedingt durch ihre elektropositiveren mittleren Redoxpotenziale, als Elektronenakzeptoren von PGRL1 in Frage (Abb. 10, PQ, $\text{cyt } b_H$, $\text{cyt } b_L$).

3.8 Thioredoxin-abhängige Regulation von PGRL1

-PGRL1-Thioredoxin-Interaktion

Eine Vielzahl plastidärer Prozesse wird durch Modifikation des Thiol/Disulfid-Redoxstatus von Schlüsselenzymen reguliert. Dabei sind häufig Regulatorproteine der Thioredoxinfamilie involviert. In Plastiden existieren 5 Familien von Thioredoxinen (f-, m-, x-, y-, z-). Davon stellen die f- und m-Familie die meisten Vertreter. Dabei wird häufig die funktionelle Austauschbarkeit von Thioredoxinen innerhalb oder zwischen den einzelnen Familien beobachtet. Die h-Typ-Thioredoxinfamilie stellt die Hauptform der cytoplasmatischen Redoxregulatorproteine dar, deren Vertreter zwar vereinzelt auch in Mitochondrien, jedoch nicht in Plastiden vorkommen. Diese Thioredoxine wurden im Folgenden als Kontrolle verwendet.

Zunächst wurde eine mögliche Interaktion von Thioredoxinen mit PGRL1 untersucht. Dabei wurde eine von Motohashi et al., 2001 entwickelte Methode verwendet, bei der durch Mutation eines Cysteins im katalytischen Zentrum von Thioredoxinen statt einer transienten Interaktion mit Zielproteinen eine kovalente Kopplung erfolgt. Auf diese Weise sollten die Interaktionspartner der verwendeten Thioredoxine mittels Affinitätschromatographie isoliert werden. Die mutierten Formen von Thioredoxinen wurden zunächst durch Oligonukleotid-vermittelte Mutagenese von cDNAs der Gene Thioredoxin f1: AT3G02730, Thioredoxin m4: AT3G15360 und Thioredoxin H (Thioredoxin like-4): AT1G07700 hergestellt. Nach Klonierung in bakterielle Expressionsvektoren und heterologer Expression in *E. coli* wurden die Proteine nativ aufgereinigt und mittels His-tag an eine Matrix immobilisiert. Anschließend wurden die Thioredoxin-Säulen zur Aufreinigung von Interaktionspartnern mit solubilisierten Thylakoiden ko-inkubiert. Thioredoxin-Zielproteine wurden durch DTT-Zugabe von der Säule eluiert und immunologisch mit PGRL1-spezifischen Antikörpern auf die Anwesenheit von PGRL1 überprüft (Abb. 11).

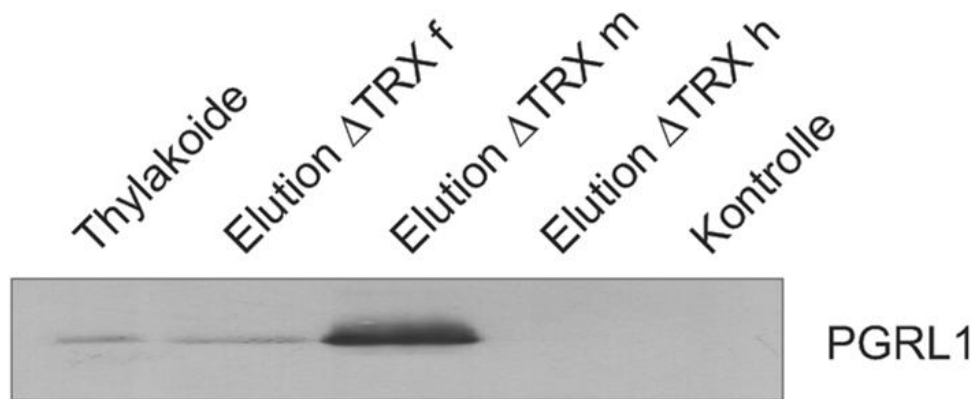


Abb. 11: PGRL1 konnte durch Thioredoxin-Affinitätschromatographie aus solubilisierten Thylakoiden isoliert werden

Mutierte His-getagte Thioredoxine (TRX f, m und h) wurden mit einem N-terminalen Tag heterolog in *E. coli* exprimiert und an Ni-NTA-Agarose immobilisiert. 10 ml durch Digitonin (1,5%) solubilierte Thylakoide einer Chlorophyllkonzentration von 100 µg/ml wurden mit dem Thioredoxin-Säulenmaterial (5 mg Thioredoxin /ml Säule) für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Säule wurden die über Thioredoxin gebundenen Proteine mit DTT (10 mM) eluiert (Elution ΔTRX f, Elution ΔTRX m, Elution ΔTRX h). Die Eluate wurden nach Solubilisierung in 2x Lämmli-Puffer mittels SDS-PAGE getrennt und nach Westerntransfer mit PGRL1-spezifischen Antikörpern auf dessen Anwesenheit überprüft. 1/500 der Elution 10 µl unbehandelte Thylakoidsuspension einer Chlorophyllkonzentration von 50 µg/ml Chlorophyll, sowie Elutionen von Inkubationen solubilisierter Thylakoide mit thioredoxinfreiem Säulenmaterial (Kontrolle) wurden mit analysiert.

Unter Verwendung der modifizierten Thioredoxinvarianten m und f konnte PGRL1 als Zielprotein von Thioredoxinen nachgewiesen werden (Abb. 11). Hierbei zeigte sich trotz funktioneller Redundanz beider Thioredoxine bei Thioredoxin m eine höhere Affinität zu PGRL1 als bei Thioredoxin f (Abb. 11). Mittels Thioredoxin h oder thioredoxinfreiem Säulenmaterial konnte PGRL1 nicht isoliert werden (Abb. 11).

-Effekt von Thioredoxin auf den PGRL1-Thiol/Disulfid-Status

Um den Effekt von Thioredoxinen auf den Thiol/Disulfid-Zustand von PGRL1 in Thylakoiden zu untersuchen, wurden nicht mutierte heterolog exprimierte Thioredoxine der m-, f- und h-Familie, zu WT-Thylakoiden hinzugegeben. Der Nachweis von Veränderungen des PGRL1-Redoxzustands erfolgte immunologisch (Abb. 12).

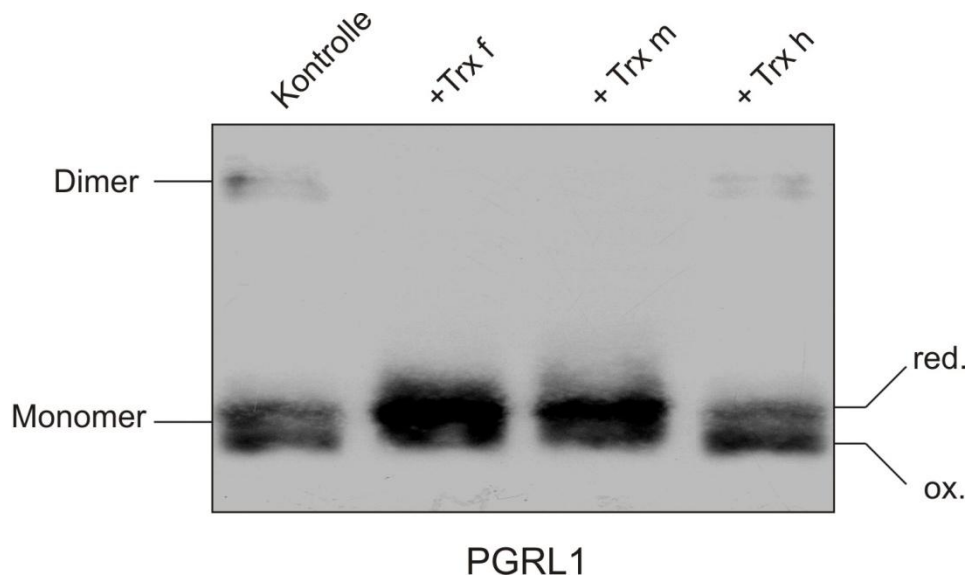


Abb. 12: Thioredoxin f und m bewirken die Reduktion von PGRL1-Dimeren zu -Monomeren

10 μ l einer Thylakoidsuspension entsprechend einer Chlorophyllkonzentration 0,35 mg/ml, wurden mit jeweils 2 μ g Thioredoxin f, m oder h für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Unbehandelte Proteine dienten als Kontrolle. Die Proben wurden in 2x Lämmli-Puffer solubilisiert. Nach Trennung mit SDS-PAGE und Westerntransfer wurde der PGRL1-Redoxzustand mit PGRL1-Antikörpern detektiert.

Durch Zugabe von Thioredoxin f und m konnte ein reduktiver Effekt auf PGRL1 nachgewiesen werden, wobei ein Verlust des PGRL1-Homodimers unter verringerter Ausprägung von Homodimeren beobachtet wurde. Die Menge an Monomeren mit intramolekularen Disulfidbrücken blieb dagegen weitgehend unverändert (Abb. 12, Kontrolle +TRX F, +TRX M, +TRX H). Durch Zugabe von Thioredoxin h konnte keine Veränderung des PGRL1-Redoxzustandes beobachtet werden (Abb.12). Vertreter der Thioredoxin f- und m-Familie bewirken folglich eine reduktive Spaltung von PGRL1-Dimeren.

-Effekt von Thioredoxinen auf den zyklischen Elektronentransport (*in vitro*)

Im Folgenden sollte der Effekt von reduktiver Spaltung der PGRL1-Dimere durch Thioredoxine auf PGR5/PGRL1-abhängigen ZET untersucht werden. Dazu wurden osmotisch aufgebrochene Chloroplasten von WT und *pgrl1ab*-Mutanten mit Thioredoxinen der m-, f- und h-Familie ko-inkubiert und der ZET-vermittelte Fluoreszenzanstieg nach Zugabe von NADPH und Ferredoxin gemessen. Als Kontrolle wurden Chloroplasten von WT und *pgrl1ab*-Mutanten analysiert (Abb. 13).

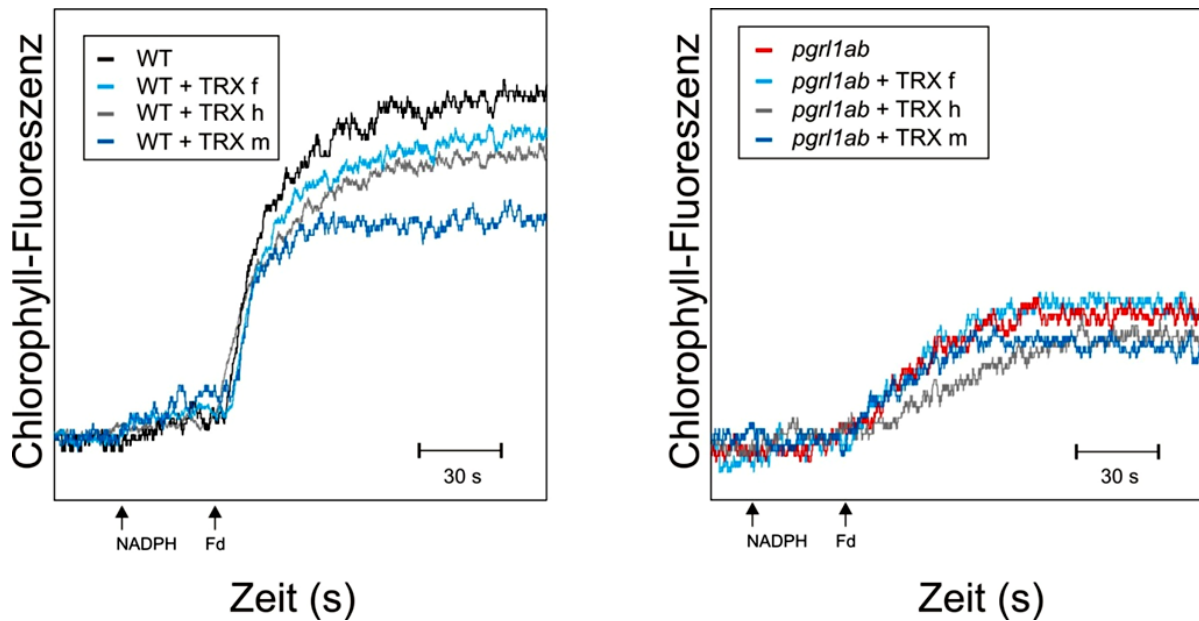


Abb. 13: Thioredoxin-abhängige Regulation der zyklischen Elektronentransportaktivität in WT und *pgr1ab*-Mutanten

200 μ l einer Suspension osmotisch aufgebrochener Chloroplasten von WT und *pgr1ab*-Mutanten entsprechend einer Chlorophyllkonzentration von 50 μ g/ml wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit Thioredoxin f (TRX f), m (TRX m) und h (TRX h) inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität von zyklischem Elektronentransport nach Zugabe von NADPH (0,25 mM) und Ferredoxin (5 μ M) mittels PAM-Fluorimeter gemessen. Als Kontrolle wurden unbehandelte WT- und *pgr1ab*-Chloroplasten gemessen.

↑ kennzeichnet den Zeitpunkt der NADPH- bzw. Ferredoxin-Zugabe.

Durch Zugabe von Thioredoxin f, m und h konnte in WT-Plastiden eine Aktivitätsabnahme von zyklischem Elektronentransport gemessen werden (Abb. 13). Diese konnte, wenngleich in geringerem Ausmaß, in *pgr1ab*-Chloroplasten nach Zugabe von Thioredoxin m und h gemessen werden. Dadurch konnten die beobachteten Effekte als PGR5/PGR1-abhängig interpretiert werden. Lediglich unter Verwendung von Thioredoxin f konnten nur in WT-Plastiden Veränderungen beobachtet werden (Abb. 13). In Folge der Widersprüchlichkeit dieser Resultate zu den Ergebnissen der Affinitätschromatographie sowie der DTT-Behandlung sollte der Effekt von Thioredoxinen in Mutanten untersucht werden, welche ausschließlich über PGR5/PGR1-abhängigen ZET verfügen. Dazu wurden Plastiden von *crr2-1*-Mutanten verwendet. Da diese Mutanten keinen Ndh-abhängigen zyklischen Elektronentransport aufweisen (Hashimoto et al., 2003), kann die Restaktivität von zyklischem Elektronentransport als PGR5/PGR1-abhängig betrachtet werden (Abb. 14).

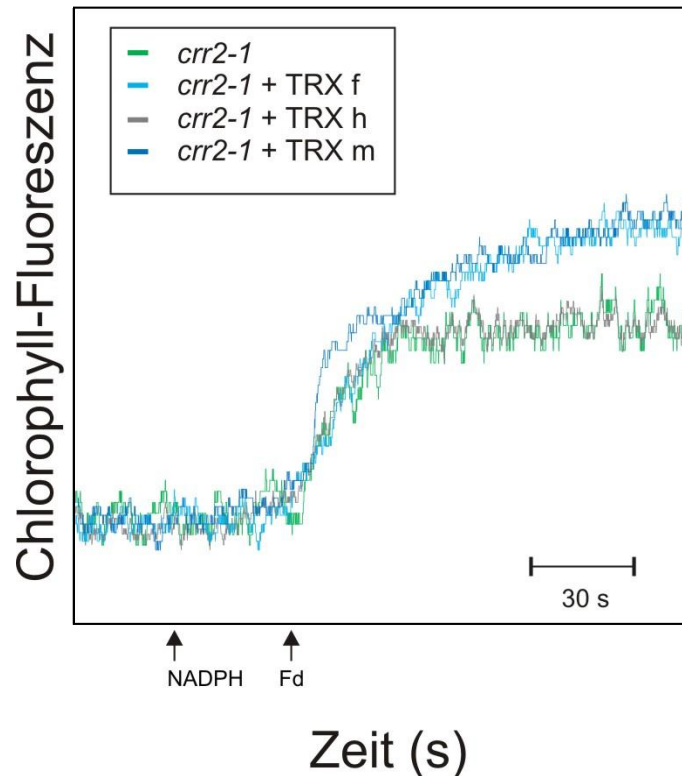


Abb. 14: Thioredoxin f und m bewirken in *crr2-1*-Mutanten eine Steigerung des zyklischen Elektronentransports

200 μ l einer Suspension von osmotisch aufgebrochenen Chloroplasten von *crr2-1*-Mutanten entsprechend einer Chlorophyllkonzentration von 50 μ g/ml wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur zusammen mit Thioredoxin f, m und h inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität von zyklischem Elektronentransport nach Zugabe von NADPH (0.25 mM) und Ferredoxin (5 μ M) mittels PAM-Fluorimeter gemessen. Als Kontrolle wurden unbehandelte *crr2-1*-Chloroplasten gemessen.

Durch Zugabe von Thioredoxin f und m konnte bei Plastiden von *crr2-2*-Mutanten eine gesteigerte Aktivität von PGR5/PGRL1-abhängigen ZET beobachtet werden (Abb. 14, TRX f, TRX m, *crr2-1*). Dabei wurde durch Zugabe von Thioredoxin f und m zwar der gleiche Endwert an Chlorophyll Fluoreszenz erreicht, durch Thioredoxin m erfolgte jedoch zunächst ein schnellerer Anstieg. Thioredoxin h bewirkt keine Veränderungen (Abb. 14 TRX h, *crr2-1*). Die durch Thioredoxine bewirkte Aktivitätszunahme unterstützte die in Absatz 3.6 beschriebenen Effekte von DTT.

3.9 Aktivitätsmessungen von zyklischem Elektronentransport nach Cystein-Alkylierung

Die bisherigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass nicht nur das Ausmaß der Dimerisierung von PGRL1 sondern auch die Bildung intramolekularer Disulfide eine wichtige Rolle bei der Regulation des ZET spielt. Dafür wurde die Rolle der intramolekularen Disulfide von PGRL1 für die Aktivität des ZET untersucht werden. Dies erfolgte durch eine kovalente Modifikation des Thiolstatus von PGRL1 unter der Verwendung von Thiol-alkylierenden Agenzien (N-Ethylmaleimide (NEM)). Die Aktivitätsänderungen des zyklischen Elektronentransports wurden dazu anschließend sowohl durch *in vitro*-Messungen von zyklischem Elektronentransport an aufgebrochenen Chloroplasten als auch *in vivo* durch Messung des transienten NPQs überprüft. Durch die Untersuchung von behandelten Plastiden mittels nicht reduzierender SDS-PAGE konnte die Wirkung von NEM auf den Thiol/Disulfid-Status von PGRL1 immunologisch untersucht werden (Abb. 15).

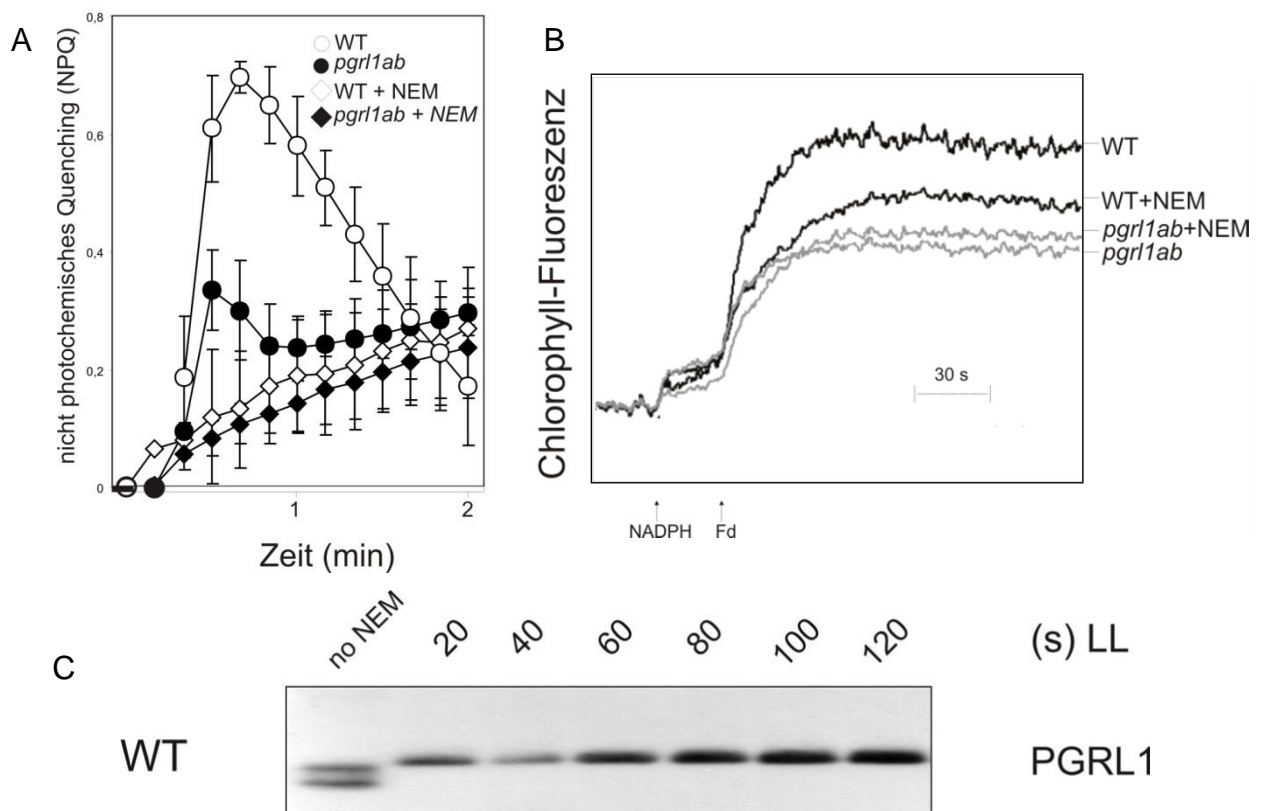


Abb. 15: Cystein-Alkylierung durch NEM führt zur Inhibition des transienten NPQ's, der Ferredoxin-vermittelten Plastochinonreduktion durch PGR5/PGRL1-abhängigen ZET und der Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken bei PGRL1

Blätter von WT und *pgr11ab*-Mutanten wurden in H₂O mit oder ohne 100 mM NEM vakuumfiltriert und anschließend für 10 min dunkeladaptiert. Die Aktivität von transientem NPQ wurde mittels PAM bei 80 $\mu\text{E}/\text{m}^2 \text{ sec}^{-1}$ (=Schwachlicht=LL) in 10-sekündigen Zeitabständen gemessen. Der Balken am unteren Bildrand zeigt den Übergang von Dunkelheit (■) zu Licht (□) an (A).

10 μl einer Chloroplastensuspension von WT und *pgr11ab*-Mutanten entsprechend einer Chlorophyllkonzentration von 0,5 mg/ml wurden für 45 min unter Schwachlicht (40 $\mu\text{E}/\text{m}^2 \text{ sec}^{-1}$) mit oder ohne 100 mM NEM bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Plastiden durch eine 1:10 Verdünnung mit Lysepuffer osmotisch aufgebrochen und die Aktivität des zyklischen Elektronentransportes an Hand des Chlorophyllfluoreszenzanstiegs nach Zugabe von NADPH und Ferredoxin mittels PAM bei (1 $\mu\text{E}/\text{m}^2 \text{ sec}^{-1}$) ermittelt (B).

Der Thiol/Disulfid-Status von PGRL1 aus den Proben der Messung aus Abb. 15 A wurde in 20-sekündigen Abständen vor und nach Behandlung mit NEM sowie nach Trennung mit SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen und Western Transfer mit PGRL1-Antikörpern untersucht (C).

Die transiente NPQ-Zunahme war sowohl bei WT als auch bei *pgr11ab*-Mutanten nach Behandlung mit NEM stark unterdrückt (Abb. 15 A). Da die NEM-Behandlung auch bei *pgr11ab*-Mutanten zu einer Abnahme des transienten NPQ beitrug, kann darauf geschlossen werden, dass NEM außer Ferredoxin-abhängigen ZET auch noch andere Prozesse beeinträchtigt. In Plastiden wurde dagegen durch NEM-Behandlung die ZET-Aktivität reduziert, jedoch auf ein Niveau, welches noch über dem von *pgr11ab*-Mutanten lag (Abb. 15 B). Die Untersuchung des Thiol/Disulfid-Status von PGRL1 zeigte vor der Behandlung mit NEM sowohl PGRL1-Proteine mit als auch ohne intramolekulare Disulfidbrücken. Nach NEM-Behandlung konnten dagegen nur noch PGRL1-Proteine ohne intramolekulare Disulfidbrücken beobachtet werden (Abb. 15 C). Der beobachtete inhibitorische Effekt von NEM auf den transienten NPQ sowie die ZET-Aktivität *in vitro* zeigt in Kombination mit der Inhibierung der Disulfidbrückenbildung bei PGRL1-Monomeren eine Funktion dieser Cysteine in ZET an.

3.10 Cystein/Serin-Austauschmutanten von PGRL1 in *E. coli*

Um eine detaillierte Untersuchung der Cysteinfunktionen von PGRL1 durchzuführen, wurden alle PGRL1-Cysteine einzeln oder in Gruppen zu Serinen mutiert. Die Mutagenese erfolgte auf cDNA-Basis durch Amplifikation von *PGRL1a* unter Verwendung sequenzüberlappender mutagenisierter Oligonukleotide. Mutagenisierte PGRL1-Proteine wurden nach Klonierung mit einem N-terminalen His-Tag heterolog in *E. coli* exprimiert. Da es sich bei PGRL1 um ein Membranprotein handelt, wurde die Aufreinigung aus *E. coli* in Puffern mit ansteigenden Detergenzkonzentrationen (Triton-X) durchgeführt, um membranassoziiertes PGRL1 in der löslichen Fraktion anzureichern. Die Proteinverteilung in löslichen und unlöslichen Fraktionen wurde

durch Coomassiefärbung visualisiert. Anschließend erfolgte eine native Aufreinigung und nach Westerntransfer ein immunologischer Nachweis mit His- bzw. PGRL1-spezifischen Antikörpern (Abb. 16).

