

**Proteinimport in Plastiden:
Zum Aufbau von Transitpeptiden und zu importunabhängigen
Funktionen des 1 MDa-TIC-Komplexes**

Dissertation

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Daniel Köhler

geb. am 24.06.1986 in Löbau

Gutachter: 1. Prof. Dr. Sacha Baginsky
 2. Prof. Dr. Klaus Humbeck
 3. Prof. Dr. Enrico Schleiff

Tag der öffentlichen Verteidigung: 08.06.2018

Summary

The plastid protein import is of substantial importance for the functionality of plastids. The main import route is formed by translocation complexes at the outer (TOC) and inner (TIC) envelope membrane of the chloroplast. An N-terminal transit peptide is essential for the recognition and import of nucleus-encoded plastid proteins through the TOC-TIC-import machinery.

This work reveals new insights into the nature of transit peptides of nucleus encoded plastid proteins of the unicellular alga *Cyanophora paradoxa*. It was possible to identify experimentally a large number of transit peptides of *in vivo* relevance. This permits the determination of transit peptide features like their average length, the overall amino acid composition as well as their general hydrophobic profile. These determined features could be compared to those of transit peptides of the vascular land plant *Arabidopsis thaliana*.

Based on the evolutionary distance and the massive morphologic differences between unicellular alga and multicellular plants, a much simpler structure of alga transit peptides was expected. We observed that transit peptides of *Arabidopsis thaliana* and *Cyanophora paradoxa* are surprisingly similar. An exception is an N-terminal occurring phenylalanine in most *Cyanophora paradoxa* transit peptides as it was also described previously. The high accordance of the transit peptide constitutions of both organisms demonstrates that the basic principles of the plastid protein import are most likely determined very early.

Beside comparative analysis of transit peptides of evolutionary well separated organisms it was also possible to characterise the relevance of the import component Tic56 for plastids of *Arabidopsis thaliana*. This protein is a part of a Tic20-I concerning 1 MDa-TIC-complex, with an estimated importance for the import of photosynthetic proteins.

Surprisingly we couldn't observe hints for a dramatic import defect of plastids of *tic56* mutant lines. Instead we identified a broad range of proteins which get imported into plastids of the albinotic knockout mutant line *tic56-1*. Thus no substrate class could be determined whose accumulation depends on Tic56. This observation is challenging the actual model of the substrate specificity of the 1 MDa-TIC-complex.

Quantitative analysis of the proteome and corresponding transcriptome of *tic56-1* mutant plants revealed a specific impaired accumulation of ribosomal plastid proteins which can't be attributed to a transcriptional regulation effect. Further *tic56-1* mutants exhibit a processing defect of the plastid 23S rRNA and their phenotype and proteome is very similar to those of plants impaired in plastid translation.

These observations demonstrate that the loss of Tic56 leads to *Arabidopsis thaliana* plants with an impaired plastidic translation. Thus, it is likely that Tic56 is important for the functionality of other plastidic processes and the connection of those to the plastidic import.

Zusammenfassung

Der plastidäre Proteinimport ist von grundlegender Bedeutung für die Funktionalität des Plastiden. Den Hauptimportweg bilden dabei Translokationskomplexe an der äußeren (TOC) und inneren (TIC) Hüllmembran des Chloroplasten. Ein essentielles Erkennungsmerkmal Kern-codierter Plastidenproteine, die über die TOC-TIC-Importmaschinerie importiert werden sollen, sind N-terminale Transitpeptide.

Mit dieser Arbeit konnte das Verständnis zur Natur der Transitpeptide plastidärer Proteine der einzelligen Alge *Cyanophora paradoxa* verbessert werden. Es ist gelungen eine größere Anzahl an *in vivo* relevanten Transitpeptiden experimentell zu identifizieren. Das ermöglichte generelle Merkmale wie durchschnittliche Länge, Häufigkeit und relative Position der einzelnen Aminosäuren und das allgemeine Hydropathieprofil der Transitpeptide zu bestimmen. Diese ermittelten Merkmale konnten der Beschaffenheit von Transitpeptiden der Gefäßpflanze *Arabidopsis thaliana* gegenübergestellt werden.

Auf Grund der evolutionären Distanz und dem stark differenziellen Aufbau einzelligen Algen und vielzelliger Pflanzen ging man davon aus, dass die Transitpeptide der Alge deutlich einfacher aufgebaut sind. Erstaunlicherweise konnten wir feststellen, dass sich die Transitpeptide von *Arabidopsis thaliana* und *Cyanophora paradoxa* sehr ähnlich sind. Eine Ausnahme stellt dabei ein schon zuvor beschriebenes Phenylalanin dar, wie es ein Großteil der Transitpeptide von *Cyanophora paradoxa* N-terminal aufweisen. Die hohe Ähnlichkeit der Transitpeptidbeschaffenheit demonstriert, dass die Grundprinzipien des plastidären Proteinimports evolutionär wahrscheinlich schon sehr früh determiniert wurden.

Neben der Analyse von Transitpeptiden zweier Organismen die evolutionär weit voneinander entfernt sind, ist es auch gelungen die Rolle der Importkomponente Tic56 für Plastiden von *Arabidopsis thaliana* näher zu charakterisieren. Es handelt sich dabei um einen Bestandteil des 1 MDa-TIC-Komplexes um die Importkomponente Tic20-I, der vor allem für den Import photosynthetisch-relevanter Proteine von Bedeutung sein soll.

Überraschenderweise war für Plastiden von *tic56*-Mutantenlinien kein bedeutender Importdefekt zu beobachten. Stattdessen war festzustellen, dass noch ein erstaunlich breites Spektrum an Proteinen in Plastiden der albinotischen Nullmutante *tic56-1* importiert werden kann. Es wurde somit keine Substratklasse bestimmt, deren Akkumulation von Tic56 abhängt, was das bestehende Modell zur Substratspezifität des 1 MDa-TIC-Komplexes in Frage stellt.

Durch die quantitative Erfassung des Proteoms und des korrespondierenden Transkriptom von *tic56-1* wurde ein spezifischer Akkumulationsdefekt ribosomaler Plastidenproteine bestimmt,

der nicht auf eine transkriptionelle Regulation zurückzuführen ist. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in *tic56-1* eine Prozessierungsstörung der plastidären 23S rRNA auftritt und diese Mutantenlinie phänotypisch aber auch in ihrem Proteom sehr stark Pflanzen mit inhibierter plastidärer Translation ähnelt.

Dadurch konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass es in *Arabidopsis thaliana* beim Verlust von Tic56 zu einer Störung der plastidären Translation kommt. Somit scheint Tic56 auch für die Funktionalität anderer plastidärer Prozesse eine bedeutende Rolle zu spielen und diese dadurch mit dem Proteinimport zu verknüpfen.

Inhaltsverzeichnis

Summary	I
Zusammenfassung.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Der Plastid als Zentrum essentieller Stoffwechselwege des eukaryotischen photoautotrophen Lebens.....	1
1.2 Die Proteinimportmaschinerie an den plastidären Hüllmembranen	3
1.2.1 Chaperone als cytosolische Faktoren zur Unterstützung des plastidären Proteinimports.....	5
1.2.2 TOC: Aufbau des Translokationsapparates an der äußeren Hüllmembran des Chloroplasten	6
1.2.3 TIC: Aufbau des Translokationsapparates an der inneren Hüllmembran des Chloroplasten	8
1.2.4 Stromale Chaperone als Motor und Faltungshelfer an der Importmaschinerie ..	10
1.3 Das Transitpeptid als Träger der notwendigen Information für den plastidären Proteinimport	11
1.4 Die Spezifität für Importsubstrate an der Plastidenhülle	14
1.5 Der plastidäre Proteinimport als zentraler Regulationspunkt zur Erhaltung, der Homöostase des Plastiden.....	16
1.5.1 Möglichkeiten der direkten Regulation des plastidären Proteinimports.....	17
1.5.2 Die Koordination von Plastiden und Zellkern	19
1.6 Zielstellung	20
2 Publikationen	22
2.1 Manuskript 1	23
2.1.1 Zusammenfassung und Manuskript	23
2.2 Manuskript 2	37

2.2.1	Zusammenfassung und Manuskript	37
2.3	Manuskript 3	59
2.3.1	Zusammenfassung und Manuskript	59
3	Diskussion.....	79
3.1	Das Mysterium der Motive in Transitpeptiden.....	79
3.2	Cyanellen: Primitive Plastiden mit primitivem Importsystem?.....	81
3.3	Variabilität der Zusammensetzung des TOC-TIC-Importapparates.....	83
3.4	Die Beziehung zwischen Toc159 und dem 1 MDa-TIC-Komplex	84
3.5	Die Rolle des 1 MDa-TIC-Komplexes im plastidären Proteinimport	87
3.6	Der 1 MDa-TIC-Komplex ist mehr als ein reiner Importkomplex.....	89
3.7	Die Funktion von Tic56 im 1 MDa-TIC-Komplex	92
4	Referenzen.....	95
	Appendix	108
4.1	Abkürzungsverzeichnis.....	108
4.2	Unterstützendes Material	110
4.2.1	Unterstützende Abbildungen zu Manuskript 2	110
4.2.2	Unterstützende Abbildungen zu Manuskript 3	116
4.2.3	Übersicht über die unterstützenden Tabellen.....	123
4.3	Danksagung	124
4.4	Eidesstattliche Erklärung	125
4.5	Lebenslauf.....	126

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Ursprung des eukaryotischen photoautotrophen Lebens.	2
Abb. 1.2: Posttranslationale Importwege Kern-codierter Proteine an den Zielort im Plastiden.	4
Abb. 1.3: Zusammensetzung des TOC-Komplexes.....	7
Abb. 1.4: Die bekannten Komponenten der TIC-Importmaschinerie.	10
Abb. 1.5: ‘ <i>Multi-selection and multi-order</i> ’ (M&M) Modell nach Li und Teng (2013).....	13
Abb. 3.1: Modell zur Rolle des Tic56-umfassenden 1 MDa-TIC-Komplexes basierend auf der aktuellen Datenlage.....	94

1 Einleitung

1.1 Der Plastid als Zentrum essentieller Stoffwechselwege des eukaryotischen photoautotrophen Lebens

Voraussetzung für die Etablierung eines Stoffwechsels und damit die Bildung von Leben ist das Schaffen von eigenständigen Reaktionsräumen abgetrennt von der Umwelt. Umso komplexer der Stoffwechsel einer Zelle desto mehr voneinander separierte Reaktionsräume sind nötig. Diese Reaktionsräume bezeichnet man als Kompartimente. Sie beherbergen die Stoffwechselwege, welche der Zelle aber auch einem gesamten Organismus Zugang zu einem breiteren Spektrum an molekularen Verbindungen verschaffen.

Typisch für pflanzliche Zellen ist das plastidäre Kompartiment. Plastiden sind Organellen, die in Abhängigkeit von dem Zweck dem sie dienen, in verschiedenen Formen vorliegen können. Die undifferenzierten Vorläuferformen werden als Proplastiden bezeichnet. Diese können in die Speicherorganellen Eleioplasten (Lipidspeicher) oder Amyloplasten (Stärkespeicher) umgewandelt werden. Des Weiteren bilden Proplastiden auch die Grundlage für die pigmenthaltigen Chromoplasten und Chloroplasten. Chromoplasten akkumulieren hauptsächlich Carotinoide, während Chloroplasten daneben auch Chlorophylle enthalten. Diese Pigmente ermöglichen es dem Chloroplasten Licht als Energiequelle für die Photosynthese zu nutzen. Chloroplasten spielen somit eine Schlüsselrolle im Energiestoffwechsel der photoautotrophen pflanzlichen Zelle. Etioplasten stellen eine Vorform des Chloroplasten dar, die unter Lichtmangelsituationen aus den Proplastiden gebildet wird. Die Anlage dieser Plastiden ermöglicht eine schnelle Reaktion auf verbesserte Lichtverhältnisse durch deren Umwandlung in Chloroplasten. Im Zuge der kontrolliert ablaufenden Seneszenz einer Zelle bilden sich aus den Chloroplasten Gerontoplasten. Über diese findet der systematische Abbau der Plastiden statt, verbunden mit dem Recycling der Bestandteile (Jarvis und López-Juez, 2013).

Plastiden sind Träger wichtiger Stoffwechselprozesse und nehmen daher eine wichtige Rolle im pflanzlichen Leben ein. Wie erläutert, ist die Photosynthese einer dieser Prozesse und wahrscheinlich auch der geläufigste. Daneben gibt es aber noch eine Reihe anderer weiterer Stoffwechselwege, für die der Plastid eine essentielle Rolle spielt. Die Basis für die Synthese einer Reihe weiterer essentieller molekularer Verbindungen bilden die Lipidsynthese, der



Stärkestoffwechsel und die Assimilation von Stickstoff und Schwefel (Neuhaus und Emes, 2000).

Über den Plastiden haben sich pflanzliche Zellen die Synthese von Stoffen erschlossen, die andere Lebewesen ihrem Metabolismus nur über pflanzliche Nahrung zuführen können. Den Ursprung dieses Organells sieht man in einer frühen Form des Cyanobakteriums. Die Endosymbiontentheorie geht davon aus, dass dieser prokaryotische Organismus von einer eukaryotischen Zelle aufgenommen wurde. Statt die phagozytierte Nahrung wie üblich abzubauen, hat diese Zelle den photoautotrophen Prokaryoten in ihr intrazelluläres System aufgenommen (Martin *et al.*, 2015).

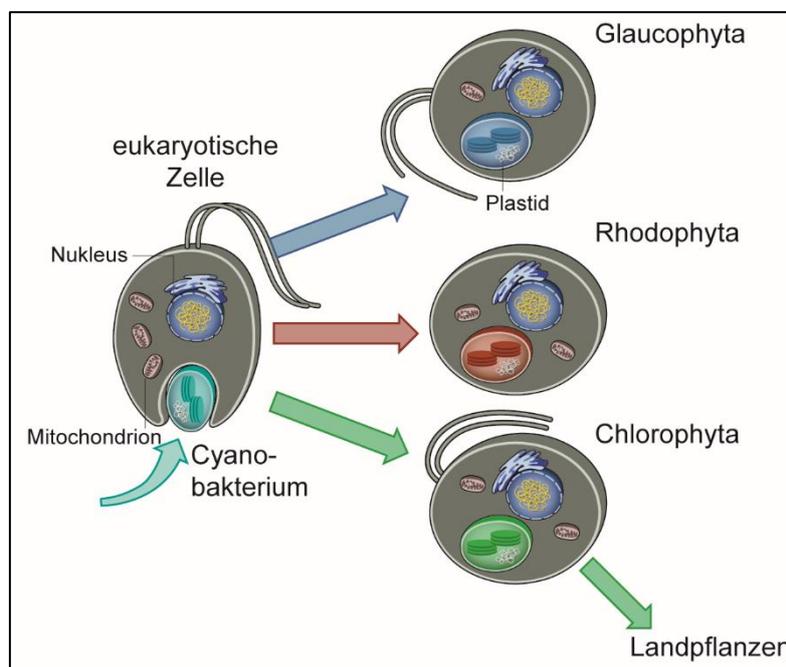


Abb. 1.1: Ursprung des eukaryotischen photoautotrophen Lebens. Die Endosymbiontentheorie besagt, dass ein Cyanobakterium von einer eukaryotischen Zelle aufgenommen und in diese als Organell integriert wurde. Aus diesem primären Endosymbioseereignis gingen die Glaucophyta, Rhodophyta und Chlorophyta hervor. Mit diesem Bakterium hat sich die eukaryotische Zelle auch gleichzeitig eine Vielzahl wichtiger Stoffwechselwege zu Eigen gemacht (Nach Gould, 2012).

Aus diesem primären endosymbiotischen Ereignis gingen drei Zweige hervor, welche die Basis des heute bekannten eukaryotischen photoautotrophen Lebens darstellen: Glaucophyta, Rhodophyta und Chlorophyta (Abb. 1.1, Gould, 2012). Merkmale des Plastiden wie seine doppelte Hüllmembran oder das eigene Genom mit eigener Transkriptions- und



Translationsmaschinerie bestätigen die Endosymbiontentheorie. Ein besonderes Merkmal weisen die als Cyanellen bezeichneten Plastiden der Glaucophyta auf. Diese besitzen noch eine dünne Peptidoglykanschicht (Steiner und Löffelhardt, 2002), welche eigentlich typisch für Bacteria ist. Viele Gene wurden nach der Endosymbiose vom Plastiden in den Zellkern ausgelagert (Martin und Herrmann, 1998). Da der Plastid für seine Funktionsfähigkeit auf die Proteine angewiesen ist, die von diesen Genen codiert werden, musste ein System etabliert werden, um den posttranslationalen Proteinimport zu gewährleisten. Für die korrekte Adressierung der Kern-codierten Plastidenproteine verfügen die meisten über eine N-terminale Erkennungssequenz, dem sog. Transitpeptid.

1.2 Die Proteinimportmaschinerie an den plastidären Hüllmembranen

Für den Import Kern-codierter Plastidenproteine sind mehrere Importwege beschrieben (Abb. 1.2, Paila *et al.*, 2015). Für einige Proteine der äußeren Chloroplastenhüllmembran wurde ein *Ankyrin repeat protein 2* (AKR2)-vermittelter Import nachgewiesen (Bae *et al.*, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass AKR2 in der Lage ist über Lipide der Hüllmembran an den Plastiden zu binden (Kim *et al.*, 2014) und naszierende Importsubstrate im Cytosol co-translational zu erkennen (Kim *et al.*, 2015). Ein weiterer Importweg stellt der Transport bestimmter Plastidenproteine über das ER und den Golgiapparat in den Plastiden dar (Radhamony und Theg, 2006; Baslam *et al.*, 2016). Neben diesen Importwegen gibt es auch den Proteinimport über Translokationseinheiten an der äußeren (TOC) und inneren Hüllmembran des Chloroplasten (TIC).

Die meisten Kern-codierten Plastidenproteine weisen eine N- oder deutlich seltener eine C-terminale Erkennungssequenz auf um über die beschriebenen Wege importiert zu werden. Es wurden jedoch auch Kern-codierte Plastidenproteine identifiziert, die unabhängig von einem solchen Signal in den Plastiden gelangen (Miras *et al.*, 2002; Kleffmann *et al.*, 2004; Armbruster *et al.*, 2009). Es wird angenommen dass diese Proteine über bislang unbekannte Wege einen nicht-kanonischen Import beschreiten.



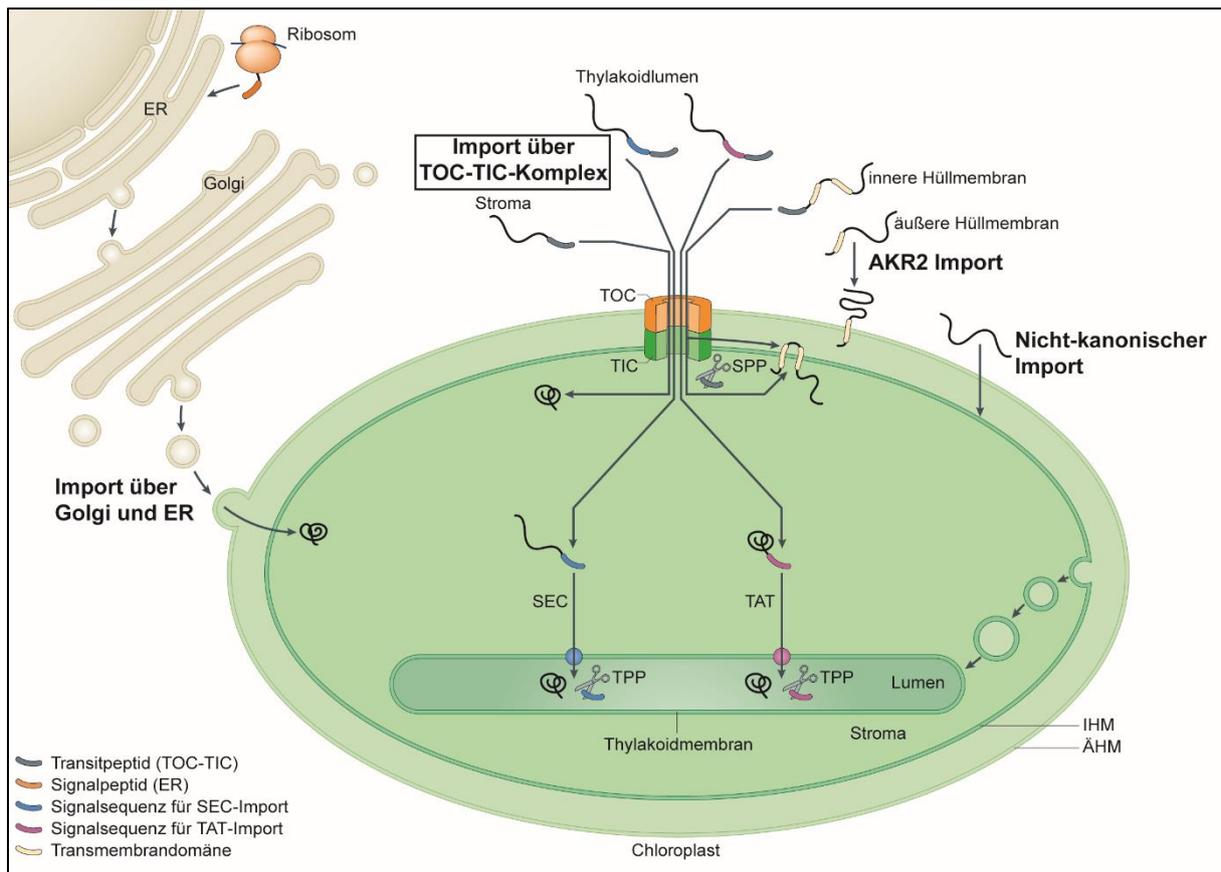


Abb. 1.2: Posttranslationale Importwege Kern-codierter Proteine an den Zielort im Plastiden. Der Plastid wird nach außen von einer doppelten Hüllmembran begrenzt. Zwischen der äußeren (ÄHM) und inneren (IHM) Hüllmembran befindet sich ein Intermembranraum. Die Plastidenhülle grenzt das sog. Stroma vom Rest der Zelle ab. Das Stroma ist durchzogen von einem Membransystem den sog. Thylakoiden, welche ein Lumen vom Stroma abgrenzen. Sowohl die Membranen als auch die von ihnen begrenzten Räume müssen mit Kern-codierten Plastidenproteinen versorgt werden. Bekannte Importwege sind momentan: Import über ER und Golgi, AKR2-abhängiger Import und der Hauptimportweg über den TOC-TIC-Importkomplex. Daneben werden noch Wege für den nicht-kanonischen Import von Proteinen ohne N- oder C-terminale Erkennungssequenz angenommen. Proteine, die über die TOC-TIC-Importmaschinerie in den Plastiden gelangen, besitzen N-terminal ein Transitpeptid, welches im Stroma von einer stromalen prozessierenden Peptidase (SPP) abgespalten wird. An dieses Transitpeptid können sich weitere Signalsequenzen anschließen, welche von Importkomponenten der Thylakoide erkannt werden können. Nötig sind solche Sequenzen für den Import über den TAT- (*twin arginine translocase*) bzw. SEC- (*secretory*) Weg. Auch diese Signale werden nach dem Import über eine thylakoidäre prozessierende Peptidase entfernt (Nach Jarvis und López-Juez, 2013).