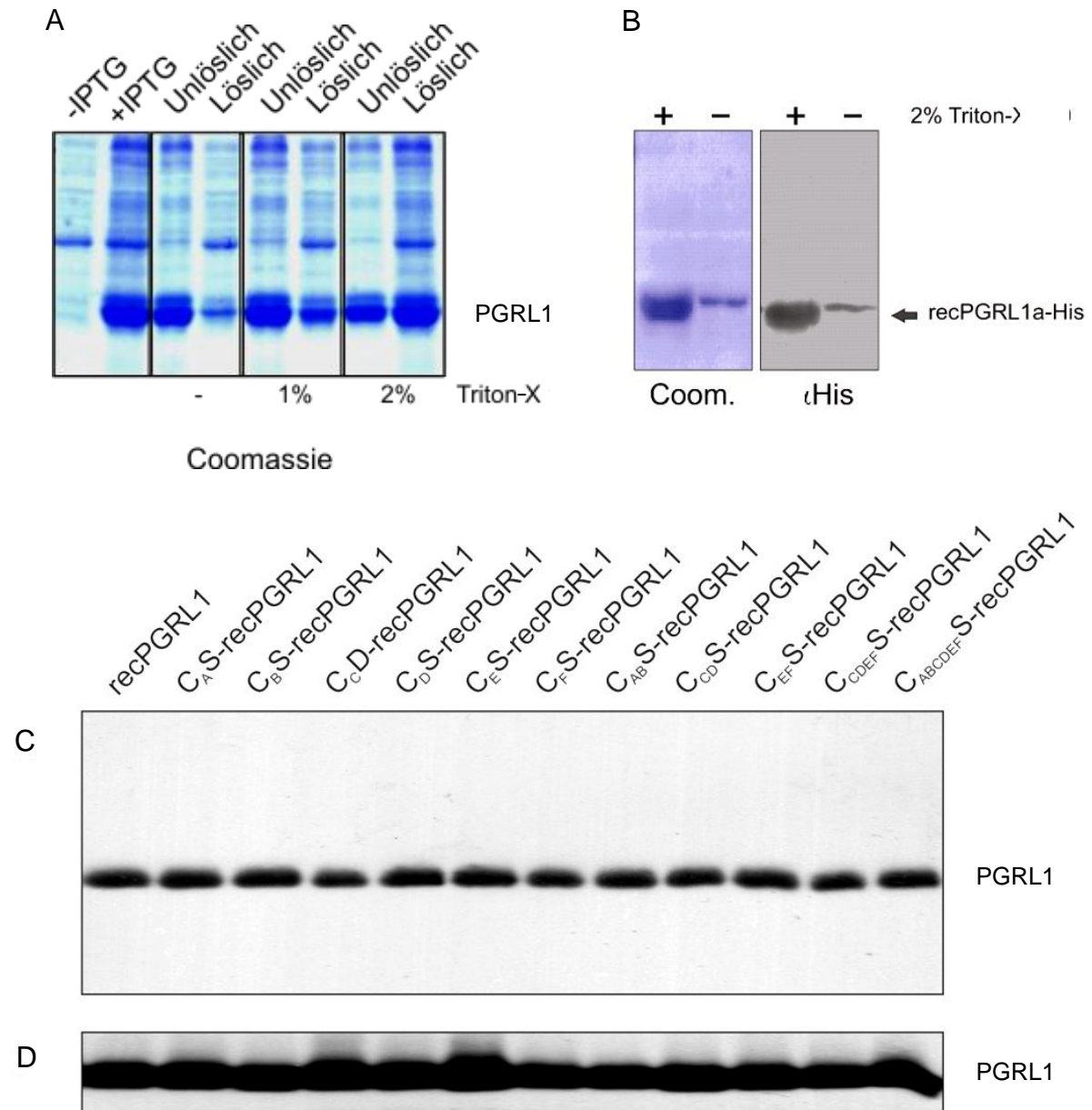


Abb. 16: Heterologer Expression von WT und Cystein-Serin-Austausch-Varianten von PGRL1 in *E. coli*

Die Expression von PGRL1 wurde durch Zugabe von IPTG induziert und nach 3-stündiger Expression die Proteinzusammensetzung der Bakterien nach Trennung mit SDS-PAGE durch Coomassiefärbung visualisiert. Vor der Solubilisierung in 2x Lämmli-Puffer wurden die Bakterienlysate ohne oder mit steigender Konzentration von Triton-X und anschließende Zentrifugation in lösliche und unlösliche Fraktionen getrennt (A). Die Menge an PGRL1 nach nativer Aufreinigung aus gleichen Mengen Bakterienkultur mit und ohne Verwendung von Triton-X wurde sowohl durch Coomassiefärbung als auch unter Verwendung von His-Antikörpern miteinander verglichen (B). recPGRL1a-His=rekombinantes PGRL1a mit His Tag. His=His-Tag-Antikörper.

Nach Überexpression in *E. coli* erfolgte unter Verwendung von Triton-X die native Aufreinigung von PGRL1 sowie seinen Cystein/Serin-Varianten. Im Folgenden werden rekombinante PGRL1-Proteine als recPGRL1 benannt. CxS (C=Cystein, x=Cystein Bezeichnung aus Abb. 3, S=Serin) bezeichnet den Cystein/Serin-Austausch. Alle PGRL1-Isoformen wurden nach Trennung mittels SDS-PAGE und Westerntransfer sowohl mit His-(C) als auch mit PGRL1-spezifischen Antikörpern detektiert (D).

Zunächst wurde PGRL1 durch IPTG-Zugabe exprimiert (Abb. 16 A). Ohne Verwendung von Detergenzien konnte PGRL1 nur zu geringen Anteilen nativ aus der löslichen Fraktion aufgereinigt werden. Durch Solubilisierung der Bakterienmembranen mit steigenden Konzentrationen von Triton-X reicherte sich PGRL1 in der löslichen Fraktion an (Abb. 16 A, B). Neben PGRL1 konnten auch alle Cystein-Serin-Austausch-Varianten durch Solubilisierung mit Triton X nativ aufgereinigt werden. Alle aufgereinigten PGRL1-Varianten ließen sich sowohl mit His- (Abb. 16 C) als auch mit PGRL1-spezifischen Antikörpern detektieren (Abb. 16 D). Im Folgenden werden rekombinante PGRL1-Proteine als recPGRL1 benannt. CxS (C=Cystein, x=Cystein Bezeichnung aus Abb. 3, S=Serin) bezeichnet den Cystein/Serin-Austausch.

3.11 Kofaktor-Analyse von PGRL1

Nach nativer Aufreinigung von WT-PGRL1 und der Cystein-Serin-Austausch-Varianten von PGRL1 wiesen einige der Varianten sowie WT-PGRL1 eine rot-braune Färbung der Proteinlösung auf. Dies deutete auf eine cysteinabhängige Bindung eines Kofaktors hin. Um den Kofaktor zu identifizieren, wurden Absorptionsspektren der Proteinelutionen aufgenommen. Die Absorption der Proteinlösungen wurde zunächst über einen Wellenlängenbereich von 260-550 nm ermittelt (Abb. 17 A, B). Auf Grund der Färbung sowie der durch differentielle PGRL1-Mutagenese angedeuteten cysteinabhängigen Koordination des Kofaktors wurde PGRL1 auf die Bindung eines Eisen-Schwefel-Clusters hin untersucht (Abb. 17 C). Zur Demonstration der cysteinabhängigen Bindung des Kofaktors erfolgte zudem eine Reduktion der Cysteine durch Zugabe von Natrium-Dithionit (DTN). Des Weiteren wurde bei allen PGRL1-Proteinvarianten ein Nachweis von Fe^{2+} und S^{2-} durchgeführt. Zum Eisennachweis nach Carter et al., 1971 wurde Ferrozin verwendet. Ein positiver Nachweis führte zu einem Farbumschlag von gelb nach violett. Bei dem Nachweis von Sulfid nach Elliot und Ljungdahl et al., 1982, erfolgte bei Zusatz von *N, N'*-Dimethyl-*p*-Phenylendiamin (DMPD) zu PGRL1-

Proteinlösungen die durch Fe^{3+} und S^{2-} katalysierte Methylenblausynthese und ein Farbumschlag von rot nach blau. Unter Verwendung von Eichlösungen (Ammonium-Eisen-Sulfat, Lithium-Sulfid) wurde bei WT-PGRL1 die Konzentration von Fe^{2+} und S^{2-} ermittelt.

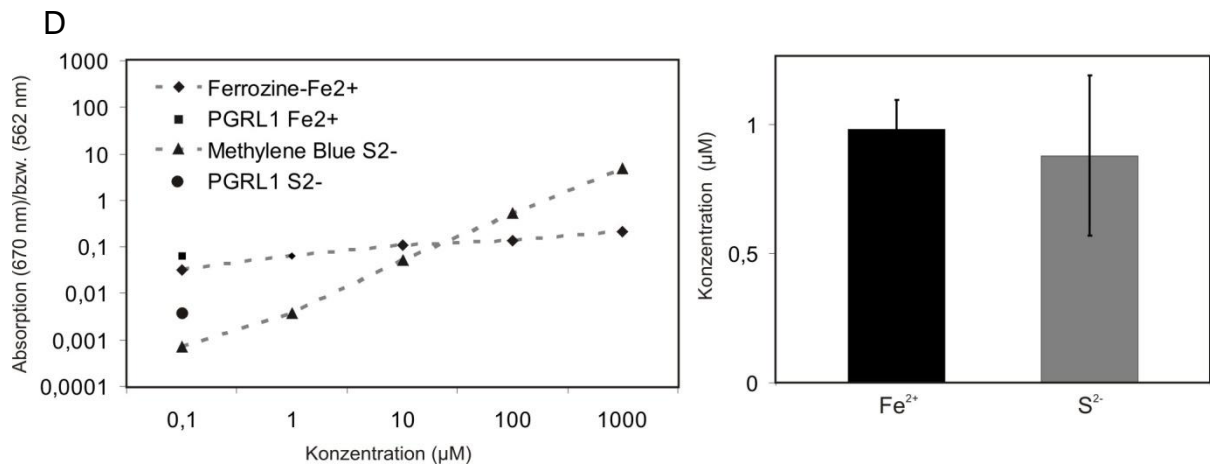
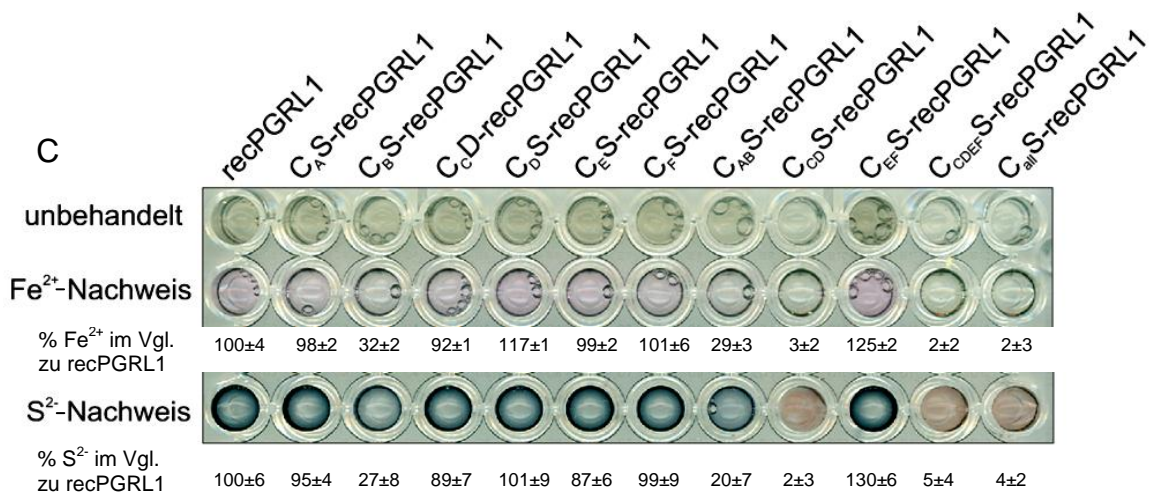
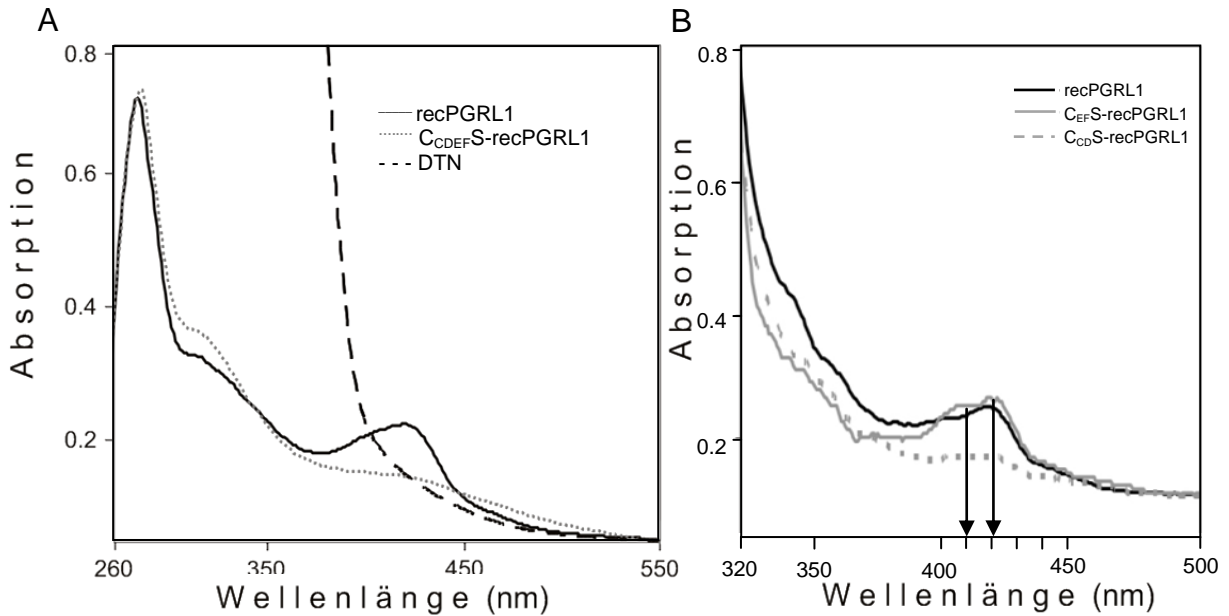


Abb. 17: CxxC-Motive von PGRL1 sind an der Koordination eines Eisen-Schwefel-Clusters beteiligt

PGRL1 wurde mit einem N-terminalen His-Tag heterolog in *E. coli* exprimiert und unter nativen Bedingungen aufgereinigt. Anschließend wurde ein Absorptionsspektrum der Proteinellution über einen Wellenlängenbereich von 260-550 nm gemessen (A und B). Als Kontrolle für einen cysteinkoordinierten Kofaktor wurde die Proteinlösung von PGRL1 mit dem Reduktionsmittel Natrium-Dithionit (DTN) versetzt (A).

Eigenfarbe von PGRL1-Proteinen (jeweils 20 µg) sowie qualitativer Nachweis von Fe^{2+} und S^{2-} durch Farbumschläge und Quantifizierung von Fe^{2+} und S^{2-} durch Messung der Absorption bei 562 nm, die von Methylenblau bei 670 nm unter Verwendung eines Tecan Safire ermittelt (C).

Unter Verwendung von Ammonium-Fe-Sulfat sowie LiS wurden Messlösungen mit einer Endkonzentration von 1 mM hergestellt. Diese wurden zur Erstellung einer Eichgerade verwendet. Fe^{2+} wurde durch Zugabe von 10 mM Ferrozin gebunden und als violette Färbung nachgewiesen. S^{2-} wurde unter Zugabe von DMPD und FeCl_3 als Methylenblau nachgewiesen. Der Ionennachweis in Eichlösungen sowie zu PGRL1-Proteinlösungen (1 µM) erfolgte in Mikrotiterplatten. Die Quantität von Fe^{2+} -Ferrozin-Komplexen wurde (D).

Das Absorptionsspektrum von rekombinatem WT-PGRL1 (recPGRL1) zeigte, entsprechend der Tryptophanabsorption der Proteine, eine maximale Absorption bei 290 nm. Zudem wurde eine Absorptionsschulter bei 320 nm sowie ein weiteres Absorptionsmaximum bei 420 nm nachgewiesen. Das Absorptionsmaximum bei 420 nm weist auf ein $[\text{4Fe-4S}]$ Cluster hin. Das Absorptionsmaximum bei 420 nm konnte durch Zugabe von Natrium-Dithionit (DTN) vollständig eliminiert werden (Abb. 17 A). Dieses konnte auch bei den Mutationen $\text{C}_{\text{CD}}\text{S}$ - und $\text{C}_{\text{CDEF}}\text{S}$ -recPGRL1 nicht mehr detektiert werden (Abb. 17 A, B). $\text{C}_{\text{EF}}\text{S}$ -recPGRL1 zeigte dagegen zwei Absorptionsmaxima bei 410 und bei 420 nm (Abb. 17 B). Unter Verwendung von Ferrozin und DMPD konnten bei allen PGRL1-Proteinen, außer bei $\text{C}_{\text{CD}}\text{S}$ -recPGRL1, $\text{C}_{\text{CDEF}}\text{S}$ -recPGRL1 und $\text{C}_{\text{alle}}\text{S}$ -recPGRL1, Eisen (Fe^{2+}) und Schwefel (S^{2-}) nachgewiesen werden. $\text{C}_{\text{EF}}\text{S}$ -recPGRL1 zeigte gegenüber WT-PGRL1 eine erhöhte, $\text{C}_{\text{B}}\text{S}$ -recPGRL1 und $\text{C}_{\text{AB}}\text{S}$ -recPGRL1 eine verringerte Kofaktor-Bindung auf (Abb. 17 C). Zudem zeigte die Quantifizierung von Fe^{2+} - und S^{2-} -Konzentrationen ein äquimolares Verhältnis von Fe^{2+} : S^{2-} in recPGRL1-Lösungen auf (Abb. 17 D).

3.12 Einfluss von Cystein/Serin-Austauschen auf den PGRL1-Redoxzustand

Im Folgenden wurde der Einfluss von Cystein-Mutationen auf den PGRL1-Redoxzustand untersucht. Dazu wurden die Cystein/Serin-Austauschvarianten sowie nicht mutiertes rekombinantes PGRL1 (recPGRL1) nach Solubilisierung mittels nicht reduzierender SDS-PAGE getrennt und immunologisch nachgewiesen (Abb. 18).

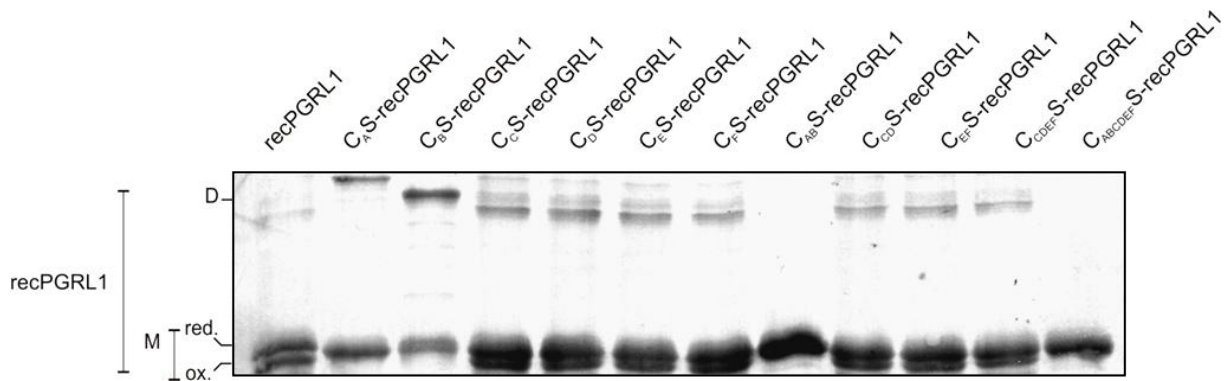


Abb. 18: Die Bildung von intra- und intermolekularen Disulfidbrücken bei PGRL1 hängt von Cystein A und B ab

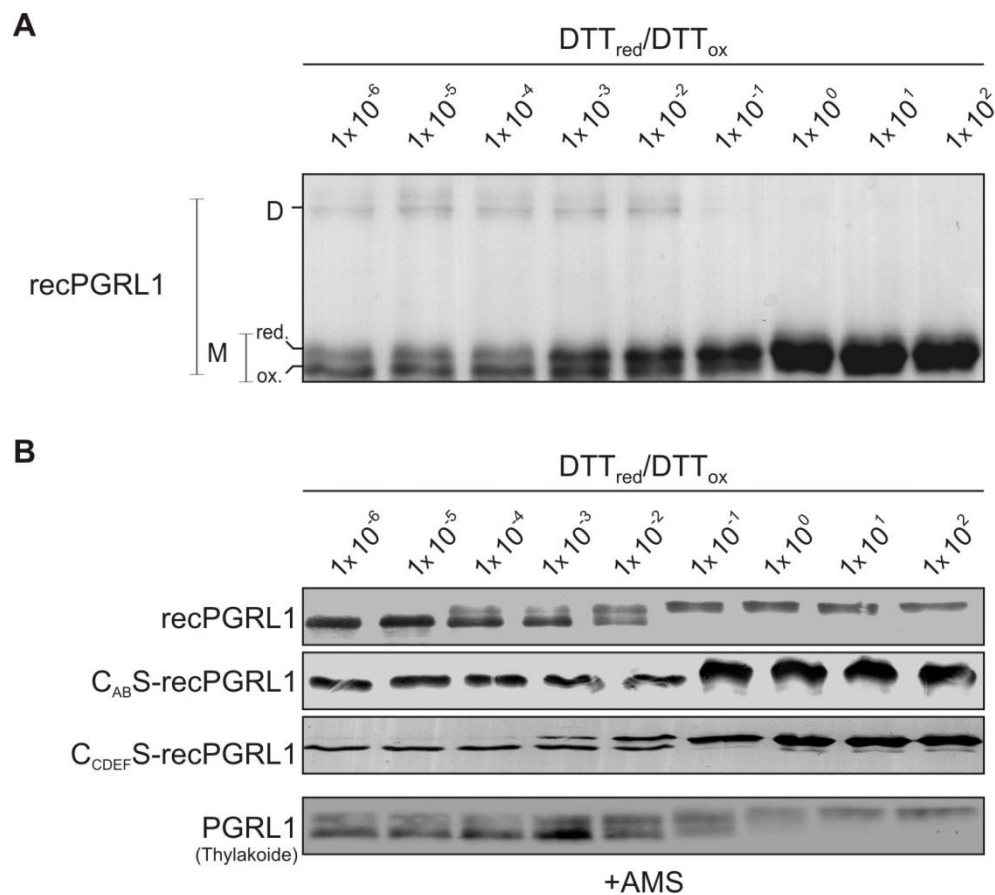
Die Cysteine von PGRL1a wurden auf cDNA-Basis mit mutagenisierten Oligonukleotiden einzeln oder in Kombinationen zu Serinen mutagenisiert. Die mutagenisierten cDNAs wurden in bakterielle Expressionsvektoren kloniert und mit einem n-terminalen His-Tag heterolog in *E. coli* exprimiert. Die Aufreinigung der Proteine erfolgte unter nativen Bedingungen unter Verwendung des His-Tags mit Ni-NTA. Gleiche Mengen der nativ aufgereinigten Proteine (2µg) wurden in 2xLämmli-Puffer ohne DTT solubilisiert und anschließend mittels SDS-PAGE getrennt. Nach Westerntransfer erfolgte die Detektion der Cystein/Serin-Austausch-Varianten mit His-Antikörpern im Vergleich zu rekombinantem WT-PGRL1 (recPGRL1). M=Monomer, D=Dimer.

Durch Mutagenese der PGRL1-Cysteine konnte die Ausbildung intra- und intermolekularer Disulfidbrücken durch Dimerisierung experimentell unterstützt werden (Abb. 18, C_{ABCDEF}-S-recPGRL1). Die Mutationen der Cysteine C, D, E, F, CD, EF sowie CDEF zeigte gegenüber WT-PGRL1 keine Veränderung der Disulfidbrückenbildung (Abb. 18). Die Mutationen der Cysteine AB (C_{AB}-S-recPGRL1) führten dagegen zum Verlust intra- und intermolekularer Disulfidbrücken. Der Verlust von Cystein A oder B führte zum Verlust von intramolekularen Disulfidbrücken. Jedoch konnten noch immer PGRL1-Homodimere gebildet werden. C_A-S-recPGRL1 und C_B-S-recPGRL1-Mutanten zeigten jedoch untereinander sowie gegenüber WT-PGRL1 ein scheinbar verändertes Molekulargewicht (Abb. 18). Die unterschiedlichen Molekularmassen von PGRL1-Homodimeren durch Mutation von Cystein A im Vergleich zu B, konnten nicht durch den Verlust intramolekularer Disulfide erklärt werden. Durch fehlende Homodimerisierung bei Mutation von Cystein A und B

zusammen konnte die Bildung intermolekularer Disulfide durch Kombination von Cystein A und B zwischen zwei PGRL1-Proteinen aufgezeigt werden (Abb. 19, C_{AB}S-recPGRL1).

3.13 Bestimmung der mittleren Redoxpotenziale von rekombinantem PGRL1 und Cystein/Serin-Austauschvarianten

Unter Verwendung von DTT_{red}/DTT_{ox} in distinkten Verhältnissen wurden Redox titrationen mit rekombinantem PGRL1 sowie Cystein/Serin-Austauschvarianten wie in Absatz 3.7 durchgeführt. Auf diese Weise sollten die aus Thylakoiden ermittelten Redoxpotenziale von PGRL1 den einzelnen Cysteinen zugeordnet werden (Abb. 19).



(Fortsetzung der Abbildung 19 auf der nächsten Seite)

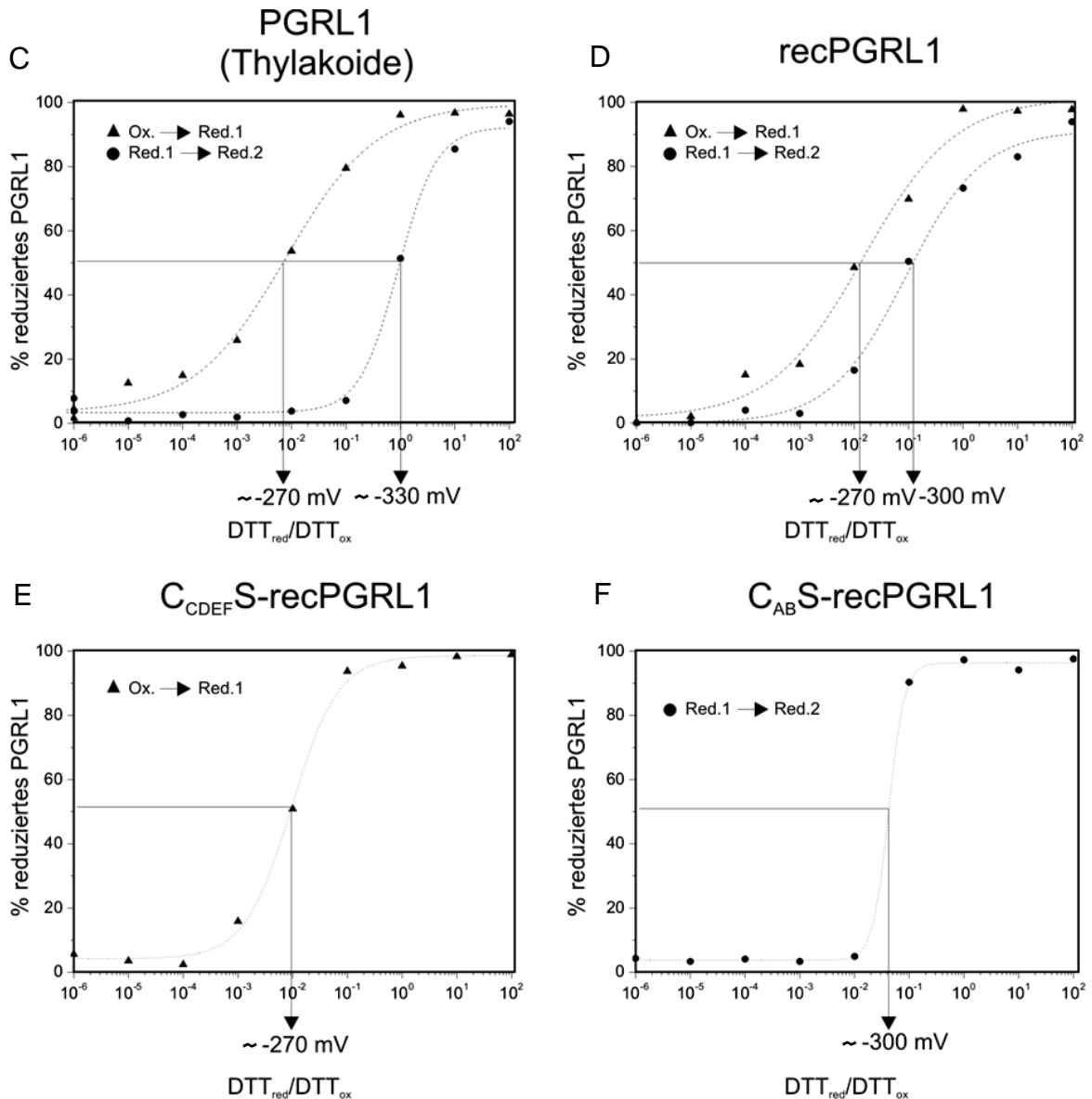


Abb. 19: Redox Titration und Quantifizierung von PGRL1 in WT-Thylakoiden und rekombinanten PGRL1-Isoformen

WT-Thylakoide entsprechend einer Chlorophyllkonzentration von 0,35mg/ml, sowie rekombinante PGRL1-Proteine (B , recPGRL1, C_{AB} -S-recPGRL1, und C_{CDEF} -S-recPGRL1) (20 μ g/ml) wurden in Puffern inkubiert, welche durch Zugabe von DTT_{red}/DTT_{ox} auf ein bestimmtes Redoxpotenzial eingestellt waren. Nach 1-stündiger Äquilibration wurde der erreichte Redoxzustand der Cysteine durch Präzipitation mit TCA (15%) stabilisiert und die Proteingemische von PGRL1 nach Solubilisierung in 2x Lämmli-Puffer sofort mittels SDS-PAGE getrennt (A) oder durch Zugabe von AMS (10 mM) alkyliert. Überschüssiges AMS wurde durch Ultrafiltration mit PD-10-Säulen entfernt und die Proteine anschließend erneut in 2x Lämmli-Puffer mit 100 mM DTT solubilisiert (B). Die Proteine der jeweiligen Redoxpotenziale wurden mittels SDS-PAGE getrennt und der Redoxzustand von PGRL1 nach Westerntransfer auf PVDF-Membranen mit PGRL1- oder His-spezifischen Antikörpern detektiert (A und B). Das sich aus dem DTT_{red}/DTT_{ox} -Verhältnis ergebende Potential (in mV) wurde mittels Nernst'scher Gleichung errechnet. Die mittels AMS-unterstützter Molekularmassenzunahme visualisierten Redox-Veränderungen wurden nach ihrer Quantifizierung mit Image Quant (GE Healthcare) gegen die entsprechenden Redoxpotenziale aufgetragen. Zur Ermittlung des mittleren Redoxpotenzials wurde auf Basis der Bandenquantifizierung ein sigmoidales "Fitting" mit Origin7.0 durchgeführt (C, D, E, F). Ox.=oxidiertes PGRL1, Red.1=1.Thiol-Übergang, Red.2=2. Thiolübergang.

Wie bereits für PGRL1 aus Thylakoiden (Abb. 9) konnten auch für rekombinante PGRL1-Proteine zwei Thiol/Disulfidübergänge detektiert werden (Abb. 19, A, B).

Während das positivere der beiden mittleren Redoxpotenziale (-270 mV) mit dem Redoxpotenzial von PGRL1 aus *Arabidopsis*-Thylakoiden übereinstimmte, wurde für das zweite mittlere Redoxpotenzial (-330 mV für *Arabidopsis*-PGRL1) von rekombinantem PGRL1 immerhin ein Wert von -300 mV bestimmt (Abb. 19 B, C, D). Damit zeigte dieses Potenzial eine Verschiebung um 30 mV in den elektropositiveren Bereich. Nach der Titration von Cystein/Serin-Austauschmutanten konnten die Redoxpotenziale den entsprechenden Cysteinen zugeordnet werden (Abb. 19 E und F). Da C_{CDEF}S-recPGRL1 ausschließlich das Redoxpotenzial von -270 mV aufwies, konnte dieses den verbliebenen Cysteinen A und B zugeordnet werden (Abb. 19 E). Das bei C_{AB}S-recPGRL1 detektierbare mittlere Redoxpotenzial bei -290 mV wurde den Cysteinen C, D, E und F zugeordnet (Abb. 19 F). Die leichte Verschiebung um ca. +10 mV im Vergleich zu recPGRL1, kann durch die verringerte Bindung des Ko-Faktors bei C_{AB}S-recPGRL1 erklärt werden (Abb.17 C, C_BS-, C_{AB}S-recPGRL1). Die Funktion der Cysteine A und B in der Ausbildung inter- und intramolekularer Disulfide konnte zudem durch Vergleich von Redox-titrations mit und ohne AMS-Behandlung beobachtet werden (Abb. 19 A und B recPGRL1). Hierbei erfolgte eine simultane Reduktion der intra- und intermolekularen Disulfide.

3.14 Assemblierung von PGR5/PGRL1-Heterodimeren *in vitro*

Die Potentialverschiebung des negativeren mittleren Redoxpotenzials von rekombinantem PGRL1 um +30 mV gegenüber PGRL1 aus Thylakoiden (-330 mV) sollte im Folgenden näher untersucht werden (Abb. 19 C, D, recPGRL1, PGRL1 (Thylakoide)). Da PGRL1 *in vivo* als PGR5/PGRL1-Komplex vorliegt, welcher unter Beteiligung von Cysteinen stabilisiert wird (Abb. 4, 6), sollte das mittlere Redoxpotenzial von PGR5/PGRL1-Komplexen durch Ko-Inkubation von rekombinantem PGRL1 mit rekombinanten PGR5 ermittelt werden. Nach der Trennung über nicht reduzierende SDS-PAGE und Westerntransfer wurden beide Proteine unter Verwendung von His-Antikörpern detektiert. Zur Kontrolle wurden beide Proteine einzeln aufgetragen (Abb. 20).

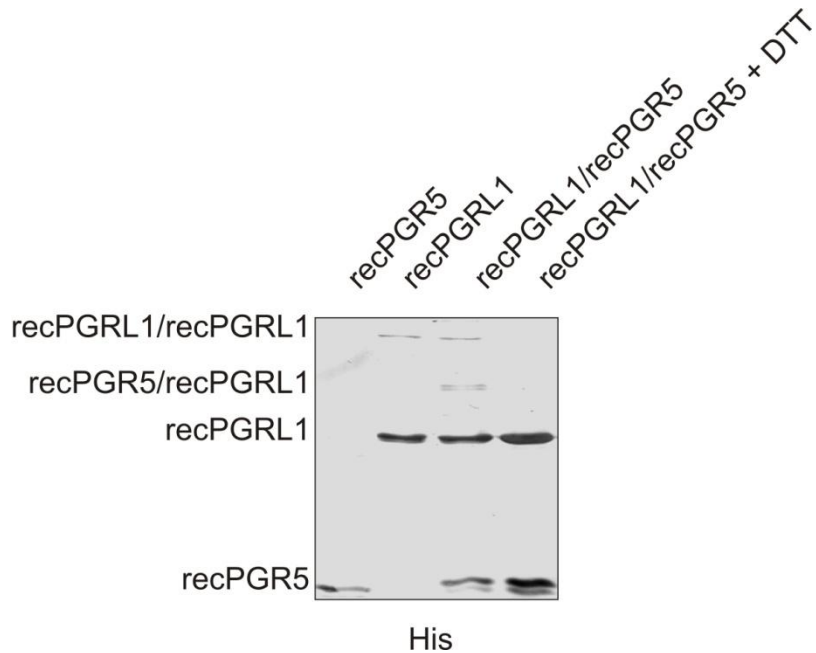


Abb. 20: Ko-Inkubationen von PGR5 und PGRL1 führen zu spontaner Rekonstitution von PGRL1/PGR5-Komplexen *in vitro*

Rekombinantes PGR5 (recPGR5: 0.5 μ g) und rekombinantes PGRL1 (recPGRL1: 2 μ g) wurden in 100 mM HEPES/NaOH (pH 7.5) für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Solubilisierung in 2x Lämmli-Puffer mit und ohne DTT erfolgte eine Trennung der Proteingemische sowie der Einzelproteine mittels SDS-PAGE. Die Proteine wurden nach Westerntransfer mit His-Antikörpern (His) detektiert.

Unter nicht reduzierenden Bedingungen wurde PGR5 ausschließlich als Monomer nachgewiesen (Abb. 20, recPGR5). PGRL1 konnte sowohl als Monomer als auch als Homodimer detektiert werden (Abb. 18, 20, recPGRL1). Durch Ko-Inkubation von PGR5 mit PGRL1 ließ sich eine direkte Interaktion von PGRL1 und PGR5 unter Ausbildung eines PGR5/PGRL1-Heterodimers nachweisen (Abb. 20, recPGRL1/recPGR5). Eine Interaktion von PGR5 mit PGRL1-Homodimeren wurde nicht beobachtet. Der Zerfall des PGRL1-Homodimers sowie der PGR5/PGRL1-Heterodimere durch Zugabe von DTT verdeutlicht die Cystein-vermittelte Interaktion der Proteine (Abb. 20, recPGRL1/recPGR5+DTT).

3.15 Untersuchung des Einflusses von PGR5 auf die mittleren Redoxpotenziale von PGRL1 und auf die PGR5-Assemblierung

Um die PGR5-Abhängigkeit der in Absatz 3.13 beschriebenen Potenzialverschiebung von rekombinanten PGRL1-Proteinen gegenüber PGRL1 in Thylakoiden zu überprüfen (Abb. 19 B, recPGRL1, PGRL1), wurden PGR5 und PGRL1 ko-inkubiert und anschließend redox-titriert (Abb. 21). Um neben der AMS-gestützten Potenzialbestimmung den sequenziellen Verlauf des redoxabhängigen Zerfalls von PGRL1/PGRL1-Homodimern und PGR5/PGRL1-Heterodimern zu untersuchen, wurden die Proteine zusätzlich ohne AMS-Behandlung und anschließende Reduktion mittels SDS-PAGE getrennt und immunologisch untersucht.

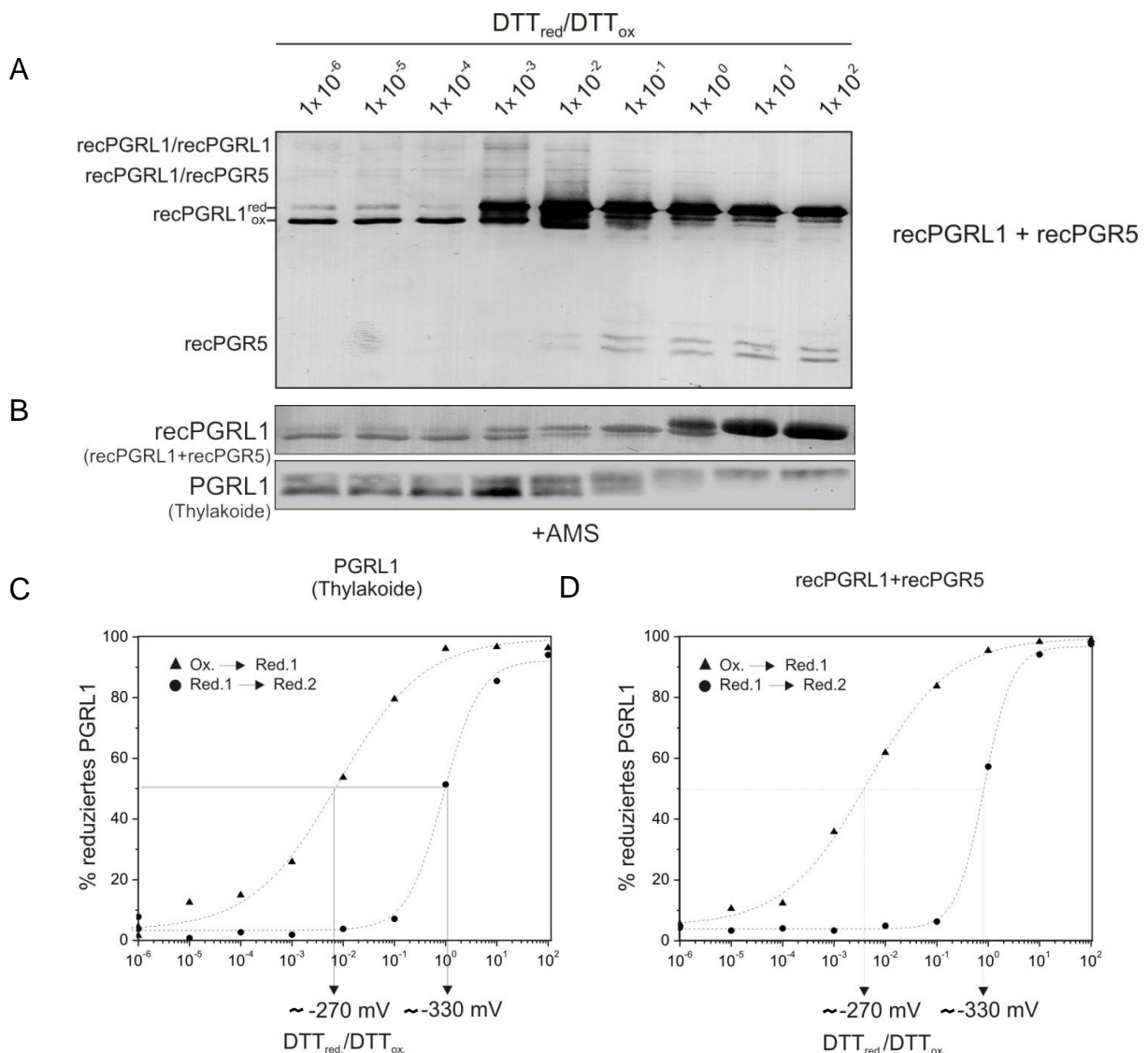


Abb. 21: Redoxpotenzialverschiebungen von PGRL1 aus Thylakoiden und rekombinantem PGRL1 können durch PGR5-Zugabe aufgehoben werden

Rekombinantes PGRL1 (2 µg) sowie rekombinantes PGR5 (1 µg) wurden zusammen in Puffern mit steigenden Redoxpotenzialen inkubiert ($\text{DTT}_{\text{red}}/\text{DTT}_{\text{ox}}$). Nach 1-stündiger Äquilibrierung wurden die Proteine entweder in 2x Lämmli-Puffer ohne DTT solubilisiert und mittels SDS-PAGE getrennt (A) oder durch Präzipitation mit TCA (15%) stabilisiert und die Cysteine der Proteine durch Solubilisierung in 2x Lämmli-Puffer ohne DTT mit 10 mM AMS alkyliert, ultrafiltriert sowie anschließend mit 100 mM DTT reduziert (B). Die Proteine der jeweiligen Redoxpotenziale wurden mittels SDS-PAGE getrennt und der Redoxzustand von PGRL1 nach Westerntransfer auf PVDF-Membranen mit PGRL1- oder His-Antikörpern detektiert (A und B). Das sich aus dem $\text{DTT}_{\text{red}}/\text{DTT}_{\text{ox}}$ -Verhältnis ergebende Potenzial (in mV) wurde mittels Nernst'scher Gleichung errechnet. Die mittels AMS-unterstützter Molekularmassenzunahme visualisierten Redoxveränderungen wurden nach ihrer Quantifizierung mit Image Quant (GE Healthcare) gegen die entsprechenden Redoxpotenziale aufgetragen. Zur Ermittlung des mittleren Redoxpotenzials wurde auf der Basis der Bandenquantifizierung ein sigmoidales "Fitting" mit Origin7.0 durchgeführt (C und D). Zum besseren Vergleich sind sowohl die AMS-gestützte Redoxtitration als auch deren Quantifizierung aus Abb. 9 mit abgebildet ((B) PGRL1) und (C)

Neben PGRL1-Proteinen mit inter- und intramolekularen Disulfiden konnte bei einem $\text{DTT}_{\text{red}}/\text{DTT}_{\text{ox}}$ -Verhältnis von 10^{-6} zunächst auch die Assemblierung von PGR5/PGRL1-Heterodimeren immunologisch nachgewiesen werden (Abb. 21 A). Durch Verringerung des Redoxpotenzials konnte zuallererst die Dissoziation von PGRL1-Homodimeren und die Reduktion intramolekularer Disulfide von PGRL1 beobachtet werden. Die Reduktion der Disulfidbrücken verringerte dabei zwar die Stabilität der PGR5/PGRL1-Heterodimere, trotzdem erfolgte deren Dissoziation hauptsächlich bei negativeren Potenzialen (Abb. 21 A). Die exakte Bestimmung mittlerer Redoxpotenziale wurde unter Verwendung von AMS durchgeführt (Abb. 21 B). Während die Anwesenheit von PGR5 nur geringen Einfluss auf das mittlere Redoxpotenzial von -270 mV hatte, konnte das elektronegativere Redoxpotenzial von recPGRL1 (-300 mV) wie in Thylakoidtitrationen auf -330 mV gebracht werden (Abb. 21 C und D). Beim Vergleich von AMS-gestützten mit nicht-AMS-gestützten Redoxtitrationen entsprach dieses Potenzial folglich der Dissoziation von PGR5/PGRL1-Heterodimeren und des Ko-Faktors (Abb. 21 A und B).

-Koordination von PGR5 in PGR5/PGRL1-Heterodimeren

Die PGR5 bindenden Cysteine von PGRL1 wurden durch Koinkubation von PGR5 mit PGRL1-Cystein-Serin-Austausch-Varianten durch die unterbundene Fähigkeit zur Heterodimerisierung identifiziert. Nach Trennung mittels SDS-PAGE und Westerntransfer wurden die PGRL1- und PGR5-Assemblierungen immunologisch unter Verwendung von His spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Abb. 22).

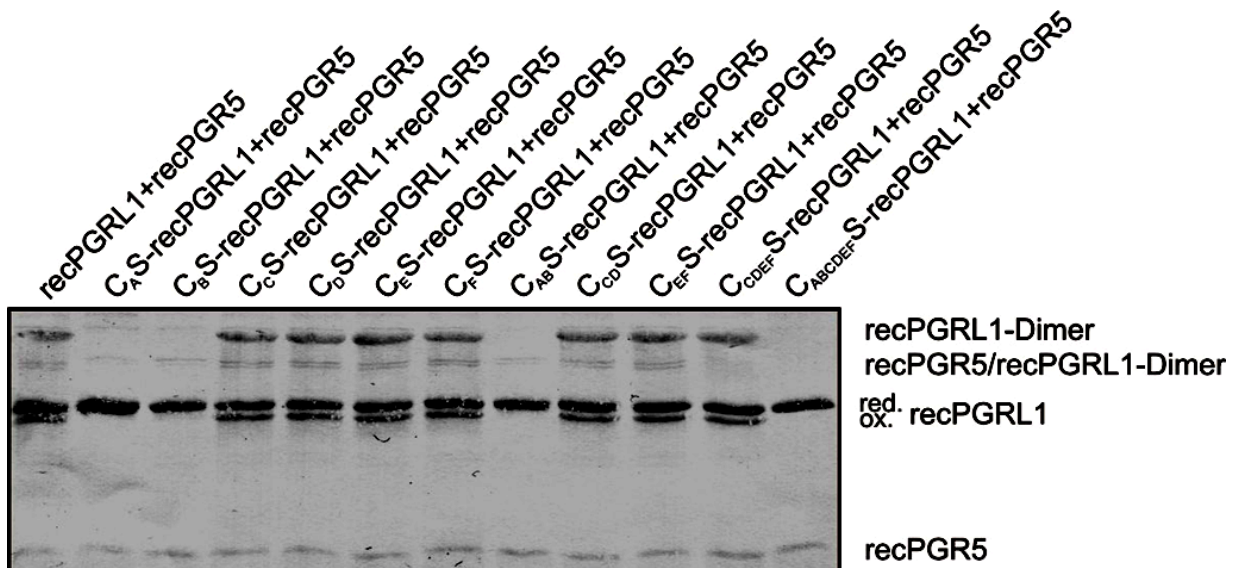


Abb. 22: Die spontane Rekonstitution von PGR5/PGRL1-Heterodimeren *in vitro* benötigt die Anwesenheit beider CxxC-Motive von PGRL1

Rekombinantes PGR5 (recPGR5: 0,5 µg) sowie rekombinante Cystein/Serin-Austauschmutanten von PGRL1 (recPGRL1: 2 µg) wurden in 100 mM HEPES/NaOH (pH 7.5) für 5 min bei RT inkubiert. Nach Solubilisierung in 2x Lämmli-Puffer mit oder ohne DTT erfolgte eine Trennung der Proteingemische sowie der Einzelproteine mittels SDS-PAGE. Die Proteine wurden nach Westerntransfer mit His-Antikörpern detektiert.

Die Cystein-Abhängigkeit der PGR5/PGRL1-Heterodimer-Bildung zeigte sich darin, dass cysteinfreies PGRL1 (C_{ABCDEFGH}S-recPGRL1) keine Interaktion mehr mit PGR5 aufwies (Abb. 22, recPGRL1+recPGR5, C_{ABCDEFGH}S-recPGRL1+recPGR5). Einzel- und Doppel-Cystein-Serin-Austausch-Varianten bildeten dagegen weiterhin PGR5/PGRL1-Heterodimere. Eine verminderte PGR5-Bindung konnte bei Varianten ohne intramolekulare Disulfide (Abb. 22, C_AS-, C_BS- und C_{AB}S-PGRL1) beobachtet werden. Ausschließlich bei einer kombinierten Mutation beider CxxC-Motive konnte keine PGR5 Bindung mehr nachgewiesen werden (Abb. 22, C_{CDEF}S-recPGRL1). Die Bindung von PGR5 durch die CxxC-Motive wird indirekt durch die beschriebene Redoxpotenzialverschiebung von C_{CDEF}S-recPGRL1 bestätigt (Abb. 19, 21).

3.16 Rekonstitution von PGR5/PGRL1-abhängigem zyklischem Elektronentransport in *pgr1ab*-Mutanten unter Verwendung von PGR5/PGRL1-Heterodimeren

Als nächstes sollte getestet werden, ob die Zugabe von PGR5/PGRL1-Heterodimeren zu osmotisch aufgebrochenen *pgr1ab*-Chloroplasten zur Rekonstitution des zyklischen Elektronentransports beiträgt. Hierfür wurde rekombinantes PGRL1 und rekombinantes PGR5 einzeln oder kombiniert appliziert und die Aktivität von zyklischem Elektronentransport nach Zugabe von NADPH und Ferredoxin als Anstieg der Chlorophyll-Fluoreszenz gemessen. Als Kontrolle dienten unbehandelte aufgebrochenen WT- und *pgr1ab*-Plastiden (Abb. 23 A). Die Funktionalität von PGRL1A-Cystein-Serin-Austausch-Varianten wurde ebenfalls in Kombination mit rekombinantem PGR5 auf diese Weise getestet (Abb. 23 B).

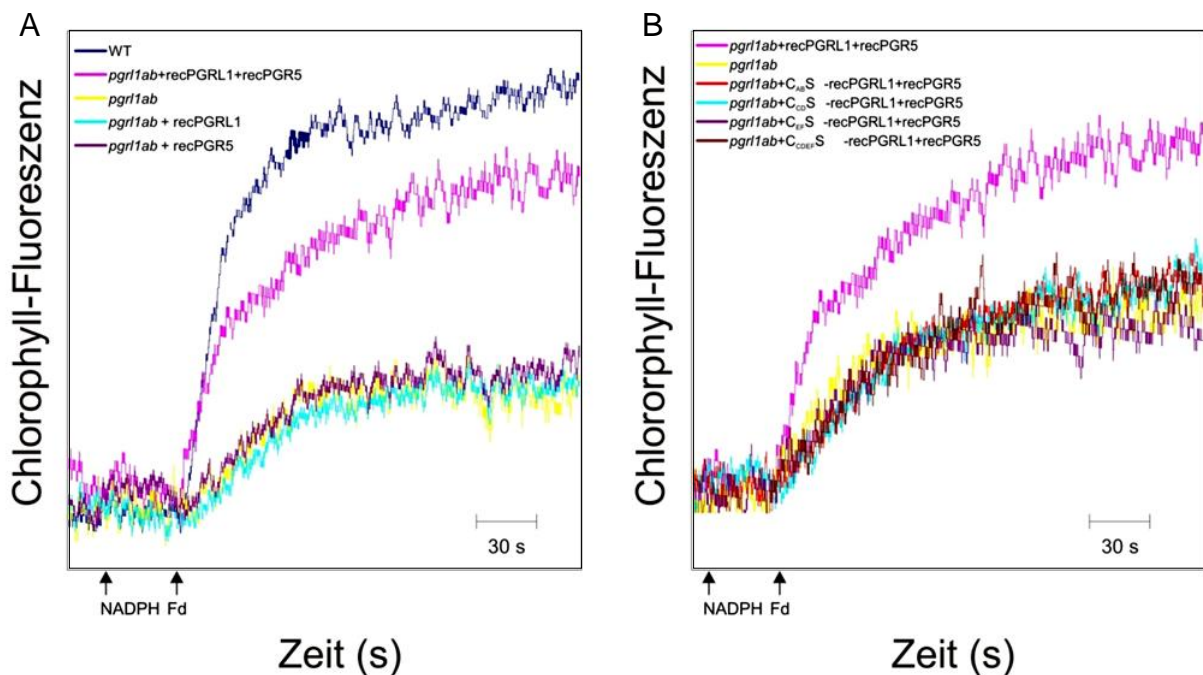


Abb. 23: ZET-Rekonstitution in *pgr1ab*-Mutanten durch Zugabe von PGR5, PGRL1 und PGRL1 Cystein/Serin-Austausch-Varianten

recPGRL1 (20 μ g) und recPGR5 (10 μ g) sowie recPGRL1 oder recPGR5 alleine wurden. Die Aktivität von zyklischem Elektronentransport wurde nach Zugabe von NADPH (0.25 mM) und Ferredoxin (5 μ M) mittels PAM-Fluorimeter gemessen. Als Kontrolle wurden unbehandelte WT- und *pgr1ab*-Chloroplasten gemessen (A).

recPGRL1 (20 μ g) und recPGR5 (10 μ g) sowie die Cystein/Serin-Austausch-Varianten C_{AB}S-, C_{DS}S-, C_{ES}S- und C_{DEFS}S-recPGRL1 (je 20 μ g) mit recPGR5 (10 μ g) wurden in 200 μ l einer Suspension von osmotisch aufgebrochenen Chloroplasten von *pgr1ab*-Mutanten entsprechend einer Chlorophyllkonzentration von 50 μ g/ml für 1h bei 4°C inkubiert. Die Aktivität von zyklischem Elektronentransport wurde nach Zugabe von NADPH (0.25 mM) und Ferredoxin (5 μ M) mittels PAM-Fluorimeter gemessen. Als Kontrolle wurden *pgr1ab*-Chloroplasten verwendet (B).

Durch Zugabe von PGR5 und PGRL1 sowie NADPH und Ferredoxin konnte eine partielle Rekonstitution von PGR5/PGRL1-abhängigem zyklischen Elektronentransport gemessen werden (Abb. 23. A, recPGRL1+recPGR5). Eine vollständige Rekonstitution der WT-Aktivität unter Verwendung von *pgr1ab*-Plastiden konnte jedoch nicht erreicht werden. PGR5 und PGRL1 alleine sowie die Cystein-Serin-Austausch-Varianten von PGRL1 zusammen mit PGR5 bewirkten keine Rekonstitution von PGR5/PGRL1-abhängigem zyklischen Elektronentransport (Abb. 23 A, recPGRL1, recPGR5, B).