Als bedeutendster Importweg gilt die Translokationsmaschinerie aus TOC- und TIC-Subkomplexen, da die meisten Proteine über diesen importiert werden (Paila *et al.*, 2015).



Importanalysen mit isolierten Chloroplasten von *Pisum sativum* haben gezeigt, dass der Importprozess über die TOC-TIC-Importmaschinerie energetisch in drei Phasen unterteilt werden kann: i) Die ATP-unabhängige reversible Bindung an den Chloroplasten ii) Die schwach ATP-abhängige Bildung eines frühen Importintermediates, was die beginnende Translokation des Importsubstrates durch die äußere Hüllmembran widerspiegelt. iii) Die ATP-abhängige Translokation über beide Hüllmembranen in das Stroma, was als spätes Importintermediat definiert wurde (Andrès *et al.*, 2010). Neben ATP ist für den Importprozess und zur Ausbildung des frühen Importintermediates GTP notwendig (Young *et al.*, 1999). Nach erfolgtem Import des Vorläufers ins Stroma des Plastiden wird das N-terminale Transitpeptid des Proteins durch eine stromale prozessierende Peptidase (SPP) abgespalten (Richter und Lamppa, 1998). Das Protein kann nun mit der Hilfe von Chaperonen seine korrekte Konformation einnehmen oder an seinen intraplastidären Zielort weitertransportiert werden (Abb. 1.2).

1.2.1 Chaperone als cytosolische Faktoren zur Unterstützung des plastidären Proteinimports

Für den Transport in den Plastiden müssen Kern-codierte Proteine zu der Plastidenhülle gelangen. Mittels *in vitro* synthetisierter Vorläuferproteine wurden mehrere cytosolische Komponenten entdeckt, die in der Lage sind an Plastidenproteine zu binden. Es wird angenommen, dass die cytosolischen Faktoren die Aufgabe haben, die potentiellen Importsubstrate vor Abbau geschützt zum Importapparat zu geleiten und für einen effektiven Import im ungefalteten Zustand zu halten. Zu diesen cytosolischen Komponenten zählen auch Vertreter der Hsp70 und Hsp90 Familie (Paila *et al.*, 2015). Die TOC-Komponente Toc64 besitzt drei *tetratricopeptide repeat* Motive (Sohrt und Soll, 2000), welche vermutlich zur Interaktion mit Isoformen von Hsp70 und Hsp90 dienen. Tatsächlich wurde gezeigt, dass Vorläuferproteine mit gebundenem Hsp90 von Toc64 erkannt werden (Qbadou *et al.*, 2006). Das Importsubstrat wird nachfolgend an andere Komponenten des TOC-Komplexes weitergereicht. Des Weiteren wurden zwei *guidance* Komplexe beschrieben, welche an den plastidären Vorläufer binden. Einer dieser Komplexe wird durch ein 14-3-3 Protein und cytosolisches Hsp70 (May und Soll, 2000) gebildet und der andere aus einem HOP-Protein und dem Immunophilin FKBP73 (Fellerer *et al.*, 2011). Für die Erkennung der Vorläuferproteine durch den 14-3-3-Komplex werden Phosphorylierungen im Bereich des Transitpeptids benötigt. Eine solche Phosphorylierung konnte für *in vitro* exprimierte Importsubstrate unter Verwendung von Weizenkeimextrakt nachgewiesen werden (May und Soll, 2000). Es konnte



auch eine Gruppe potentieller Kinasen beschrieben werden, die *in vitro* in der Lage sind plastidäre Vorläufer zu phosphorylieren aber keine Spezifität für mitochondriale Importsubstrate zeigen (Martin *et al.*, 2006). Ob eine Phosphorylierung im Transitpeptidbereich *in vivo* vorkommt konnte bis jetzt jedoch nicht gezeigt werden.

1.2.2 TOC: Aufbau des Translokationsapparates an der äußeren Hüllmembran des Chloroplasten

Die Erkennung der zu importierenden Proteine erfolgt durch Vertreter der Toc159- und Toc34-Familie. Diese sind als Rezeptoren an der äußeren Plastidenhüllmembran beschrieben (Kessler *et al.*, 1994). Für *Arabidopsis thaliana* sind vier Vertreter der Toc159-Familie bekannt: Toc159, Toc132, Toc120 und Toc90 (Soll und Schleiff, 2004; Shi und Theg, 2013). Diese setzen sich aus drei Domänen zusammen. N-terminal befindet sich die A-Domäne. Diese besitzt einen hohen Anteil an sauren Aminosäuren was namensgebend für diese Domäne ist (A = *acidic* = sauer). Die A-Domäne bildet das wesentliche Unterscheidungsmerkmal zwischen den Toc159-Vertretern. Sowohl die Aminosäuresequenz als auch die Länge der Domäne sind sehr spezifisch für jedes der Rezeptorproteine. An die A-Domäne schließt sich die G-Domäne an, welche ein GTPase-Motiv umfasst. C-terminal befindet sich ein Bereich, der das Protein in der Membran verankert, die sog. M-Domäne (Bauer *et al.*, 2000).

Die Vertreter der Toc34-Familie bestehen aus einer cytosolischen, N-terminalen G-Domäne und einem C-terminalen hydrophoben Membrananker in Form einer Transmembranhelix (Kessler *et al.*, 1994). Für *Arabidopsis thaliana* wurden zwei Homologe beschrieben: Toc34 und Toc33 (Jarvis *et al.*, 1998).

Durch die Verwendung von schlecht oder nicht hydrolysierbaren GTP-Analoga ist es möglich den Plastidenimport zu inhibieren, woraus man schließen kann, dass die Aktivität von GTPasen essentiell für den Importprozess ist (Kessler *et al.*, 1994). Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Mutation der G-Domäne bei Toc159 bzw. Toc33 keinen bedeutenden Einfluss auf die plastidäre Importfähigkeit hat (Agne *et al.*, 2009; Aronsson *et al.*, 2010). Denkbar wäre, dass es zwischen den Toc159- bzw. Toc34-Vertretern einen funktionellen Überlapp in der GTPase-Aktivität gibt und nur ein Defekt in den G-Domänen mehrerer TOC-GTPasen zu einem deutlichen Effekt führt. Ein weiteres Protein, welches an der äußeren Membran des Chloroplasten mit Vorläufern interagiert, ist Toc75 (Kouranov und Schnell, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass dieses Protein einen Ionen-durchlässigen Kanal bildet (Hinnah *et al.*,



1997). Eine Null-Mutation in *TOC75* ist embryonal (Hust und Gutensohn, 2006) was belegt, dass es sich um einen essentiellen Importkanal an der äußeren Membran des Chloroplasten handelt. Es wurde gezeigt, dass die chloroplastidären Importkomponenten Toc159, Toc34 und Toc75 von *Pisum sativum* einen stabilen Komplex bilden der gut isolierbar ist (Schleiff *et al.*, 2003b) und ausreicht um Vorläuferproteine in Proteoliposomen zu importieren (Schleiff *et al.*, 2003a). Es ist darum davon auszugehen, dass Vertreter der Toc159- und Toc34-Familie mit Toc75 den TOC-Kernkomplex bilden (Agne und Kessler, 2009, Abb. 1.3).

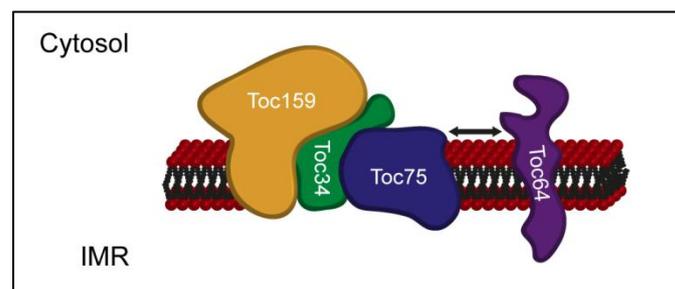


Abb. 1.3: Zusammensetzung des TOC-Komplexes. Der Kern des TOC-Komplexes besteht aus einem Vertreter der Toc159- und der Toc34-Familie, sowie Toc75. Toc159 und Toc34 sind als Rezeptoren des Komplexes beschrieben, während Toc75 den Kanal für die zu importierenden Proteine an der äußeren Membran bildet. Für *Arabidopsis thaliana* sind vier Toc159-Homologe beschrieben: Toc159, Toc132, Toc120 und Toc90. Diese unterscheiden sich im Wesentlichen in ihrer N-terminalen A-Domäne (A=*acidic*=sauer). Für Toc34 sind zwei Homologe bekannt: Toc33 und Toc34. Sowohl die Toc34- als auch Toc159-Vertreter besitzen eine GTPase- sowie eine Membrananker-Domäne. Toc64 scheint nur transient mit dem TOC-Kernkomplex zu assoziieren. Es wird als alternativer Rezeptor für die Erkennung von Importsubstraten mit gebundenem Hsp90 diskutiert. Auch im Intermembranraum (IMR) soll Toc64 mit den zu importierenden Proteinen interagieren können.

Einen alternativen Weg stellt der Import von Vorläufern mit N-terminal gebundenem Hsp90 über Toc64 dar (Sohrt und Soll, 2000; Qbadou *et al.*, 2006). Diese TOC-Komponente weist Domänen im Cytosol und Intermembranraum auf. Man geht davon aus, dass es somit in der Lage ist auf beiden Seiten der äußeren Plastidenhüllmembran mit dem Vorläufer zu interagieren und somit dessen Translokation zu vermitteln (Qbadou *et al.*, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass Toc64 mit Toc33 interagiert, also beide Proteine im Import kooperieren (Sommer *et al.*, 2013). Jedoch scheint Toc64 keine zentrale Bedeutung im plastidären Proteinimport einzunehmen, da Mutanten unter physiologischen Wachstumsbedingungen kaum phänotypische Auffälligkeiten gegenüber dem Wildtyp aufweisen (Rosenbaum Hofmann und Theg, 2005; Aronsson *et al.*, 2007). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Pflanzen der



Arabidopsis thaliana Nullmutantenlinie *toc64-1* unter Starklicht einen kleineren Rosettendurchmesser und unter Schwachlicht eine niedrigere maximale PSII-Quantenausbeute als der Wildtyp aufweisen. Bei Salzstress zeigen diese Mutanten einen Phänotyp der von dem des Wildtyps abweicht (Sommer *et al.*, 2013). Denkbar wäre, dass Toc64 unter bestimmten Stressbedingungen eine Import-unterstützende Funktion einnimmt.

1.2.3 TIC: Aufbau des Translokationsapparates an der inneren Hüllmembran des Chloroplasten

An der inneren Hüllmembran übernimmt der TIC-Komplex den Import von Kern-codierten Plastidenproteinen (Abb. 1.4). Die ersten Komponenten, die man entdeckte, waren Tic110 (Schnell *et al.*, 1994) und Tic40 (Wu *et al.*, 1994; Stahl *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass beide Proteine miteinander interagieren (Stahl *et al.*, 1999; Chou *et al.*, 2003) und somit in einem Komplex vorkommen. Mittels elektrophysikalischer Messungen konnte in Gegenwart von heterolog exprimiertem und rekonstituiertem Tic110 Ionenkanal-Aktivitäten festgestellt werden (Heins *et al.*, 2002). Dies ist ein Hinweis, dass Tic110 eine Rolle bei der Bildung eines Kanals an der inneren Hüllmembran der Plastiden spielt. Während Tic110 stromale Chaperone rekrutiert (Kessler und Blobel, 1996) und stromal mit importierten Proteinen interagiert (Inaba *et al.*, 2003; Chou *et al.*, 2006), ist Tic40 selber als Co-Chaperon beschrieben (Chou *et al.*, 2003). Es wird diskutiert, dass dieser Chaperon-Komplex am Faltungsprozess und der Qualitätskontrolle importierter Proteine beteiligt ist. Des Weiteren geht man davon aus, dass einzelne Chaperone Bestandteile des stromalen Importmotors sind (Flores-Pérez und Jarvis, 2013; Flores-Pérez *et al.*, 2016). Durch die Suche nach *tic40* Suppressor-Genen hat man Indizien finden können, dass Tic40 neben seiner Rolle im Import auch Prozesse beeinflussen könnte die eine Rolle bei der Biogenese von Thylakoiden spielen (Bedard *et al.*, 2017).

Mittels nativer Gelelektrophorese wurde ein 1 MDa-TIC-Komplex entdeckt, der kein Tic110 enthält (Kikuchi *et al.*, 2009). Dieser enthielt nachweisbar Tic20 und Tic21, welche in vorangegangenen Studien als mögliche kanalbildende Komponenten beschrieben wurden (Chen *et al.*, 2002; Teng *et al.*, 2006). Identifiziert wurde Tic20 ursprünglich zusammen mit Tic22 (Kouranov und Schnell, 1997; Kouranov *et al.*, 1998). Bei Tic22 handelt es sich um die einzige Komponente im Intermembranraum, die bis jetzt unumstritten ist und möglicherweise eine Rolle bei der Vermittlung des Imports substrats zwischen dem TOC- und TIC-Komplex spielt (Kouranov *et al.*, 1998; Rudolf *et al.*, 2013). Mittels *in vitro* Analysen mit heterolog



überexprimiertem und in Liposomen rekonstituiertem Tic20 konnte eine Ionenkanal-Aktivität nachgewiesen werden (Kovacs-Bogdan *et al.*, 2011), was die TIC-Komponente als Kanalprotein an der inneren Hüllmembran des Plastiden bestätigt. Für *Arabidopsis thaliana* sind vier Isoformen von Tic20 beschrieben: Tic20-I, -II und IV, V (Hirabayashi *et al.*, 2011; Machettira *et al.*, 2011). Dabei stellt Tic20-I die als Importkomponente identifizierte Isoform an der inneren Hüllmembran des Plastiden dar. Mittels Sequenzanalyse konnte gezeigt werden, dass Tic20-IV die größte Ähnlichkeit zu Tic20-I aufweist. Des Weiteren ist Tic20-IV in der Lage, einen Defekt in Tic20-I partiell zu komplementieren (Hirabayashi *et al.*, 2011), was auf eine überlappende Funktion hindeutet.

Mittels co-Isolationsexperimenten einer Variante von Tic20-I mit Affinitätstag, konnte 2013 ein neuer 1 MDa-TIC-Komplex definiert werden, der zwar Tic20-I aber weder Tic21 oder Tic22 noch die Komponenten Tic110 oder Tic40 enthielt (Kikuchi *et al.*, 2013). Stattdessen wurden der TIC-Importmaschinerie bis dahin unbeschriebene Bestandteile zugeordnet: Tic100, Tic214 und Tic56. Bei der Komponente Tic214 handelt es sich um ein Plastiden-codiertes Protein, welches auch unter der Bezeichnung Ycf1 (*hypothetical chloroplast open reading frame 1*) bekannt ist. Es stellt die erste plastiden-codierte Komponente der TOC-TIC-Importmaschinerie dar, die noch dazu als essentiell für die Entwicklung von *Arabidopsis thaliana* beschrieben ist (Bölter und Soll, 2017). Beim Verlust einer der anderen Komponenten nehmen die Pflanzen einen albinotischen Phänotyp an, der dem von *tic20-I* gleicht (Kikuchi *et al.*, 2013). Auch Doppelmutanten basierend auf *tic20-I* und *tic56* bzw. *tic100* zeigen keine phänotypischen Unterschiede gegenüber den Einzelmutanten. Damit wird bestätigt, dass bei diesen Pflanzen der gleiche funktionelle Defekt, hervorgerufen durch eine gestörte Assemblierung des 1 MDa-TIC-Komplexes, vorliegt. Die Isolation des Importkomplexes war über Affinitäts-tag tragende Imports substrate möglich und für den gesamten Komplex konnte eine Ionenkanalaktivität nachgewiesen werden. Diese Befunde bestätigen, dass es sich um einen Importkomplex handelt. Allerdings wurden diese Beobachtungen auch schon für Tic20 alleine gemacht (Kouranov und Schnell, 1997; Kouranov *et al.*, 1998; Kovacs-Bogdan *et al.*, 2011), womit die genaue Rolle und Bedeutung der einzelnen Komponenten für den Komplex bzw. die Ausbildung eines Importkanals offen bleibt.



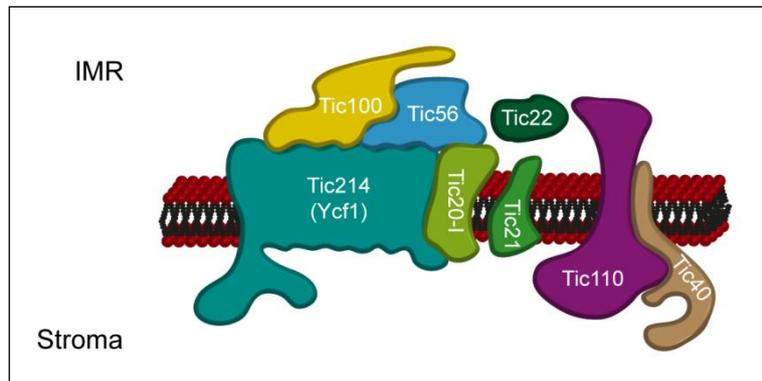


Abb. 1.4: Die bekannten Komponenten der TIC-Importmaschinerie. Ursprünglich wurde Tic110 als Kanal an der inneren Membran des Chloroplasten beschrieben. Es wurde eine Assoziation mit Tic40 nachgewiesen, welches als co-Chaperon beschrieben ist. Tic110 scheint zur stromalen Rekrutierung von Chaperonen zu dienen. Später kamen noch Tic20 und Tic21 als potentielle Kanalproteine hinzu, wobei diese scheinbar unabhängig von Tic110 in den Importprozess involviert sind. Tic22 wurde zusammen mit Tic20 entdeckt und stellt heute die einzige bekannte Komponente im Intermembranraum (IMR) dar. Tic20-I bildet mit Tic214, Tic100 und Tic56 den jüngst beschriebenen 1 MDa-TIC-Komplex (Kikuchi *et al.*, 2013).

1.2.4 Stromale Chaperone als Motor und Faltungshelfer an der Importmaschinerie

Nach der Passage der inneren Membran gelangt das zu importierende Protein in das Stroma des Plastiden. Wie zuvor an der cytosolischen Seite der Plastidenhülle sind auch hier Chaperone neben den Komponenten des TIC-Komplexes am Importprozess beteiligt. Neben Vertretern der Hsp70 und Hsp90 Familie wurde auch eine Beteiligung von Hsp93 und Chaperonin (Cpn) 60 beschrieben (Paila *et al.*, 2015). Der plastidäre Proteinimport ist ein sehr energieaufwendiger Prozess (Schnell und Blobel, 1993) wobei die höchste ATP-Konzentration im Stroma benötigt wird. Es ist also anzunehmen, dass der Motor der Importmaschinerie hier lokalisiert ist. Diskutiert werden zwei Proteine als Kernkomponenten des stromalen Importmotors: Hsp93 und stromales Hsp70.