3.17 Rolle der FNR im zyklischen Elektronentransport

Die Rekonstitution von zyklischem Elektronentransport durch Zugabe von PGR5, PGRL1 sowie NADPH und Ferredoxin zu aufgebrochenen Chloroplasten von *pgr1ab*-Mutanten deutete auf eine direkte Beteiligung von PGR5/PGRL1-Komplexen am zyklischen Elektronentransport hin. Der gemessene Chlorophyll-Fluoreszenz-Anstieg war jedoch nur nach Zugabe von NADPH und Ferredoxin beobachtbar, was auf eine zusätzliche Beteiligung der Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase (FNR) bei der Generierung von reduziertem Ferredoxin hindeutet. Da durch die Interaktion der FNR mit dem Cyt b₆f-Komplex eine FNR vermittelte Elektronenreinjektion lange als Modell für zyklischen Elektronentransport diente, sollte die Funktion der FNR im zyklischen Elektronentransport unter Verwendung von FNR-Mutanten untersucht werden.

In Blättern existieren zwei Isoformen, FNR1 und FNR2. Die Bindung beider Isoformen an der Thylakoidmembran ist FNR1-abhängig (Lintala et al., 2007). Beide Formen unterscheiden sich zudem durch ihr Molekulargewicht sowie die unterschiedliche Affinität gegenüber ihrem Substrat Ferredoxin. *fnr1*- und *fnr2*-Mutanten wurden auf einen Defekt im zyklischen Elektronentransport untersucht.

-Einfluss von FNR1 und FNR2 auf zyklischen Elektronentransport

Um einen Einfluss der FNR auf zyklischen Elektronentransport zu untersuchen, wurde zyklischer Elektronentransport bei *fnr1*- und *fnr2*- Mutanten sowohl mittels oben beschriebener *in vitro*-Messung unter Verwendung osmotisch aufgebrochener Chloroplasten als auch *in vivo* durch Messung des transienten NPQs an Blättern gemessen (Abb. 24). Als Kontrollen dienten WT und *pgr1ab*-Mutanten. Da ein

Verlust beider FNR-Isoformen für Pflanzen letal ist konnte keine Doppelmutante untersucht werden.

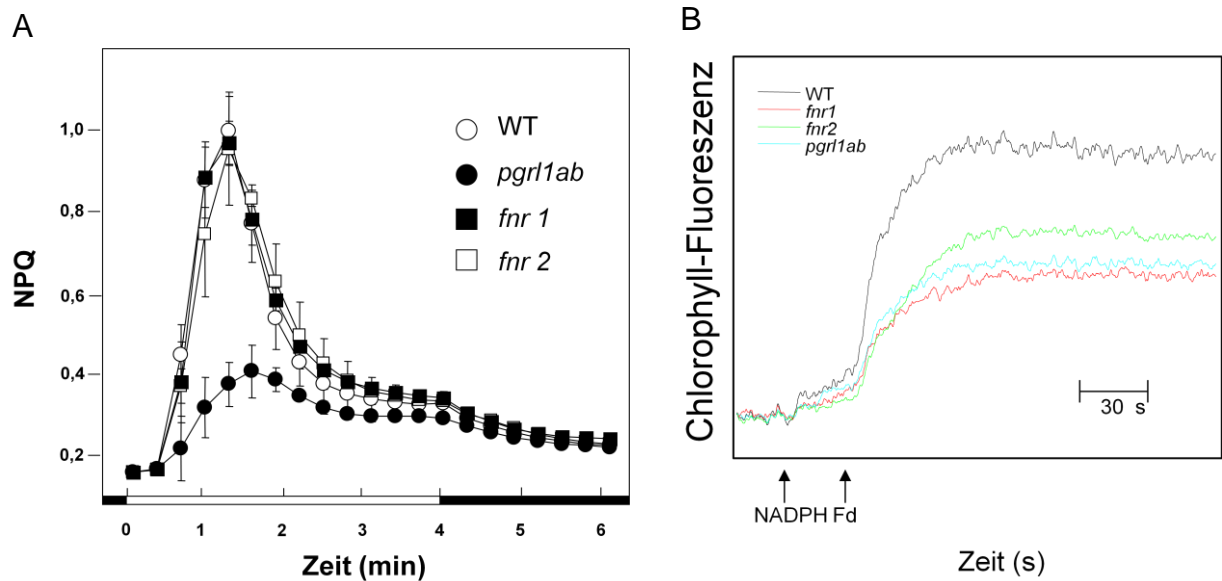


Abb. 24: *In vivo*- und *in vitro*-Messungen der Aktivität von zyklischem Elektronentransport in WT sowie *fnr1*-, *fnr2*- und *pgr1ab*-Mutanten

Transienter NPQ (*in vivo*). Pflanzen wurden für 15 min dunkeladaptiert, anschließend wurde die Induktion sowie die Relaxation des NPQ im Übergang von Dunkelheit zu Licht gemessen (Licht: 80 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$). Nach einer 4-minütigen Belichtung (weißer Balken) erfolgte eine 2-minütige Dunkelperiode (schwarzer Balken) (A).

In vitro-Messung von zyklischem Elektronentransport. Nach Zugabe von NADPH und Ferredoxin zu 200 μl einer Suspension von osmotisch aufgebrochenen Chloroplasten von WT sowie *pgr1ab*-, *fnr1*- und *fnr2*-Mutanten entsprechend einer Chlorophyllkonzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wurde die Aktivität von zyklischem Elektronentransport durch einen Anstieg der Chlorophyll-Fluoreszenz mit Hilfe eines PAM101-Fluorimeters gemessen (B).

Die Messung des transienten NPQs zeigte bei *fnr1*- und *fnr2*-Mutanten keinen Unterschied zum WT (Abb. 24 A). Im Fall von *fnr1*-Mutanten kann jedoch ein kompensatorischer Effekt der im Plastidenstroma lokalisierten Isoform FNR2 nicht ausgeschlossen werden. Eine fehlende Membranassoziation von FNR2 in der *fnr1*-Mutante wurde dagegen bereits gezeigt (Lintala et al., 2007).

Die *in vitro*-Messung von zyklischem Elektronentransport zeigte hingegen sowohl bei einem Verlust von FNR1 als auch FNR2 einen ähnlichen Defekt im zyklischem Elektronentransport wie in *pgr1ab*-Mutanten (Abb. 24 B). Dies deutete darauf hin, dass die FNR bei *in vitro*-Assays notwendig ist, um die Reduktion von Ferredoxin mit Elektronen von NADPH zu generieren, jedoch *in vivo* nicht zwingend am zyklischen Elektronentransport beteiligt ist.

-Rekonstitution von zyklischem Elektronentransport durch Zugabe rekombinanter FNR

Die Rolle der FNR1 in der Generierung von reduziertem Ferredoxin sollte durch Zugabe von heterolog in *E. coli* exprimierter FNR1 zu aufgebrochenen Chloroplasten von *fnr1* als auch *pgrl1ab* bestätigt werden. Nach Zugabe von FNR1, NADPH und Ferredoxin wurde die Aktivität von zyklischem Elektronentransport gemessen. Als Kontrolle dienten *pgrl1ab*-Mutanten (Abb.25).

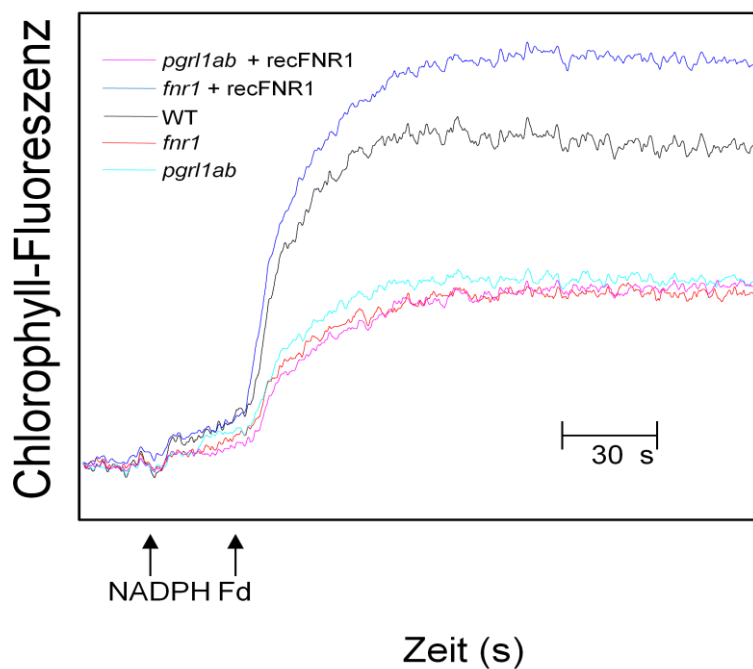


Abb. 25: Zyklischer Elektronentransport kann in *fnr1*- jedoch nicht in *pgrl1ab*-Mutanten durch exogene Zugabe von rekombinanter FNR1 rekonstituiert werden

An 200 μ l einer Suspension von aufgebrochenen Chloroplasten von WT, *pgrl1ab*- und *fnr1*-Mutanten entsprechend einer Chlorophyllkonzentration von 50 μ g/ml wurde die Aktivität des zyklischen Elektronentransports an Hand der Zunahme der Chlorophyll-Fluoreszenz nach Zugabe von NADPH und Ferredoxin mit Hilfe eines PAM101-Fluorimeters gemessen. *pgrl1ab*- und *fnr1*-Präparationen wurde zudem rekombinante FNR1 (recFNR1, 10 μ g) vor der Zugabe von NADPH und Ferredoxin zugesetzt, um eine mögliche Rekonstitution von zyklischem Elektronentransport zu messen.

Durch Zugabe rekombinanter FNR1 konnte bei *fnr1*-Mutanten eine vollständige Rekonstitution von zyklischem Elektronentransport gezeigt werden. Durch Zugabe rekombinanter FNR1 zu *pgrl1ab*-Plastiden zeigte sich dagegen keine Aktivitätsveränderung (Abb. 25). Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die Messung von zyklischem Elektronentransport durch Zugabe von NADPH und Ferredoxin zu aufgebrochenen Chloroplasten sowohl von FNR1 als auch von PGR5/PGRL1 abhängt. Da die exogene Zugabe von FNR1 zu *fnr1*-Plastiden zeigte

zudem eine erhöhte Intensität des beobachteten Fluoreszenzanstiegs im Vergleich zu WT-Plastiden.

-Einfluss von PGR5 und PGRL1 auf die Abundanz der FNR in Thylakoidmembranen

Im Weiteren sollte geprüft werden, ob ein Verlust von PGRL1 und PGR5 einen Einfluss auf die Abundanz von FNR1 und/oder FNR2 in der Thylakoidmembran hat. Dazu wurde die Menge an FNR1 und FNR2 in der Thylakoidmembran von WT, *pgr5*- und *pgr11ab*-Mutanten mittels FNR-Antikörpern untersucht. Da FNR1 und FNR2 einen hohen Grad an Homologie zeigen, jedoch unterschiedliche Molekulargewichte besitzen, konnten beide Isoformen mit dem gleichen Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 26).

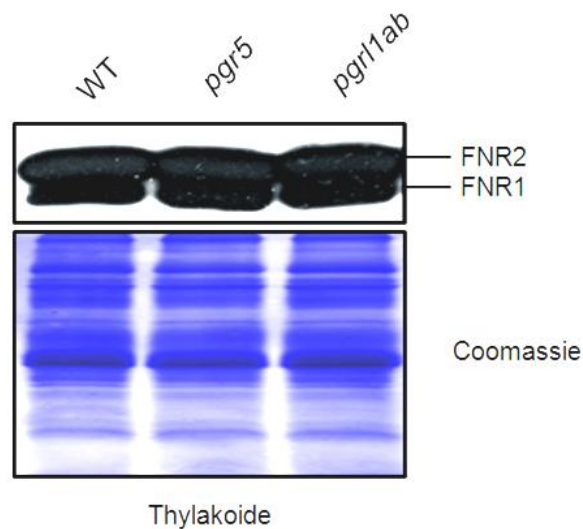


Abb. 26: Immunologischer Nachweis thylakoidassoziierter FNR1- und FNR2-Isoformen in WT, *pgr11ab* und *pgr5*

10 μ l einer Thylakoidsuspension entsprechend einer Chlorophyllkonzentration von 0,35mg/ml, wurden mittels SDS-PAGE getrennt. Nach Westerntransfer erfolgte der Nachweis von FNR1 und FNR2 mit FNR-Antikörpern. Als Ladungskontrolle diente eine Coomassiefärbung.

Weder *pgr5*- noch *pgr11ab*-Mutanten wiesen eine Veränderung in der Abundanz thylakoidassoziierter FNR1- und FNR2-Isoformen auf (Abb. 26).

3.18 Chinon-Reduktion mit einer Elektronentransportkette aus rekombinanten Proteinen

Durch exogene Zugabe von rekombinantem PGR5 und PGRL1 zu osmotisch aufgebrochenen *pgr1ab*-Chloroplasten, sowie FNR1-Zugabe zu lysierten *fnr1*-Plastiden konnte nach Zugabe von NADPH und Ferredoxin eine Reduktion von Plastochinon durch Elektronenreinjektion in die membrangebundene Elektronentransportkette gezeigt werden. Zur weiteren Aufklärung des ZET-Prozesses sollte die komplette Reaktionskette der Elektronenreinjektion in einem Reaktionsgefäß simuliert werden. Als finaler Elektronenakzeptor wurde wie bei Tanaka-Kitatani et al., 1990, das Plastochinonanalog 2,6-Dimethyl-1,4-Benzoquinone (DMBQ) verwendet. Die Reduktion von Chinon wurde durch eine Elektronentransportkette bestehend aus folgenden Komponenten gebildet: NADPH, FNR1, Ferredoxin, PGR5, PGRL1, DMBQ. Die Reaktion wurde jeweils durch Zugabe des Elektronendonors NADPH gestartet. Als Kontrollen dienten dieselbe Elektronentransportketten ohne PGRL1 bzw. ohne Ferredoxin (Abb. 27).

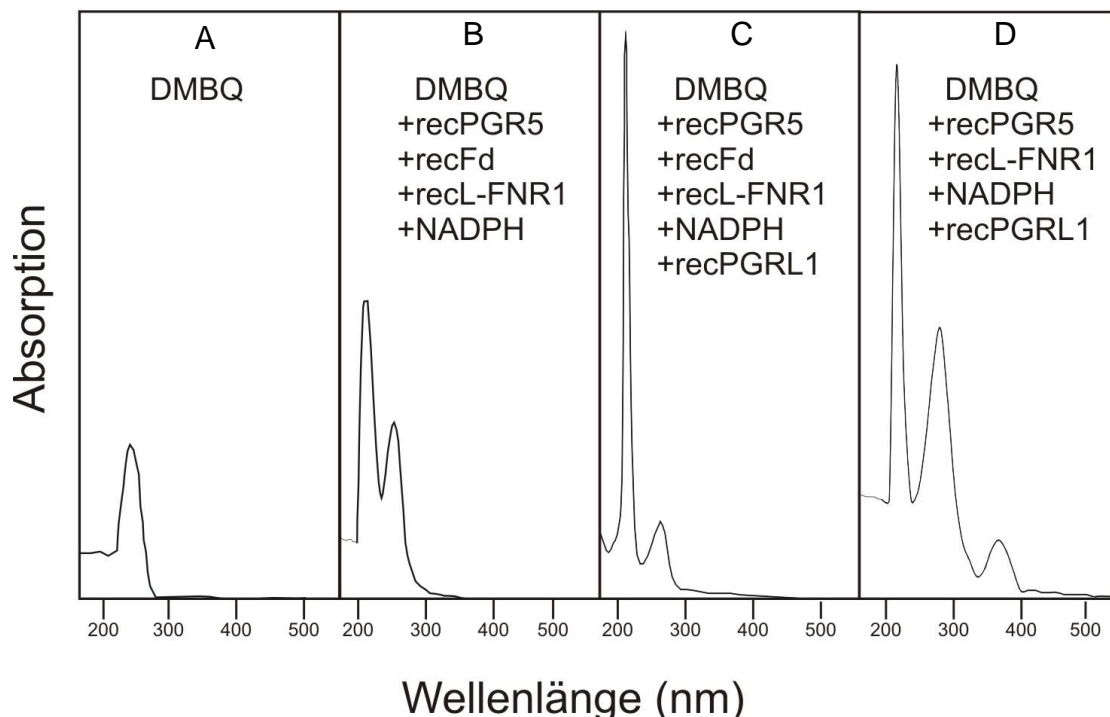


Abb. 27: *In vitro*-Elektronentransport unter Verwendung von Komponenten des zyklischen Elektronentransports
DMBQ (1 mM) (A), DMBQ, NADPH (10 mM), recPGR5 (10 µg), recFd (20 µg), recFNR1 (10 µg), (B), DMBQ, NADPH recPGR5, recFd, recFNR1, recPGRL1 (40 µg) (C) oder DMBQ, NADPH recPGR5, recFNR1, recPGRL1 (D) wurden zusammen für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Absorptionsspektren der Lösungen über einen Wellenlängenbereich von 190-550 nm gemessen.

Ausgehend von oxidiertem DMBQ, welches bei einer Wellenlänge von 260 nm ein Absorptionsmaximum zeigt (Abb. 27 A), konnte durch Zugabe von recPGRL1, recPGR5, recFd, recFNR1 und NADPH eine Abnahme des Absorptionsmaximums bei 260 nm beobachtet werden. Zudem wurde ein Absorptionsmaximum bei 210 nm entsprechend reduziertem Chinon gemessen werden (Abb 27 C). Die Absorption bei 210 nm setzte sich dabei aus der Absorption der Peptidbindungen zugegebener Proteine sowie der Absorption von reduziertem Chinon zusammen. Ohne Zugabe von PGRL1 konnte ebenfalls, wenn auch in geringerem Ausmaß, eine Reduktion von Chinon beobachtet werden. Ohne Zugabe von Ferredoxin konnte dagegen keine Reduktion von Chinon mehr beobachtet werden (Abb. 27 C).

-PGRL1-abhängige Chinon-Reduktion

Da reduziertem Chinon *in vitro* direkt Chinon reduziert, konnte unter Verwendung von Elektronentransportketten mit Ferredoxin und Chinon keine PGR5/PGRL1-Abhängigkeit gezeigt werden. Folglich wurde die oben angeführte Elektronentransportkette in zwei Reaktionsschritte unterteilt. Zunächst wurde die Reduktion von Chinon nach Zugabe von PGRL1 spektrometrisch untersucht. (Abb. 28).

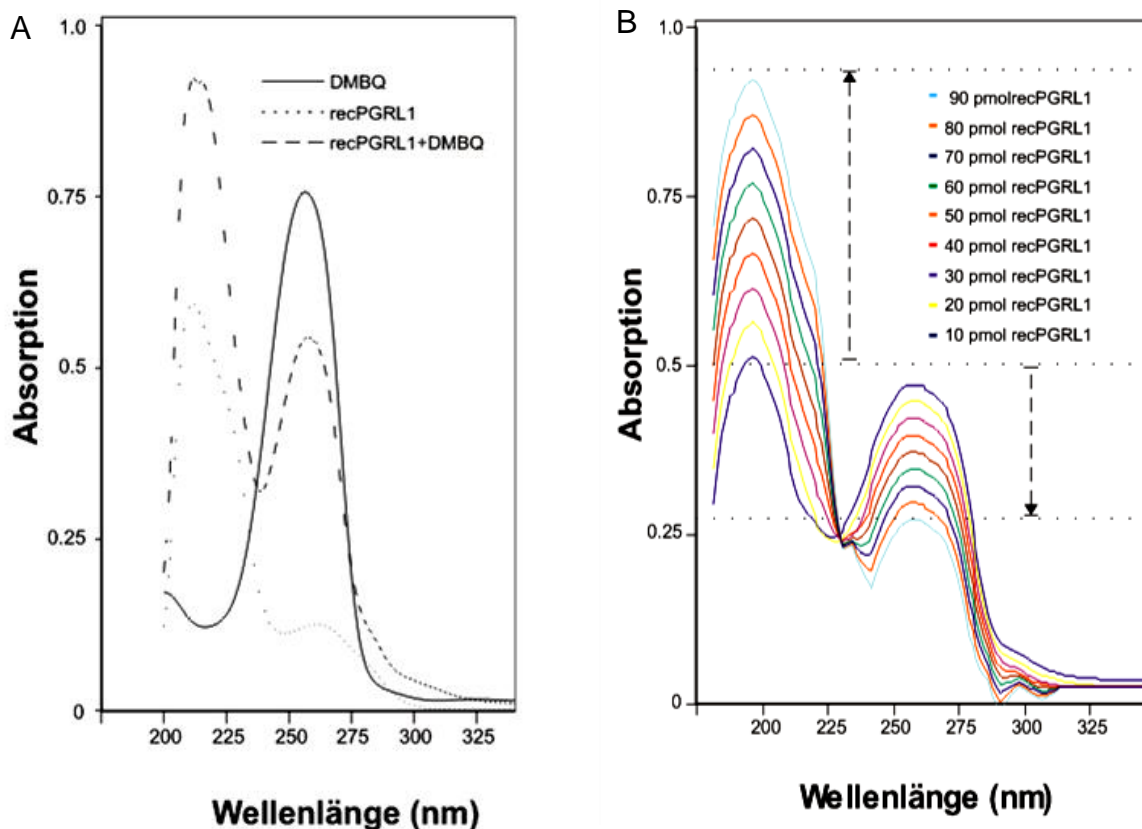


Abb. 28: Rekombinantes PGRL1 besitzt Chinonreduktase-Aktivität

Absorptionsspektren von DMBQ (10 μ M), rekombinatem PGRL1 (20 μ g) sowie PGRL1 und DMBQ zusammen wurden nach 10-minütiger Inkubation bei RT über einen Wellenlängenbereich von 190 bis 350 nm aufgenommen (A).

1 mM DMBQ wurde mit steigenden Konzentrationen von rekombinanten PGRL1 (10-90 pmol) versetzt. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Absorptionsspektrum der Lösung zwischen 190 und 350 nm bestimmt (B).

Das Absorptionsspektrum von PGRL1 zeigte ein breites Absorptionsmaximum zwischen 180 und 250 nm, was der Absorption der Peptidbindungen entspricht. Ein weiteres Absorptionsmaximum wurde zwischen 240 und 300 nm gemessen, welches der Absorption von Aminosäuren entspricht (Abb. 28 A, recPGRL1). Das Absorptionsspektrum von DMBQ zeigte eine Absorption zwischen 225 und 290 nm mit einem Maximum bei 260 nm (Abb. 28 A, DMBQ). Dieses entspricht der oxidierten Form des Chinonderivates. Das Absorptionsspektrum von PGRL1 mit DMBQ zusammen zeigte eine maximale Absorption zwischen 190 und 235 nm mit einem Maximum bei 210 nm entsprechend reduziertem Chinon. Dabei war die maximale Absorption bei 210 nm stärker als der Absorptionsspeak des PGRL1-Proteins alleine. Das Absorptionsmaximum setzte sich folglich aus der Absorption der Peptidbindung sowie der Absorption des durch PGRL1 reduzierten DMBQ zusammen (Abb. 28 A, DMBQ+recPGRL1). Des Weiteren konnte eine Veränderung der Absorption zwischen 230 und 290 nm mit einem Maximum bei 260 nm gemessen werden. Diese zeigte gegenüber der gleichen Menge an oxidiertem DMBQ alleine, eine verringerte Absorption trotz zusätzlicher Absorption der aromatischen Aminosäuren des Proteins (Abb. 28, A, B). Durch die Steigerung der PGRL1-Menge von anfangs 10 pmol auf 90 pmol im Verhältnis bei gleichbleibender Konzentration von DMBQ konnte eine kontinuierliche Abnahme des Absorptionsmaximums bei 260 nm beobachtet werden (Abb. 28, B). Zeitgleich erfolgte eine Zunahme des Absorptionsmaximums bei 210 nm (Abb. 28, B).

-PGRL1-abhängige Chinon-Reduktion in PGRL1 und Cystein/Serin-Austausch -
Varianten sowie nach Zugabe von Antimycin A

Ko-Inkubation von PGRL1 mit DMBQ führte direkt zu dessen Reduktion. Da Chinon-Reduktionen über Thiol-Gruppen katalysiert werden können (Li et al., 2005, Malpica et al., 2004), wurde zur Kontrolle das DMBQ-Reduktionsvermögen der Cystein/Serin-Austauschmutanten $C_{AB}S$ - und $C_{CDEF}S$ -recPGRL1 gemessen. Da PGRL1/PGR5-katalysierter zyklischer Elektronentransport vom Chinon-Analog Antimycin A (AA) gehemmt werden konnte (Munekage et al., 2004), sollte die PGRL1-vermittelte

DMBQ-Reduktion nach Behandlung von PGRL1 mit Antimycin A gemessen werden. Im Weiteren sollte die Geschwindigkeit der PGRL1-vermittelten DMBQ-Reduktion unter Substratüberschuss spektroskopisch bestimmt werden. Dazu wurde die Reduktion von oxidiertem DMBQ bei 260 nm durch Zugabe von rekombinantem PGRL1 in Intervallen von 2 Sekunden über einen Zeitraum von 30 Sekunden gemessen (Abb. 29).

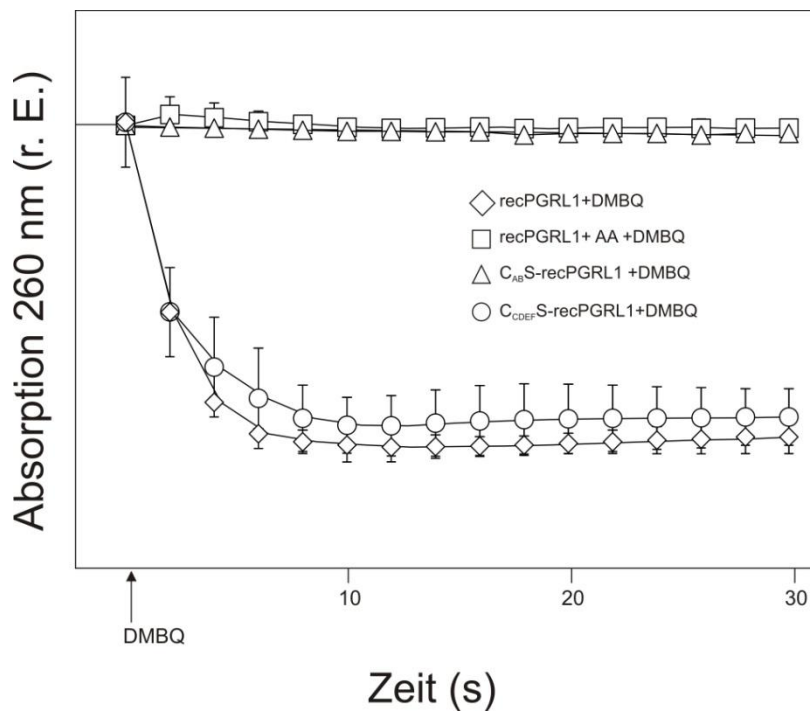


Abb. 29: DMBQ-Reduktionskinetik in Abhängigkeit von PGRL1

Die PGRL1-abhängige Reduktion von 2,6-Dimethoxy-1,4-Benzoquinone (DMBQ) wurde durch Zugabe von recPGRL1, C_{AB}S-recPGRL1 und C_{CDEF}S-recPGRL1 zu 1 μ M DMBQ gestartet und an Hand der Absorptionsabnahme von oxidiertem DMBQ bei 260 nm gemessen. Die Messung erfolgte in 2-Sekunden-Intervallen über die Dauer von 30 Sekunden. Antimycin A (1 μ M) wurde der recPGRL1-Lösung 5 min vor Zugabe zu DMBQ zugesetzt. r.E.= relative Einheiten

Sowohl der Zusatz von recPGRL1 als auch C_{CDEF}S-recPGRL1 konnte eine Abnahme der DMBQ-Absorption bei 260 nm, entsprechend einer DMBQ-Reduktion, gemessen werden (Abb. 29). Diese konnte durch Mutation der Cysteine A und B in C_{AB}S-recPGRL1 nicht mehr beobachtet werden (Abb. 29). Nach Behandlung von recPGRL1 mit Antimycin A fand ebenfalls keine Chinon-Reduktion mehr statt (Abb. 29). Dies deutete auf einen Thiol-vermittelten Reduktionsmechanismus durch die Cysteine A und B hin.