Bei Hsp93 handelt es sich um einen Vertreter der Hsp100 Familie, welche ihrerseits zur AAA+ Superfamilie (AAA = ATPase-assoziiert mit unterschiedlichen zellulären Aktivitäten) zählt. Vertreter dieser Familie können viele Funktionen innehaben, u.a. können sie auch bei der Translokation von Proteinen über Membranen eine Rolle spielen (Flores-Pérez und Jarvis, 2013). Es konnte nachgewiesen werden, dass Hsp93 sowohl mit dem Tic110/Tic40 Komplex (Kessler und Blobel, 1996; Chou *et al.*, 2003) als auch mit Transitpeptiden von Kern-codierten Plastidenproteinen interagiert (Chou *et al.*, 2006). Des Weiteren wurde für eine *hsp93*-Mutante



ein Defekt im plastidären Proteinimport nachgewiesen, was die Bedeutung des Proteins für diesen Prozess belegt (Kovacheva *et al.*, 2005).

Vertreter der AAA+ Superfamilie können aber auch an der ATP-abhängigen Proteolyse beteiligt sein (Hanson und Whiteheart, 2005). Neben einer Funktion im Importmotor wird daher diskutiert ob Hsp93 eine Rolle bei der Qualitätskontrolle importierter Proteine spielt (Flores-Pérez und Jarvis, 2013; Flores-Pérez *et al.*, 2016). Es gibt Hinweise, dass es sich bei Hsp93 um einen Bestandteil des caseinolytischen Proteasekomplexes (Clp) in Plastiden handeln könnte. Dafür spricht, dass Hsp93 als ClpC Protein die proteolytische Aktivität von *Escherichia coli* ClpP unterstützen kann (Shanklin *et al.*, 1995). Des Weiteren wurde beschrieben, dass eine Hsp93-Variante ohne potentielles ClpP Bindemotiv nicht in der Lage ist *hsp93* Pflanzen zu komplementieren (Flores-Pérez *et al.*, 2016).

Neben Hsp93 wird auch stromales Hsp70 als Motorbestandteil der Importmaschinerie diskutiert. Stromales Hsp70 konnte reproduzierbar mit Komponenten der plastidären Importmaschinerie gereinigt werden (Shi und Theg, 2010; Su und Li, 2010). Studien haben gezeigt, dass ein Defekt in stromalen Hsp70-Proteinen zu einer reduzierten Importfähigkeit der Plastiden führt (Shi und Theg, 2010; Su und Li, 2010). Des Weiteren konnten in *Physcomitrella patens* Nukleotid-Austauschfaktoren identifiziert werden, die bei der Funktion von Hsp70-Proteinen eine wichtige Rolle spielen (Shi und Theg, 2010). Ob nun Hsp93 oder Hsp70 die treibende Kraft für den plastidären Importprozess liefert, bleibt zu klären. Eine weitere Option wäre die Existenz von zwei Motorkomponenten.

Neben einem stromalen Importmotor und einer Qualitätskontrolle für importierte Proteine wird auch die Assoziation von Faltungshelfern diskutiert. So konnte Tic110 zusammen mit Cpn60, dem Homologen zu GroEL aus *Escherichia coli* isoliert werden (Kessler und Blobel, 1996). Dieses Chaperonin bildet zusammen mit Cpn10 einen Faltungsapparat, dessen faltungsunterstützende Wirkung gut belegt ist (Boston *et al.*, 1996).

1.3 Das Transitpeptid als Träger der notwendigen Information für den plastidären Proteinimport

Je komplexer der Aufbau einer Zelle wird und je höher die damit verbundene Kompartimentierung, desto wichtiger ist es, die Kern-codierten Proteine richtig zu verteilen. Die Mehrzahl der Kern-codierten Plastidenproteine besitzen N-terminal ein Transitpeptid, darauf können weitere Signalsequenzen für den TAT (*twin arginine translocase*) - bzw. SEC



(secretory)-abhängigen Import ins Lumen der Thylakoide folgen. Die Signalsequenzen, werden im Zielkompartiment von den entsprechenden Peptidasen vom restlichen Protein abgespalten (Abb. 1.2).

Die Länge der Transitpeptide variiert unter den Kern-codierten Plastidenproteinen sehr (von Heijne und Nishikawa, 1991). Auch zwischen einzelnen Spezies können große Unterschiede auftreten. Man geht davon aus, dass die Transitpeptide in Algen im Schnitt deutlich kürzer sind als die höherer Pflanzen (Bruce, 2000; Patron und Waller, 2007). Man stützt sich dabei vor allem auf Untersuchungen zu Transitpeptiden der Alge *Chlamydomonas reinhardtii*. Hier wurde von einer durchschnittlichen Transitpeptidlänge von 29 Aminosäuren berichtet (Franzen *et al.*, 1990), während es bei *Arabidopsis thaliana* ca. 50 und bei *Oriza sativa* ca. 54 Aminosäuren sind (Zybailov *et al.*, 2008). Es wird angenommen, dass höhere Pflanzen auf Grund ihrer höheren Komplexität einen deutlich differenzierteren Proteinimport betreiben als einzellige Algen und deshalb auch mehr Informationen in den Transitpeptiden enthalten sein müssen (Bruce, 2000). So setzen sich mehrzellige Pflanzen aus unterschiedlichen Geweben und Zellen verschiedenen Alters zusammen. Der Proteinbedarf hängt dabei vom Plastidentypen und dem Entwicklungsstand des Plastiden ab. Es konnte gezeigt werden, dass Transitpeptide auch Bereiche haben können, die eine Rolle bei der altersabhängigen Regulierung des Imports spielen. Diese Bereiche scheinen allerdings keine Bedeutung beim Import der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* zu haben (Teng *et al.*, 2012).

Neben der Länge ist auch die Aminosäuresequenz verschiedener Transitpeptide höchst unterschiedlich (von Heijne und Nishikawa, 1991). Ein N-terminal auftretendes Phenylalanin in den Transitpeptiden von Rhodophyta und Glaucophyta stellt dabei als gut konserviertes Sequenzmotiv eine Ausnahme bei der doch eher heterogenen Primärstruktur von Transitpeptiden dar (Patron und Waller, 2007). Typisch für Transitpeptide ist ein dreigeteilter Aufbau (Bruce, 2001). Auf einen hydrophoben N-Terminus folgt die mittlere Region, die Spezies-abhängig reich an Serin oder Alanin ist (Zybailov *et al.*, 2008), während C-terminal die basische Aminosäure Arginin angereichert ist. Aminosäuren mit saurem Rest sind im Transitpeptid eher selten (Bruce, 2001). Den C-terminus des Transitpeptids stellt die Spaltstelle für die SPP dar, welche durch ein schwach konserviertes Motiv angezeigt wird (Gavel und von Heijne, 1990). Diese allgemeinen Merkmale in der Beschaffenheit von Transitpeptiden bilden die Grundlage, diese in Proteinen vorherzusagen zu können (Emanuelsson *et al.*, 1999).



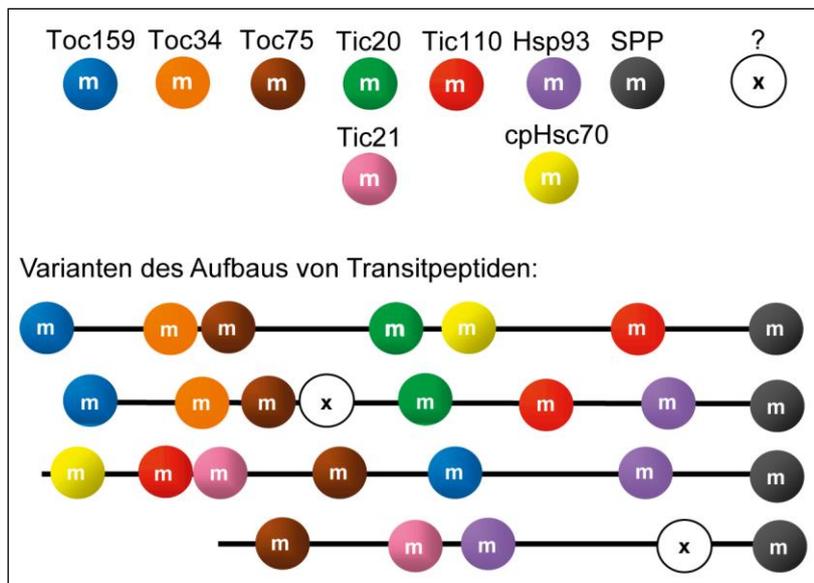


Abb. 1.5: ‘Multi-selection and multi-order’ (M&M) Modell nach Li und Teng (2013). Bei diesem Modell wird davon ausgegangen, dass in den Transitpeptiden von Imports substraten mehrere Motive existieren (dargestellt als Kreise). Diese sollen notwendig sein, um im Rahmen des Importprozesses die involvierten Importkomponenten ansprechen zu können. Kreise mit einem x repräsentieren dabei noch unbekannte Interaktionen. Die große Anzahl an möglichen Motivzusammensetzungen und die Annahme, dass die Transitpeptide über unterschiedlich viele Motive verfügen können, soll die hohe Diversität der Transitpeptide erklären.

Wenn Transitpeptide so hoch variabel in ihrem Aufbau sind, stellt sich die Frage, wie diese zur Erkennung Kern-codierter Plastidenproteine durch die Importmaschinerie beitragen. Eine mögliche Erklärung ist in Abb. 1.5 dargestellt. Im M&M-Modell (*multi-selection and multi-order*, Li und Teng, 2013) geht man davon aus, dass Transitpeptide aus mehreren Modulen aufgebaut sind, die für die Interaktion mit den einzelnen Komponenten des Importapparates wichtig sind. In einer Reihe von Studien wurde gezeigt, dass der Austausch, das Entfernen oder Invertieren von Transitpeptidbereichen einen entscheidenden Einfluss auf die Importeffizienz von Proteinen hat (Pilon *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009a; Chotewutmontri *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2015). Diese Befunde bestätigen den modularen Aufbau von Transitpeptiden. Trotz dieser Studien wurden bis jetzt nur wenig Motive beschrieben und diese waren meist nicht universell anwendbar. Die bestetablierten Motive bilden die Aminosäureabfolge FGLK (Pilon *et al.*, 1995) und ein N-terminaler hydrophober Bereich, welcher als Bindemotiv für Hsp70 dient (Ivey *et al.*, 2000). Das FGLK-Motiv tritt im mittleren Bereich des Transitpeptids auf und ist nur schwach konserviert (Chotewutmontri *et al.*, 2012).



Es gibt Überlegungen, dass neben der Primär- auch die Sekundärstruktur und evtl. sogar Tertiärstrukturen eine Rolle bei der Bildung von Erkennungsmotiven in Transitpeptiden spielen könnten (Bruce, 2001). Bis jetzt gibt es allerdings nicht viele Untersuchungen zu solchen Strukturen in Transitpeptiden. Die meisten Untersuchungen zu Sekundärstrukturen wurden unter abiotischen Bedingungen durchgeführt und nur wenige befassen sich mit Transitpeptiden höherer Pflanzen. Untersuchungen gibt es zum Ferredoxin-Transitpeptid von *Silene pratensis* (Wienk *et al.*, 1999; Wienk *et al.*, 2000). Hier konnte nachgewiesen werden, dass abhängig von der molekularen Umgebung N- und C-terminal alpha-helikale Strukturen ausgebildet werden können, die durch einen unstrukturierten Bereich mit hoher Flexibilität im Peptidrückgrad getrennt sind. Der Nachweis von Sekundärstrukturen belegt, dass Transitpeptide in der Lage sind, solche Strukturen auszubilden. Jedoch gibt es keinen Nachweis, dass Sekundär- oder Tertiärstrukturen *in vivo* auftreten und eine Rolle für den plastidären Proteinimport spielen.

1.4 Die Spezifität für Importsubstrate an der Plastidenhülle

Die Entdeckung, dass bestimmte Importkomponenten durch mehrere Vertreter repräsentiert werden, wirft die Frage auf, welche Rolle diese im plastidären Proteinimport einnehmen. Eine mögliche Erklärung wäre eine differenzierte Substratspezifität der einzelnen Vertreter. Wie beschrieben, setzt sich die Toc159-Importrezeptorfamilie an der äußeren Hüllmembran aus mehreren Homologen zusammen. Für *Arabidopsis thaliana* sind auch zwei Vertreter der Toc34-Familie beschrieben. Die Beobachtung, dass die Abwesenheit der einzelnen Vertreter unterschiedliche Auswirkungen für die Pflanze hat, liefert ein erstes Indiz, dass eine funktionelle Differenzierung besteht. Während die *toc33*-Mutante *ppi1* (*plastid protein import 1*) im Vergleich zum Wildtyp kleiner und ausgebleichen grün erscheint (Jarvis *et al.*, 1998; Gutensohn *et al.*, 2004), zeigt die *toc34*-Mutante *ppi3* (*plastid protein import 3*) kaum einen phänotypischen Unterschied (Constan *et al.*, 2004). Das Ausschalten beider Toc34-Vertreter ist jedoch embryolethal was auf eine gewisse Redundanz in der Funktion hindeutet (Constan *et al.*, 2004).

Ähnlich wie bei den Toc34-Vertretern, verhält es sich auch bei der Toc159-Importrezeptorfamilie. Die *toc159*-Mutante *ppi2* (*plastid protein import 2*) zeigt einen albinotischen Phänotyp und eine stark gestörte Plastidenentwicklung. Es wurde gezeigt, dass einzelne photosynthetisch relevante Proteine in *ppi2* nicht akkumulieren. Die Kultivierung solcher Mutanten ist nur unter der externen Zufuhr von Zucker möglich. Diese essentielle



Bedeutung von Toc159 für die Pflanzenentwicklung hat dazu beigetragen, dass dieser Vertreter die Bezeichnung Hauptimportrezeptor erhalten hat (Bauer *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu, zeigen die *toc120*-, *toc132*- und *toc90*-Nullmutanten keine deutlichen phänotypischen Veränderungen gegenüber dem Wildtyp (Kubis *et al.*, 2004). Erst das Ausschalten von Toc120 und Toc132 hat drastische Auswirkungen auf die Pflanzenentwicklung (Ivanova *et al.*, 2004; Kubis *et al.*, 2004). Dies liefert, wie schon bei der Toc34-Familie, den Hinweis einer funktionellen Überschneidung beider Proteine. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Toc120, Toc132 oder Toc90 eine Null-Mutation in *TOC159* nicht komplett kompensieren kann (Kubis *et al.*, 2004). Es ist lediglich eine partielle Kompensation durch die Überexpression von Toc90 in *ppi2* beschrieben (Infanger *et al.*, 2011).

Zusammengenommen sind diese Beobachtungen sehr deutliche Hinweise, dass es bei den Vertretern der Toc159-Familie eine Spezialisierung auf Importsubstrate gibt. Unterstützt wird diese Hypothese durch *in vivo* und *in vitro* Importversuche verschiedener Substrate (Smith *et al.*, 2004). Es ist davon auszugehen, dass diese Substratspezifität bei den Toc159-Importrezeptoren vor allem auf die N-terminale saure Domäne zurückzuführen ist (Inoue *et al.*, 2013).

Basierend auf den Erkenntnissen zu den transgenen Pflanzenlinien wurde eine Unterteilung in zwei Gruppen vorgenommen. Toc159 soll einen Komplex mit einer Substratspezifität für photosynthetisch relevante Proteine bilden, während ein Komplex mit Toc120 bzw. Toc132 den Import von Proteinen gewährleisten soll, die nicht für die Photosynthese relevant sind (Jarvis und Robinson, 2004).

Basierend auf der quantitativen Analyse und dem Abgleichen des Proteoms mit dem Transkriptom von *ppi2* konnten Proteine identifiziert werden, deren Abundanz eine spezifische Abhängigkeit von Toc159 zeigt (Bischof *et al.*, 2011). Diese Liste umfasst Proteine unterschiedlichster Stoffwechselwege. Mittels der Protoplasten-basierten Importanalyse eines RNA-Bindeproteins (RNP29) in Plastiden von *ppi2* konnte nachgewiesen werden, dass die Akkumulation dieses Proteins im außerordentlichen Maße von Toc159 abhängt (Grimmer *et al.*, 2014). In einer weiteren Studie wurde mittels *Split-Ubiquitin* Hefe Zwei-Hybrid Analyse die Interaktion eines breiten Spektrums an Importsubstraten mit Domänen der Importrezeptoren Toc159 und Toc132 analysiert (Dutta *et al.*, 2014). Dabei wurde festgestellt, dass die Substratdifferenzierung an den Rezeptoren nicht so strikt ist, wie anzunehmen war. Diese tiefgehenden Analysen des Substratspektrums der Toc159-Vertreter haben gezeigt, dass ein einfaches Modell zur Substratspezifität der TOC-Importmaschinerie nicht haltbar ist.



Neben einer Substratspezifität des Importapparates an der äußeren Membran wird auch eine solche an der inneren Membran diskutiert. Während ursprünglich nur ein TIC-Komplex um die Komponenten Tic110 und Tic40 bekannt war, hat sich immer mehr ein zweites Modul um Tic20-I etabliert (Nakai, 2015). Aktuell wird dieses Modul als eigenständiger Komplex mit einer Größe von 1 MDa behandelt. Dieser TIC-Komplex, der neben Tic20-I noch aus Tic214, Tic100 und Tic56 besteht, wurde sogar als genereller Importweg an der inneren Hüllmembran beschrieben (Kikuchi *et al.*, 2013). Eine naheliegende Erklärung für das Vorkommen mehrerer unabhängiger Importkomplexe an der inneren Hüllmembran wäre eine Spezialisierung dieser auf bestimmte Substrate.

Welche Rolle der Komplex um Tic110 bezüglich der Substratspezifität einnimmt, ist nicht näher bekannt. Mittels Protoplasten-basierten Importstudien konnte gezeigt werden, dass Tic20-I eine wichtige Rolle beim Import von RbcS (kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase) spielt, während der Import von E1 α (Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase) weitestgehend unabhängig von dieser Importkomponente zu sein scheint (Kikuchi *et al.*, 2009). *Arabidopsis thaliana* mit einer Null-Mutation in den Genen *TIC20-I*, *TIC56* und *TIC100* zeigen einen albinotischen Phänotyp (Hirabayashi *et al.*, 2011; Kikuchi *et al.*, 2013). Des Weiteren wird Tic20-I im Gegensatz zur Isoform Tic20-IV vornehmlich in photosynthetisch aktivem Gewebe exprimiert (Hirabayashi *et al.*, 2011). Diese Punkte führten zu der Annahme, dass der 1 MDa-Komplex um Tic20-I vor allem für den Import von Proteinen mit Relevanz für die Photosynthese verantwortlich ist, während ein anderer Komplex um Tic20-IV den Import der anderen Plastidenproteine übernimmt (Nakai, 2015). Allerdings ist dieses Modell sehr hypothetisch, da es keinerlei Daten zu dem Importkomplex um Tic20-IV gibt. Es bleibt zu überprüfen, ob eine solche simple Substratdifferenzierung am TIC-Komplex existiert oder die Definition der Substratklassen auch hier zu einfach ist.

1.5 Der plastidäre Proteinimport als zentraler Regulationspunkt zur Erhaltung, der Homöostase des Plastiden

Die Entwicklung der Pflanze hängt im hohen Maß von einer korrekten Plastidenbiogenese ab. Seit dem Ereignis der Endosymbiose hat sich der Plastid zu einem festen Bestandteil der eukaryotischen Zelle entwickelt. Dieser spielt eine zentrale Rolle im Metabolismus der pflanzlichen Zelle indem er diese mit energiereichen Verbindungen und essentiellen Bausteinen versorgt. Durch die Auslagerung ursprünglich plastidärer Gene in den Zellkern wurde das



Genom des Plastiden auf zwei unterschiedliche Kompartimente verteilt. Der Plastid ist also auf eine entsprechende Versorgung mit zum Teil essentiellen Genprodukten vom Zellkern angewiesen. Zwischen Zelle und dem Plastiden hat sich eine komplexe Wechselbeziehung etabliert, die über diverse Regulationsmechanismen im Gleichgewicht gehalten werden muss (Jarvis und López-Juez, 2013).

1.5.1 Möglichkeiten der direkten Regulation des plastidären Proteinimports

Eine Möglichkeit, um die Balance aufrecht zu erhalten und auf Veränderungen reagieren zu können, ist die direkte Regulation des plastidären Proteinimports über die Importmaschinerie. Als potentielle Sensoren des stromalen Redoxzustandes wurden die Komponenten Tic55 (Caliebe *et al.*, 1997), Tic32 (Hormann *et al.*, 2004) und Tic62 (Stengel *et al.*, 2008) entdeckt. Alle drei Proteine weisen Motive auf, die diese Funktion ermöglichen könnten und es konnte gezeigt werden, dass die drei Proteine transient über Tic110 mit dem TIC-Importkomplex interagieren können (Caliebe *et al.*, 1997; Hormann *et al.*, 2004; Stengel *et al.*, 2008). Für Tic55 konnte demonstriert werden, dass es Phyllobiline hydroxilieren kann und somit eine Rolle beim Chlorophyllabbau bei der pflanzlichen Seneszenz spielt (Hauenstein *et al.*, 2016). Die potentielle Funktion als Redoxsensor des Importapparates bleibt zu belegen. Der Redoxzustand des Stromas wird im Wesentlichen durch die photosynthetische Aktivität des Plastiden bestimmt. Es besteht also die Möglichkeit, dass die Komponenten Tic55, Tic32 und Tic62 die photosynthetische Aktivität im Plastiden mit dem plastidären Proteinimport koppeln (Sjuts *et al.*, 2017). Wie das Signal an die Importmaschinerie weitergegeben wird und der Import daraufhin reguliert wird, ist ungeklärt. Es konnte jedoch mittels *in vitro* Importanalysen gezeigt werden, dass eine erhöhte Konzentration des Photosyntheseproduktes und Reduktionsmittels NADPH im Stroma die Importeffizienz negativ beeinflusst (Zhang *et al.*, 2016).

Neben der Regulation des Plastidenimports in Abhängigkeit von der photosynthetischen Aktivität ist es wichtig, diesen auch auf den Entwicklungszustand des Plastiden abzustimmen. Gerade in jungen Entwicklungsstadien und während des Übergangs eines Plastiden in eine andere Form verändert sich das Plastidenproteom stark (Kleffmann *et al.*, 2007). Gerade am Anfang der Plastidenentwicklung wird ein breites Spektrum Kern-codierter Proteine für die Etablierung eines eigenständigen Genexpressionssystems sowie wichtiger Stoffwechselwege benötigt. Es ist nachgewiesen, dass die Importeffizienz mit zunehmendem Alter der Plastiden nachlässt (Dahlin und Cline, 1991).



Eine Möglichkeit der Importregulation ist über die Quantität der Importkomponenten und der damit verbundenen Verfügbarkeit der Importwege gegeben. So konnte für die Kanalproteine Toc75 an der äußeren Membran (Tranel *et al.*, 1995; Gutensohn *et al.*, 2000) sowie Tic20 an der inneren Membran (Chen *et al.*, 2002) eine Altersabhängigkeit der Expression und Abundanz nachgewiesen werden. Auch für die Rezeptorproteine an der äußeren Hüllmembran der Toc159- (Ivanova *et al.*, 2004) und Toc34-Familie (Jarvis *et al.*, 1998; Gutensohn *et al.*, 2000) in *Arabidopsis thaliana* konnte eine solche altersabhängige Entwicklung der Häufigkeit gezeigt werden. Die Abundanz dieser Importkomponenten ist dabei vor allem in noch relativ jungem Gewebe hoch und nimmt ab einem bestimmten Alter stark ab. Des Weiteren wurde durch das Analysieren einer Ethylmethansulfonat-mutagenisierten Pflanzenpopulation ein Genlocus identifiziert, der in der Lage ist, die Folgen der Mutation in *TOC33* auf die Pflanzenentwicklung zu unterdrücken (*SPI = suppressor of ppil locus1*). Es wurde gezeigt, dass dieses Gen eine RING-typ E3 Ligase codiert, welche in die Ubiquitinierung der TOC-Kernkomponenten involviert ist (Ling *et al.*, 2012). Durch Polyubiquitinierung können diese Bestandteile also als Proteasomsubstrat markiert und abgebaut werden. Dies könnte einen Weg zur dynamischen Variation des plastidären Importapparates darstellen.

Ein weiterer zentraler Regulationspunkt am plastidären Importapparat könnte die A-Domäne von Toc159 sein. Es handelt sich dabei um eine intrinsisch ungeordnete Domäne, welche bekannt für Protein-Protein-Interaktionen sind (Richardson *et al.*, 2009). Man geht darum davon aus, dass sie für die Rezeptor-Importsubstrat-Interaktion von entscheidender Bedeutung ist. Die N-terminale A-Domäne wird mit einer hohen Rate vom Rest des Proteins abgespalten (Agne und Kessler, 2010). Der Kontrollmechanismus und die Protease hinter diesem Phänomen sind unbekannt, doch es ist anzunehmen, dass dieser Vorgang der Kontrolle des Imports dient. Neben der proteolytischen Kontrolle der A-Domäne konnte auch nachgewiesen werden, dass diese stark phosphoryliert wird (Agne *et al.*, 2010). Die Kinase-abhängige Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung durch eine antagonistisch arbeitende Phosphatase zählt zu den Grundmechanismen der dynamische Steuerung der Aktivität von Proteinen (Schönberg und Baginsky, 2012). Welche Bedeutung die Phosphorylierung für den Import hat ist noch nicht klar. *In vitro* Analysen deuten darauf hin, dass nicht nur die A-Domäne sondern auch die G-Domänen von Toc159 und Toc34 als Kinasesubstrate erkannt werden (Sveshnikova *et al.*, 2000; Fulgosi und Soll, 2002). Dabei scheint die Phosphorylierung an der G-Domäne in *Arabidopsis thaliana* spezifisch für Toc33 zu sein, da diese Domäne im homologen Toc34 nicht *in vitro* phosphoryliert wird (Jelic *et al.*, 2003). Ob die Phosphorylierungen auch *in vivo*



stattfindet ist ungeklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Expression eines Toc33 mit gemintter Phosphorylierung Auswirkungen auf die frühe Pflanzenentwicklung hat (Oreb *et al.*, 2007). *In vitro* Analysen implizieren, dass durch die Phosphorylierung die GTPase-Aktivität (Jelic *et al.*, 2002), die Erkennung des Imports substrates (Sveshnikova *et al.*, 2000) und die Assemblierung des Importapparates (Oreb *et al.*, 2008) beeinflusst werden kann. Verändert man Toc33 genetisch so, dass eine Phosphorylierung in der G-Domäne nicht mehr möglich ist, hat dies jedoch keine Folgen auf die Pflanzenentwicklung (Aronsson *et al.*, 2006). Sollte es also tatsächlich zur *in vivo* Phosphorylierung kommen, bleibt offen inwieweit diese für die Importregulation von Bedeutung ist.

Die Kinasen, welche für die Phosphorylierung und damit die dynamische Modifikation in Betracht kommen sind noch weitestgehend unbekannt. Für viele Phosphorylierungsstellen der A-Domäne von Toc159 kommt Casein Kinase 2 in Betracht (Agne *et al.*, 2010). Allerdings gibt es in der A-Domäne Phosphorylierungsstellen, die sicher nicht von diesem Kinasetyp phosphoryliert werden. Mittlerweile wurde eine Kinase der äußeren Chloroplastenhüllmembran (KOC1) mit der TOC-TIC-Importmaschinerie co-isoliert (Zufferey *et al.*, 2017). Die Assoziation von KOC1 mit der Importmaschinerie konnte so sehr überzeugend nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass KOC1 *in vitro* in der Lage ist, die A-Domäne von Toc159 zu phosphorylieren. In Zukunft muss die Frage geklärt werden, ob diese Phosphorylierung auch *in vivo* erfolgt und welche Folgen diese für die Toc159-Funktion hat. Es bleibt auch zu klären, ob KOC1 noch weitere Zielproteine erkennt.

1.5.2 Die Koordination von Plastiden und Zellkern

Zur Aufrechterhaltung aller essentiellen plastidären Stoffwechselwege ist ein korrekter Import plastidärer Proteine vom Cytosol in den Plastiden von großer Bedeutung. Ein Defekt im Import kann dramatische Folgen für die Plastidenbiogenese und somit auch für die Entwicklung der Pflanze haben. Wird der Plastid in seiner weiteren Entwicklung gestört, können Signale an den Kern ausgesendet werden um die Expression von Plastidenproteinen entsprechend zu regeln. Diesen Signalfuss von den Plastiden zum Zellkern bezeichnet man als retrogrades *Signaling*. Es sind mehrere Auslöser für ein retrogrades Signal bekannt, wobei die Signaltransduktion komplex ist (Kleine und Leister, 2016). Auch ein Defekt im Toc159-abhängigen Import führt zu einem solchen Signal (Kakizaki *et al.*, 2009). Das Gen *GUNI* scheint dabei eine Schlüsselrolle zu spielen, da *gun1xppi2*-Doppelmutanten partiell eine molekulare



Kompensation der *toc159*-Mutation zeigen. Unter anderem verbessert sich deutlich die Expression des Zellkern-lokalisierten Transkriptionsfaktors *GLK1* (Kakizaki *et al.*, 2009). Dieser spielt vor allem eine Rolle bei der Expression von Kern-codierten Photosyntheseproteinen (Waters *et al.*, 2009). Tiefergehende Analysen zu *GUNI* liefern deutliche Hinweise, dass dieses Gen ein Protein mit einer Rolle in der plastidären Transkription codiert (Koussevitzky *et al.*, 2007). Eine gestörte Expression plastiden-codierter Gene gilt als Auslöser retrograder Signale (Oelmüller *et al.*, 1986). Wie in diesem Fall das Signal an den Kern übermittelt wird ist ungeklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass es an der Chloroplasten-Hülle membranverankerte Transkriptionsfaktoren gibt, die bei der Notwendigkeit eines retrograden Signals gespalten werden können. Der nicht-membrangebundene Teil kann dann in den Zellkern gelangen und dort die notwendigen regulatorischen Schritte initiieren (Sun *et al.*, 2011).

Es wird deutlich, dass ein Defekt im plastidären Proteinimport eine Kaskade an regulatorischen Mechanismen auslöst. Makroskopische Auswirkungen, wie eine veränderte Pflanzenentwicklung oder molekulare Auswirkungen, wie das Verschwinden bestimmter Proteine, müssen also keine direkte Folge des Defekts sein, sondern können indirekt auf regulatorischen Effekten basieren. So konnte schon im Fall von *Toc159* gezeigt werden, dass der Phänotyp von *ppi2* und das Fehlen vieler photosynthetischer Proteine nicht mit dem mangelnden Import dieser zusammenhängt. Es ist vielmehr die herunterregulierte Expression photosynthetisch wichtiger Gene, welche zu den Auswirkungen führen (Kakizaki *et al.*, 2009; Bischof *et al.*, 2011). Eine Trennung zwischen direkten und Folgeeffekten ist schwierig aber notwendig, um Fragen der Substratspezifität und *in vivo* Funktion der einzelnen Importkomponenten zu klären.

1.6 Zielstellung

Diese Arbeit hatte das Ziel neue Erkenntnisse in Bezug auf den plastidären Proteinimport zu gewinnen. Dabei wurden zwei Schwerpunkte gesetzt: i) Zum einen sollte die Beschaffenheit von Transitpeptiden plastidärer Proteine der Alge *Cyanophora paradoxa* analysiert werden ii) zum anderen war es das Ziel die 1 MDa-TIC-Komplexkomponente Tic56 Bezüglich ihrer Rolle im Plastiden näher zu charakterisieren.



i) Transitpeptide sind zwar essentielle Bestandteile eines funktionierenden Imports doch ist das genaue Prinzip noch nicht vollständig verstanden. Die meisten Studien repräsentieren Analysen einzelner Transitpeptide oder bioinformatisch vorhergesagter Transitpeptid-Datensätze.

Hinzu kommt, dass der Erkenntnisstand bezüglich der Beschaffenheit von Transitpeptiden bei höheren Pflanzen deutlich besser ist als im Fall einzelliger Algen. Nur wenige Studien existieren zu Transitpeptiden von Kern-codierten Proteinen, die in die Plastiden der Glaukophyta den sog. Cyanellen importiert werden.

Ziel dieser Arbeit war es experimentell eine umfassende Anzahl *in vivo* relevanter Transitpeptide von Cyanellenproteinen von *Cyanophora paradoxa* zu identifizieren. Die generelle Beschaffenheit dieser sollte bestimmt und mit der von Transitpeptiden der Gefäßpflanze *Arabidopsis thaliana* verglichen werden. Das Ziel war es Gemeinsamkeiten und Unterschiede von Transitpeptiden zweier evolutionär weit entfernter Organismen aufzuzeigen.

ii) In Vorarbeiten konnte eine TAP-tag tragende Variante von Toc159 (Agne *et al.*, 2010) unter nativen Bedingungen mit interagierenden Proteinen isoliert werden (Dr. Birgit Agne). Neben bekannten Interaktionspartner von Toc159 wurden auch neue identifiziert, die näher charakterisiert und hinsichtlich einer Funktion im plastidären Proteinimport untersucht werden sollten.

Eines dieser interagierenden Proteine wurde durch den Genlocus At5g01590 codiert. Annähernd zu Beginn der Arbeit wurde gezeigt, dass es sich dabei um eine Komponente des 1 MDa-TIC-Komplexes um Tic20-I handelt (Kikuchi *et al.*, 2013). Das Protein bekam die Bezeichnung Tic56. Die Autoren beschrieben den 1 MDa-TIC-Komplex als generellen Translokationskomplex an der inneren Hüllmembran und nahmen auf der Basis einzelner Hinweise an, dass dieser eine Importspezifität für photosynthetisch-relevante Proteine hat.

Ziel dieser Arbeit war es mit Hilfe von Mutantenlinien zu testen, welche Konsequenzen ein Defekt von Tic56 für den plastidären Import hat. Dazu sollte auch ermittelt werden was für Kern-codierte Proteine bei Abwesenheit von Tic56 noch in die Plastiden importiert werden können. Dieser Ansatz sollte dazu dienen der Frage der Substratspezifität auf TIC-Ebene nachzugehen.

Durch die quantitative Erfassung des Proteoms und des korrespondierenden Transkriptom von Nullmutanten sollte die Abhängigkeit einzelner Plastidenproteine sowie ganzer plastidärer Prozesse von Tic56 geprüft werden.



2 Publikationen

Veröffentlichungen, auf denen diese kumulative Dissertation basiert:

Manuskript 1:

Köhler, D., Dobritzsch, D., Hoehenwarter, W., Helm S., Steiner J. M., Baginsky, S. (2015). *Identification of protein N-termini in Cyanophora paradoxa cyanelles: transit peptide composition and sequence determinants for precursor maturation.* Front Plant Sci 6: 559

Manuskript 2:

Köhler, D., Montandon, C., Hause, G., Majovsky, P., Kessler, F., Baginsky, S., and Agne, B. (2015). *Characterization of chloroplast protein import without Tic56, a component of the 1-MDa TIC translocon.* Plant Physiol 167: 972-990

Manuskript 3:

Köhler, D., Helm, S., Agne, B. and Baginsky, S. (2016). *Importance of translocon subunit Tic56 for rRNA processing and chloroplast ribosome assembly.* Plant Physiol 172: 2429-2444

Weitere Veröffentlichung:

Agne, B., Köhler, D., Baginsky S. (2017). *Protein import-independent functions of Tic56, a component of the 1-MDa translocase at the inner chloroplast envelope membrane.* Plant Signal Behav. 12: e1284726



2.1 Manuskript 1

Beteiligung an: Planung der Anreicherung von N-terminalen Peptiden, Auswertung und Darstellung der N-terminomics Analysen, Anfertigung und Bearbeitung des Manuskripts

Eigenanteil: 40%

2.1.1 Zusammenfassung und Manuskript

Die meisten Erkenntnisse gibt es aktuell zu Transitpeptiden von Vertretern der Chloroplastida. Nur wenig ist über Transitpeptide von anderen eukaryotischen photoautotrophen Organismen bekannt. In diesem Manuskript werden die Resultate der näheren Analyse der Beschaffenheit von Transitpeptiden der Alge *Cyanophora paradoxa* präsentiert. Die ermittelten Merkmale wurden denen der Transitpeptide von *Arabidopsis thaliana* gegenübergestellt.

Um dies zu ermöglichen musste eine repräsentative Anzahl an *in vivo* relevanten Transitpeptiden der Alge identifiziert werden. Mittels einer Methode namens TAILS (*terminal amine isotopic labeling of substrates*, Doucet *et al.*, 2011) waren wir in der Lage N-terminale Peptide anzureichern und massenspektrometrisch zu analysieren.

Es konnten so *in vivo* auftretende N-Termini von 123 Kern-codierten Cyanellenproteinen identifiziert werden. Ziel war es den Sequenzbereich vor der detektierten minimalen Startposition als Transitpeptid zu nutzen. Lag der ermittelte Start sehr früh in der Proteinsequenz, konnte hier kein Transitpeptid definiert werden. Protein-N-Termini deren Position sehr weit in der Proteinsequenz liegen sind höchstwahrscheinlich auf proteolytische Ereignisse zurückzuführen. Bei 77 Proteinen lag die minimale Startposition zwischen der 11ten bis 110ten Aminosäure ihrer Proteinsequenz. Die Sequenzbereiche vor der Startposition dieser Proteine wurden als Transitpeptide für weiterführende Analysen genutzt.

Für vergleichende Analysen mit Transitpeptiden von *Arabidopsis thaliana* wurde auf einen Datensatz zurückgegriffen der mit der gleichen Methodik generiert wurde (Köhler *et al.*, 2015b).

Während die durchschnittliche Transitpeptidlänge bei der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* deutlich kürzer sein soll als bei höheren Pflanzen (Bruce, 2001),



war diese zwischen *Arabidopsis thaliana* und *Cyanophora paradoxa* nicht signifikant unterschiedlich.

Wie Transitpeptide höherer Pflanzen weisen auch die Transitpeptide von *Cyanophora paradoxa* einen dreigeteilten Aufbau auf. Nach einem hydrophoben N-Terminus folgt ein weniger hydrophober mittlerer Abschnitt, bis sich C-terminal die Region mit der Spaltstelle für die SPP anschließt. Es war festzustellen, dass auch die Übergangsregion vom Transitpeptid zum reifen Protein bei beiden Organismen vergleichbar beschaffen ist.

Für beide Organismen wurden überwiegend Plastidenproteine mit einer Protein-stabilisierenden Aminosäure (Apel *et al.*, 2010) an der detektierten Startposition identifiziert. Es wurde jedoch festgestellt, dass im Gegensatz zu Plastidenproteinen von *Arabidopsis thaliana* keine Proteinsequenz der Cyanellenproteine direkt vor der identifizierten minimalen Startposition ein Cystein aufwies. Offen ist, ob dieses Cystein bei den Kern-codierten Plastidenproteinen durch die SPP abgespalten wird oder in einem zusätzlichen Prozessierungsereignis. Sollten in *Arabidopsis thaliana* noch weitere Prozessierungen des N-Terminus einiger importierter Proteine nötig sein, konnten keine Anzeichen bestimmt werden, dass dies auch bei Cyanellenproteinen von *Cyanophora paradoxa* der Fall ist.

Unterschiede zwischen den verglichenen Organismen haben sich bei der Analyse der Aminosäurezusammensetzung gezeigt. Es konnte festgestellt werden, dass die Transitpeptide von *Cyanophora paradoxa* wie die von *Chlamydomonas reinhardtii* und *Oriza sativa* reich an Alaninen sind. Die eher Serin-reichen Transitpeptide von *Arabidopsis thaliana* scheinen eine Ausnahme darzustellen (Kleffmann *et al.*, 2007). Desweiteren war festzustellen, dass bei Transitpeptiden von *Cyanophora paradoxa* Valin etwas häufiger vorkommt als Leucin, während es sich bei *Arabidopsis thaliana* genau andersherum zu verhalten scheint.

Ein deutlicher Unterschied ist, dass der überwiegende Anteil der Transitpeptide von *Cyanophora paradoxa* im Gegensatz zu denen von *Arabidopsis thaliana* ein N-terminales Phenylalanin aufweist. Dieses bekannte Merkmal (Steiner und Löffelhardt, 2002) konnte so mit einem großen Datensatz bestätigt werden.

Mittels quantitativer Massenspektrometrie konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Proteinen ohne N-terminales Phenylalanin hauptsächlich um niedrigabundante Proteine handelt. Viele der Transitpeptide ohne N-terminales Phenylalanin sind auf fehlerhafte Proteinmodelle zurückzuführen. Wenige besitzen evtl. ein unkonventionelles Transitpeptid ohne Phenylalanin. Andere weisen anstelle des Phenylalanins eine andere aromatische Aminosäure auf, die möglicherweise als Ersatz dient (Steiner *et al.*, 2005; Gruber *et al.*, 2007).



Abgesehen von diesem N-terminalen Phenylalanin konnten wir eine verblüffende Ähnlichkeit zwischen den Transitpeptiden zweier Organismen feststellen, die evolutionär weit voneinander getrennt sind, was wir als eine frühe Etablierung der Grundmechanismen des plastidären Imports interpretieren.



Identification of protein N-termini in *Cyanophora paradoxa* cyanelles: transit peptide composition and sequence determinants for precursor maturation

Daniel Köhler¹, Dirk Dobritzsch¹, Wolfgang Hoehenwarter², Stefan Helm¹, Jürgen M. Steiner³ and Sacha Baginsky¹

¹Plant Biochemistry, Institute of Biochemistry and Biotechnology, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Biozentrum, Halle(Saale), Germany, ²Proteomeanalytik, Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Halle (Saale), Germany, ³Plant Physiology, Institute of Biology, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany

Abstract:

Glaucophyta, rhodophyta, and chloroplastida represent the three main evolutionary lineages that diverged from a common ancestor after primary endosymbiosis. Comparative analyses between members of these three lineages are a rich source of information on ancestral plastid features. We analyzed the composition and the cleavage site of cyanelle transit peptides from the glaucophyte *Cyanophora paradoxa* by terminal amine labeling of substrates (TAILS), and compared their characteristics to those of representatives of the chloroplastida. Our data show that transit peptide architecture is similar between members of these two lineages. This entails a comparable modular structure, an over representation of serine or alanine and similarities in the amino acid composition around the processing peptidase cleavage site. The most distinctive difference is the overrepresentation of phenylalanine in the N-terminal 1–10 amino acids of cyanelle transit peptides. A quantitative proteome analysis with periplasm-free cyanelles identified 42 out of 262 proteins without the N-terminal phenylalanine, suggesting that the requirement for phenylalanine in the N-terminal region is not absolute. Proteins in this set are on average of low abundance, suggesting that either alternative import pathways are operating specifically for low abundance proteins or that the gene model annotation is incorrect for proteins with fewer EST sequences. We discuss these two possibilities and provide examples for both interpretations.