-Chinon-Reduktion und PGRL1-Thiol/Disulfid-Status

Die Chinon-Reduktion unter Elektronenaufnahme von Thiolen kann zu einer Reoxidation der Thiole unter Disulfidbrückenbildung führen. Damit kann der Prozess auf der Basis von Konformationsveränderungen analysiert werden. Um dies zu untersuchen, wurden rekombinante PGRL1-Proteine nach Behandlung mit DMBQ immunologisch untersucht. Als Kontrolle wurden die Cystein-Serin-Austausch-Varianten $C_{AB}S$ - und $C_{CDEF}S$ -recPGRL1 vor und nach Zugabe von DMBQ immunologisch mit analysiert (Abb. 30).

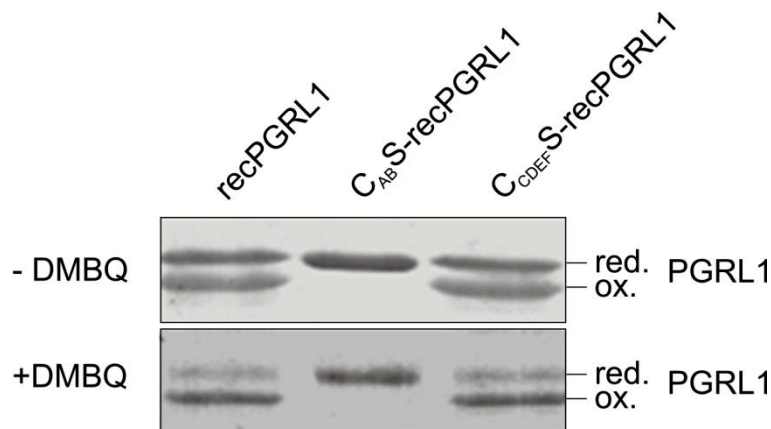


Abb. 30: Die Thiol-vermittelte Reduktion von DMBQ führt zur Bildung von intramolekularen Disulfidbrücken bei PGRL1 Rekombinantes PGRL1 (recPGRL1, $C_{AB}S$ - und $C_{CDEF}S$ -recPGRL1) (4 μ g) wurde mit 2,6-Dimethoxy-1,4-benzoquinone (DMBQ) (1 μ M) für 30 min bei Raumtemperatur unter N_2 -Atmosphäre inkubiert. Nach Solubilisierung in 2x Lämmli-Puffer ohne DTT wurden die Proteine mittels SDS-PAGE und Immunoblotting unter Verwendung von His-Antikörpern detektiert.

Durch Zugabe von DMBQ zu PGRL1-Proteinen erfolgte eine Reduktion von Chinon unter Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke. (Abb. 30, recPGRL1, \pm DMBQ). Da diese durch die Cysteine A und B gebildet wird, konnte durch deren Mutation keine Chinon-abhängige Konformationsänderung beobachtet werden (Abb. 30 $C_{AB}S$ -recPGRL1, \pm DMBQ). Die Mutation der Cysteine C, D, E und F beeinflusste dagegen die Chinon-vermittelte Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken nicht (Abb. 30 $C_{CDEF}S$ -recPGRL1, \pm DMBQ). Veränderungen in der Abundanz von PGRL1-Homodimeren traten nicht auf.

-Ferredoxin-abhängige Reduktion von PGRL1 in Anwesenheit von PGR5

Mittels Ko-Inkubation von DMBQ und rekombinatem PGRL1 konnte ein möglicher Reduktionsmechanismus von Chinonen unter Oxidation der PGRL1-Cysteine A und B zu einer intramolekularen Disulfidbrücke gezeigt werden. Daraufhin sollte auch eine mögliche Rereduktion von PGRL1 durch Ferredoxin untersucht werden, um

einen potenziellen Oxidoreduktase-Mechanismus nachzuweisen. Dazu wurde *in vitro* reduziertes Ferredoxin durch Inkubation rekombinanter FNR1 mit NADPH und Ferredoxin in einem reversen FNR-Mechanismus generiert. Zum direkten Nachweis einer Disulfid-Reduktion von PGRL1 wurde diese über den thiol-sensitiven Redoxfarbstoff DTNB spektroskopisch nachgewiesen, wodurch zudem die Reaktionsgeschwindigkeit ermittelt wurde. C_{CDEF}S-recPGRL1-Proteine, welche keine Ko-Faktor Bindung bzw. PGR5-Bindung mehr aufweisen, sowie C_{AB}S-PGRL1-Proteine, welche keine intramolekularen Disulfide mehr ausbilden, wurden als Kontrolle für die Ferredoxin-abhängige Reduktion von PGRL1 verwendet. Zusätzlich sollte die Funktion von PGR5 durch kombinatorische Verwendung von recPGRL1, C_{AB}S-recPGRL1 und C_{CDEF}S-recPGRL1 zusammen mit PGR5 Proteinen (recPGR5) aufgeklärt werden (Abb. 31).

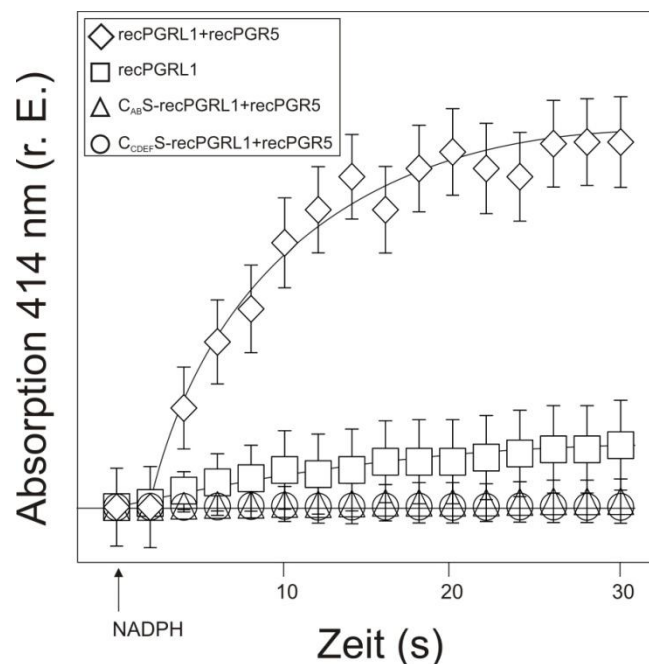


Abb. 31: PGRL1 kann in Anwesenheit von PGR5 durch Ferredoxin reduziert werden

Rekombinantes PGRL1 (recPGRL1, C_{AB}S-recPGRL1, C_{CDEF}S-recPGRL1) (40 µg) wurde mit oder ohne PGR5 (10 µg), sowie NADPH (10 mM) / rekombinanter FNR1 (20 µg) und rekombinatem Ferredoxin (10 µg) inkubiert. Die Reduktion von Disulfiden zu Thiolen wurde durch Zugabe von 1 mM DTNB kolorimetrisch in 2-Sekunden-Intervallen bei einer Wellenlänge von 414 nm gemessen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von NADPH gestartet. r.E.= relative Einheiten

Die Inkubation von NADPH, FNR und Ferredoxin in Kombination mit recPGRL1 zeigte keine signifikante Veränderung der Absorption bei 414 nm. Erst nach Zugabe von PGR5 konnte eine Absorptionzunahme durch Bildung von Thiolen beobachtet werden (Abb. 31). Die unterbleibenden Absorptionsveränderungen bei Inkubation von C_{AB}S-recPGRL1 bzw. C_{CDEF}S-recPGRL1 mit PGR5 zeigten, dass sowohl das Fehlen von intramolekularen Disulfiden bei PGRL1 als auch der Verlust des

Kofaktors sowie der Assemblierung von PGR5 eine Ferredoxin-abhängige Reduktion von PGRL1 verhinderten.

- Thiol/Disulfid-Status von PGR5/PGRL1-Heterodimeren nach Reduktion durch Ferredoxin

Da Konformationsänderung von PGRL1 nach Chinonreduktion über Thiol/Disulfidmodifikationen der Cysteine A und B erfolgten, sollten konformationelle Veränderungen von PGRL1 durch Ferredoxin-abhängige Reduktion ebenfalls immunologisch nachgewiesen werden. Zum Vergleich erfolgte zudem eine Behandlung von PGRL1-Proteinen mit Chinon (Abb. 32).

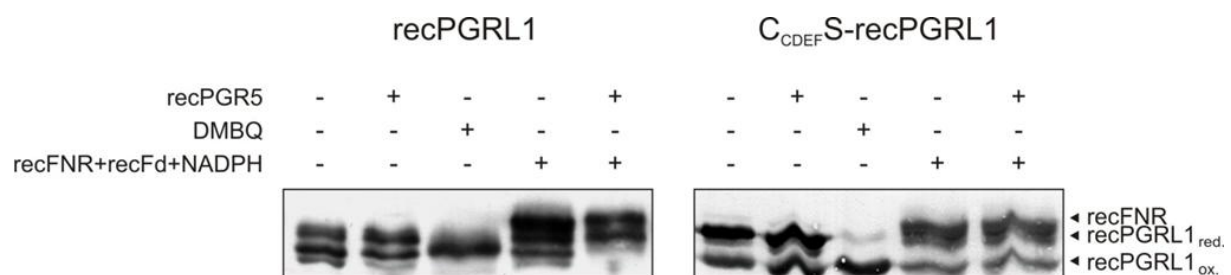


Abb. 32: Die Ferredoxin-vermittelte Reduktion von PGRL1 führt zum Verlust der intramolekularen Disulfide von PGRL1
 Rekombinantes PGRL1 (recPGRL1, C_{CDEF}S-recPGRL1) (40 µg) wurden mit oder ohne PGR5 (10 µg), 2,6-Dimethoxy-1,4-benzoquinone (DMBQ) (1 µM), NADPH (10 mM) / rekombinanter FNR1 (20 µg) und rekombinantem Ferredoxin (10 µg) oder NADPH (10 mM) / rekombinanter FNR1 (40 µg) / rekombinantem Ferredoxin (10 µg) und rekombinantem PGR5 (10 µg) für 30 Minuten bei RT unter N₂-Atmosphäre inkubiert. Nach Solubilisierung in 2x Lämmli-Puffer ohne DTT wurden die Proteine mittels SDS-PAGE und Immunoblotting unter Verwendung von His-Antikörpern detektiert.

Zunächst konnte durch Zugabe von PGR5 (recPGR5) zu PGRL1 (recPGRL1) und C_{CDEF}S-recPGRL1 keine Veränderung in der Abundanz intramolekularer Disulfidbrücken von PGRL1 beobachtet werden (Abb. 32). Die anschließende Zugabe von NADPH, recFNR sowie recFd zu recPGRL1 und C_{CDEF}S-recPGRL1 führte auch zu keiner Veränderung. Ausschließlich durch Zugabe von recPGR5 sowie NADPH, recFNR1 und recFd zu recPGRL1 konnte eine durch Disulfidreduktion bewirkte Abnahme intramolekularer Disulfidbrücken in recPGRL1 beobachtet werden. Für C_{CDEF}S-recPGRL1 konnte diese Reaktion nicht beobachtet werden (Abb. 32). Dies kann sowohl durch die Abwesenheit des Eisen-Schwefel-Clusters von PGRL1 (Abb. 17) als auch durch die fehlende Assemblierung von PGRL1 mit PGR5 erklärt werden (Abb. 22).

3.19 Dynamik des PGRL1-Thiol/Disulfid-Status *in vivo*

Durch Kombination von recPGRL1 mit recPGR5, recFd, recFNR1 und NADPH sowie recPGRL1 mit DMBQ konnte *in vitro* eine Oxidoreduktase-Aktivität für PGRL1 aufgezeigt werden. Diese basiert auf Konformationsänderungen von PGRL1 durch Umlagerungen von intramolekularen Disulfiden. Diese Erkenntnisse sollten zum Nachweis des Mechanismus *in planta* verwendet werden. Dazu wurde die Dynamik des PGRL1-Thiol/Disulfid-Status auf zwei Arten untersucht. Zum einen wurde der Thiol/Disulfid-Status während eines Übergangs von Dunkelheit zum Licht betrachtet. Dabei wird oxidiertes Plastochinon (Dunkelheit) durch Belichtung in reduziertes Plastochinon überführt, da die Enzyme des Calvin-Zyklus erst nach etwa einer Minute Belichtung durch Thioredoxine aktiviert werden können. Somit findet zunächst nur zyklischer Elektronentransport statt. Zum Anderen wurde der Thiol/Disulfid-Status von PGRL1 nach Belichtung mit unterschiedlichen Lichtqualitäten bzw. Lichtquantitäten untersucht. Dafür wurde Licht einer Stärke von $80 \mu\text{mol Photonen m}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Low-Light=LL) verwendet, das durch präferenzielle Anregung von PS II gegenüber PS I zu einer verstärkten Reduktion des Plastochinonpools beiträgt. Als zweite Lichtqualität wurde dunkelrotes Licht (FR) gewählt, da dieses bei einer Wellenlänge von 810 nm vorwiegend eine Anregung von PS I bewirkt, während PS II weitgehend nicht angeregt wird. Auf diese Weise wird der Plastochinonpool bei andauernder Belichtung zunehmend oxidiert. Um zudem noch die Lichtquantität zu testen, wurde Hochlicht verwendet. Unter Hochlicht erfolgt auf Grund übermäßiger Belichtung der Photosysteme zunächst die Photoinhibition von PS II und anschließend von PS I. Während dieser Belichtungsexperimente erfolgte der Nachweis konformationeller Veränderungen durch Probennahme in 20-sek-Intervallen über einen Zeitraum von 2 min, nach 6 min sowie nach 60 min. Der Redoxzustand von PGRL1 wurde nach Trennung mittels SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen immunologisch unter Verwendung von PGRL1-Antikörpern nachgewiesen (Abb. 33).

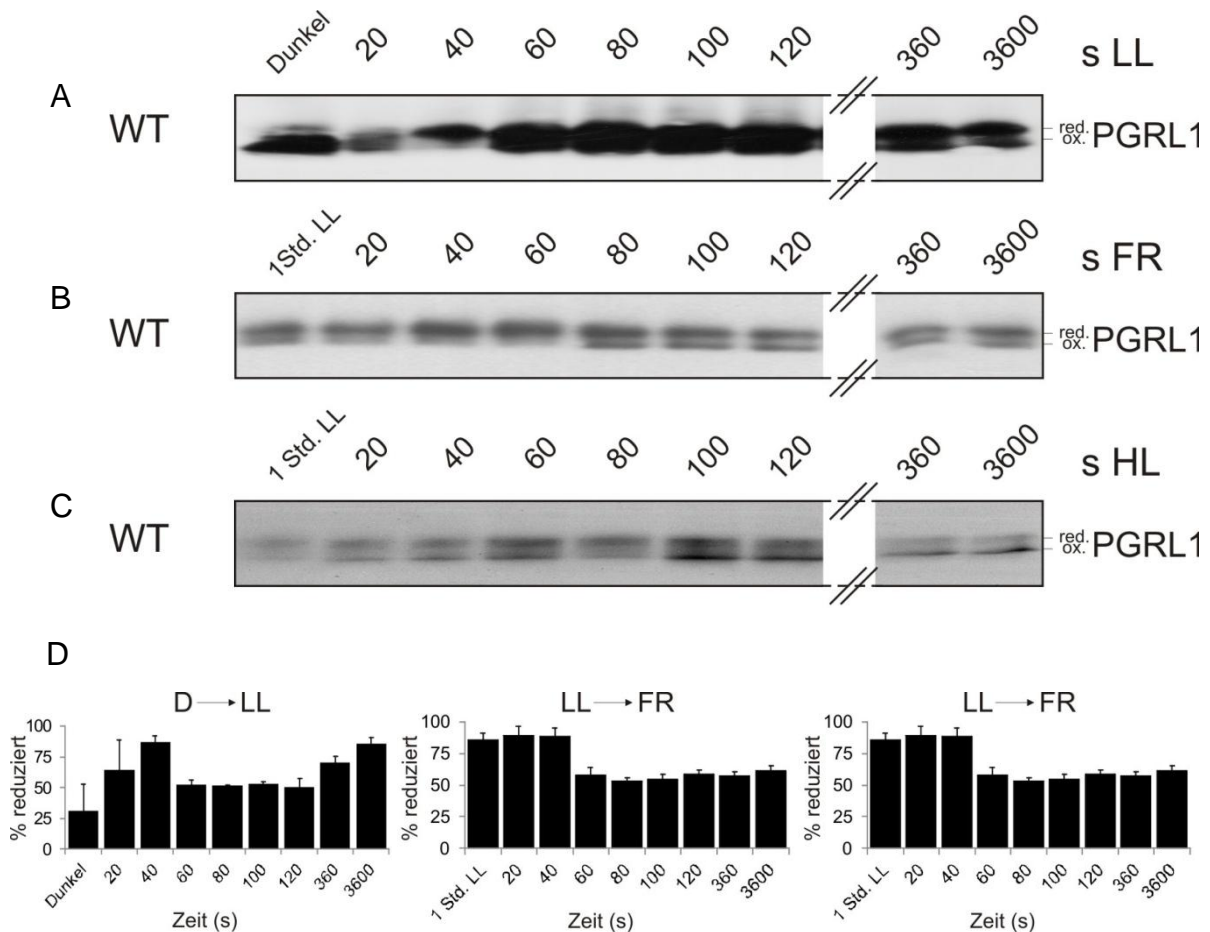


Abb. 33: PGRL1-Redoxzustand in Abhängigkeit von unterschiedlicher Lichtquantität und -qualität

Blätter von WT-Pflanzen wurden vor und nach Belichtung mit 80 $\mu\text{mol Photonen m}^{-1}\text{s}^{-1}$ (=Low-Light (LL)) in 20-sek-Intervallen sowie nach 360 bzw. 3600 min in flüssigem N_2 eingefroren (Dunkel (D) \rightarrow LL) (A).

Blätter von WT-Pflanzen wurden nach 1stündiger Belichtung im LL sowie nach Belichtung mit dunkelrotem Licht (FR) in 20-sek-Intervallen sowie nach 360 bzw. 3600 min in flüssigem N_2 eingefroren (LL \rightarrow FR) (B).

Blätter von WT-Pflanzen wurden nach 1stündiger Belichtung im LL sowie nach Belichtung mit Hochlicht (HL) (2000 $\mu\text{mol Photonen m}^{-1}\text{s}^{-1}$) in 20-sek-Intervallen sowie nach 360 bzw. 3600 s in flüssigem N_2 eingefroren (LL \rightarrow HL) (C).

Aus den homogenisierten gefrorenen Blättern wurden im Dunkeln Thylakoide isoliert und mittels Zugabe von 0,01% DOC, 0,1M HCl und 80% Aceton für 1Std. bei -20°C präzipitiert. Die Proteine wurden in 2x Lämmli-Puffer ohne DTT solubilisiert und zu je 30 μg Protein mittels SDS-PAGE getrennt. Nach Westerntransfer wurde PGRL1 mit Antikörpern detektiert. Die Fraktion reduzierter PGRL1-Monomere wurde zum jeweiligen Zeitpunkt quantifiziert und gegen die Zeit aufgetragen (D).

Beim Übergang von Dunkelheit zu LL-Belichtung konnten innerhalb der ersten drei Zeitintervalle massive Veränderungen des PGRL1-Redoxzustandes beobachtet werden (Abb. 33 A). Redox-Veränderungen traten dabei ausschließlich in PGRL1-Monomeren auf. Es konnte dabei gezeigt werden, dass PGRL1 im Dunkeln, wenn der Plastochinonpool überwiegend oxidiert ist, als oxidiertes Monomer vorliegt. Durch 20-40-sekündige Belichtung wurden PGRL1-Monomere vollständig reduziert. Nach einer Belichtungszeit von 60 Sekunden erfolgte dagegen eine Re-Oxidation von bis zu 50%. Dies kann durch eine Aktivierung des linearen Elektronentransportes sowie

die Aktivierung der ATP-Synthase erklärt werden, wodurch Elektronen aus der Elektronentransportkette abgezogen werden. Nach andauernder Belichtung erfolgte eine zunehmende Reduktion des PGRL1-Monomers bis zu 90% der Gesamtmenge nach 60 minütiger Belichtung (Abb. 33 A, D, D→LL). Beim Übergang von LL zur Belichtung mit dunkelrotem Licht (FR) erfolgte eine Re-Oxidation von PGRL1-Monomeren von bis zu 40% der Gesamtmenge nach etwa 80 sec. (Abb. 33 B). Dieses Verhältnis konnte bis zu einer Belichtungsdauer von 60 Minuten nachgewiesen werden (Abb. 33 B, D, LL→FR). Der gleiche Effekt konnte durch Belichtung mit Hochlicht bereits nach 40 sec. beobachtet werden. Der Anteil an oxidiertem PGRL1 nahm bei andauernder Belichtung auf bis zu 90 % zu (Abb. 33 C, D, (LL→HL).

-PGRL1 und Thioredoxin

Der Thiol/Disulfid-Status von PGRL1 kann sowohl durch Ferredoxin als auch durch Thioredoxine moduliert werden. Thioredoxin-abhängige Regulationen treten vorwiegend im Übergang von Dunkelheit zum Licht sowie durch starke Reduktion des Ferredoxin-Pools bspw. durch Belichtung mit Hochlicht auf. Während der Lichtversuche wurden folglich auch Veränderungen des Monomer/Dimer-Verhältnisses von PGRL1 untersucht. Der im Abschnitt 3.8 beschriebene Effekt von Thioredoxinen auf den PGRL1-Redox-Status zeigte sich in der Reduktion des PGRL1-Homodimers. Eine lichtabhängige Veränderung von Monomer/Dimer-Verhältnissen konnte jedoch lediglich durch Belichtung mit Hochlicht beobachtet werden. Im Übergang vom Dunkeln ins Licht traten dagegen keine Veränderungen auf (Abb. 34).

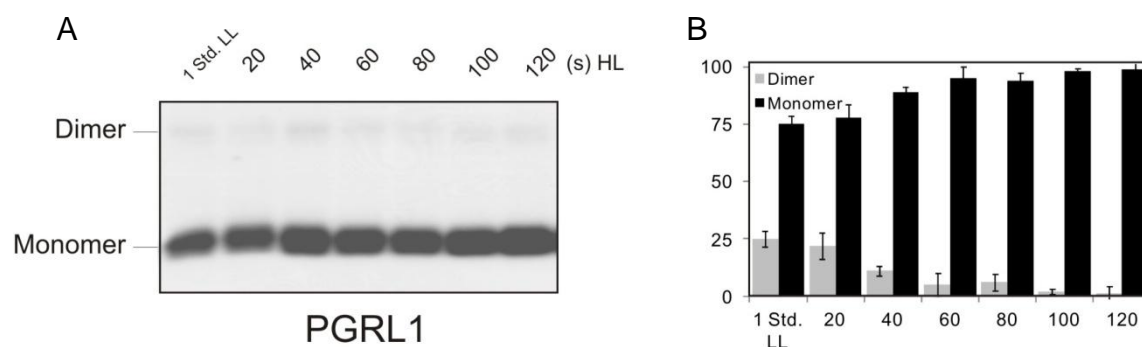


Abb. 34: Veränderungen des PGRL1-Monomer/Dimer-Verhältnisse durch Hochlichtexposition

Blätter von WT-Pflanzen wurden nach 1-stündiger Belichtung mit Licht einer Stärke von $80 \mu\text{mol Photonen m}^{-1}\text{s}^{-1}$ (1 Std. LL) mit Hochlicht (HL) einer Stärke von $2000 \mu\text{mol Photonen m}^{-1}\text{s}^{-1}$ belichtet. Nach jeweils 20 Sek. über eine Dauer von 2 Min. wurden

Blätter in flüssigem N₂ eingefroren. Aus den homogenisierten gefrorenen Blättern wurden im Dunkeln Thylakoide isoliert und mittels Zugabe von 0,01% DOC, 0,1M HCl und 80% Aceton für 1h bei -20°C präzipitiert. Die Proteine wurden in 2xLämmli-Puffer ohne DTT solubilisiert und zu je 30 µg Protein mittels SDS-PAGE getrennt. Nach Westerntransfer wurde PGRL1 mit Antikörpern detektiert (A). Die Anteile von monomerem und dimerem PGRL1 wurde quantifiziert und gegen die Zeit aufgetragen (B).

-PGRL1 und die Rolle von PGR5

Zuletzt sollte die Beteiligung von PGR5 an der Reduktion der intramolekularen Disulfidbrücken von PGRL1 *in vivo* untersucht werden. Dazu wurde der Thiol/Disulfid-Status von PGRL1 beim Übergang vom Dunkeln zu Licht analog zu Abb. 33 A, immunologisch in *pgr5*-Mutanten untersucht (Abb. 35).

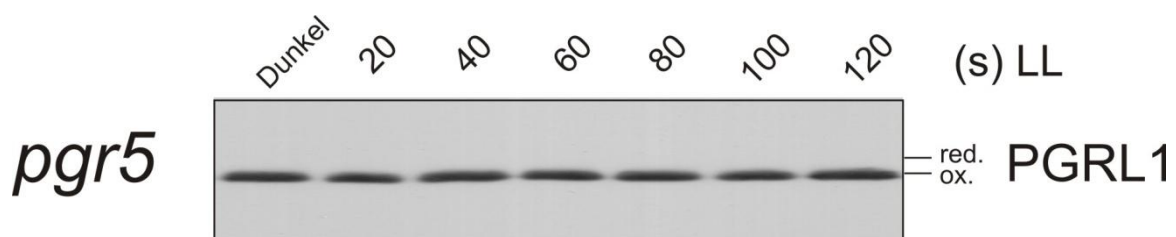


Abb. 35: in *pgr5*-Mutanten akkumulieren PGRL1-Monomere vorwiegend oxidiert

Blätter von *pgr5*-Pflanzen wurden vor oder nach Belichtung beim Übergang vom Dunkeln ins Licht (Dunkel)→(LL) nach jeweils 20 Sek. über eine Dauer von 2 Min. in flüssigem N₂ eingefroren. Aus den homogenisierten gefrorenen Blättern wurden im Dunkeln Thylakoide isoliert und mittels Zugabe von 0,01% DOC, 0,1 M HCl und 80% Aceton für 1h bei -20°C präzipitiert. Die Proteine wurden in 2x Lämmli-Puffer ohne DTT solubilisiert und zu je 50 µg Protein mittels SDS-PAGE getrennt. Nach Westerntransfer wurde PGRL1 mit Antikörpern detektiert.