Keywords: TAILS, cyanelle, transit peptide, quantitative proteomics, evolution

PMID: 26257763

PMCID: [PMC4510345](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26257763/)

DOI: [10.3389/fpls.2015.00559](https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00559)



2.2 Manuskript 2

Beteiligung an: Planung der Experimente, Durchführung und Auswertung der N-Terminomics Analysen, Untersuchungen zur *tic56-1*-Mutantenlinie, Anfertigung und Bearbeitung des Manuskripts

Eigenanteil: 40%

2.2.1 Zusammenfassung und Manuskript

Beim 1 MDa-TIC-Komplex handelt es sich um eine Einheit der Importmaschinerie des Plastiden mit bedeutender Rolle für die pflanzliche Entwicklung. Die Komponente Tic20-I ist die einzige des Komplexes, welche schon näher charakterisiert ist. Die Bedeutung von Tic214, Tic100 und Tic56 für den plastidären Proteinimport ist noch weitestgehend ungeklärt. Im folgenden Manuskript werden Daten präsentiert, auf deren Basis die Funktion von Tic56 im plastidären Import näher charakterisiert werden kann. Dazu werden vor allem Analysen mit den *tic56*-Mutantenlinien *tic56-1* und *tic56-3* durchgeführt. Bei der albinotischen Linie *tic56-1* handelt es sich um eine Nullmutante, während *tic56-3* ausschließlich größenveränderte Formen von Tic56 in geringer Menge aufweist. Im Gegensatz zu *tic56-1* werden diese Pflanzen grün und unterscheiden sich lediglich in der frühen Entwicklungsphase etwas vom Wildtyp.

Wir konnten zeigen, dass es möglich ist mit einer TAP(*Tandem Affinitation Purification*)-tag Variante von Toc159 neben bekannten Toc159-interagierenden TOC-Proteinen auch Komponenten des 1 MDa-TIC-Komplexes inklusive Tic56 sowie Tic110 und Tic40 zu isolieren. Da keine Importsubstrate zugesetzt wurden demonstriert dies, dass es unabhängig vom Importprozess zur Ausbildung von Superkomplexen kommt.

Mittels elektronenmikroskopischer Analyse der Plastiden der albinotischen *tic56*-Nullmutante *tic56-1* konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von Tic56 dramatische Folgen für die Plastidenbiogenese hat. Im Stroma waren nur vereinzelt Strukturen auszumachen, bei denen es sich um Thylakoide handeln könnte.

Wie für eine albinotische Linie zu erwarten war, konnten im Proteingesamtextrakt von *tic56-1* mittels Immunodetektion keine typischen Proteine der Photosynthese nachgewiesen werden. Deren Akkumulation scheint in der Mutante also gestört zu sein. Im Gegensatz konnte nachgewiesen werden, dass die Kern-codierten Importkomponenten Toc159, Toc132, Tic110



und Tic40 unabhängig von Tic56 akkumulieren. Dies steht im Kontrast zu Beobachtungen bezüglich anderer 1 MDa-TIC-Komplex Komponenten, deren Abundanz in *tic56-1* gegenüber der im Wildtyp deutlich reduziert ist (Kikuchi *et al.*, 2013).

Um die Importcharakterisierung auf ein breiteres Spektrum an Kern-codierten Plastidenproteinen auszuweiten, wurden mittels TAILS (Doucet *et al.*, 2011) N-terminale Peptide von *tic56-1* angereichert und massenspektrometrisch identifiziert. Daneben wurden auch Proben der gut etablierten *toc159*-Mutante *ppi2* und des Wildtyps generiert und analysiert. Für die Pflanzenlinien konnte so eine große Anzahl an N-terminal prozessierten Plastidenproteinen bestimmen werden. Durch den Abgleich der experimentell bestimmten Prozessierungsstellen mit den vorhergesagten von ChloroP (Emanuelsson *et al.*, 1999) konnte sichergestellt werden, bei welchen es sich um Prozessierungen durch die SPP handelt. Die Proteinsequenz des Bereichs vor der SPP-Spaltstelle repräsentiert das Transitpeptid und wurde für weitere Analysen genutzt. Auf diese Weise waren wir in der Lage für alle drei Linien eine große Anzahl *in vivo* relevanter Transitpeptide zu bestimmen.

Durch tieferegehende Analysen und vergleichende Betrachtungen dieser Datensätze mittels bioinformatischer Programme, konnten leider keine Motive innerhalb der Transitpeptide bestimmt werden, die eine Klassifizierung der Substrate zugelassen hätten. Des Weiteren umfasste die Liste an SPP-prozessierten (und somit als importiert eingestuft) Plastidenproteinen bei allen drei Pflanzenlinien Komponenten unterschiedlichster Stoffwechselwege und plastidärer Lokalisation. Wir konnten also keine Substratklasse definieren, die in den Mutanten fehlt und damit eine Abhängigkeit von den Importkomponenten zeigt. Die Identifikation korrekt prozessierter thylakoidärer Proteine unterstützte die elektronenmikroskopische Beobachtung von Thylakoidstrukturen.

Neben vielen SPP-prozessierten Kern-codierten Plastidenproteinen konnten auch unprozessierte detektiert werden. Dabei könnte es sich um Proteine handeln, die für ihren Import auf Toc159 bzw. Tic56 angewiesen sind. Für *tic56-1* konnten zwei solcher Proteine als potentielle Tic56-abhängige Importsubstrate identifiziert werden, während es für *ppi2* vier potentielle Toc159-abhängige Importsubstrate waren.

Bei beiden Linien befand sich unter diesen Proteinen die gleiche chloroplastidäre Peptidase. Des Weiteren konnten für beide Linien annähernd die gleichen Kern-codierten Plastidenproteine nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass in beiden Linien der Import der gleichen Proteine gewährleistet ist. Diese Gemeinsamkeiten sind Indizien dafür, dass



Toc159 und Tic56 von Bedeutung für die Funktionalität eines gemeinsamen Superkomplexes sind.

Um den Import bei einem Defekt von Tic56 tiefer zu analysieren, wurden auch klassische Importanalysen mit der Linie *tic56-3* durchgeführt. In Protoplasten-basierten Importanalysen wurden keine Unterschiede im Import der Substrate spFNR (Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase aus Spinat), E1 α (Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase) sowie RbcS (kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase) zwischen Wildtyp und Mutante ausgemacht. Auch beim *in vitro* Import von E1 α sowie RbcS in isolierte Chloroplasten von *tic56-3* bzw. Wildtyp konnten keine signifikanten Veränderungen zwischen den Linien bestimmt werden. Diese Ergebnisse zeigten, dass Plastiden aus *tic56-3* des von uns gewählten Entwicklungsstadiums überraschend importkompetent sind.

Da in Tic56-defekten Pflanzen auch die anderen Komponenten des 1 MDa-TIC-Komplexes in ihrer Abundanz reduziert sind, wirft das die Frage auf, ob man bei diesem Komplex tatsächlich von einem generellen TIC-Komplex sprechen kann. Die Komponente Tic56 scheint auf Basis unserer Ergebnisse jedenfalls keine generelle Rolle im plastidären Import einzunehmen. Möglicherweise spielt sie während früherer Entwicklungsphasen der Pflanzen- und Plastidenbiogenese eine Rolle, als wir in dieser Arbeit mittels klassischer *in vitro* und Protoplasten-basierter Importexperimente untersucht haben. Durch die co-Isolation von Tic56 mit Toc159 und die Detektion von zwei unprozessierten Kern-codierten Plastidenproteinen bei der Abwesenheit von Tic56 konnte bestätigt werden, dass es sich um eine Komponente des plastidären Imports handelt.



Characterization of Chloroplast Protein Import without Tic56, a Component of the 1-Megadalton Translocon at the Inner Envelope Membrane of Chloroplasts

Daniel Köhler, Cyril Montandon, Gerd Hause, Petra Majovsky, Felix Kessler, Sacha Baginsky and Birgit Agne

Institut für Biochemie und Biotechnologie (D.K., S.B., B.A.) and Biozentrum (G.H.), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 06120 Halle (Saale), Germany; Laboratory of Plant Physiology, University of Neuchâtel, 2000 Neuchatel, Switzerland (C.M., F.K.); and Research Group Proteome Analytics, Leibniz Institute of Plant Biochemistry, 06120 Halle (Saale), Germany (P.M.)

Abstract:

We report on the characterization of Tic56, a unique component of the recently identified 1-MD translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts (TIC) in *Arabidopsis thaliana* comprising Tic20, Tic100, and Tic214. We isolated Tic56 by copurification with Tandem Affinity Purification-tagged Toc159 in the absence of precursor protein, indicating spontaneous and translocation-independent formation of the translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts (TOC) and TIC supercomplexes. Tic56 mutant plants have an albino phenotype and are unable to grow without an external carbon source. Using specific enrichment of protein amino termini, we analyzed the *tic56-1* and *plastid protein import2 (toc159)* mutants to assess the *in vivo* import capacity of plastids in mutants of an outer and inner envelope component of the anticipated TOC-TIC supercomplex. In both mutants, we observed processing of several import substrates belonging to various pathways. Our results suggest that despite the severe developmental defects, protein import into Tic56-deficient plastids is functional to a considerable degree, indicating the existence of alternative translocases at the inner envelope membrane.

PMID: 25588737

PMCID: [PMC4348784](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25588737/)

DOI: [10.1104/pp.114.255562](https://doi.org/10.1104/pp.114.255562)



2.3 Manuskript 3

Beteiligung an: Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente, Anfertigung und Bearbeitung des Manuskripts

Eigenanteil: 50%

2.3.1 Zusammenfassung und Manuskript

In unseren Analysen zur Bedeutung von Tic56 für den plastidären Proteinimport mussten wir feststellen, dass Plastiden Tic56-defekter Pflanzen noch erstaunlich importkompetent sind (Köhler *et al.*, 2015b). Damit bleibt zu klären warum Tic56 so bedeutend für die Pflanzen- und Plastidenentwicklung ist. Das folgende Manuskript enthält Resultate der tieferen molekularen Charakterisierung von *tic56-1*. Dadurch wird gezeigt was für Proteine und plastidäre Prozesse eine Tic56-Abhängigkeit aufweisen.

In unserer Studie zur Abhängigkeit des plastidären Imports von Tic56 (Köhler *et al.*, 2015b) gab es deutliche Hinweise, dass Tic56 und Toc159 in einem funktionellen TOC-TIC-Komplex involviert sind. Wir sind der Annahme des funktionellen Zusammenhangs zwischen Toc159 und Tic56 weiter nachgegangen indem wir u.a. *tic56-1* mit *ppi2* kreuzten um die entsprechende Doppelmutante zu generieren. Dabei mussten wir feststellen, dass ein Defekt beider Importkomponenten embryolethal ist. Mittels der massenspektrometrisch-basierten quantitativen Analyse der Proteome von *tic56-1* und *ppi2* konnten wir feststellen, dass diese bei beiden Linien sehr ähnlich sind. Die Embryolethalität der Doppelmutante deutet darauf hin, dass die Proteine Toc159 und Tic56 auch in Funktionen involviert sind, die unabhängig vom jeweils anderen ablaufen. Nichtsdestotrotz stellt die Ähnlichkeit auf Ebene des Plastidenproteoms einen Hinweis auf eine hohe funktionelle Konvergenz der Proteinkomplexe um die beiden Proteine dar.

Da Mutationen mit dramatischen Auswirkungen auch zu indirekten Veränderungen des Proteoms führen, musste unterschieden werden, welche Veränderungen im Plastidenproteom spezifisch für die Importmutanten sind. Dazu wurden die Proteinquantitäten unserer Analyse denen einer anderen Studie zu Mutanten mit albinotischen Phänotyp (Motohashi *et al.*, 2012) gegenübergestellt. In dieser anderen Studie enthielt keine der Linien eine Mutation in dem Gen einer Komponente der TOC-TIC-Importmaschinerie. Durch den Vergleich konnten wir



feststellen, dass die beiden Importmutanten im Gegensatz zu den anderen Linien eine reduzierte Akkumulation plastidärer ribosomaler Proteine gegenüber dem Wildtyp aufwiesen.

Es ist also gelungen durch die quantitative Analyse der Plastidenproteome von *ppi2* und *tic56-1* Proteine zu identifizieren, die in beiden Linien niedriger-abundant als beim Wildtyp auftraten. Es blieb nun abzuklären, bei welchen Proteinen es sich um einen Effekt durch transkriptionelle Regulation handelt. Dazu haben wir mittels RNA-Mikroarray das Transkriptom von *tic56-1* und einer zugehörigen Wildtypkontrolle untersucht. Für *ppi2* wurden quantitative Transkriptomdaten einer vorangegangenen Studie (Bischof *et al.*, 2011) bei weiteren Betrachtungen mit eingebunden.

Wie zuvor für *ppi2* (Bischof *et al.*, 2011) konnte auch für *tic56-1* festgestellt werden, dass die meisten photosynthetisch-relevanten Proteine schon auf Ebene ihres Transkripts gegenüber dem Wildtyp negativ reguliert sind. Die Transkripte ribosomaler Plastidenproteine zeigten sich hingegen bei beiden Linien als nahezu unverändert, was bedeutet, dass die reduzierte Abundanz dieser Proteine nicht auf transkriptionelle Regulation zurückzuführen ist.

Die stark reduzierte Akkumulation ribosomaler Plastidenproteine ließ eine Störung in der plastidären Translation vermuten.

Durch die Analyse der Abundanz des Plastiden-codierten Proteins AccD einer Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase konnte gezeigt werden, dass diese in beiden Importmutanten, und vor allem in *tic56-1*, deutlich geringer vertreten ist als im Wildtyp.

Mittels Northern-Blot-Analyse wurde die Abundanz verschiedener Transkripte von Plastiden-codierten Proteinen untersucht. Wir waren so in der Lage die Ergebnisse des RNA-Microarrays bezüglich der Transkripte von plastidären Genen zu validieren und einen plastidären Transkriptionsdefekt auszuschließen. Dabei haben wir auch Sonden gegen die plastidäre 23S rRNA und 16S rRNA eingesetzt. Es konnte festgestellt werden, dass die Signale für die rRNAs in den Importmutanten deutlich schwächer ausfallen als im Wildtyp. Des Weiteren konnten wir für *tic56-1* eine Störung bei der Prozessierung der 23S rRNA ausmachen. Diese wird i.d.R. zu sog. *hidden breakes* weiter prozessiert. Diese Prozessierung gilt als Indikator für die korrekte Assemblierung der Ribosomen und damit einer funktionierenden Translation.

Interessanterweise zeigten Recherchen, dass vor allem Genloci von Proteinen des RNA-Metabolismus mit Schwerpunkt auf (r)RNA-prozessierenden Proteinen mit Tic56 co-exprimiert werden. Dieser Befund ist ein Hinweis darauf, das Tic56 hier eine direkte Rolle spielen könnte.



Das Antibiotikum Spectinomycin inhibiert die plastidäre Translation durch die Bindung an die 30S-Untereinheit des Ribosoms. Durch die Anzucht von Pflanzen auf Medium mit Spectinomycin ist man in der Lage, Material mit inhibierter Plastidentranslation zu generieren (Wirmer und Westhof, 2006). Es blieb nun zu klären, wie ähnlich *tic56-1* solchen translationsinhibierten Pflanzen auf molekularer Ebene ist. Dazu haben wir das Proteom von Spectinomycin behandelten Pflanzen quantitativ analysiert und den *tic56-1* Daten gegenübergestellt. Unsere Analysen zeigen, dass *tic56-1* den translationsinhibierten Pflanzen nicht nur phänotypisch, sondern auch vom Proteomprofil sehr ähnlich ist. Im Plastidenproteom von Arabidopsis sind essentielle Proteine codiert. Eines davon soll das schon erwähnte AccD sein. Wie am Beispiel der Importmutanten demonstriert, hat ein Defekt in der plastidären Translation auch einen Mangel dieses Proteins zur Folge. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die betroffenen Pflanzen diesem Problem durch die erhöhte Expression von Acc2 entgegenwirken können (Babychuk *et al.*, 2011; Parker *et al.*, 2014). Dieses Protein ist eine Kern-codierte Untereinheit eines homomeren Acetyl-CoA-Carboxylase Komplexes. Massenspektrometrisch war der quantitative Nachweis von Acc2 nur für Spectinomycin behandelte Pflanzen und *tic56-1* möglich. Diese Daten deuten somit darauf hin, dass die Menge dieser Acetyl-CoA-Carboxylase-Untereinheit in diesen Pflanzen erhöht ist gegenüber der im Wildtyp und *ppi2*. Mit Hilfe der Transkriptdaten der vorangegangenen Studie zu *ppi2* (Bischof *et al.*, 2011), konnten wir feststellen, dass die Expression dieses Proteins in *tic56-1* gegenüber der in *ppi2* deutlich höher ist. Anscheinend reicht die detektierte Proteinmenge an AccD in *ppi2* noch aus, während in *tic56-1* Acc2 zum Aufrechterhalten der Lipidbiosynthese gebraucht wird. Es blieb zu klären ob die geringere Akkumulation ribosomaler Proteine auf ein Importproblem bei einem Tic56-Defekt zurückzuführen ist. Um dies zu überprüfen wurde eine *in vitro* Importanalyse mit dem ribosomalen Protein SSR16 (*small subunit ribosomal protein 16*) in Chloroplasten der Linie *tic56-3* durchgeführt. Trotz der Tatsache, dass in dieser Linie kein Tic56 in seiner nativen Form mehr vorkommt, konnten wir keinen Importdefekt für SSR16 feststellen. Wir konnten zeigen, dass bei den verwendeten Chloroplasten von *tic56-3* auch die Abundanz von Tic20-I gegenüber der im Wildtyp leicht reduziert ist. Das trotzdem kein Importdefekt zu beobachten war, könnte daran liegen, dass die verbliebene Menge an Tic20-I ausreicht um die Importfunktionalität zu gewährleisten oder es keine so essentielle Komponente ist, wie bislang angenommen.

Auch im Rahmen dieser Studie konnte kein bedeutender Importdefekt bei der Abwesenheit von nativem Tic56 festgestellt werden, was den Verdacht bestärkt, dass es sich hier um keine



generell essentielle Importkomponente handelt. Diese Beobachtung kann als Hinweis gesehen werden, dass Tic56 auch noch für andere plastidäre Prozesse eine bedeutend Rolle spielt.

Wir waren in der Lage, in Analogie zu *ppi2* (Bischof *et al.*, 2011) Proteine zu bestimmen, die eine Tic56-Abhängigkeit zeigen. Des Weiteren konnte demonstriert werden, dass es keinerlei Hinweise gibt, dass es sich bei photosynthetisch relevanten Proteinen um eine Klasse von Tic56- und damit 1 MDa-TIC-Komplex-abhängigen Importsubstraten handelt. Hingegen hängen die Abundanz von ribosomalen Plastidenproteinen und eine funktionierende plastidäre Translation stark von Tic56 ab. Es war uns also möglich eine Verbindung zwischen der plastidären Translation und der Importmaschinerie aufzuzeigen.



Importance of Translocon Subunit Tic56 for rRNA Processing and Chloroplast Ribosome Assembly

Daniel Köhler, Stefan Helm, Birgit Agne and Sacha Baginsky

Institute of Biochemistry and Biotechnology, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Biozentrum, 06120 Halle (Saale), Germany

Abstract:

Toc159-containing complexes at the outer chloroplast envelope membrane form stable supercomplexes with a 1-MD translocon at the inner chloroplast envelope membrane of which Tic56 is one essential subunit. While the single mutants *tic56-1* and *ppi2 (toc159)* have an albino phenotype and are able to grow heterotrophically, we find the double mutant to be embryo lethal. Comprehensive quantitative proteome profiling with both single mutants in combination with GeneChip analyses identified a posttranscriptional defect in the accumulation of plastid ribosomal proteins and diminished expression of plastid encoded proteins. In the *tic56-1* mutant, the assembly of functional ribosomes is furthermore hampered by a processing defect of the plastid 23S rRNA. Spectinomycin-treatment of wild-type plants phenocopies the molecular phenotype of plastid proteome accumulation in *tic56-1* and to a smaller degree also *ppi2* plastids, suggesting that a defect in plastid translation is largely responsible for the phenotype of both import mutants. Import experiments with the *tic56-3* mutant revealed no significant defect in the import of small ribosomal protein 16 in the absence of full-length Tic56, suggesting that the defect in ribosome assembly in *tic56-1* may be independent of a function of Tic56 in protein import. Our data establish a previously unknown link between plastid protein import, the processing of plastid rRNAs, and the assembly of plastid ribosomes and provide further knowledge on the function of the translocon components and the molecular basis for their albino phenotype.