Während in WT-Thylakoiden die Belichtungsübergänge den PGRL1-Redoxzustand sowohl reduktiv als auch oxidativ beeinflussten (Abb. 33 A), lag PGRL1 in Thylakoidpräparationen von *pgr5*-Mutanten vorwiegend in der oxidierten Form vor (Abb. 35). Nach längerer Exposition konnten auch reduzierte PGRL1-Proteine detektiert werden. Die Rolle von PGR5 bei der Reduktion von PGRL1 konnte somit auch *in vivo* bestätigt werden.

4. Diskussion

4.1 Interaktionspartner und Aufbau des PGR5/PGRL1-Komplexes

In vitro- und *in vivo*-Messungen der Thylakoidmembrankapazität für zyklischen Elektronentransport zeigten einen Verlust des Antimycin A-sensitiven Prozesses in *pgr5*- und *pgr11ab*-Mutanten (Munekage et al., 2002, Munekage et al., 2004, DalCorso et al., 2008). Aufgrund der PGRL1-Abhängigkeit der PGR5-Proteinakkumulation in der Thylakoidmembran wurde ein gemeinsamer Komplex postuliert, der direkt oder indirekt am zyklischen Elektronentransport (ZET) beteiligt ist. Eine direkte Interaktion beider Proteine konnte durch Interaktionsstudien in Hefe bestätigt werden (DalCorso et al., 2008). Ein aus PGR5 und PGRL1 bestehender Komplex konnte jedoch bislang *in planta* nicht nachgewiesen werden. Weitere Hefe-Interaktionsstudien von PGRL1 mit putativen Komponenten des Antimycin A-sensitiven ZETs zeigten eine Interaktion von PGRL1 mit der PS I-Untereinheit PsaD, Ferredoxin, FNR und Cytochrom b_6 des Cyt b_6f -Komplexes. Cytochrom b_6 , eine stromal exponierte Untereinheit des Cyt b_6f -Komplexes, wurde als Reinjektionsort für Elektronen postuliert (DalCorso et al., 2008). Um die Interaktion von PGRL1 mit Cytochrom b_6 und PGR5 *in planta* zu bestätigen und zudem die Komposition des PGRL1-Komplexes zu untersuchen, wurde eine Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP) von PGRL1 aus solubilisierten Thylakoidmembranen unter Verwendung von PGRL1-spezifischen Antikörpern durchgeführt (siehe Abschnitt 3.3). Damit konnte sowohl PGR5 als auch Cytochrom b_6 als Interaktionspartner von PGRL1 *in planta* bestätigt werden (Abb. 6). Ko-IP unter nicht reduzierenden Bedingungen zeigten, dass PGR5 Thiol-vermittelt mit PGRL1-Monomeren einen heterodimeren Komplex über die beiden CxxC-Motive von PGRL1 ausbildet (Abb. 6, 22). Die PS I-Untereinheiten PsaF und Lhca3 sowie das Rieske-Protein des Cyt b_6f Komplexes konnten massenspektrometrisch als Interaktionspartner identifiziert werden (Tabelle 5). Die Interaktion von PGRL1 mit FNR und Ferredoxin konnte dagegen nicht bestätigt werden. Auch weitere potentielle unbekannte Interaktionspartner von PGRL1 konnten nach Ko-IP massenspektrometrisch nicht identifiziert werden. Somit unterstützen die Ko-IP-Ergebnisse die von DalCorso et al., 2008 postulierte Interaktion von PGRL1/PGR5-Komplexen mit dem PS I und dem Cyt b_6f -Komplex. PsaF und Lhca3 befinden sich in ähnlichen Bereichen des PS I. Da sie zudem wie

PGRL1 und PGR5 in stromal orientierten Membranbereichen zugänglich sind, könnte es sich hierbei um die Andockstelle des PGR5/PGRL1-Komplexes an PS I handeln. Die Interaktion von PGRL1 mit Cytochrom b_6 liefert ein Indiz für den Ort der Elektronenreinjektion des ZETs in die thylakoidlokalisierte Elektronentransportkette. Dass keine neuen Interaktionspartner von PGRL1 identifiziert werden konnten, deutet darauf hin, dass PGR5/PGRL1-Komplexe die "mature" Form des Komplexes darstellen, der Elektronen von PSI auf Cyt b_6f -Komplex überträgt. Die partielle Rekonstitution von ZET durch Zugabe von rekombinanten PGRL1/PGR5-Komplexen zu osmotisch aufgebrochenen Chloroplasten von *pgr1ab*-Mutanten unterstützt diese Annahme (Abb. 23 A).

4.2 Die Bedeutung des Thiol/Disulfid-Status von PGRL1

Das Fehlen von Homologien zu annotierten Aminosäuresequenzmotiven in Proteindatenbanken führte zur Klassifizierung von PGR5 und PGRL1 als Proteine unbekannter Funktion. Dennoch konnte an Hand von multiplen Sequenzvergleichen verschiedener photosynthetisierender Eukaryoten zumindest für PGRL1 eine charakteristische konservierte Cysteinstruktur identifiziert werden (Abb. 3). Diese beinhaltet zwei stromal lokalisierte CxxC-Motive nahe dem C-Terminus sowie zwei einzeln angeordnete hoch konservierte Cysteine im N-terminalen Bereich der beiden Transmembranhelices von PGRL1.

Die Funktion der PGRL1-Cysteinstruktur wurde zunächst *in planta* mittels Diagonal-SDS-PAGE untersucht (Abb. 4). So konnte gezeigt werden, dass PGRL1 sowohl intra- als auch intermolekulare Disulfidbrücken ausbildet (Abb. 4).

Ko-IP aus PGRL1A-HA/PGRL1-Thylakoiden mit HA-Antikörpern und deren Analyse unter reduzierenden Bedingungen mit PGRL1-spezifischen Antikörpern zeigte die Funktion der intermolekularen Disulfide in der Bildung von PGRL1-Homodimeren auf (Abb. 7). Intermolekulare Disulfide von PGRL1 führten zudem nach Ko-IP von PGRL1 aus WT-Thylakoiden unter Verwendung von PGRL1-spezifischen Antikörpern und deren Analyse unter nicht reduzierenden Bedingungen zur Identifikation von PGR5/PGRL1-Heterodimeren. Durch Cystein-Serin-Mutagenese von PGRL1 sowie heterologe Expression in *E. coli* konnten diese Ergebnisse erneut bestätigt und den jeweiligen Cysteinen spezifische Funktionen zugeordnet werden. Hierbei konnte die Ausbildung von intra- und intermolekularen Disulfidbrücken

eindeutig den Cysteinen A und B zugeschrieben werden (Abb. 18). Mutationen einzelner Cysteine führten jedoch auch zu artifizierlicher intermolekularer Disulfidbrückenbildung, wie die Mutation von C_AS-recPGRL1 und C_BS-recPGRL1 im Fall der Homodimerisierung von PGRL1 zeigte. Im Vergleich zu den beobachteten Molekularmassenunterschieden des PGRL1-Homodimers in C_AS-recPGRL1- und C_BS-recPGRL1-Einzelaustauschvarianten, konnte in C_{AB}S-recPGRL1-Doppelmutanten keine Dimerisierung mehr beobachtet werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung der intermolekularen Disulfidbrücke unter PGRL1-Homodimerisierung durch gemischte Disulfide aus Cystein A und B aus zwei unterschiedlichen PGRL1-Proteinen erfolgt (Abb. 18). Die Funktion der CxxC-Motive bei der Assemblierung von PGR5 sowie eines Ko-Faktors konnte erst unter Verwendung von Redoxitrationen und unter Verwendung der nativen Aufreinigung von heterolog exprimierten Cystein/Serin-mutagenisierten PGRL1-Proteinen ermittelt werden (Abb. 17 A, C, 19 B, 21, 22).

4.3 PGRL1, ein Eisen-Schwefel-Protein

PGRL1 verfügt über zwei CxxC-Motive. Die beschriebenen Funktionen von CxxC-Motiven sehr vielseitig. Einerseits können sie wie im Fall von Thioredoxinen an der Regulation von Proteinfunktionen durch Reduktion von Disulfidbrücken oder Oxidation von Thiolen beteiligt sein (Buchanan und Balmer, 2005). Dahingehend ist das in PGRL1 auftretende CPNC-Motiv auch in einer atypischen Thioredoxin-Familie aus Bakterien bekannt (Kreft et al., 2009). Andererseits sind CxxC-Motive als direkte Elektronenüberträger in Elektronentransportketten und Oxidoreduktasemechanismen beschrieben (Inaba et al., 2002). Häufig erfolgt die Koordination von Metallen über Cysteine einer CxxC-Sequenz (Walters et al., 2009). Desweiteren wurden CPNC-Motive wie in PGRL1 sowie andere CxxC-Motive als Koordinatoren von Ko-Faktoren wie Eisen-Schwefel-Clustern oder als Eisenspeicher- oder -transporter-Motive beschrieben (Nishio et al., 2000, Briat et al., 2010). Die rotbraune Färbung der PGRL1-Proteinlösung nach heterologer Expression in *E. coli* und nativer Aufreinigung unterstützt die These einer Funktion von PGRL1-CxxC-Motiven in der Ko-Faktor-Bindung (Abb. 17 C). Die Absorptionsspektren von PGRL1 und seinen Cystein-Serin-Austauschmutanten deutet auf die Koordination eines Eisen-Schwefel-Clusters hin (Abb. 17 A, B). Durch den Nachweis von Fe²⁺ und S²⁻ in PGRL1-

Proteinlösungen bestätigte sich diese Annahme. Proteine koordinieren Eisen-Schwefel-Verbindungen in verschiedenster Stöchiometrie. Bei den am häufigsten charakterisierten Formen handelt es sich um [2Fe-2S]- und [4Fe-4S]-Konformationen (Walters et al., 2009, Florin et al., 2001, Sainz et al., 2006, Boxhammer et al. 2008). Fe^{2+} und S^{2-} liegen in diesen Konformationen in äquimolaren Mengen vor. Dies konnte auch für rekombinantes WT-PGRL1 bestätigt werden (Abb. 17 D). Der Nachweis von geringeren Mengen an Eisen und Sulfid gegenüber der eingesetzten Proteing Gesamtmenge deutete in WT-PGRL1-Präparationen jedoch an, dass nicht alle rekombinanten WT-PGRL1-Proteine über diesen Ko-Faktor verfügen. Eine Ursache hierfür kann in der hohen Sensitivität von Eisen-Schwefel-Proteinen gegenüber Sauerstoff gesehen werden (Imlay et al., 2006, Imlay et al., 2008). Eine Degradation führt dabei ausgehend von [4Fe-4S]- häufig zur Bildung von [2Fe-2S]-Verbindungen welche eine höhere Stabilität gegenüber Sauerstoff besitzen (Jervis et al., 2009). Eine Unterscheidung von [4Fe-4S]- bzw. [2Fe-2S]-Clustern kann mittels spektroskopischen Analysen getroffen werden. Dabei zeigen [4Fe-4S]-Cluster neben der Absorption ihres Trägerproteins bei 290 nm ein Absorptionsmaximum bei 420 nm. Die Absorptionsmaxima von [2Fe-2S]-Clustern sind dagegen geringfügig in den kurzwelligen Bereich verschoben. Bei PGRL1 konnte das typische Absorptionsspektrum von [4Fe-4S]-Clustern beobachtet werden. Zusätzlich kann das Fehlen von einem oder mehreren stabilisierenden Interaktionspartnern oder Liganden zur verringerten Kofaktor-Bindung beitragen. So führte die Mutagenese der PGRL1-Cysteine C und D zum kompletten Verlust des Ko-Faktors (Abb. 17 B). Die in PGRL1 konservierten PC_cPNC_d -Motive sind als Sequenzmotive zur Eisen-Schwefel-Cluster-Assemblierung bekannt (Sheftel et al., 2009). Deren Mutation trägt folglich zum Verlust des Assemblierungsvermögens für Eisen-Schwefel-Ko-Faktoren bei. Die Mutation stabilisierender Liganden kann mitunter durch andere Aminosäuren substituiert werden oder führt zum vollständigen Verlust des Proteins (Kauppi et al. 1998, Zhou, 1997, Binda et al., 1998, Davidson et al., 1997, Gatti et al., 1989). So zeigte die Quantifizierung der Eisen-Schwefel-Menge pro Protein bei Mutation der Cysteine E und F im Vergleich zu WT-PGRL1 eine gesteigerte Koordination des Ko-Faktors (Abb. 17 C). Ergänzend zeigen spektroskopische Untersuchungen von $\text{C}_{EF}\text{S-recPGRL1}$ eine Verschiebung des Absorptionsmaximums in den kurzwelligen Bereich und somit eine gesteigerte Akkumulation von [2Fe-2S]-Verbindungen (Abb. 17 B). Den Cysteinen kann demzufolge eine Funktion als unterstützende Liganden

der Eisen-Schwefel-Cluster-Assemblierung zugeschrieben werden. Eine vermehrte Akkumulation von [2Fe-2S]-Clustern, welche gegenüber Sauerstoff eine höhere Stabilität aufweisen, würde die gesteigerte Ko-Faktor-Bindung in C_{EF}S-recPGRL1 Proteinen erklären (Abb. 17 B). Die Manipulation stabilisierender Liganden trägt jedoch häufig zu Veränderungen des Redoxpotenzials von Ko-Faktoren bei (Banci et al., 1996). Mutationen welche zu konformationellen Veränderungen führen, können eine Enzym Substrat-Interaktion zudem negativ beeinflussen (Banci et al., 1996, Liebl et al., 1997, Merbitz-Zahradnik et al., 2003, Guergova-Kuras et al., 2000). Da sich durch Koinkubation von PGRL1 mit PGR5 das Redoxpotenzial der PGRL1-CxxC-Motive in den elektronegativeren Bereich verschob, ist anzunehmen, dass PGR5 an der Koordination der Eisen-Schwefel-Cluster beteiligt ist (Abb. 21). Die PGR5-abhängige Reduktion von PGRL1 durch Ferredoxin unterstützte diese Annahme zusätzlich (Abb. 23, 31, 32). Da PGR5 auch mit C_{CD}S-recPGRL1 Proteinen interagiert, die keinen Ko-Faktor mehr besitzen, könnte die Bindung von PGR5 auch zu einer Konformationsänderung von PGRL1 beitragen, die zu einem elektronegativeren Redoxpotenzial von PGRL1 führt. Ein Einfluss der Tertiärstruktur von PGRL1 auf die Ko-Faktor-Assemblierung in PGRL1-Proteinen wurde zudem bei PGRL1-Proteinen ohne intramolekulare Disulfide (recC_{AB}S-recPGRL1) beobachtet (Abb. 17 C). Demzufolge scheint die Konformation von PGRL1 für eine Interaktion mit PGR5 durchaus eine Rolle zu spielen, da in PGRL1-Proteinen ohne intramolekulare Disulfidbrücken eine geringere Menge von PGR5 gebunden wird. Dies könnte auf eine transiente Interaktion von PGRL1 mit PGR5 hindeuten (Abb. 22).

4.4 Der PGR5/PGRL1-Komplex als Oxidoreduktase im zyklischen Elektronentransport um Photosystem I

Phylogenetisch leiten sich Plastiden von cyanobakteriellen Vorläufern ab, welche die Komponenten photosynthetischer und respiratorischer Elektronentransportketten in einem gemeinsamen Membransystem vereinen. Nach der Kompartimentierung von respiratorischer und photosynthetischer Elektronentransportkette erfolgte neben der Translokation von Genen endosymbiotischer Genome in den Nukleus auch die Entstehung neuer Genfunktionen (Leister et al., 2003). PGRL1 und PGR5 sind auf Grund fehlender Homologe in prokaryotischen Spezies ein Beispiel für nukleär

kodierte, genetische Innovationen zur Optimierung photosynthetischer Aktivität. Unter Annahme von PGRL1/PGR5-Komplexen als Ferrdeoxin-Plastochinon-Oxidoreduktase (FQR), zeigen Vergleiche mit Proteinen bzw. Proteinkomplexen ähnlicher Funktion in Mitochondrien sowie Prokaryoten die Voraussetzungen für den postulierten Oxidoreduktasemechanismus an. So besitzt beispielsweise das cyanobakterienspezifische Membranprotein FesM neben einer cAMP-Bindedomäne, eine NTRC-Erkennungssequenz, ein Redoxsensormotiv und die Bindungsfähigkeit zweier Eisen-Schwefel-Ko-Faktoren über CxxC-Motive. In *Synechocystis* führt das Fehlen des Proteins zu einem Verlust von ZET um PS I sowie Defekten in der Respiration (Xu et al., 2005). Der mitochondrielle und cyanobakterielle NDH-Komplex weist dagegen einen Thiol/Disulfid-abhängigen Ubichinon-Reduktase-Mechanismus unter Beteiligung von mehreren Eisen-Schwefel-Clustern auf (Günebaut et al., 1997, Nixon et al., 2004). Im Allgemeinen erfolgt die Reduktion von Chinonen ausgehend von verschiedensten Elektronendonoren (H_2O , H_2S , NADPH/H^+ , FADH_2) meist enzymatisch (Müh et al., 2011, Ralph et al., 2011, Griesbeck et al., 2002, Marcia et al., 2009, Inaba et al., 2002) (Abb. 38). In vielen Fällen basiert der Mechanismus der Chinonreduktion auf Thiol-Additionen nach dem Prinzip von Michael (Li et al., 2005, Hay et al., 2007) (Abb.36). Thiolat-Anionen agieren dabei als Nucleophile und tragen durch Thiol-Addition an den aromatischen Ring zur Reduktion der Phenolderivate bei. Die vollständige Reduktion eines Chinon-Moleküls erfordert dabei zwei Elektronen. Nach Elektronenabgabe werden die beteiligten Thiolat-Anionen zu intra- bzw. intermolekularen Disulfidbrücken reoxidiert (Inaba et al., 2006, Malpica et al., 2004). Bei Chinonüberschuss kann es zu einer stabilen Addition kommen. Diese kann durch nukleophilen Angriff eines weiteren Thiolat-Anions aufgehoben werden und führt in manchen Fällen zur Bildung von Homodimeren (Li et al., 2005, Malpica et al., 2004).

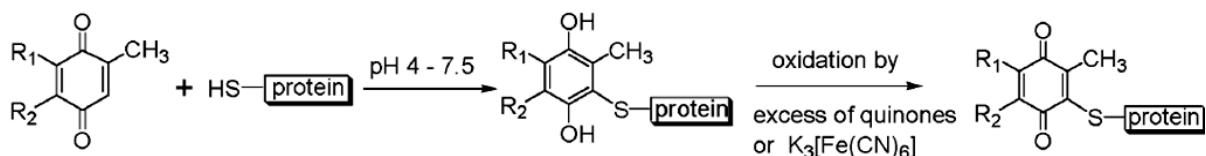


Abb. 36: Thiol-Addition nach Michael (aus Li et al., 2005)

Der nucleophile Angriff von Thiolat-Anionen auf Chinone führt zur Übertragung der negativen Ladung von Thiolat-Anionen auf das delokalisierte π -Elektronensystem des Chinons unter Bildung einer kovalenten Thioetherbindung. Dies bewirkt eine Kondensierung der negativen Ladung an den Sauerstoffatomen der Chinone. Durch Chinonüberschuss oder $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ kommt es zur intermolekularen Ladungsübertragung. Dies führt zur stabilen Addition des Thiols unter Bildung eines Chinon-Cysteinyll-Addukts.

Ein analoger Mechanismus konnte für PGRL1 in Bezug auf DMBQ (Chinon-Analogon) demonstriert werden (Abb. 28). Die gezeigte *in vitro* Chinonreduktaseaktivität von PGRL1 war dabei PGR5-unabhängig und bewirkte eine Chinonreduktion unter Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke durch die Cysteine A und B. Die Chinonreduktion konnte durch Zugabe von Antimycin A inhibiert werden (Abb. 29). Antimycin A ist ein Chinon-Analogon und besetzt in Mitochondrien die Qi-Chinonbindestelle (Qi) des Cytochrom-bc1-Komplexes (Bolgunas et al. 2006). Eine Blockade der Chinonbindestelle von PGRL1 kann damit die Antimycin A-Sensitivität bei PGRL1-abhängigem zyklischen Elektronentransport erklären.

Biochemische Prozesse, die über den Redoxzustand des Chinon-Pools reguliert werden, können durch Disulfidbrückenbildung oder -reduktion zur Aktivierung oder Inaktivierung enzymatischer Aktivität beitragen (Malpica et al., 2004). Eine Regulation durch Disulfidreduktion wird meist über Regulatorproteine wie Thioredoxine, Peroxiredoxine oder Glutaredoxine vermittelt (Copper et al., 2011, Rhee et al., 2011, Klomsiri et al., 2011, Balmer et al., 2003, Motohashi et al., 2001, Deneke et al., 2000). Unter Berücksichtigung des hohen Grades an Reversibilität von Thiol/Disulfid-Übergängen können Elektronentransportketten postuliert werden, welche sich von den bekannten Elektronentransportketten lediglich durch die Häufigkeit ihres Auftretens bzw. ihre Reaktionsgeschwindigkeit unterscheiden. Prinzipiell werden alle Proteine, die von Thioredoxinen reduziert werden auch indirekt von Ferredoxin reduziert. Dieses Prinzip liegt auch dem PGR5-unabhängigen PGRL1-Thiol/Disulfid-Oxidoreduktasemechanismus zu Grunde (siehe Abschnitt 4.6). Wie im Fall von PGRL1 gezeigt werden konnte, kann eine Reduktion auch vermittelt direkt über einen Ko-Faktor vermittelt werden. Dieser kann sowohl am Anfang als auch am Ende einer auf Thiol/Disulfidveränderungen-basierenden Elektronentransportkette stehen (Bader et al., 1999, Bardwell et al., 2004, Bien et al., 2010). Häufig sind Ko-Faktoren wie Eisen-Schwefel-Cluster, Flavinadenindinucleotide (FAD) sowie Flavinmononucleotide (FMN) involviert, die ihrerseits von weiteren Elektronendonoren wie NAD(P)H, Ferredoxin oder Metaboliten reduziert werden (Walter et al. 2009, Bardwell, 2004, Cho, 2011). In PGRL1 erfolgt die Reduktion der intramolekularen Disulfidbrücken dabei analog zum Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase-Mechanismus durch einen Eisen-Schwefel-Cluster, der zur Reduktion der Disulfide beiträgt (Abb. 31, 32). Ein hypothetisches

Modell von PGR5/PGRL1-Heterodimeren in ihrer Funktion als FQR ist in Abb. 37 dargestellt.

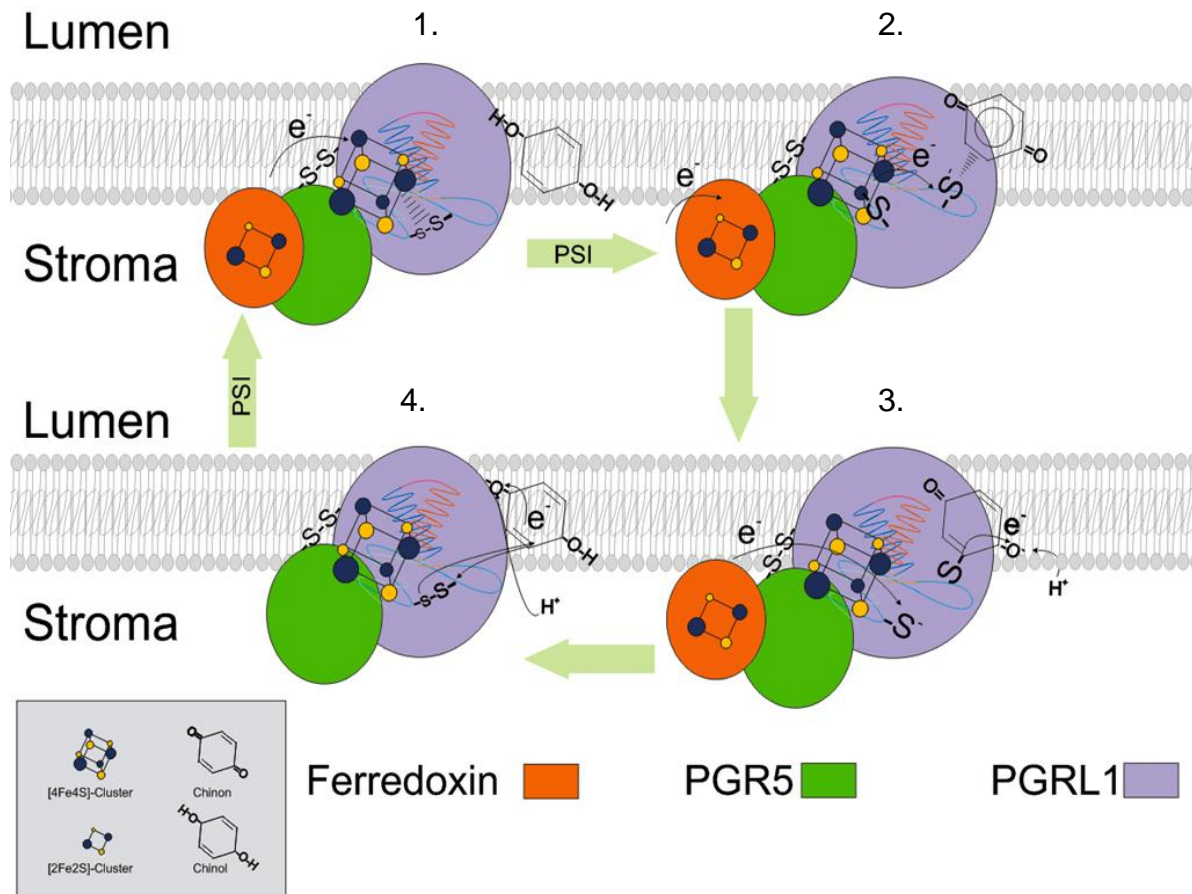


Abb. 37: Modell von PGR5/PGRL1-abhängigen zyklichen Elektronentransport um Photosystem I

1. Durch PSI reduziertes Ferredoxin überträgt durch PGR5 vermittelt ein Elektron auf den [4Fe-4S]-Cluster von PGRL1. Die Reduktion des [4Fe-4S]-Clusters bewirkt die Spaltung intramolekularer Disulfidbrücken von PGRL1 unter Bildung von Thiolat-Anionen.
2. Thiolat-Anionen beginnen einen nukleophilen Angriff auf oxidiertes Chinon.
3. Durch Thiol-Addition erfolgt die Reduktion von Chinon, während Ferredoxin ein weiteres Elektron auf den [4Fe-4S]-Cluster von PGRL1 überträgt.
4. Die Weiterleitung des Elektrons auf Chinon führt zu dessen vollständiger Reduktion unter Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke bei PGRL1.