PMID: 27733515

PMCID: [PMC5129725](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27733515/)

DOI: [10.1104/pp.16.01393](https://doi.org/10.1104/pp.16.01393)



3 Diskussion

3.1 Das Mysterium der Motive in Transitpeptiden

Die N-terminalen Transitpeptide Kern-codierter Plastidenproteine stellen die Wissenschaft vor große Rätsel. Unsere Untersuchungen zum allgemeinen Aufbau von Cyanellentransitpeptiden der Alge *Cyanophora paradoxa* haben gezeigt, dass diese den Transitpeptiden von höheren Pflanzen verblüffend ähnlich sind (Köhler *et al.*, 2015a). Wir haben daraus geschlossen, dass Transitpeptide Bestandteile eines grundlegenden und essentiellen Mechanismus des Imports Kern-codierter Plastidenproteine sind, der sich entwicklungsgeschichtlich schon sehr früh etabliert hat.

Es gehört zu den Standardmethoden Proteine mit einem Fluoreszenzmarker wie z.B. eGFP zu fusionieren um das Importverhalten dieses Proteins zu analysieren. Dabei wird mitunter nur mit der N-terminalen Region von diesem Protein gearbeitet. Auf diese Weise kann tatsächlich ein abweichendes Importverhalten zwischen unterschiedlichen Transitpeptiden beobachtet werden (u.a. Grimmer *et al.*, 2014). Durch Veränderungen der Primärsequenz von Transitpeptiden kann man Einfluss auf die Importeffizienz von Proteinen nehmen (Pilon *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009a; Chotewutmontri *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2015).

Dies alles sind Beweise dafür, dass Transitpeptide Informationen enthalten, die für einen erfolgreichen Import eines Kern-codierten Plastidenproteins notwendig sind und dass es sich um ein relativ gut konserviertes Prinzip handeln muss.

Man geht davon aus, dass die Informationen in Transitpeptiden für die Erkennung durch die einzelnen Komponenten des Importprozesses in einzelnen Motiven verschlüsselt sind (Li und Teng, 2013). Bis jetzt konnten allerdings nur wenige und zumeist schlecht konservierte Motive bestimmt werden (Chotewutmontri *et al.*, 2012). Die meisten Erkenntnisse wurden anhand von Transitpeptiden einzelner Proteine gewonnen und sind nicht ohne weiteres auf alle Transitpeptide anwendbar. Lediglich in einer Studie waren die Verfasser in der Lage ein breiteres Spektrum an Transitpeptiden an Hand ihrer Sequenz unter Verwendung bioinformatischer Algorithmen in Gruppen zu unterteilen. Allerdings konnten auch hier unter wenig stringenten Kriterien viele Transitpeptide keiner Gruppe zugeordnet werden (Lee *et al.*, 2008).



Ein Grund für die schwierige Bestimmbarkeit von Motiven in plastidären Transitpeptiden könnte die Komplexität und große Variationsmöglichkeit der Motivzusammensetzung sein (Li und Teng, 2013).

In Importmutanten sollten eigentlich hauptsächlich Proteine importiert werden können, die nicht auf die betroffenen Komponenten angewiesen sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Analysen zum N-Terminom und Proteom von *ppi2* und *tic56-1* durchgeführt (Köhler *et al.*, 2015a; Köhler *et al.*, 2016). In *ppi2* ist der sog. Hauptimportrezeptor (Bauer *et al.*, 2000) betroffen und in *tic56-1* der gesamte 1 MDa-TIC-Komplex (Kikuchi *et al.*, 2013). Allerdings konnten keine Proteingruppen mit gestörter Akkumulation definiert werden, die ein gemeinsames Motiv im Transitpeptid aufwiesen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass immer noch zu viele Transitpeptide mit unterschiedlichen und schwach konservierten Motiven in den Plastiden gelangen.

Aufschlussreicher könnte es sein, sich Proteine anzuschauen, welche als Vorläufer also als nicht-importierte Importsubstrate detektiert wurden. In unseren wie auch in anderen Untersuchungen konnten für Importmutanten allerdings nur sehr wenige solcher Proteine identifiziert werden (Bischof *et al.*, 2011; Köhler *et al.*, 2015b). Der aktuelle Datensatz ist nicht ausreichend um allgemeinzutreffende Motive zu definieren. Ein Grund für die schlechte Detektion könnte der Zell-protective Mechanismus des schnellen Abbaus von nicht importierten Vorläuferproteinen sein (Lee *et al.*, 2009b; Bischof *et al.*, 2011). Man muss diesen Mechanismus im Detail verstehen, um ihn gezielt umgehen und unimportierte Vorläuferproteine anreichern zu können.

Auch im Fall der von uns bestimmten und analysierten Cyanellentransitpeptide von *Cyanophora paradoxa* (Köhler *et al.*, 2015a) war es uns nicht möglich Gruppen mit bestimmten Sequenzmotiven zu bestimmen. Allerdings mussten wir wie erwähnt feststellen, dass diese denen höherer Pflanzen deutlich ähnlicher und damit auch komplexer waren als ursprünglich erwartet.

Neben der Suche nach Motiven in der Aminosäuresequenz von Transitpeptiden, ist es auch denkbar, dass Sekundärstrukturen eine wesentliche Bedeutung haben können. Aktuell gibt es nur wenig publizierte Analysen, die sich mit Sekundärstrukturelementen beschäftigen und diese basieren hauptsächlich auf Transitpeptiden der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* (Bruce, 2001). Jedoch konnte gezeigt werden, dass Transitpeptide in der Lage sind, solche Strukturen zu bilden womit auch die Möglichkeit zur Bildung von Tertiärstrukturen gegeben ist.



Denkbar wäre auch, dass posttranslationale Modifikationen am Transitpeptid die Motivbildung wesentlich beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass *in vitro* synthetisierte Vorläuferproteine am Transitpeptid phosphoryliert werden können. Diese Modifikation kann zur Erkennung der Imports substrate durch einen Hsp70/14-3-3-Proteinkomplex und zur Effektivierung des Imports dieser führen (May und Soll, 2000). Des Weiteren konnte im Fall der *ppi2*- und *tic56-1*-Importmutanten nachgewiesen werden, dass Vorläufer im Cytosol nach der Abspaltung des Startmethionins N-terminal acetyliert werden (Bischof *et al.*, 2011; Köhler *et al.*, 2015b). Es bleibt zu zeigen, welche Konsequenzen für diese Proteine resultieren. Acetylierung von Proteinen in Hefe können als Signal für den proteasomalen Abbau dienen (Hwang *et al.*, 2010). Auch die Abundanz cytosolischer Vorläuferproteine wird über das Proteasom limitiert (Lee *et al.*, 2009b). Man kann also annehmen, dass auch hier die Acetylierung als Abbausignal fungiert, wobei es für das pflanzliche System keine experimentellen Belege gibt.

Um Erfolg bei der Suche nach Motiven in Transitpeptiden zu haben, muss geklärt werden, welche Rolle die Ausbildung sekundärer oder gar tertiärer Strukturelemente sowie posttranslationale Modifikationen bei der Bildung dieser spielen. Durch unsere Analysen haben wir einen großen Datensatz an *in vivo* auftretenden Transitpeptiden geschaffen, der auch in Zukunft einen wichtigen Beitrag zur Motivfindung in Transitpeptiden leisten kann.

3.2 Cyanellen: Primitive Plastiden mit primitivem Importsystem?

Die komplexe Zusammensetzung des Transitpeptids nach dem M&M-Modell (Li und Teng, 2013, Abb. 1.5) soll nötig sein, um mit einzelnen Bereichen des Transitpeptids die unterschiedlichen interagierenden Importkomponenten anzusprechen. Das Modell legt also nahe, dass es bei einem weniger komplexen Importapparat auch weniger Motive und somit einen klarer strukturierten Aufbau der Transitpeptide geben müsste. Tatsächlich ist bekannt, dass Transitpeptide von *Chlamydomonas reinhardtii* deutlich kürzer sind als die höherer Pflanzen, was die Basis der Annahme darstellt, dass der Import in Algen deutlich weniger komplex ist (Bruce, 2001).

Bei unserer Analyse von Cyanellentransitpeptiden von *Cyanophora paradoxa* als Vertreter der Glaucophyta, mussten wir festgestellt, dass diese eher eine Tendenz zeigen länger als Transitpeptide höherer Pflanzen zu sein. Es hat sich wie erwähnt gezeigt, dass die



Transitpeptide der Alge denen von *Arabidopsis thaliana* ähnlicher sind als erwartet (Köhler *et al.*, 2015a).

Eine mögliche Erklärung könnte die morphologische Beschaffenheit der Cyanellen liefern. Im Gegensatz zu Plastiden der Chlorophyta oder Rhodophyta weisen die der Glaucophyta noch eine Peptidoglykan-Zellwand auf. Diese Schicht muss zusätzlich zu den zwei Membranen des Plastiden überwunden werden. Der Mechanismus, wie die Zellwand beim Import Kern-codierter Cyanellenproteine überwunden wird und welche Rolle Abschnitte auf dem Transitpeptid spielen, ist nicht geklärt.

Die ähnliche Beschaffenheit von Transitpeptiden von Kern-codierten Cyanellen- bzw. Chloroplastenproteinen höherer Pflanzen könnte bedeuten, dass der Importprozess sich in seiner Komplexität zwischen den Organellen beider Linien nicht wesentlich unterscheidet. Diese These wird durch die Beobachtung unterstützt, dass Vorläuferproteine höherer Pflanzen *in vitro* effektiv in Cyanellen importiert werden können, vorausgesetzt es wird N-terminal ein Phenylalanin in das Transitpeptid integriert (Steiner *et al.*, 2005).

Über den Aufbau des Proteinimport-Komplexes ist allerdings noch nicht viel bekannt. Man geht davon aus, dass ein Toc75-Homolog an der äußeren Membran und ein Tic110-Homolog an der inneren Membran existieren (Yusa *et al.*, 2008). Basierend auf phylogenetischen Analysen zu den einzelnen Importkomponenten des 1 MDa-TIC-Komplex konnte für Rhodophyta als auch Glaucophyta nur die Existenz eines Tic20-Homologen aufgezeigt werden (Kikuchi *et al.*, 2013). Damit ist anzunehmen, dass der 2013 beschriebene 1MDa-TIC-Komplex in diesen Algen nicht auftritt. Anlässlich der großen Bedeutung, die diesem Komplex für den Import zukommt (Kikuchi *et al.*, 2013; Nakai, 2015), bleibt zu klären, warum diese Algenlinien ohne ihn auskommen bzw. ob es Alternativen gibt, die seine Funktion übernehmen.

Interessant war auch, dass wir Cyanellentransitpeptide bestimmen konnten, die nicht über ein N-terminales Phenylalanin oder ein alternatives Tryptophan verfügten. Bislang ist man davon ausgegangen, dass es sich um ein typisches Merkmal mit wichtiger Bedeutung für den Import von Cyanellenproteinen handelt (Steiner und Löffelhardt, 2002; Patron und Waller, 2007). Wie in unserem Artikel (Köhler *et al.*, 2015a) diskutiert, könnte es sich um ein Datenbankproblem handeln. Die Protein-Datenbank, welche zur Auswertung der massenspektrometrischen Messdaten Verwendung fand, beruht auf dem vollständig sequenzierten Genom der Alge (Price *et al.*, 2012). Leider steht *Cyanophora paradoxa* nicht im gleichen Maße im wissenschaftlichen Focus wie *Arabidopsis thaliana*, obwohl es sich um einen geeigneten Modellorganismus für



den evolutionären Zweig der Glaucophyta handelt. So fehlen für die Bestätigung und Validierung vieler theoretischer Proteinmodelle noch experimentelle Daten.

Wir diskutieren jedoch auch die Möglichkeit, dass einige Proteine kein N-terminales Phenylalanin brauchen. Dies könnte bedeuten, dass auch die Cyanellen über mehr als eine Importmöglichkeit für Kern-codierte Cyanellenproteine mit Transitpeptid verfügen. Für Plastiden höherer Pflanzen wird diskutiert, ob es Importwege speziell für den hohen Importbedarf gibt (Agne und Kessler, 2009; Teng *et al.*, 2012; Nakai, 2015). Sollten auch die Cyanellen über mehrere Importrouten verfügen, wäre das ein weiteres Indiz, dass sich der plastidäre Import in seiner Komplexität zwischen *Cyanophora paradoxa* und *Arabidopsis thaliana* nicht wesentlich unterscheidet.

Mit unserer Analyse zu Transitpeptiden der Cyanellenproteine von *Cyanophora paradoxa* haben wir Hinweise geliefert, dass der Proteinimport an der äußeren Hüllmembran hier komplexer ist als zuvor angenommen. Diese Ergebnisse tragen damit zu einem verbesserten Verständnis des Importprozess an Cyanellen bei.

3.3 Variabilität der Zusammensetzung des TOC-TIC-Importapparates

Dem M&M-Modell (Li und Teng, 2013, Abb. 1.5) zu folge, sollen Transitpeptide unterschiedliche Motive zur Erkennung durch Importkomponenten umfassen können. Das Modell impliziert damit, dass diese Komponenten auf verschiedene Weisen miteinander kombiniert werden können, um diverse Importrouten mit unterschiedlicher Substratspezifität auszubilden. Tatsächlich wird angenommen, dass die Vertreter der Toc159-Familie bei der Ausbildung verschiedener TOC-Komplexe mit unterschiedlicher Importspezifität beteiligt sind (Bauer *et al.*, 2000; Ivanova *et al.*, 2004; Kubis *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2004). Auch auf Ebene des TIC-Komplexes gibt es Hinweise für die Existenz mehrere Importrouten mit unterschiedlicher Importspezifität (Kikuchi *et al.*, 2009; Hirabayashi *et al.*, 2011; Kikuchi *et al.*, 2013; Nakai, 2015). Dabei wurden Tic110 (Heins *et al.*, 2002), Tic20 (Kouranov *et al.*, 1998) und Tic21 (Teng *et al.*, 2006) als kanalbildende Komponenten vorgeschlagen. Offen ist die Frage wie dynamisch das System tatsächlich ist und wie viele unterschiedliche Kompositionen es gibt.

Uns war es möglich diverse TOC- als auch TIC-Importkomponenten zusammen mit einer Variante von Toc159 mit N-terminalen Affinitäts-tag zu isolieren (Köhler *et al.*, 2015b). Darunter befanden sich neben Komponenten des TOC-Kernkomplexes auch Tic110, Tic40



sowie Tic20 und Tic56. Zwar stellt Nakai (2015) die Bedeutung von Tic110 für die plastidäre Importmaschinerie in Frage, doch handelt es sich um eine gut etablierte TIC-Komponente, für die eine direkte Interaktion mit Vorläuferproteinen nachgewiesen ist (Schnell *et al.*, 1994; Lübeck *et al.*, 1996; Inaba *et al.*, 2003; Chou *et al.*, 2006). Mittels nativer Gelelektrophorese konnte ein 1 MDa großer TIC-Komplex bestimmt werden, der zwar Tic20 aber weder Tic110 noch Tic40 (Kikuchi *et al.*, 2009) beinhaltet. Später wurde von der gleichen Arbeitsgruppe der sog. 1 MDa-TIC-Komplex beschrieben (Kikuchi *et al.*, 2013) indem die Komponenten Tic110 und Tic40 nicht auftauchen. Dabei galten diese Komponenten ursprünglich zusammen mit Hsp93 als eigentlicher TIC-Komplex (Chou *et al.*, 2003; Chou *et al.*, 2006). Kanalaktivitätsmessungen existieren für Tic110 (Heins *et al.*, 2002) und Tic20 (Kovacs-Bogdan *et al.*, 2011) unabhängig voneinander.

All das sind Hinweise dafür, dass Tic110 und Tic20 jeweils Teil eines eigenständigen Moduls der Importmaschinerie sind. Da wir in der Lage waren, beide Module über eine TOC-Komponente zu isolieren, bleibt die Frage offen, wie die Module zum Toc159-umfassenden TOC-Komplex stehen (Abb. 3.1). Denkbar wäre, dass es sich um zwei eigenständige TIC-Komplexe handelt, welche beide von dem Toc159-umfassende TOC-Komplex rekrutiert werden. Beide Module könnten aber auch Bestandteile eines großen Komplexes und über den TOC-Komplex verbunden sein.

Sollte der 1 MDa-TIC-Komplex unabhängig von Tic110 und Tic40 einen funktionellen Importapparat ausbilden können, bleibt zu klären, welche Komponenten in diesem Importapparat den Importmotor bilden. Bei den aktuell diskutierten Antriebskraft-liefernden Komponenten handelt es sich um Chaperone, die über den Tic110/Tic40 Komplex rekrutiert werden.

3.4 Die Beziehung zwischen Toc159 und dem 1 MDa-TIC-Komplex

Während wir in der Lage waren den Toc159-umfassenden TOC-Komplex und 1 MDa-TIC-Komplex zusammen über eine Variante von Toc159 zu isolieren, gelang dies auch einer anderen Arbeitsgruppe mit Hilfe von Varianten der Vorläuferproteine RbcS bzw. Ferredoxin (Kikuchi *et al.*, 2013). Diese besaßen C-terminal eine IgG-Bindedomäne von Protein A und einen 6xHis-tag. Zwischen der Sequenz der Vorläuferproteine und dem Bereich zur Affinitätsreinigung befand sich bei beiden Substraten ein Erkennungsmotiv für die *Tobacco Etch Virus* Protease um gebundene Komplexe nativ reinigen zu können (Kikuchi *et al.*, 2013).



Es konnte also eindeutig nachgewiesen werden, dass der 1 MDa-TIC-Komplex um Tic20-I einen großen Importapparat zusammen mit dem Toc159-umfassenden TOC-Komplex bildet (Abb. 3.1).

Die Null-Mutation von *tic56-1* hat auch eine drastische Abnahme der Abundanz der anderen Komponenten des 1 MDa-TIC-Komplexes zur Folge (Kikuchi *et al.*, 2013). Es ist also davon auszugehen, dass dieser in der Mutante nicht mehr zustande kommt. Mit unseren parallelen Analysen der Mutantenlinien *tic56-1* und *ppi2* waren wir in der Lage einen Eindruck über die funktionelle Verflechtung des Toc159-umfassenden TOC-Komplexes und des 1 MDa-TIC-Komplexes zu erhalten.

Bekannt war bereits, dass sowohl *tic56-1* als auch *ppi2* Pflanzen einen albinotischen Phänotyp zeigen (Bauer *et al.*, 2000; Kikuchi *et al.*, 2013). Wir haben beobachtet, dass die Mutantenlinie *tic56-1* stark morphologisch veränderte Plastiden gegenüber dem Wildtyp aufweist, was auf eine Störung in der Plastidenbiogenese hinweist (Köhler *et al.*, 2015b). Eine vergleichbare Beobachtung wurde auch für die *toc159*-Mutantenlinie *ppi2* gemacht (Bauer *et al.*, 2000).

Auch auf molekularer Ebene konnten wir große Ähnlichkeiten im Transkriptom als auch im Proteom beider Linien nachweisen (Köhler *et al.*, 2016). Bei unserer Analyse des N-Terminoms beider Importmutantenlinien konnten wir einen sehr großen Überlapp an Kern-codierten und nachweislich importierten Plastidenproteinen beobachten (Köhler *et al.*, 2015b). Was ein Indiz dafür ist, dass bei der Abwesenheit von Tic56 bzw. Toc159 die gleichen Proteine importiert werden können. Beide Importmutanten zeigen eine niedrigere Akkumulation von ribosomalen Plastidenproteinen gegenüber dem Wildtyp (Köhler *et al.*, 2016). Für andere albinotische Mutanten ohne Defekt im TOC-TIC-abhängigen Import wurde das Gegenteil beschrieben (Motohashi *et al.*, 2012), was zeigt, dass es sich nicht um ein typisches Merkmal albinotischer Pflanzen handelt.

Interessanterweise konnten wir beobachten, dass die Abundanz von Tic20-I in *ppi2* gegenüber der im Wildtyp nicht erhöht ist (Köhler *et al.*, 2016). Dies wäre zu erwarten gewesen, da das Proteom zwischen Wildtyp und albinotischer Mutante sehr unterschiedlich ist und sonst hochabundante Proteine der Photosynthese hier nahezu fehlen (Motohashi *et al.*, 2012). Die Frage ist, was die nur leicht geringere Akkumulation an Tic20-I in *ppi2* bedeutet. Möglicherweise ist Tic20-I als Kern-codiertes Plastidenprotein auf Toc159 angewiesen. Allerdings bleibt dann die Frage offen, wieso noch eine gut detektierbare Menge an Tic20-I im Proteom von *ppi2* vertreten ist. Eine andere Erklärung wäre, dass bei Abwesenheit von Toc159 ein wichtiger Importweg mit Tic20-I an der inneren Membran nicht zustande kommt. Als Folge



wird eine zu starke Akkumulation an Tic20-I über einen noch unbekanntem regulatorischen Weg verhindert. Es würde sich somit um einen weiteren Hinweis einer funktionellen Überschneidung zwischen dem Toc159-umfassenden TOC-Komplex und dem 1 MDa-TIC-Komplex handeln. Auch die japanische Arbeitsgruppe hat einen solchen funktionellen Zusammenhang postuliert (Nakai, 2015).

Wir mussten jedoch feststellen, dass die *tic56-1xppi2*-Doppelmutante embryolethal ist (Köhler *et al.*, 2016). Unter der Annahme dass bei *ppi2* und *tic56-1* derselbe Defekt vorliegt, war dies nicht zu erwarten. Wie von uns diskutiert, könnte es sich um einen kumulativen Effekt handeln. Auf der Basis unserer Transkriptom- und Proteom-Daten, als auch den bereits veröffentlichten Transkriptom-Daten zu *ppi2* (Bischof *et al.*, 2011) konnten wir Proteine identifizieren, welche entweder Toc159- oder Tic56-abhängig sind (Köhler *et al.*, 2016). Der Nachweis solcher Proteine ist ein deutlicher Hinweis, dass beide Komponenten auch noch voneinander unabhängige Funktionen wahrnehmen können. So wäre es möglich, dass diese auch bei der Bildung alternativer Importwege beteiligt sind. Bei der Doppelmutante würden dann all diese Importrouten nicht mehr verfügbar sein.

In unseren Untersuchungen haben wir festgestellt, dass *tic56-1* eine starke Störung in der plastidären Translation aufweist. Zwar weist auch *ppi2* Anzeichen einer gestörten Plastidentranslation auf, doch scheint diese nicht so stark auszufallen wie bei *tic56-1*. Das Proteom von *tic56-1* scheint jedenfalls dem von Spectinomycin-behandelten Pflanzen mit inhibierter Plastidentranslation ähnlicher zu sein als dem von *ppi2* (Köhler *et al.*, 2016). Das Zusammenkommen des Importdefekts von *ppi2* und dem ausgeprägten Translationsproblem von *tic56-1* wäre eine weitere Erklärung für die Embryolethalität der Doppelmutante.

Inwieweit dieses Translationsproblem allein auf eine Störung im plastidären Import zurückzuführen ist bleibt offen. Denkbar wäre aber auch, dass die Interaktion zwischen Toc159 und dem 1 MDa-TIC-Komplex wichtig ist, damit der 1 MDa-TIC-Komplex seine Einflussnahme auf die plastidäre Translation effektiv ausüben kann. Sollte wie in *ppi2* Toc159 fehlen, wäre dies nur noch begrenzt möglich. Immunodetektionen von Tic20 und Tic56 in *ppi2* deuten darauf hin, dass die Komponenten des 1 MDa-TIC-Komplex trotz der Null-Mutation noch akkumulieren können (Köhler *et al.*, 2016). Das könnte begründen, warum der Translationsdefekt in *ppi2* nicht so ausgeprägt auftritt wie in *tic56-1*. Es stellt sich die Frage, ob noch andere Mutanten von Importkomponenten einen Defekt in der plastidären Translationsmaschinerie zeigen. Sollte der Effekt spezifisch für einen zusammenhängenden



Importapparat sein, müsste man die beteiligten Komponenten über dieses Merkmal ermitteln können.

Es bleibt herauszuarbeiten, wie der 1 MDa-TIC-Komplex auf die plastidäre Translation Einfluss nimmt und inwieweit diese Einflussnahme von Toc159 und dem dazugehörigen TOC-Komplex bedingt wird. Marker, wie die Abundanz ribosomaler Plastidenproteine, könnten dann genutzt werden um die Bedeutung anderer Importkomponenten in diesem System zu bestimmen. Dies bietet die Chance, die funktionellen Zusammenhänge zwischen den einzelnen Komponenten besser zu verstehen. Auf der Basis unsere Ergebnisse, als auch der vorangegangener Arbeiten, lässt sich sagen, dass beide Proteinkomplexe, der Toc159-umfassende TOC-Komplex und der 1 MDa-TIC-Komplex, in einer Einheit auftreten. Die Mutanten beider Komponenten weisen molekular viele Parallelen auf, was als Beleg gesehen werden kann, dass auch eine funktionelle Verknüpfung vorliegt (Abb. 3.1).

3.5 Die Rolle des 1 MDa-TIC-Komplexes im plastidären Proteinimport

Es hat sich aktuell ein Modell etabliert, bei dem der 1 MDa-TIC-Komplex präferentiell für den Import photosynthetisch relevanter Proteine verantwortlich ist (Nakai, 2015). Für diese These spielte unter anderem der vergleichbare albinotische Phänotyp der Mutantenlinien *tic100*, *tic56-1*, *tic56-2*, *tic20-1* sowie der Doppelmutanten *tic56xtic20-1* und *tic100xtic20-1* eine bedeutende Rolle (Kikuchi *et al.*, 2009; Hirabayashi *et al.*, 2011; Kikuchi *et al.*, 2013). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die Plastiden der Einzelmutanten eine gestörte Akkumulation photosynthese-relevanter Proteine haben.

Null-Mutationen mit so drastischen Folgen für die Entwicklung der Pflanze führen jedoch auch zu Effekten die nicht direkt mit der betroffenen Komponente zusammenhängen. So ist bekannt dass ein Defekt im Import in einem retrograden Signal an den Zellkern resultieren kann (Kakizaki *et al.*, 2009). Daraufhin kann es zu einer verminderten Expression einer Reihe von Kern-codierten Proteinen kommen, so dass bestimmte Proteine zum Import gar nicht zur Verfügung stehen (Bischof *et al.*, 2011).

Für das Modell spricht das Ergebnis eines protoplastenbasierten Importexperimentes mit *tic20-1*, der zeigte, dass sich der Import von RbcS im Gegensatz zu E1 α in der Mutante deutlich verschlechtert (Kikuchi *et al.*, 2009). Es handelt sich hier jedoch nur um ein einzelnes Substrat, welches stellvertretend für alle Kern-codierter photosynthetisch-relevanter Proteine steht.



Durch die gezielte Anreicherung N-terminaler *in vivo* auftretender Peptide und der massenspektrometrischen Identifikation dieser, war es uns möglich, einen großen Datensatz mit Proteinen zu generieren, welche offenbar unabhängig vom 1 MDa-TIC-Komplex akkumulieren können (Köhler *et al.*, 2015b). Des Weiteren konnten wir mit Hilfe der quantitativen Analyse des Plastidenproteoms sowie des Transkriptoms von *tic56-1* eine Liste an potentiellen Tic56- und somit auch 1 MDa-TIC-Komplex-Substraten generieren (Köhler *et al.*, 2016). Es war uns so möglich zu zeigen, dass unabhängig vom 1 MDa-Importkomplex photosynthese relevante Proteine akkumulieren können und Proteine unterschiedlicher Stoffwechselwege von diesem Komplex abhängen.

Wie schon in vorangegangenen Studien bezüglich der Substratspezifität von Toc159 (Bischof *et al.*, 2011; Dutta *et al.*, 2014; Grimmer *et al.*, 2014) konnten wir zeigen, dass auch in diesem Fall ein solch einfaches Modell zur Importspezifität auf Ebene des TIC-Komplexes nicht zutrifft. Tatsächlich konnten wir keine Substratklasse definieren die von Tic56 bzw. dem 1 MDa-TIC-Komplex abhängig zu sein scheint. Zwar haben wir eine deutliche Abnahme der Abundanz ribosomaler Plastidenproteine beobachtet, doch konnten wir keinen Importdefekt mittels *in vitro* Import des ribosomalen Plastidenproteins SSR16 in Chloroplasten der Mutantenlinie *tic56-3* bestimmen. Auch mit anderen Importsubstraten konnten wir in unseren Analysen mittels transienter Protoplastentransformation oder *in vitro* Import in isolierte Chloroplasten einen solchen Defekt nicht feststellen (Köhler *et al.*, 2015b; Köhler *et al.*, 2016). Bis jetzt konnte nur ein leichter Importdefekt im Falle eines Fusionsproteins als Importsubstrat aus RbcS und Dihydrofolatreduktase beobachtet werden (Kikuchi *et al.*, 2013).

Obwohl *tic56-3* im geringen Masse nur modifizierte Formen von Tic56 ausbildet und die anderen Komponenten des 1 MDa-TIC-Komplexes geringer abundant sind als im Wildtyp (Kikuchi *et al.*, 2013; Köhler *et al.*, 2016) ist es erstaunlich schwer einen Importdefekt zu bestimmen.

Eine mögliche Erklärung wären alternative Importrouten an der inneren Membran mit Komponenten wie Tic110 oder Tic21 (Abb. 3.1). So ist die Abundanz von Tic110 in *tic56-3* im Gegensatz zu den 1 MDa-TIC-Komplexkomponenten nahezu unverändert (Kikuchi *et al.*, 2013).

Denkbar wäre auch, dass nicht Tic56 sondern eine andere Komponente des 1 MDa-TIC-Komplexes essentiell für den plastidären Proteinimport ist. Die Kanal-bildende Komponente Tic20-I könnte bedeutender für die Importfunktion sein. Da schon gezeigt wurde, dass Tic20-IV



in der Lage ist Tic20-I partielle zu ersetzen (Hirabayashi *et al.*, 2011) wäre es denkbar, dass es in *tic56-3* den Mangel an Tic20-I ausgleichen und den Import retten kann.

Dem 1 MDa-TIC-Komplex wurde eine essentielle Bedeutung für den plastidären Proteinimport zugesprochen. Er wurde sogar als generelles Translokon der inneren Hüllmembran klassifiziert. Der Umstand, dass auch bei Abwesenheit von Tic56 und dem 1 MDa-TIC-Komplex erstaunlich viele Kern-codierte Plastidenproteine in den Plastiden gelangen und *tic56-3* Plastiden bei den von uns getesteten Importsubstraten keinen Importdefekt zeigen, lässt dies jedoch bezweifeln. Die drastischen Auswirkungen einer Nullmutation auf die Biogenese der Plastiden und der Pflanzen ist für eine solche funktionelle Klassifizierung nicht ausreichend. Auch der Verlust anderer Importkomponenten hat schwere Folgen für die Pflanzenentwicklung, bis hin zur Embryoletalität (Inaba *et al.*, 2005; Teng *et al.*, 2006).

3.6 Der 1 MDa-TIC-Komplex ist mehr als ein reiner Importkomplex

Das Ausschalten einer Komponente des 1 MDa-TIC-Komplexes hat dramatische Folgen für die Plastiden- aber auch die Pflanzenentwicklung (Kikuchi *et al.*, 2013; Köhler *et al.*, 2015b). Wir konnten zeigen dass eine Ursache dafür eine gestörte plastidäre Translation ist. Die Mutantenlinie *tic56-1* akkumuliert deutlich geringere Mengen ribosomaler Plastidenproteine als der Wildtyp. Der Phänotyp und das Proteom dieser Mutantenlinie weist starke parallelen zu Pflanzen mit inhibierter plastidärer Translation auf (Köhler *et al.*, 2016). Da die Phänotypen von *tic20-1* und *tic100* dem von *tic56-1* sehr gleichen (Kikuchi *et al.*, 2013) kann man auch hier eine solche Störung annehmen.

Die Abundanz der Transkripte ribosomaler Plastidenproteine war bei *tic56-1* nur wenig geringer als im Wildtyp (Köhler *et al.*, 2016). Ein Effekt der transkriptionellen Kontrolle kann also für diese Proteine ausgeschlossen werden. Proteine deren geringere Abundanz gegenüber der im Wildtyp nicht durch die Regulation der Expression bedingt ist, wurden im Fall von *ppi2* als Toc159-abhängig definiert (Bischof *et al.*, 2011). Man kann also hier von Tic56- oder sogar 1 MDa-TIC-Komplex-abhängigen Proteinen sprechen.

Das 70S Ribosom setzt sich aus einer großen 50S und einer kleineren 30S Untereinheit zusammen. An der Bildung beteiligt sind ca. 50 verschiedene ribosomale Proteine (Yamaguchi und Subramanian, 2000; Yamaguchi *et al.*, 2000), die zum Teil im Zellkern codiert sind (Tiller und Bock, 2014). Es wäre also denkbar, dass hier ein Importdefekt für ribosomale Plastidenproteine vorliegt. Wie zuvor beschrieben, haben wir mittels *in vitro* Import



exemplarisch mit SSR16 auf einen Importdefekt geprüft, konnten jedoch keinen feststellen (Köhler *et al.*, 2016). Es kann also auf keinen Fall der Import aller ribosomalen Proteine gestört sein. Wir können jedoch nicht ausschließen, dass der Import eines anderen ribosomalen Plastidenproteins betroffen ist.

Von den ribosomalen Plastidenproteinen sind manche essentiell für die Pflanze, während das Fehlen anderer weniger dramatische Auswirkungen hat (Tiller und Bock, 2014). Sollte also tatsächlich der Import eines ribosomalen Plastidenproteins betroffen sein, kann es sich dabei entweder um eine nicht-essentielle Komponente handeln oder um eine essentielle Komponente, die wenigstens zum Teil über einen alternativen Weg importiert wird. Voraussetzung um den Translationseffekt durch einen Importdefekt zu erklären wäre also, dass auf Grund der Abwesenheit bzw. niedrigeren Abundanz einzelner ribosomaler Proteine die Abundanz aller anderen auch deutlich gesenkt wird.

Denkbar wäre auch, dass der Mangel an ribosomalen Plastidenproteinen ein Effekt der gestörten plastidären Translation ist. Ein großer Teil der ribosomalen Proteine wird schließlich im Plastiden codiert (Tiller und Bock, 2014).

Für eine funktionierende Translation braucht es neben ribosomalen Proteinen noch eine Reihe weiterer Faktoren. Für die Ribosomenbiogenese sind dabei korrekt prozessierte und modifizierte rRNAs von wesentlicher Bedeutung. An der Reifung der rRNAs sowie der Assemblierung der Ribosomen ist eine Vielzahl diverser Komponenten beteiligt (Bohne, 2014). Tatsächlich konnten wir für *tic56-1* eine Störung in der Prozessierung der ribosomalen 23S rRNA in die sog. *hidden breaks* detektieren (Köhler *et al.*, 2016). Mehrere Analysen deuten darauf hin, dass diese Prozessierung der 23S rRNA von großer Bedeutung für die Funktionalität der Ribosomen zu sein scheint (Bollenbach *et al.*, 2005; Nishimura *et al.*, 2010; Chi *et al.*, 2012). Dieser Defekt könnte also das Problem in der plastidären Translation erklären. Leider ist der Mechanismus, wie die Prozessierung der 23S rRNA stattfindet und welche Enzyme daran beteiligt sind, aktuell nicht im Detail aufgeklärt.

Wir konnten feststellen, dass Tic56 zusammen mit Komponenten des RNA-Metabolismus, im Speziellen mit Funktion in der rRNA-Prozessierung, co-exprimiert wird (Köhler *et al.*, 2016). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Einflussnahme von Tic56 auf die plastidäre Translation nicht nur indirekt über den Import kern-codierter Plastidenproteine erfolgt.

Die plastidäre Translation spielt eine wichtige Rolle bei der Plastiden- sowie Pflanzenentwicklung (Sun und Zerges, 2015). Dabei unterscheidet sich ihre Bedeutung je nach Organismus. Während für die Lebensfähigkeit von Maispflanzenzellen eine funktionierende



plastidäre Translation nicht nötig ist (Walbot und Coe, 1979), scheint diese im Fall von *Arabidopsis thaliana* sehr wichtig zu sein (Asakura und Barkan, 2006). Der Grund dafür ist wahrscheinlich, dass im Plastidengenom von Mais keine essentiellen Gene codiert sind (Asakura und Barkan, 2006).

Ein typisches Beispiel für ein essentielles Plastidengen ist *accD* (Asakura und Barkan, 2006). Dieses codiert für eine Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase, welches die Reaktion von Acetyl-CoA mit Hydrogencarbonat zu Malonyl-CoA katalysiert und damit die *de novo* Synthese von Fettsäureketten initiiert. Nicht alle Pflanzen sind für ihre Fettsäuresynthese auf ein Plastiden-codiertes Gen angewiesen (Schulte *et al.*, 1997). Bei einigen Pflanzen, wie Mais sind die Untereinheiten der Acetyl-CoA-Carboxylase nur im Kern codiert, während wieder andere Pflanzen sowohl über die AccD-abhängige als auch die Kern-codierte Acetyl-CoA-Carboxylase verfügen. Letzteres konnte so auch für *Arabidopsis thaliana* gezeigt werden. Sollte die Expression von *accD* gestört werden, so kann dieser Defekt partiell durch eine Acetyl-CoA-Carboxylase aus Kern-codierten Acc2 Untereinheiten kompensiert werden (Babiychuk *et al.*, 2011; Parker *et al.*, 2014, 2016).

Im Einklang mit diesen Studien konnten wir beobachten, dass bei einem Translationsproblem, wie es in *tic56-1* oder bei Spectinomycin-Behandlung von Pflanzen auftritt, die Abundanz von Acc2 ansteigt (Köhler *et al.*, 2016). Tatsächlich wurden phylogenetische Zusammenhänge zwischen dem Vorkommen des Plastidengens *accD* und der 1 MDa-TIC-Komplexkomponente Tic214 demonstriert (de Vries *et al.*, 2015). Diese Beobachtung ist aber nicht auf Tic214 begrenzt. So konnte gezeigt werden, dass der 1 MDa-TIC-Komplex in Dikotyledonen vorkommt, während die monokotyledonen Süßgräser nur noch über Tic20 verfügen sollen (Kikuchi *et al.*, 2013). Dies stellt eine ungewöhnliche und diskutierte Phylogenie für einen Proteinkomplex dar, der eine so grundlegende Bedeutung im plastidären Proteinimport einnehmen soll (de Vries *et al.*, 2015; Bölder und Soll, 2016). Berücksichtigt man jedoch unsere Beobachtung, dass der 1 MDa-TIC-Komplex auch eine Bedeutung für eine funktionierende Translation des Plastiden hat, könnte es sich um eine parallele Entwicklung des Komplexes mit dem Plastidengenom handeln.

Es wird bereits diskutiert, ob der Proteinimport über die sog. redoxregulatorischen Komponenten Tic32, Tic55 und Tic62 an den stromalen Redoxstatus und damit an die Photosyntheseaktivität des Plastiden gekoppelt ist (Sjuts *et al.*, 2017). Des Weiteren ist für einzelne Komponenten der Importmaschinerie nachgewiesen, dass diese phosphoryliert werden können (Sveshnikova *et al.*, 2000; Agne *et al.*, 2010). Phosphorylierungen stellen reversible



dynamische Proteinmodifikationen dar, die meist der Aktivitätsregulation dienen. Außerdem ist der Plastid in der Lage über Signale an den Kern die Expression von Genen zu beeinflussen, welche für Plastidenproteine codieren (Sun *et al.*, 2011).

All das stellt mögliche Maßnahmen dar, die dem Plastiden dazu dienen können die Balance zwischen dem Neuimport plastidärer Proteine und dem bereits vorhandenen Proteom zu gewährleisten. Eine Kopplung zwischen der Translation und dem Proteinimport des Plastiden wäre durchaus ein weiterer denkbarer Regulationsmechanismus. Der Plastid wäre somit in der Lage die Synthese neuer Plastiden-codierter Proteine direkt mit dem Import Kern-codierter Plastidenproteine abzustimmen. Wie diese Intervention aussieht und wie gerichtet die Regulation stattfindet oder ob es sich um einen Effekt handelt, welcher allein durch einen Importdefekt bedingt ist, bleibt noch zu klären. Wir konnten jedoch mittels der *tic56-1*-Linie eindeutig zeigen, dass der 1 MDa-TIC-Komplex einen gewichtigen Einfluss auf plastidäre Ribosomen und somit auch auf die Translation hat.

3.7 Die Funktion von Tic56 im 1 MDa-TIC-Komplex

Mit dem 1 MDa-TIC-Komplex wurde ein neuer Importkomplex an der inneren Membran des Chloroplasten beschrieben (Kikuchi *et al.*, 2013). Lediglich zu der Komponente Tic20-I gibt es weiterführende Erkenntnisse die darauf hindeuten, dass dieses Protein den Kanal des Komplexes bildet (Kovacs-Bogdan *et al.*, 2011). Zwar wurde auch für den gesamten Komplex eine Ionenkanalaktivität nachgewiesen (Kikuchi *et al.*, 2013), welche Rolle dabei die anderen Importkomponenten einnehmen, wurde jedoch nicht demonstriert. Damit bleibt die Funktion der Komponenten innerhalb des Komplexes zu klären.

Interessant ist in dieser Hinsicht, wie unterschiedlich sich der Verlust einer Komponente auf die Abundanz der anderen auswirken kann. In *tic20-1* nimmt die Abundanz der anderen Komponenten des 1 MDa-TIC-Komplexes, die nicht von der Mutation betroffenen sind, gegenüber der im Wildtyp nur leicht bis gar nicht ab (Kikuchi *et al.*, 2013; Köhler *et al.*, 2016). In den Mutantenlinien *tic100* und *tic56-1* verschwinden die nicht betroffenen Komponenten jedoch nahezu (Kikuchi *et al.*, 2013). Bei einer Inhibierung der plastidären Translation durch die Behandlung von Pflanzen mit Spectinomycin kann neben dem Plastiden-codierten Tic214 auch Tic20-I nicht mehr akkumulieren (Köhler *et al.*, 2016; Bölder und Soll, 2017). Die Abundanz von Tic20-I scheint also stark von den anderen Komponenten des Komplexes abzuhängen, während diese Abhängigkeit in dieser Form offenbar umgekehrt nicht existiert.