Dabei erhält der [4Fe-4S]-Cluster von PGRL1 seine Elektronen von durch PS I reduziertem Ferredoxin. Die Reduktion ist PGR5-abhängig (Abb. 31, 32, 35), welches dabei vermutlich sowohl über intermolekulare Disulfide als auch über den Eisen-Schwefel-Ko-Faktor mit PGRL1 assembliert (Abb. 22). Eine indirekte Ferredoxinoxidation durch Elektronenübertragung von Ferredoxin auf PGR5 und danach auf PGRL1 kann dabei nicht ausgeschlossen werden. erfolgt Die reduktive Spaltung der intramolekularen Disulfidbrücke von PGRL1 erfolgt anschließend

vermittelt durch den reduzierten [4Fe-4S]-Cluster (Cystein A und B, Abb. 31, 32). Die durch Reduktion freigesetzten Thiolat-Anionen von PGRL1 reagieren direkt mit Chinon (Abb. 28, 29, 30). Da Eisen-Schwefel-Verbindungen Ein-Elektronen-Überträger darstellen, erfolgt die Reduktion von Chinon in zwei Schritten. Zur vollständigen Reduktion von PGRL1 sind folglich ebenfalls zwei Elektronen nötig. Diese werden durch weiteres reduziertes Ferredoxin bereitgestellt (Abb. 37). Nach vollständiger Reduktion eines Chinon-Moleküls erfolgt unter Reoxidation der PGRL1-Cysteine A und B die Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke (Abb. 30).

Eine fehlende experimentelle Darstellung der gesamten Reaktionskette (von NADPH zum Chinon) durch PGRL1/PGR5-Komplexe begründet sich in der Kompatibilität von Elektronentransportketten (Abb. 27). Dabei spielt die räumliche Anordnung der Komponenten eine entscheidende Rolle. Es konnte beispielsweise die Reduktion von DMBQ ausschließlich durch reduziertes PGRL1 erfolgen, jedoch nicht durch reduzierte FNR1 (Abb. 27 D). Die Reduktion von PGRL1 durch Ferredoxin konnte dagegen nur in Anwesenheit von PGR5 ablaufen (Abb. 31, 32). *In vitro* konnte Chinon jedoch auch direkt durch Ferredoxin reduziert werden. Unter natürlichen Bedingungen liegt dieses aber innerhalb der Thylakoidmembran vor und wird somit gegenüber Ferredoxin abgeschirmt. Da die alleinige Zugabe von Ferredoxin und NADPH zu aufgebrochenen Chloroplasten von *pgr5-*, *pgr11ab-* und *crr2-1/pgr5-* Mutanten nicht zu einer gesteigerten Aktivität von Antimycin A-abhängigem zyklischen Elektronentransport beiträgt (Munekage et al., 2004), muss demzufolge die Reinjektion von Elektronen ausgehend von reduziertem Ferredoxin über einen zusätzlichen Faktor vermittelt werden, die FQR.

4.5 Die Rolle von PGR5/PGRL1-Komplexen und der Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase (FNR) im zyklischen Elektronentransport

Es wurden vier mögliche Modelle für zyklischen Elektronentransport um Photosystem I postuliert (DalCorso et al., 2008). In allen Modellen spielt die Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase (FNR) eine entscheidende Rolle. Eine Funktion der FNR bei der Elektronenübertragung auf die Thylakoidelektronentransportkette wurde postuliert (Zhang et al., 2001, Hanke et al. 2008, Lintala et al. 2007, Lintala et al., 2009, Breyton et al., 2006). Die Ko-Migration von FNR mit dem Cytochrom *b₆f*-Komplex in BN-Gelen diente dabei zur Unterstützung dieser Hypothese (Zhang et al., 2001,

Breyton et al., 2006). Ein Beweis der essentiellen Funktion von FNR im zyklischen Elektronentransport wurde jedoch bislang in Pflanzen nicht gezeigt. Eine Rolle der FNR im zyklischen Elektronentransport wird zudem durch die Entdeckung eines neuen PSI und Cyt b_6f -Komplex beinhaltenden Superkomplexes in *Chlamydomonas reinhardtii* unterstützt, der zyklischen Elektronentransport vermittelt (Iwai et al. 2010). Die immunologische Untersuchung zeigt neben dem Nachweis der Polypeptide von PS I und des Cyt b_6f -Komplexes ebenfalls FNR und Ferredoxin. Zusammen mit dem Superkomplex wurde auch PGRL1 nachgewiesen, jedoch nicht dessen Interaktionspartner PGR5 (Iwai et al., 2010). In *Arabidopsis thaliana* zeigen *pgr5*- und *pgr1ab*-Mutanten jedoch identische Phänotypen des zyklischen Elektronentransports (Munekage et al., 2002, Dalcorso et al., 2008). *In vitro*-Messungen des zyklischen Elektronentransportes in osmotisch aufgebrochenen Chloroplasten von *fnr1*- sowie *fnr2*-Mutanten zeigten zwar einen Verlust der FQR-Aktivität, der durch exogene Zugabe rekombinanter FNR1 vollständig rekonstituiert werden konnte (Abb. 24, 25). In *pgr1ab*- und *pgr5*-Mutanten konnte jedoch keine Steigerung der Aktivität von zyklischem Elektronentransport durch exogene Zugabe von FNR erreicht werden. Dies geschah nur unter Zugabe von PGRL1 und PGR5 (Abb. 23). Folglich stellen FNR und PGRL1/PGR5-Komplexe zwei unabhängige Komponenten innerhalb des zyklischen Elektronentransportes dar (Abb. 23, 25). Die Richtung des Elektronentransports von NADPH zu reduziertem Chinon im zyklischen Elektronentransport konnte durch *in vitro*-Assays aufgeklärt werden (Abb. 23, 27-32). Es zeigte sich dabei, dass eine Reinjektion von Elektronen in den Plastochinonpool zwar die FNR *in vitro* benötigt aber nicht, wie zuvor postuliert, für die direkte Reduktion von Plastochinon oder Cytochromen, sondern in reverser Aktion für die Reduktion von Ferredoxin mit Elektronen von NADPH. Da reduziertem Ferredoxin *in vivo* durch PS I bereitgestellt wird, stellt sich die Frage, ob die FNR wirklich am zyklischen Elektronentransport beteiligt ist. *In vivo*-Messungen des transienten NPQ's sowie anderer photosynthetischer Parameter in *fnr1*- bzw. *fnr2*-Mutanten lieferten keine Indizien für Defekte im Antimycin A-sensitiven zyklischen Elektronentransport (Abb. 24, Lintala et al., 2009). Von den beiden in photosynthetischen Geweben auftretenden Isoformen der FNR stellt FNR1 die membranassoziierte Form dar. Über das Protein TROL (Konnektein) sowie in ähnlicher Weise durch Tic62, erfolgt vermittelt über ein FNR-Membran-Rekrutierungs-Motiv (FNR-MRM) die Bindung der zweiten Isoform, FNR2 (Juric'et

al., 2009, Alte et al., 2010, Mulo 2011). Das Fehlen von FNR1 führt daher zu einem vollständigen Verlust der Membranassoziation beider Isoformen (Lintala et al., 2007, Lintala et al., 2009). Ein ähnlicher Effekt konnte auch in *tic62*-Mutanten gezeigt werden (Benz et al., 2010). Die membranassoziierte FNR als Elektronenreinjektionsstelle für zyklischen Elektronentransport erscheint deshalb unwahrscheinlich. Ebenso trifft dies auf den Superkomplex aus PS I und dem Cyt b_6f -Komplex sowie postulierter FNR/Cyt b_6f -Komplexe zu.

4.6 Dimerisierung von PGRL1 und Regulation von PGR5/PGRL1-abhängigem zyklischen Elektronentransport

In vielen Fällen haben Veränderungen des Thiol/Disulfid-Status von Proteinen (intramolekulare Disulfide) oder Proteinkomplexen (intermolekulare Disulfide) regulatorische Funktion (Moreno et al., 2008, Balmer et al., 2001, Tiessen et al., 2002). Die in Abb. 7 gezeigte Thiol/Disulfid-abhängige intermolekulare Disulfidbildung (Homodimerisierung) wurde ebenfalls auf regulatorische Aspekte hin untersucht (Abb. 8, 12, 13, 14). Das Ergebnis der Messung von zyklischem Elektronentransport in osmotisch aufgebrochenen Chloroplasten von WT und *pgr1ab*-Mutanten nach Zugabe von DTT lieferte aufgrund der Aktivitätsmodulation von ZET die Grundlage für eine mögliche Thioredoxin-Regulation (Abb. 8). Durch Thioredoxin-Affinitätschromatographie konnte eine Interaktion von PGRL1 mit Thioredoxinen der f- und m-Familie gezeigt werden (Abb. 11). Eine Redundanz der Mitglieder dieser beiden Thioredoxin-Familien ist bereits bekannt (Buchanan und Balmer, 2005). Die Inkompatibilität mit Thioredoxinen der h-Familie begründet sich vermutlich auf zwei Aspekte: (i) zum einen besitzen manche Thioredoxine der h-Familie positivere mittlere Redoxpotenziale als PGRL1 (Gelhaye et al., 2004, Montrichard et al., 2009), (ii) zum anderen handelt es sich bei dem verwendeten Thioredoxin h um ein Thioredoxinhybrid, das über ein charakteristisches CPGC-Motiv verfügt, dessen Wirkungsweise jedoch noch nicht bekannt ist. Die Auswirkungen von Thioredoxin f- und m- auf den PGRL1-Disulfid-Status konnten durch die Analyse der Cysteine A und B aufgeklärt werden. PGRL1-Dimere werden über gemischte Disulfide von Cystein A und B gebildet. Die Reduktion der intermolekularen Disulfidbrücken durch Thioredoxine führen daher zur Trennung beider Interaktionspartner und der Akkumulation ihrer reduzierten Monomere (Abb. 12). Da die Reoxidation von PGRL1-

Monomeren durch Chinonreduktion PGR5-unabhängig abläuft, ergibt sich daraus zudem eine Möglichkeit für eine PGR5-unabhängige Variante von zyklischem Elektronentransport unter Beteiligung von PGRL1. Abb. 38 verdeutlicht diese Theorie.

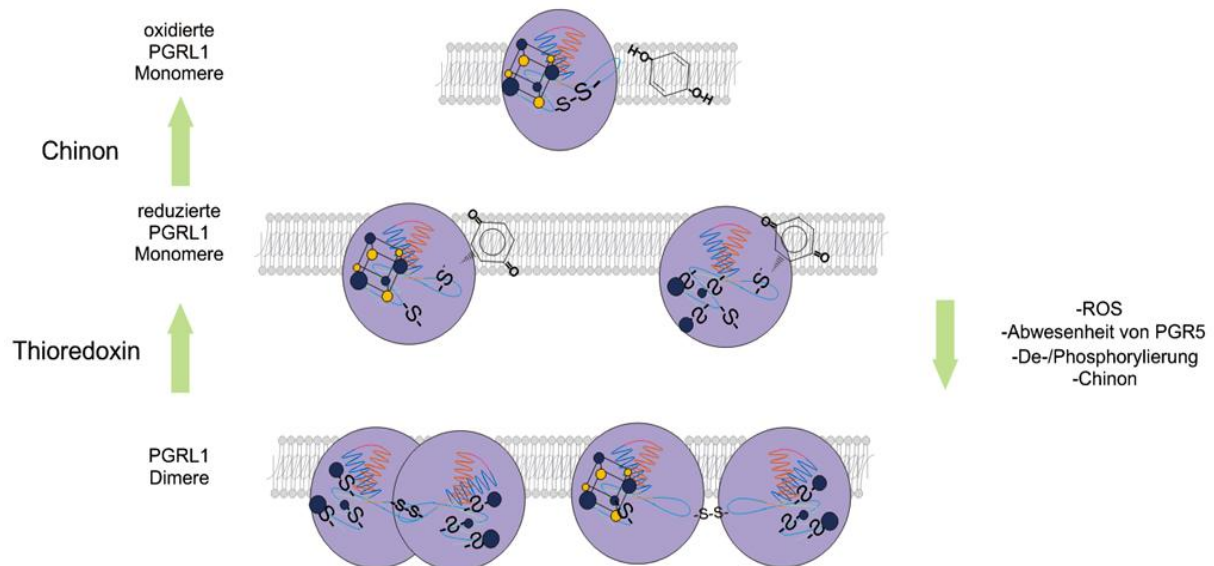


Abb. 38: Modell von PGR5-unabhängigen zyklischen Elektronentransport

PGRL1-Dimere werden durch Thioredoxine in Monomere ohne intramolekulare Disulfidbrücken überführt. Diese tragen PGR5-unabhängig zur Reduktion von Chinonen bei. Dabei erfolgt die Bildung intramolekularer Disulfide in PGRL1-Monomeren. Alternativ können reduzierte PGRL1 auch wieder zu PGRL1-Dimeren assemblieren. Mögliche Ursachen können die Abwesenheit von PGR5, reaktive Sauerstoff Spezies (ROS), überschüssiges Chinon oder Phosphorylierung darstellen.

Durch PS I-abhängige Reduktion von Ferredoxin erfolgt die reduktive Aktivierung von Thioredoxin über die Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase (FTR). Die reduktive Spaltung von PGRL1-Dimeren durch Thioredoxine führt sodann zur Akkumulation von reduzierten PGRL1-Monomeren. Durch Chinonreduktion vermittelte Reoxidation der Cysteine A und B unter Bildung von intra- oder intermolekularen Disulfiden werden Elektronen in die Elektronentransportkette der Thylakoidmembran reinjiziert. Die Kapazität der Thioredoxin-vermittelten und PGR5-unabhängigen Chinonreduktion hängt jedoch von der Menge an PGRL1-Homodimeren ab, da eine Reduktion intramolekularen Disulfiden von PGRL1-Monomeren nur unter Beteiligung von PGR5 erfolgen kann (Abb. 31, 34). Diese Hypothese liefert aber möglicherweise die Erklärung für die residuale Aktivität von zyklischem Elektronentransport von *pgr5/crr2-1*-Doppelmutanten unter Verwendung von P700-Messungen, dunkelrotem Licht und DCMU-Behandlung (Nandha et al. 2007). *pgr1ab/crr2-1*-Mutanten sollten dagegen keinen zyklischen Elektronentransport mehr aufweisen, wurden bislang

jedoch nicht untersucht. Da *pgr5*- und *pgr1ab*-Mutanten jedoch identische Phänotypen besitzen, scheint dieser Prozess eher eine untergeordnete Rolle zu spielen.

4.7 Elektronen-Reinjektion in die Thylakoidmembran

Eine wichtige Frage bei der Untersuchung von zyklischem Elektronentransport um Photosystem I befasst sich mit dem Ort der Elektronenreinjektion in die Elektronentransportkette der Thylakoidmembran. Postuliert wurden die Reinjektion über den Q-Zyklus des Cyt b_6f -Komplexes, ein Elektronenaustausch innerhalb eines Photosystem I/Cyt b_6f -Superkomplexes (Zhang et al., 2001, Breyton et al., 2006, Iwai et al., 2010) oder auch eine direkte Reduktion des membranintegralen Plastochinon-Pools (Lam et al., 1984, McCauley et al. 1987, Okegawa et al. 2005). Da mittels Ko-IP die Interaktion von Cytochrom b_6 mit PGRL1 und PGR5 gezeigt werden konnte, ist eine Reinjektion von Elektronen über Cytochrom b_6 naheliegend. Unter Annahme des Cytochrom b_6 vermittelten Q-Zyklus als Ort der Elektronenreinjektion werden drei weitere mögliche Reinjektionswege diskutiert. I. Die Reinjektion erfolgt über das atypische Häm-x. Dieses wird über Cytochrom b_6 koordiniert und gilt, basierend auf Untersuchungen von Kristallstrukturen auf Grund seiner stromalen Exposition, als idealer Reinjektionsort stromaler Redoxäquivalente (Zhang et al., 2004, Kurisu et al. 2003, Stroebel et al., 2003, Alric et al., 2005). II. Die partielle Reduktion von Chinonen durch Ferredoxin-abhängigen ZET erfolgt nahe des stromal lokalisierten Häm b_L der Cytochrome b_6 -Untereinheit unter Beteiligung von anionischen Semiquinonradikalen. Diese können sowohl durch Elektronenreinjektion, als auch durch Reduktion über Häm-Ko-Faktoren entstehen und werden durch ein weiteres Elektron des jeweils komplementären Reduktionspartners zu Chinolen reduziert (Joliot et al., 2006). III. Ein PS I-vermittelter Zwei-Elektronenübertragungsmechanismus verhindert durch direkte Reinjektion über den stromal orientierten Häm- b_n -Häm- c_n -Plastochinon-Weg die Entstehung von anionischen Semichinonradikalen (Bayman et al., 2006).

Für PGRL1 konnte mit Hilfe von heterolog exprimierten PGRL1-Proteinen ein Zwei-Elektronenübertragungsmechanismus gezeigt werden, welcher sowohl an freiem wie auch an Cytochrom b_6f -gebundenen Plastochinonen zu deren Reduktion beitragen würde (Abb. 28). Die Reduktion von Chinon erfolgt dabei jedoch vermittelt über Ein-

Elektronen-Überträger, den Eisen-Schwefel-Cluster von PGRL1 sowie von Ferredoxin (Abb. 31, 32). Somit könnte auch ein Ein-Elektronenmechanismus stattfinden. Ein Ein-Elektronenübertragungsmechanismus würde dabei jedoch die Bildung anionischer Semichinon ($PQ^{\cdot-}$)-Radikale innerhalb des Cyt b_6f -Komplexes bewirken. Diese konnten jedoch mit EPR im plastidären Cytochrom b_6f -Komplexen nicht nachgewiesen werden (Bayman et al. 2006). Dies spricht entweder für eine geringe Stabilität der Semiquinonradikale oder einen Zwei-Elektronenübertragungsmechanismus. Der Vorteil eines Zwei-Elektronenübertragungsmechanismus gegenüber eines Ein-Elektronenübertragungsmechanismus liegt in der Prävention der Bildung reaktiven Sauerstoffspezies sowie Superoxidationradikale durch Generierung reduktiver Semiquinonradikale in Ein-Elektronenmechanismen (Furbacher et al., 1989, Girvin et al., 1984, Baniulis et al. 2008).

5. Literaturverzeichnis

Albertsson, P. A quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane. *Trends in plant science* **6**, 349-58 (2001).

Alric, J., Lavergne, J. & Rappaport, F. Redox and ATP control of photosynthetic cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii* (l) aerobic conditions. *Biochimica et biophysica acta* **1797**, 44-51 (2010).

Alric, J., Pierre, Y., Picot, D., Lavergne, J. & Rappaport, F. Spectral and redox characterization of the heme ci of the cytochrome b6f complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 15860-5 (2005).

Alte, F. et al. Ferredoxin:NADPH oxidoreductase is recruited to thylakoids by binding to a polyproline type II helix in a pH-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 19260-5 (2010).

ARNON, D.I., ALLEN, M.B. & WHATLEY, F.R. Photosynthesis by isolated chloroplasts. *Nature* **174**, 394-6 (1954).

Arnon, D.I., Tagawa, K. & Tsujimoto, H.Y. Role of Ferredoxin in the Energy Conversion Process of Photosynthesis. *Science (New York, N.Y.)* **140**, 378 (1963).

Asada, K. The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 601–639 (1999).

Asada, K. The water–water cycle as alternative photon and electron sinks. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B.* **355**: 1419–1431 (2000).

Bach, R.D., Dmitrenko, O. & Thorpe, C. Mechanism of thiolate-disulfide interchange reactions in biochemistry. *The Journal of organic chemistry* **73**, 12-21 (2008).

Bader, M., Muse, W., Ballou, D.P., Gassner, C. & Bardwell, J.C. Oxidative protein folding is driven by the electron transport system. *Cell* **98**, 217-27 (1999).

Balmer, Y. et al. Oxidation-reduction and activation properties of chloroplast fructose 1,6-bisphosphatase with mutated regulatory site. *Biochemistry* **40**, 15444-50 (2001).

Balmer, Y. et al. Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 370-5 (2003).

Banci, L., Bertini, I., Gori Savellini, G. & Luchinat, C. Individual Reduction Potentials of the Iron Ions in Fe(2)S(2) and High-Potential Fe(4)S(4) Ferredoxins. *Inorganic chemistry* **35**, 4248-4253 (1996).

Baniulis, D., Yamashita, E., Zhang, H., Hasan, S.S. & Cramer, W.A. Structure-function of the cytochrome b6f complex. *Photochemistry and photobiology* **84**, 1349-58

Bardwell, J.C.A. The dance of disulfide formation. *Nature structural & molecular biology* **11**, 582-3 (2004).

Baymann, F., Giusti, F., Picot, D. & Nitschke, W. The ci/bH moiety in the b6f complex studied by EPR: a pair of strongly interacting hemes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 519-24 (2007).

Bendall, D.S., and Manasse, R.S. Cyclic photophosphorylation and electron transport. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1229**, 23-38 (1995).

Bennoun, P. The present model for chlororespiration. *Photosynthesis research* **73**, 273-7 (2002).

Benz, J.P., Lintala, M., Soll, J., Mulo, P. & Bölder, B. A new concept for ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase binding to plant thylakoids. *Trends in plant science* **15**, 608-13 (2010).

Bien, M. et al. Mitochondrial disulfide bond formation is driven by intersubunit electron transfer in Erv1 and proofread by glutathione. *Molecular cell* **37**, 516-28 (2010).

Binda, C., Coda, A., Aliverti, A., Zanetti, G. & Mattevi, A. Structure of the mutant E92K of [2Fe-2S] ferredoxin I from *Spinacia oleracea* at 1.7 Å resolution. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **54**, 1353-8 (1998).

Bolgunas, S., Clark, D.A., Hanna, W.S., Mauvais, P.A. & Pember, S.O. Potent inhibitors of the Qi site of the mitochondrial respiration complex III. *Journal of medicinal chemistry* **49**, 4762-6 (2006).

Bothe, H. [Ferredoxin as cofactor for cyclic photophosphorylation in a cell-free system from the blue alga *Anacystis nidulans*]. *Zeitschrift für Naturforschung. Teil B: Chemie, Biochemie, Biophysik, Biologie* **24**, 1574-82 (1969).

Boxhammer, S., Glaser, S., Kühl, A., Wagner, A.K. & Schmidt, C.L. Characterization of the recombinant Rieske [2Fe-2S] proteins HcaC and YeaW from *E. coli*. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* **21**, 459-67 (2008).

Breyton, C., Nandha, B., Johnson, G.N., Joliot, P. & Finazzi, G. Redox modulation of cyclic electron flow around photosystem I in C3 plants. *Biochemistry* **45**, 13465-75 (2006).

Briat, J.-F., Duc, C., Ravet, K. & Gaymard, F. Ferritins and iron storage in plants. *Biochimica et biophysica acta* **1800**, 806-14 (2010).

Buchanan, B.B. The ferredoxin/thioredoxin system: a key element in the regulatory function of light in photosynthesis. *Bioscience* **34**, 378-83 (1984).

Buchanan, B.B. & Balmer, Y. Redox regulation: a broadening horizon. *Annual review of plant biology* **56**, 187-220 (2005).

Büchel C, Wilhelm C. Wavelengthindependent state transitions and lightregulated chlororespiration as mechanisms to control the energy status in the chloroplast of *Pleurochloris meiringensis*. *Plant Physiol. Biochem.* **28**:307–14 (1990).

Cain, P., Hall, M., Schröder, W.P., Kieselbach, T. & Robinson, C. A novel extended family of stromal thioredoxins. *Plant molecular biology* **70**, 273-81 (2009).

Campbell, W.J. & Ogren, W.L. Electron Transport through photosystem I Stimulates Light Activation of Ribulose Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) by Rubisco Activase. *Plant physiology* **94**, 479-84 (1990).

Carter, P. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Analytical biochemistry* **40**, 450-8 (1971).

Castelo-Branco, P.A. et al. Inhibition and uncoupling of photosynthetic electron transport by diterpene lactone amide derivatives. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences* **63**, 251-9

Cho, E.J. et al. Protein disulfide isomerase-2 of Arabidopsis mediates protein folding and localizes to both the secretory pathway and nucleus, where it interacts with maternal effect embryo arrest factor. *Molecules and cells* (2011).

Cooper, A.J., Pinto, J.T. & Callery, P.S. Reversible and irreversible protein glutathionylation: biological and clinical aspects. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* **7**, 891-910 (2011).

Correll, C.C., Ludwig, M.L., Bruns, C.M. & Karplus, P.A. Structural prototypes for an extended family of flavoprotein reductases: comparison of phthalate dioxygenase reductase with ferredoxin reductase and ferredoxin. *Protein science : a publication of the Protein Society* **2**, 2112-33 (1993).

Crawford, N.A. et al. Contrasting modes of photosynthetic enzyme regulation in oxygenic and anoxygenic prokaryotes. *Archives of microbiology* **139**, 124-9 (1984).

DalCorso, G. et al. A complex containing PGRL1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electron flow in Arabidopsis. *Cell* **132**, 273-85 (2008).

Davidson, E., Ohnishi, T., Atta-Asafo-Adjei, E. & Daldal, F. Potential ligands to the [2Fe-2S] Rieske cluster of the cytochrome bc₁ complex of *Rhodobacter capsulatus* probed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **31**, 3342-51 (1992).

de la Torre, A., Lara, C., Yee, B.C., Malkin, R. & Buchanan, B.B. Physiochemical properties of ferraltherin. A regulatory iron-sulfur protein functional in oxygenic photosynthesis. *Archives of biochemistry and biophysics* **213**, 545-50 (1982).

Dekker, J.P. & Boekema, E.J. Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochimica et biophysica acta* **1706**, 12-39 (2005).

Deneke, S.M. Thiol-based antioxidants. *Current topics in cellular regulation* **36**, 151-80 (2000).

Dietz, K.-J. et al. The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *Journal of experimental botany* **57**, 1697-709 (2006).

Droux, M. et al. Ferredoxin-thioredoxin reductase, an iron-sulfur enzyme linking light to enzyme regulation in oxygenic photosynthesis: purification and properties of the enzyme from C₃, C₄, and cyanobacterial species. *Archives of biochemistry and biophysics* **252**, 426-39 (1987).

Droux, M. et al. Ferredoxin-thioredoxin reductase: a catalytically active dithiol group links photoreduced ferredoxin to thioredoxin functional in photosynthetic enzyme regulation. *Archives of biochemistry and biophysics* **256**, 372-80 (1987).

Elliott, J.I. & Ljungdahl, L.G. Isolation and characterization of an Fe-S₈ ferredoxin (ferredoxin II) from *Clostridium thermoaceticum*. *Journal of bacteriology* **151**, 328-33 (1982).

Endo, T., Shikanai, T., Takabayashi, A., Asada, K. & Sato, F. The role of chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in photoprotection. *FEBS letters* **457**, 5-8 (1999).

Endo, T., Shikanai, T., Sato, F., and Asada, K. (1998). NAD(P)H dehydrogenase-dependent, antimycin A-sensitive electron donation to plastoquinone in tobacco chloroplasts, . *Plant Cell Physiol* **39**, 1226-1231.

Endo, T., Ishida, S., Ishikawa, N. & Sato, F. Chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase complex and cyclic electron transport around photosystem I. *Molecules and cells* **25**, 158-62 (2008).

Endo, T., Kawase, D. & Sato, F. Stromal over-reduction by high-light stress as measured by decreases in P700 oxidation by far-red light and its physiological relevance. *Plant & cell physiology* **46**, 775-81 (2005).

Fan, D.-Y., Jia, H., Barber, J. & Chow, W.S. Novel effects of methyl viologen on photosystem II function in spinach leaves. *European biophysics journal: EBJ* **39**, 191-9 (2009).

Finazzi, G., Barbagallo, R.P., Bergo, E., Barbato, R. & Forti, G. Photoinhibition of *Chlamydomonas reinhardtii* in State 1 and State 2: damages to the photosynthetic apparatus under linear and cyclic electron flow. *The Journal of biological chemistry* **276**, 22251-7 (2001).

Furbank, R.T. and Horton, P. Regulation of photosynthesis in isolated barley protoplasts: the contribution of cyclic photophosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta.* **894**: 332–338 (1987).

Florin, L., Tsokoglou, A. & Happe, T. A novel type of iron hydrogenase in the green alga *Scenedesmus obliquus* is linked to the photosynthetic electron transport chain. *The Journal of biological chemistry* **276**, 6125-32 (2001).

Forti, G. et al. Interaction of ferredoxin and ferredoxin-NADP reductase with thylakoids. *Archives of biochemistry and biophysics* **221**, 507-13 (1983).

Foyer, C. and Noctor, G.D. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytol.* **146**: 359–388 (2000).

Frauer, C. et al. Different binding properties and function of CXXC zinc finger domains in Dnmt1 and Tet1. *PloS one* **6**, e16627 (2011).

Furbacher, P.N., Girvin, M.E. & Cramer, W.A. On the question of interheme electron transfer in the chloroplast cytochrome b6 in situ. *Biochemistry* **28**, 8990-8 (1989).

Gallogly, M.M., Starke, D.W. & Mieryal, J.J. Mechanistic and kinetic details of catalysis of thiol-disulfide exchange by glutaredoxins and potential mechanisms of regulation. *Antioxidants & redox signaling* **11**, 1059-81 (2009).

Gao, X. et al. Structural basis for the quinone reduction in the bc1 complex: a comparative analysis of crystal structures of mitochondrial cytochrome bc1 with bound substrate and inhibitors at the Qi site. *Biochemistry* **42**, 9067-80 (2003).

Gatti, D.L., Meinhardt, S.W., Ohnishi, T. & Tzagoloff, A. Structure and function of the mitochondrial bc1 complex. A mutational analysis of the yeast Rieske iron-sulfur protein. *Journal of molecular biology* **205**, 421-35 (1989).

Gelhaye, E. et al. A specific form of thioredoxin h occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 14545-50 (2004).

Girvin, M.E. & Cramer, W.A. A redox study of the electron transport pathway responsible for generation of the slow electrochromic phase in chloroplasts. *Biochimica et biophysica acta* **767**, 29-38 (1984).

Golding, A.J. & Johnson, G.N. Down-regulation of linear and activation of cyclic electron transport during drought. *Planta* **218**, 107-14 (2003).

Griesbeck, C. et al. Mechanism of sulfide-quinone reductase investigated using site-directed mutagenesis and sulfur analysis. *Biochemistry* **41**, 11552-65 (2002).

Guergova-Kuras, M., Kuras, R., Ugulava, N., Hadad, I. & Crofts, A.R. Specific mutagenesis of the rieske iron-sulfur protein in *Rhodobacter sphaeroides* shows that both the thermodynamic gradient and the pK of the oxidized form determine the rate of quinol oxidation by the bc(1) complex. *Biochemistry* **39**, 7436-44 (2000).

Hanke, G.T., Endo, T., Satoh, F. & Hase, T. Altered photosynthetic electron channelling into cyclic electron flow and nitrite assimilation in a mutant of ferredoxin:NADP(H) reductase. *Plant, cell & environment* **31**, 1017-28 (2008).

Harbinson, J., Genty, B. & Baker, N.R. Relationship between the Quantum Efficiencies of Photosystems I and II in Pea Leaves. *Plant physiology* **90**, 1029-34 (1989).

Hashimoto, M., Endo, T., Peltier, G., Tasaka, M. & Shikanai, T. A nucleus-encoded factor, CRR2, is essential for the expression of chloroplast *ndhB* in *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **36**, 541-9 (2003).

Havaux, M., Rumeau, D. & Ducruet, J.-M. Probing the FQR and NDH activities involved in cyclic electron transport around Photosystem I by the “afterglow” luminescence. *Biochimica et biophysica acta* **1709**, 203-13 (2005).

Hay, S., Westerlund, K. & Tommos, C. Redox characteristics of a de novo quinone protein. *The journal of physical chemistry. B* **111**, 3488-95 (2007).

Heber, U., Egneus, H., Hank, U. Jensen, M. and Koster, S. Regulation of photosynthetic electron transport and phosphorylation in intact chloroplasts and leaves of *Spinacia oleracea*. *Planta* **143**: 41–49 (1978).

Herbert, S.K., Fork, D.C. & Malkin, S. Photoacoustic measurements in vivo of energy storage by cyclic electron flow in algae and higher plants. *Plant physiology* **94**, 926-34 (1990).

Horvath EM, Peter SO, Joët T, Rumeau D, Cournac L, et al.. Targeted inactivation of the plastid *ndhB* gene in tobacco results in an enhanced sensitivity of photosynthesis to moderate stomatal closure. *Plant Physiol.* **123**:1337–49 (2000).

Ifuku, K., Endo, T., Shikanai, T. & Aro, E.-M. Structure of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex: nomenclature for nuclear-encoded subunits. *Plant & cell physiology* **52**, 1560-8 (2011).

Imlay, J.A. Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Molecular microbiology* **59**, 1073-82 (2006).

Imlay, J.A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual review of biochemistry* **77**, 755-76 (2008).

Inaba, K. & Ito, K. Paradoxical redox properties of DsbB and DsbA in the protein disulfide-introducing reaction cascade. *The EMBO journal* **21**, 2646-54 (2002).

Inaba, K., Takahashi, Y.-hei, Ito, K. & Hayashi, S. Critical role of a thiolate-quinone charge transfer complex and its adduct form in de novo disulfide bond generation by DsbB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 287-92 (2006).

Ivanov, B., Asada, K. & Edwards, G.E. Analysis of donors of electrons to photosystem I and cyclic electron flow by redox kinetics of P700 in chloroplasts of isolated bundle sheath strands of maize. *Photosynthesis research* **92**, 65-74 (2007).

Iwai, M. et al. Isolation of the elusive supercomplex that drives cyclic electron flow in photosynthesis. *Nature* **464**, 1210-3 (2010).

Jagannathan, B. & Golbeck, J.H. Understanding of the binding interface between PsaC and the PsaA/PsaB heterodimer in photosystem I. *Biochemistry* **48**, 5405-16 (2009).

Jervis, A.J. et al. The O₂ sensitivity of the transcription factor FNR is controlled by Ser24 modulating the kinetics of [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 4659-64 (2009).

Johnson, G.N. Cyclic electron transport in C₃ plants: fact or artefact? *Journal of experimental botany* **56**, 407-16 (2005).

Johnson, G.N. Thiol regulation of the thylakoid electron transport chain--a missing link in the regulation of photosynthesis? *Biochemistry* **42**, 3040-4 (2003).

Joliot, P. & Joliot, A. Cyclic electron transfer in plant leaf. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 10209-14 (2002).

Joliot, P. & Joliot, A. Cyclic electron flow in C₃ plants. *Biochimica et biophysica acta* **1757**, 362-8

Jönsson, T.J., Ellis, H.R. & Poole, L.B. Cysteine reactivity and thiol-disulfide interchange pathways in AhpF and AhpC of the bacterial alkyl hydroperoxide reductase system. *Biochemistry* **46**, 5709-21 (2007).

Jönsson, T.J., Ellis, H.R. & Poole, L.B. Cysteine reactivity and thiol-disulfide interchange pathways in AhpF and AhpC of the bacterial alkyl hydroperoxide reductase system. *Biochemistry* **46**, 5709-21 (2007).

Jurić, S. et al. Tethering of ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase to thylakoid membranes is mediated by novel chloroplast protein TROL. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **60**, 783-94 (2009).

Kanazawa, A. & Kramer, D.M. In vivo modulation of nonphotochemical exciton quenching (NPQ) by regulation of the chloroplast ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 12789-94 (2002).

Kauppi, B. et al. Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase--naphthalene 1,2-dioxygenase. *Structure (London, England : 1993)* **6**, 571-86 (1998).

Kirchhoff, H., Schöttler, M.A., Maurer, J. & Weis, E. Plastocyanin redox kinetics in spinach chloroplasts: evidence for disequilibrium in the high potential chain. *Biochimica et biophysica acta* **1659**, 63-72 (2004).

Klomsiri, C., Karplus, P.A. & Poole, L.B. Cysteine-based redox switches in enzymes. *Antioxidants & redox signaling* **14**, 1065-77 (2011).

Kofer W, Koop HU, Wanner G, Steinmüller K. Mutagenesis of the genes encoding subunits A, C, H, I, J and K of the plastid NAD(P)H-plastoquinoneoxidoreductase in tobacco by polyethylene glycol-mediated plastome transformation. *Mol. Gen. Genet.* **258**:166–73 (1998).

Kurisu, G., Zhang, H., Smith, J.L. & Cramer, W.A. Structure of the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science (New York, N.Y.)* **302**, 1009-14 (2003).

Laisk, A., Talts, E., Oja, V., Eichelmann, H. & Peterson, R.B. Fast cyclic electron transport around photosystem I in leaves under far-red light: a proton-uncoupled pathway? *Photosynthesis research* **103**, 79-95 (2010).

Lajko F, Kadioglu A, Borbely G, Garab G. Competition between the photosynthetic and the (chloro)respiratory electron transport chains in cyanobacteria, green algae and higher plants. Effect of heat stress. *Photosynthetica* **33**:217–26 (1997).

Lam, E. The effects of quinone analogues on cytochrome b6 reduction and oxidation in a reconstituted system. *FEBS letters* **172**, 255-60 (1984).

Lara, C., de la Torre, A. & Buchanan, B.B. Ferraltherin: an iron-sulfur protein functional in enzyme regulation in photosynthesis. *Biochemical and biophysical research communications* **94**, 1337-44 (1980).

Lavergne, J. & Joliot, P. Restricted diffusion in photosynthetic membranes. *Trends in biochemical sciences* **16**, 129-34 (1991).

Leister, D. & Schneider, A. From genes to photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *International review of cytology* **228**, 31-83 (2003).

Léon, S., Touraine, B., Ribot, C., Briat, J.-F. & Lobléaux, S. Iron-sulphur cluster assembly in plants: distinct NFU proteins in mitochondria and plastids from *Arabidopsis thaliana*. *The Biochemical journal* **371**, 823-30 (2003).

Li, W.-W., Heinze, J. & Haehnel, W. Site-specific binding of quinones to proteins through thiol addition and addition-elimination reactions. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 6140-1 (2005).

Liebl, U., Sled, V., Brasseur, G., Ohnishi, T. & Daldal, F. Conserved nonliganding residues of the *Rhodobacter capsulatus* Rieske iron-sulfur protein of the bc1 complex are essential for protein structure, properties of the [2Fe-2S] cluster, and communication with the quinone pool. *Biochemistry* **36**, 11675-84 (1997).

Lindahl, M., Mata-Cabana, A. & Kieselbach, T. The disulfide proteome and other reactive cysteine proteomes: analysis and functional significance. *Antioxidants & redox signaling* **14**, 2581-642 (2011).

Lintala, M. et al. Comparative analysis of leaf-type ferredoxin-NADP oxidoreductase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **57**, 1103-15 (2009).

Lintala, M. et al. Structural and functional characterization of ferredoxin-NADP+-oxidoreductase using knock-out mutants of *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **49**, 1041-52 (2007).

Long, T.A., Okegawa, Y., Shikanai, T., Schmidt, G.W. & Covert, S.F. Conserved role of proton gradient regulation 5 in the regulation of PSI cyclic electron transport. *Planta* **228**, 907-18 (2008).

Makino, A., Miyake, C. & Yokota, A.. Physiological functions of the water-water cycle (Mehler reaction) and the cyclic electron flow around PSI in rice leaves. *Plant & cell physiology* **43**, 1017-26 (2002).

Malpica, R., Franco, B., Rodriguez, C., Kwon, O. & Georgellis, D. Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 13318-23 (2004).

Marcia, M., Ermler, U., Peng, G. & Michel, H. The structure of Aquifex aeolicus sulfide:quinone oxidoreductase, a basis to understand sulfide detoxification and respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 9625-30 (2009).

Matsubara, H., Wada, K. & Masaki, R. Structure and function of chloroplast-type ferredoxins. *Advances in experimental medicine and biology* **74**, 1-15 (1976).

McCauley, S.W., Melis, A., Tang, G.M. & Arnon, D.I. Protonophores induce plastoquinol oxidation and quench chloroplast fluorescence: Evidence for a cyclic, proton-conducting pathway in oxygenic photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 8424-8 (1987).

Merbitz-Zahradnik, T., Zwicker, K., Nett, J.H., Link, T.A. & Trumpower, B.L. Elimination of the disulfide bridge in the Rieske iron-sulfur protein allows assembly of the [2Fe-2S] cluster into the Rieske protein but damages the ubiquinol oxidation site in the cytochrome bc₁ complex. *Biochemistry* **42**, 13637-45 (2003).

Migge, A., Carrayol, E., Hirel, B. & Becker, T.W. Leaf-specific overexpression of plastidic glutamine synthetase stimulates the growth of transgenic tobacco seedlings. *Planta* **210**, 252-60 (2000).

Miyake, C., Shinzaki, Y., Miyata, M. & Tomizawa, K.-ichi Enhancement of cyclic electron flow around PSI at high light and its contribution to the induction of non-photochemical quenching of chl fluorescence in intact leaves of tobacco plants. *Plant & cell physiology* **45**, 1426-33 (2004).

Miyake, C. and Yokota, A. Cyclic flow of electrons within PSII in thylakoid membranes. *Plant Cell Physiol.* **42**: 508–515 (2001).

Miyake, C., Yonekura, K., Kobayashi, Y. and Yokota, A. Cyclic electron flow within PSII functions in intact chloroplasts from spinach leaves. *Plant Cell Physiol.* **43**: (2002).

Moss, D.A., and Bendall, D.S. Cyclic electron transport in chloroplasts. The Q-cycle and the site of action of antimycin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **767**, 389-395 (1984).

Moreno, J., García-Murria, M.J. & Marín-Navarro, J. Redox modulation of Rubisco conformation and activity through its cysteine residues. *Journal of experimental botany* **59**, 1605-14 (2008).

Motohashi, K., Kondoh, A., Stumpp, M.T. & Hisabori, T. Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 11224-9 (2001).

Motohashi, K. & Hisabori, T. HCF164 receives reducing equivalents from stromal thioredoxin across the thylakoid membrane and mediates reduction of target proteins in the thylakoid lumen. *The Journal of biological chemistry* **281**, 35039-47 (2006).

Motohashi, K. & Hisabori, T. CcdA is a thylakoid membrane protein required for the transfer of reducing equivalents from stroma to thylakoid lumen in the higher plant chloroplast. *Antioxidants & redox signaling* **13**, 1169-76 (2010).

Müh, F., Glöckner, C., Hellmich, J. & Zouni, A. Light-induced quinone reduction in photosystem II. *Biochimica et biophysica acta* (2011)

Mulo, P. Chloroplast-targeted ferredoxin-NADP(+) oxidoreductase (FNR): Structure, function and location. *Biochimica et biophysica acta* **1807**, 927-34 (2011).

Munekage, Y.N., Genty, B. & Peltier, G. Effect of PGR5 impairment on photosynthesis and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & cell physiology* **49**, 1688-98 (2008).

Munekage, Y. et al. Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature* **429**, 579-82 (2004).

Munekage, Y. et al. PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis*. *Cell* **110**, 361-71 (2002).

Nagahara, N. Intermolecular disulfide bond to modulate protein function as a redox-sensing switch. *Amino acids* **41**, 59-72 (2011).

Nandha, B., Finazzi, G., Joliot, P., Hald, S. & Johnson, G.N. The role of PGR5 in the redox poisoning of photosynthetic electron transport. *Biochimica et biophysica acta* **1767**, 1252-9 (2007).

Okegawa, Y., Tsuyama, M., Kobayashi, Y. & Shikanai, T. The pgr1 mutation in the Rieske subunit of the cytochrome b6/f complex does not affect PGR5-dependent cyclic electron transport around photosystem I. *The Journal of biological chemistry* **280**, 28332-6 (2005).

Onda, Y. et al. Differential interaction of maize root ferredoxin:NADP(+) oxidoreductase with photosynthetic and non-photosynthetic ferredoxin isoproteins. *Plant physiology* **123**, 1037-45 (2000).

Osmond, B., Badger, M., Maxwell, K., Björkman, O. and Leegood, R. Too many photons: photorespiration, photoinhibition and photooxidation. *Trends Plant Sci.* **2**: 119–121 (1997).

Osmond, C.B. and Grace, S.C. Perspective on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis? *J. Exp. Bot.* **48**: 1351–1362 (1995).

Peltier G, Ravenel J, Verméglio A. Inhibition of a respiratory activity by short saturating flashes in *Chlamydomonas*: evidence for a chlororespiration. *Biochim. Biophys. Acta* **893**:83–90 (1987).

Peng, L., Yamamoto, H., and Shikanai, T. (2011). Structure and biogenesis of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex. *Biochim Biophys Acta* **1807**, 945-953.

Ralph, S.J., Moreno-Sánchez, R., Neuzil, J. & Rodríguez-Enríquez, S. Inhibitors of Succinate: Quinone Reductase/Complex II Regulate Production of Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Protect Normal Cells from Ischemic Damage but Induce Specific Cancer Cell Death. *Pharmaceutical research* **28**, 2695-730 (2011).

Ransac, S. & Mazat, J.-P. How does antimycin inhibit the bc1 complex? A part-time twin. *Biochimica et biophysica acta* **1797**, 1849-57 (2010).

Rhee, S.G. & Woo, H.A. Multiple functions of peroxiredoxins: peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H₂O₂, and protein chaperones. *Antioxidants & redox signaling* **15**, 781-94 (2011).

Ruiz, N., Chng, S.-S., Hiniker, A., Kahne, D. & Silhavy, T.J. Nonconsecutive disulfide bond formation in an essential integral outer membrane protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 12245-50 (2010).

Rumeau, D., Peltier, G. & Cournac, L. Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. *Plant, cell & environment* **30**, 1041-51 (2007).

Sainz, G. et al. Structure of a [2Fe-2S] ferredoxin from *Rhodobacter capsulatus* likely involved in Fe-S cluster biogenesis and conformational changes observed upon reduction. *Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **11**, 235-46 (2006).

Schagger, H., and von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-379 (1987).

Schagger, H., and von Jagow, G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* **199**, 223-231 (1991).

Scheller, H.V., Jensen, P.E., Haldrup, A., Lunde, C. & Knoetzel, J. Role of subunits in eukaryotic Photosystem I. *Biochimica et biophysica acta* **1507**, 41-60 (2001).

Schreiber, U., Schliwa, U., and Bilger, W. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth Res* **10**, 51-62 (1986).

Scherer S. Do photosynthetic and respiratory electron transport chains share redox proteins? *Trends Biochem. Sci.* **15**:458–62 (1990).

Sheftel, A.D. et al. Human ind1, an iron-sulfur cluster assembly factor for respiratory complex I. *Molecular and cellular biology* **29**, 6059-73 (2009).

Shikanai, T., Munekage, Y., Shimizu, K., Endo, T. & Hashimoto, T. Identification and characterization of Arabidopsis mutants with reduced quenching of chlorophyll fluorescence. *Plant & cell physiology* **40**, 1134-42 (1999).

Stroebel, D., Choquet, Y., Popot, J.-L. & Picot, D. An atypical haem in the cytochrome b(6)f complex. *Nature* **426**, 413-8 (2003).

Stumpp, M.T., Motohashi, K. & Hisabori, T. Chloroplast thioredoxin mutants without active-site cysteines facilitate the reduction of the regulatory disulphide bridge on the gamma-subunit of chloroplast ATP synthase. *The Biochemical journal* **341** (Pt 1, 157-63 (1999).

Suorsa, M., Sirpiö, S. & Aro, E.-M. Towards characterization of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex. *Molecular plant* **2**, 1127-40 (2009).

Szymańska, R., Dłużewska, J., Slesak, I. & Kruk, J. Ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase bound to cytochrome b₆f complex is active in plastoquinone reduction: implications for cyclic electron transport. *Physiologia plantarum* **141**, 289-98 (2011).

Tagawa, K., Tsujimoto, H.Y., and Arnon, D.I. (1963). Role of chloroplast ferredoxin in the energy conversion process of photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **49**, 567-572.

Takabayashi, A., Endo, T., Shikanai, T. & Sato, F.. Post-illumination reduction of the plastoquinone pool in chloroplast transformants in which chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase was inactivated. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **66**, 2107-11 (2002).

Tiessen, A. et al. Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: a novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply. *The Plant cell* **14**, 2191-213 (2002).

Tolteer, D. et al. Control of Hydrogen Photoproduction by the Proton Gradient Generated by Cyclic Electron Flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant cell* **23**, 2619-30 (2011).

Tsujimoto, H.Y., McSwain, B.D. & Arnon, D.I. Differential effects of desaspidin on photosynthetic phosphorylation. *Plant physiology* **41**, 1376-80 (1966).

Walters, E.M. et al. Spectroscopic characterization of site-specific [Fe(4)S(4)] cluster chemistry in ferredoxin:thioredoxin reductase: implications for the catalytic mechanism. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 9612-24 (2005).

Walters, E.M. et al. Role of histidine-86 in the catalytic mechanism of ferredoxin:thioredoxin reductase. *Biochemistry* **48**, 1016-24 (2009).

Wang, P., Ye, J., Shen, Y. & Mi, H. The role of chloroplast NAD(P)H dehydrogenase in protection of tobacco plant against heat stress. *Science in China. Series C, Life sciences / Chinese Academy of Sciences* **49**, 311-21 (2006).

Weger, H.G. & Turpin, D.H. Mitochondrial Respiration Can Support NO(3) and NO(2) Reduction during Photosynthesis : Interactions between Photosynthesis, Respiration, and N Assimilation in the N-Limited Green Alga *Selenastrum minutum*. *Plant physiology* **89**, 409-15 (1989).

Winger, A.M., Taylor, N.L., Heazlewood, J.L., Day, D.A. & Millar, A.H. Identification of intra- and intermolecular disulphide bonding in the plant mitochondrial proteome by diagonal gel electrophoresis. *Proteomics* **7**, 4158-70 (2007).

Wouters, M.A., Fan, S.W. & Haworth, N.L. Disulfides as redox switches: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxidants & redox signaling* **12**, 53-91 (2010).

Xu, D., Liu, X., Zhao, J. & Zhao, J. FesM, a membrane iron-sulfur protein, is required for cyclic electron flow around photosystem I and photoheterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Plant physiology* **138**, 1586-95 (2005).

Yamamoto, H., Peng, L., Fukao, Y. & Shikanai, T. An Src homology 3 domain-like fold protein forms a ferredoxin binding site for the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **23**, 1480-93 (2011).

Yamashita, E., Zhang, H. & Cramer, W.A. Structure of the cytochrome b6f complex: quinone analogue inhibitors as ligands of heme cn. *Journal of molecular biology* **370**, 39-52 (2007).

Zhang, H., Whitelegge, J.P. & Cramer, W.A. Ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase is a subunit of the chloroplast cytochrome b6f complex. *The Journal of biological chemistry* **276**, 38159-65 (2001).

Zhang, H. et al. Characterization of the high-spin heme x in the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis. *Biochemistry* **43**, 16329-36 (2004).

Zhang, R. & Sharkey, T.D. Photosynthetic electron transport and proton flux under moderate heat stress. *Photosynthesis research* **100**, 29-43 (2009).

Zhou, Z.H. & Adams, M.W. Site-directed mutations of the 4Fe-ferredoxin from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: role of the cluster-coordinating aspartate in physiological electron transfer reactions. *Biochemistry* **36**, 10892-900 (1997).

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Dario Leister für die Möglichkeit bedanken, dass ich meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe und unter seiner Betreuung durchführen konnte.

Prof. Dr. Jürgen Soll danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Dario Leister, Dr. Ute Armbruster, Dr. Tatjana Kleine, Dr. Mathias Pribil, Dr. Paolo Pesaresi, Thomas Blunder und Tobias Wunder für die Unterstützung und die Zusammenarbeit bei der Erstellung der angeführten Publikationen bedanken.

Ein weiterer Dank gebührt Dr. Ute Armbruster, meiner Schwester Dr. Marie Hertle und Dr. Mathias Pribil für das kritische Lesen meiner Doktorarbeit sowie Anmerkungen und Verbesserungsvorschlägen.

Zudem möchte ich Dr. Philip Benz, Dr. Fatima Chigri, Dr. Bernd Müller, Dr. Ulrike Oster, Dr. Thilo Rühle, Dr. Chrisitan Stelljes, Dr. Anna Stengel sowie allen Kollegen in der Arbeitsgruppe Leister für die Diskussionsbereitschaft bezüglich experimenteller Fragestellungen und sich daraus ergebender neuer Hypothesen danken.

Nicht Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken. Besonders bedanke ich mich bei meinen Eltern und meiner Freundin für die Unterstützung und ihre Hilfe während der letzten Jahre.

Publikationen

-Armbruster U., Pribil M., Pesaresi P., **Hertle A.** and Leister D. (2010) Update on chloroplast research: new tools, new topics and new trends. (Invited Review). *Mol. Plant.*

-Pesaresi P., **Hertle A.**, Pribil M., Schneider A., Kleine T. and Leister D. (2010). Optimizing photosynthesis under fluctuating light: the role of the Arabidopsis STN7 kinase. *Plant Signal Behav.* .

-Pribil M., Pesaresi P., **Hertle A.**, Barbato R. and Leister D. (2010). Role of plastid protein phosphatase TAP38 in LHCII dephosphorylation and thylakoid electron flow. *PLoS Biol.* .

-**Hertle A.**, Armbruster U., Makarenko E., Zuhlke J., Pribil M., Dietzmann A., Schliebner I., Aseeva E., Fenino E., Scharfenberg M., Voigt C. and Leister D. (2009) Chloroplast Proteins without Cleavable Transit Peptides: Rare Exceptions or a Major Constituent of the Chloroplast Proteome? *Mol Plant.*

-Pesaresi P., **Hertle A.**, Pribil M, Kleine T, Wagner R, Strissel H, Ihnatowicz A, Bonardi V, Scharfenberg M, Schneider A, Pfannschmidt T, Leister D.(2009) Arabidopsis STN7 kinase provides a link between short- and long-term photosynthetic acclimation. *Plant Cell.*.

-Reisinger V, **Hertle AP**, Plöscher M, Eichacker LA. (2008). Cytochrome b6f is a dimeric protochlorophyll a binding complex in etioplasts. *FEBS J.*

Submitted (under revision)

-**Hertle AP.**, Blunder T., Wunder T. Armbruster U. and Leister D. (2012) PGRL1 is the Elusive Ferredoxin-Plastoquinone Reductase (FQR) in Photosynthetic Cyclic Electron Flow. (*Cell*, 2012).

In preparation

-**Hertle A.**, Leister D. and Kleine T. (2012) AlaAT-RPL16: a case study of genetic diversification succeeding organelle-to-nucleus transfer in *Brassicaceae*

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation mit dem Titel „Molekulare Charakterisierung von PGRL1 und seiner Rolle im zyklischen Elektronentransport um Photosystem I in *A. thaliana*“ von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

Diese Arbeit wurde weder in der jetzigen noch in einer abgewandelten Form einem anderen Prüfungskomitee vorgelegt.

München, Dezember 2011

Alexander Hertle