Diese stark gegensätzliche Regulation könnte damit erklärt werden, dass hier möglicherweise zwei Einheiten vorliegen. Zum einen die Kanalbildende Importkomponente Tic20-I und zum anderen die assoziierten Komponenten Tic56, Tic100 und Tic214 die noch andere Funktionen neben dem plastidären Import erfüllen.

Unterstützt wird diese These durch Erkenntnisse zur Bedeutung von Tic214 für den Plastiden. Dieses Plastiden-codierte Protein wurde ursprünglich als Ycf1 bezeichnet. Das codierende Gen wurde als essentiell für die Biogenese von *Chlamydomonas reinhardtii* und *Nicotiana tabacum* beschrieben (Boudreau *et al.*, 1997; Drescher *et al.*, 2000). Die exakte Funktion des Proteins blieb allerdings lange unbekannt, bis ihm als erstes Plastiden-codiertes Protein eine Bedeutung im 1 MDa-TIC-Komplex zugeordnet wurde (Kikuchi *et al.*, 2013). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass es auch eine Rolle bei der Biogenese der Photosynthese-Komplexe PSI, NDH und Cyt b6f an Thylakoidmembranen hat (Yang *et al.*, 2016). Inwieweit diese Funktion mit der im plastidären Importapparat zusammenpasst, bleibt noch zu demonstrieren, erschwert durch die Tatsache, dass hier die Bedeutung des Proteins unbekannt ist. Es zeigt jedoch deutlich, dass die Komponenten des neu etablierten 1 MDa-TIC-Komplexes nicht ausschließlich eine Funktion im plastidären Importapparat einnehmen müssen.

Wie bereits diskutiert konnten wir in unseren Analysen zu Tic56 keine Hinweise zur Rolle des 1 MDa-TIC-Komplexes im plastidären Proteinimport finden. Wir konnten jedoch einen ausgeprägten Translationsdefekt in *tic56-1* nachweisen (Köhler *et al.*, 2015b; Köhler *et al.*, 2016). Unsere Ergebnisse sprechen somit eher gegen eine essentielle Rolle von Tic56 im plastidären Proteinimport und bringen sie stattdessen mit anderen wichtigen biologischen Prozessen in Verbindung.

Es wird schwierig werden die *in vivo* Funktion der einzelnen Komponenten zu demonstrieren, da eine Beeinträchtigung der plastidären Translation auch immer Auswirkungen auf die Synthese von Tic214 hat. Des Weiteren beeinträchtigt ein Defekt von Tic56, Tic100 oder Tic214 auch die Akkumulation der anderen Komponenten des Komplexes (Kikuchi *et al.*, 2013; Köhler *et al.*, 2016; Bölter und Soll, 2017). Weitere Erkenntnisse über die molekulare Funktion der einzelnen Komponenten sind aber unerlässlich, um zu definieren wie die Einflussnahme auf die plastidäre Translation stattfindet bzw. welche Komponenten für einen korrekten Ablauf des plastidären Proteinimports unerlässlich sind.

Unsere Analysen zeigen, dass Tic56 eine Bedeutung für die Abundanz ribosomaler Plastidenproteine, die korrekte Prozessierung plastidärer 23S rRNA und somit höchstwahrscheinlich auch einen Einfluss auf die Assemblierung plastidärer Ribosomen hat.



Damit zeigen diese Ergebnisse, dass eine Verbindung zwischen Proteinimport und Translation des Plastiden besteht (Abb. 3.1).

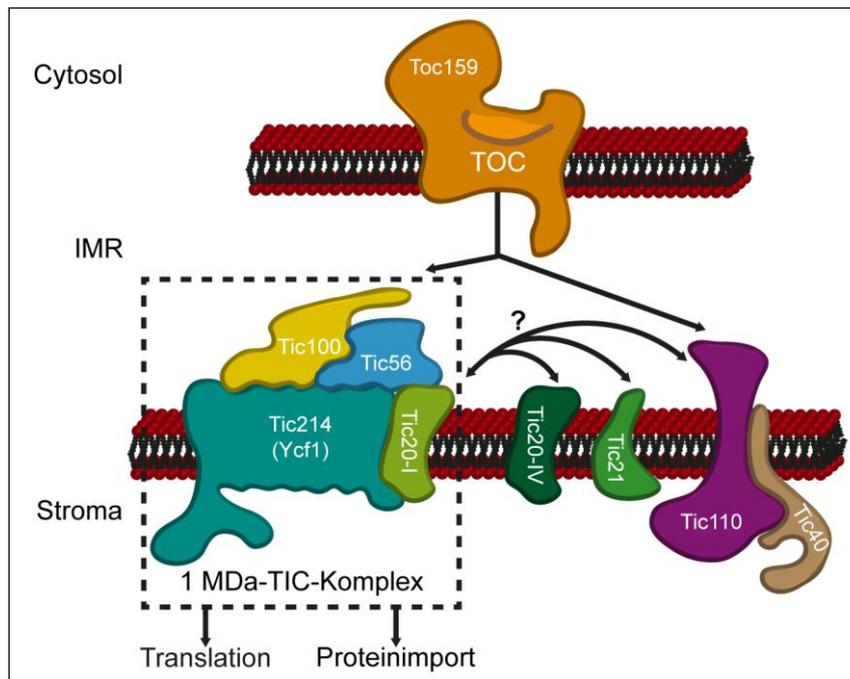


Abb. 3.1: Modell zur Rolle des Tic56-umfassenden 1 MDa-TIC-Komplexes basierend auf der aktuellen Datenlage. Durch die co-Isolation des 1 MDa-TIC-Komplexes mit Importsubstraten und den Toc159-unfassenden TOC-Komplex kann dem TIC-Komplex eine Bedeutung im plastidären Proteinimport eingeräumt werden. Dabei ist Tic20-I die einzige Komponente, zu der es aktuell tiefgreifende Analysen zur Funktion im Proteinimport gibt. Es konnte gezeigt werden, dass ein Defekt in Tic20-I partiell durch Tic20-IV ausgeglichen werden kann. Wie diese Kompensation erfolgt ist noch ungeklärt, genauso wie die Beziehung zwischen dem 1 MDa-TIC-Komplex und Tic21 bzw. dem Modul aus Tic110 und Tic40. Fakt ist, dass über Toc159 sowohl der 1 MDa-TIC-Komplex als auch dieses Modul isoliert werden können. Durch unsere Untersuchungen an der *tic56*-Nullmutante *tic56-1* war es uns möglich zu zeigen, dass Störungen im 1 MDa-TIC-Komplex auch die plastidäre Translation negativ beeinflussen. Neben dem plastidären Proteinimport scheint der Komplex also auch eine Bedeutung für die Assemblierung einer funktionierenden Translationsmaschinerie zu haben. IMR=Intermembranraum



4 Referenzen

- Agne B, Andrès C, Montandon C, Christ B, Ertan A, Jung F, Infanger S, Bischof S, Baginsky S, Kessler F** (2010) The acidic A-domain of Arabidopsis TOC159 occurs as a hyperphosphorylated protein. *Plant Physiol* **153**: 1016-1030
- Agne B, Infanger S, Wang F, Hofstetter V, Rahim G, Martin M, Lee DW, Hwang I, Schnell D, Kessler F** (2009) A *toc159* import receptor mutant, defective in hydrolysis of GTP, supports preprotein import into chloroplasts. *J Biol Chem* **284**: 8670-8679
- Agne B, Kessler F** (2009) Protein transport in organelles: The Toc complex way of preprotein import. *The FEBS journal* **276**: 1156-1165
- Agne B, Kessler F** (2010) Modifications at the A-domain of the chloroplast import receptor Toc159. *Plant Signal Behav* **5**: 1513-1516
- Andrès C, Agne B, Kessler F** (2010) The TOC complex: preprotein gateway to the chloroplast. *Biochim Biophys Acta* **1803**: 715-723
- Apel W, Schulze WX, Bock R** (2010) Identification of protein stability determinants in chloroplasts. *Plant J* **63**: 636-650
- Armbruster U, Hertle A, Makarenko E, Zuhlke J, Pribil M, Dietzmann A, Schliebner I, Aseeva E, Fenino E, Scharfenberg M, Voigt C, Leister D** (2009) Chloroplast proteins without cleavable transit peptides: rare exceptions or a major constituent of the chloroplast proteome? *Mol Plant* **2**: 1325-1335
- Aronsson H, Boij P, Patel R, Wardle A, Topel M, Jarvis P** (2007) Toc64/OEP64 is not essential for the efficient import of proteins into chloroplasts in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **52**: 53-68
- Aronsson H, Combe J, Patel R, Agne B, Martin M, Kessler F, Jarvis P** (2010) Nucleotide binding and dimerization at the chloroplast pre-protein import receptor, atToc33, are not essential in vivo but do increase import efficiency. *Plant J* **63**: 297-311
- Aronsson H, Combe J, Patel R, Jarvis P** (2006) In vivo assessment of the significance of phosphorylation of the *Arabidopsis* chloroplast protein import receptor, atToc33. *FEBS Lett* **580**: 649-655
- Asakura Y, Barkan A** (2006) *Arabidopsis* orthologs of maize chloroplast splicing factors promote splicing of orthologous and species-specific group II introns. *Plant Physiol* **142**: 1656-1663
- Babiychuk E, Vandepoele K, Wissing J, Garcia-Diaz M, De Rycke R, Akbari H, Joubes J, Beeckman T, Jansch L, Frentzen M, Van Montagu MC, Kushnir S** (2011) Plastid



gene expression and plant development require a plastidic protein of the mitochondrial transcription termination factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 6674-6679

- Bae W, Lee YJ, Kim DH, Lee J, Kim S, Sohn EJ, Hwang I** (2008) AKR2A-mediated import of chloroplast outer membrane proteins is essential for chloroplast biogenesis. *Nat Cell Biol* **10**: 220-227
- Baslam M, Oikawa K, Kitajima-Koga A, Kaneko K, Mitsui T** (2016) Golgi-to-plastid trafficking of proteins through secretory pathway: Insights into vesicle-mediated import toward the plastids. *Plant Signal Behav* **11**: e1221558
- Bauer J, Chen K, Hiltbunner A, Wehrli E, Eugster M, Schnell D, Kessler F** (2000) The major protein import receptor of plastids is essential for chloroplast biogenesis. *Nature* **403**: 203-207
- Bedard J, Trosch R, Wu F, Ling Q, Flores-Perez U, Topel M, Nawaz F, Jarvis P** (2017) Suppressors of the Chloroplast Protein Import Mutant *tic40* Reveal a Genetic Link between Protein Import and Thylakoid Biogenesis. *Plant Cell* **29**: 1726-1747
- Bischof S, Baerenfaller K, Wildhaber T, Troesch R, Vidi PA, Roschitzki B, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Kessler F, Gruissem W, Baginsky S** (2011) Plastid proteome assembly without Toc159: photosynthetic protein import and accumulation of N-acetylated plastid precursor proteins. *Plant Cell* **23**: 3911-3928
- Bohne AV** (2014) The nucleoid as a site of rRNA processing and ribosome assembly. *Front Plant Sci* **5**: 257
- Bollenbach TJ, Lange H, Gutierrez R, Erhardt M, Stern DB, Gagliardi D** (2005) RNR1, a 3'-5' exoribonuclease belonging to the RNR superfamily, catalyzes 3' maturation of chloroplast ribosomal RNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* **33**: 2751-2763
- Bölter B, Soll J** (2016) Once upon a Time - Chloroplast Protein Import Research from Infancy to Future Challenges. *Mol Plant* **9**: 798-812
- Bölter B, Soll J** (2017) Ycf1/Tic214 Is Not Essential for the Accumulation of Plastid Proteins. *Mol Plant* **10**: 219-221
- Boston RS, Viitanen PV, Vierling E** (1996) Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol Biol* **32**: 191-222
- Boudreau E, Turmel M, Goldschmidt-Clermont M, Rochaix JD, Sivan S, Michaels A, Leu S** (1997) A large open reading frame (*orf1995*) in the chloroplast DNA of *Chlamydomonas reinhardtii* encodes an essential protein. *Mol Gen Genet* **253**: 649-653
- Bruce BD** (2000) Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution. *Trends Cell Biol* **10**: 440-447



- Bruce BD** (2001) The paradox of plastid transit peptides: conservation of function despite divergence in primary structure. *Biochim Biophys Acta* **1541**: 2-21
- Caliebe A, Grimm R, Kaiser G, Lübeck J, Soll J, Heins L** (1997) The chloroplastic protein import machinery contains a Rieske-type iron-sulfur cluster and a mononuclear iron-binding protein. *EMBO J* **16**: 7342-7350
- Chen X, Smith MD, Fitzpatrick L, Schnell DJ** (2002) In vivo analysis of the role of atTic20 in protein import into chloroplasts. *Plant Cell* **14**: 641-654
- Chi W, He B, Mao J, Li Q, Ma J, Ji D, Zou M, Zhang L** (2012) The function of RH22, a DEAD RNA helicase, in the biogenesis of the 50S ribosomal subunits of Arabidopsis chloroplasts. *Plant Physiol* **158**: 693-707
- Chotewutmontri P, Reddick LE, McWilliams DR, Campbell IM, Bruce BD** (2012) Differential transit peptide recognition during preprotein binding and translocation into flowering plant plastids. *Plant Cell* **24**: 3040-3059
- Chou ML, Chu CC, Chen LJ, Akita M, Li HM** (2006) Stimulation of transit-peptide release and ATP hydrolysis by a cochaperone during protein import into chloroplasts. *J Cell Biol* **175**: 893-900
- Chou ML, Fitzpatrick LM, Tu SL, Budziszewski G, Potter-Lewis S, Akita M, Levin JZ, Keegstra K, Li HM** (2003) Tic40, a membrane-anchored co-chaperone homolog in the chloroplast protein translocon. *EMBO J* **22**: 2970-2980
- Constan D, Patel R, Keegstra K, Jarvis P** (2004) An outer envelope membrane component of the plastid protein import apparatus plays an essential role in Arabidopsis. *Plant J* **38**: 93-106
- Dahlin C, Cline K** (1991) Developmental Regulation of the Plastid Protein Import Apparatus. *Plant Cell* **3**: 1131-1140
- de Vries J, Sousa FL, Bölter B, Soll J, Gould SB** (2015) YCF1: A Green TIC? *Plant Cell* **27**: 1827-1833
- Doucet A, Kleifeld O, Kizhakkedathu JN, Overall CM** (2011) Identification of proteolytic products and natural protein N-termini by Terminal Amine Isotopic Labeling of Substrates (TAILS). *Methods in molecular biology* **753**: 273-287
- Drescher A, Ruf S, Calsa T, Jr., Carrer H, Bock R** (2000) The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes. *Plant J* **22**: 97-104



- Dutta S, Teresinski HJ, Smith MD** (2014) A Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screen to Examine the Substrate Specificity of atToc159 and atToc132, Two Arabidopsis Chloroplast Preprotein Import Receptors. *PLoS One* **9**: e95026
- Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G** (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci* **8**: 978-984
- Fellerer C, Schweiger R, Schongrubler K, Soll J, Schwenkert S** (2011) Cytosolic HSP90 cochaperones HOP and FKBP interact with freshly synthesized chloroplast preproteins of Arabidopsis. *Mol Plant* **4**: 1133-1145
- Flores-Pérez Ú, Bedard J, Tanabe N, Lympelopoulou P, Clarke AK, Jarvis P** (2016) Functional Analysis of the Hsp93/ClpC Chaperone at the Chloroplast Envelope. *Plant Physiol* **170**: 147-162
- Flores-Pérez Ú, Jarvis P** (2013) Molecular chaperone involvement in chloroplast protein import. *Biochim Biophys Acta* **1833**: 332-340
- Franzen LG, Rochaix JD, von Heijne G** (1990) Chloroplast transit peptides from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* share features with both mitochondrial and higher plant chloroplast presequences. *FEBS Lett* **260**: 165-168
- Fulgosi H, Soll J** (2002) The chloroplast protein import receptors Toc34 and Toc159 are phosphorylated by distinct protein kinases. *J Biol Chem* **277**: 8934-8940
- Gavel Y, von Heijne G** (1990) A conserved cleavage-site motif in chloroplast transit peptides. *FEBS Lett* **261**: 455-458
- Gould SB** (2012) Evolutionary genomics: Algae's complex origins. *Nature* **492**: 46-48
- Grimmer J, Rödiger A, Hoehenwarter W, Helm S, Baginsky S** (2014) The RNA-binding protein RNP29 is an unusual Toc159 transport substrate. *Front Plant Sci* **5**: 258
- Gruber A, Vugrinec S, Hempel F, Gould SB, Maier UG, Kroth PG** (2007) Protein targeting into complex diatom plastids: functional characterisation of a specific targeting motif. *Plant Mol Biol* **64**: 519-530
- Gutensohn M, Pahnke S, Kolukisaoglu Ü, Schulz B, Schierhorn A, Voigt A, Hust B, Rollwitz I, Stöckel J, Geimer S, Albrecht V, Flügge UI, Klösgen RB** (2004) Characterization of a T-DNA insertion mutant for the protein import receptor atToc33 from chloroplasts. *Mol Genet Genomics* **272**: 379-396
- Gutensohn M, Schulz B, Nicolay P, Flügge UI** (2000) Functional analysis of the two Arabidopsis homologues of Toc34, a component of the chloroplast protein import apparatus. *Plant J* **23**: 771-783



- Hanson PI, Whiteheart SW** (2005) AAA+ proteins: have engine, will work. *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**: 519-529
- Hauenstein M, Christ B, Das A, Aubry S, Hortensteiner S** (2016) A Role for TIC55 as a Hydroxylase of Phyllobilins, the Products of Chlorophyll Breakdown during Plant Senescence. *Plant Cell* **28**: 2510-2527
- Heins L, Mehrle A, Hemmler R, Wagner R, Kuchler M, Hormann F, Sveshnikov D, Soll J** (2002) The preprotein conducting channel at the inner envelope membrane of plastids. *EMBO J* **21**: 2616-2625
- Hinnah SC, Hill K, Wagner R, Schlicher T, Soll J** (1997) Reconstitution of a chloroplast protein import channel. *EMBO J* **16**: 7351-7360
- Hirabayashi Y, Kikuchi S, Oishi M, Nakai M** (2011) In vivo studies on the roles of two closely related Arabidopsis Tic20 proteins, AtTic20-I and AtTic20-IV. *Plant Cell Physiol* **52**: 469-478
- Hormann F, Kuchler M, Sveshnikov D, Oppermann U, Li Y, Soll J** (2004) Tic32, an essential component in chloroplast biogenesis. *J Biol Chem* **279**: 34756-34762
- Hust B, Gutensohn M** (2006) Deletion of core components of the plastid protein import machinery causes differential arrest of embryo development in Arabidopsis thaliana. *Plant Biology* **8**: 18-30
- Hwang CS, Shemorry A, Varshavsky A** (2010) N-terminal acetylation of cellular proteins creates specific degradation signals. *Science* **327**: 973-977
- Inaba T, Alvarez-Huerta M, Li M, Bauer J, Ewers C, Kessler F, Schnell DJ** (2005) Arabidopsis tic110 is essential for the assembly and function of the protein import machinery of plastids. *Plant Cell* **17**: 1482-1496
- Inaba T, Li M, Alvarez-Huerta M, Kessler F, Schnell DJ** (2003) AtTic110 functions as a scaffold for coordinating the stromal events of protein import into chloroplasts. *J Biol Chem* **278**: 38617-38627
- Infanger S, Bischof S, Hiltbrunner A, Agne B, Baginsky S, Kessler F** (2011) The chloroplast import receptor Toc90 partially restores the accumulation of Toc159 client proteins in the Arabidopsis thaliana ppi2 mutant. *Mol Plant* **4**: 252-263
- Inoue H, Li M, Schnell DJ** (2013) An essential role for chloroplast heat shock protein 90 (Hsp90C) in protein import into chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 3173-3178



- Ivanova Y, Smith MD, Chen K, Schnell DJ** (2004) Members of the Toc159 import receptor family represent distinct pathways for protein targeting to plastids. *Mol Biol Cell* **15**: 3379-3392
- Ivey RA, 3rd, Subramanian C, Bruce BD** (2000) Identification of a Hsp70 recognition domain within the rubisco small subunit transit peptide. *Plant Physiol* **122**: 1289-1299
- Jarvis P, Chen LJ, Li H, Peto CA, Fankhauser C, Chory J** (1998) An Arabidopsis mutant defective in the plastid general protein import apparatus. *Science* **282**: 100-103
- Jarvis P, López-Juez E** (2013) Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**: 787-802
- Jarvis P, Robinson C** (2004) Mechanisms of protein import and routing in chloroplasts. *Curr Biol* **14**: R1064-1077
- Jelic M, Soll J, Schleiff E** (2003) Two Toc34 homologues with different properties. *Biochemistry* **42**: 5906-5916
- Jelic M, Sveshnikova N, Motzkus M, Horth P, Soll J, Schleiff E** (2002) The chloroplast import receptor Toc34 functions as preprotein-regulated GTPase. *Biol Chem* **383**: 1875-1883
- Kakizaki T, Matsumura H, Nakayama K, Che FS, Terauchi R, Inaba T** (2009) Coordination of plastid protein import and nuclear gene expression by plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Plant Physiol* **151**: 1339-1353
- Kessler F, Blobel G** (1996) Interaction of the protein import and folding machineries of the chloroplast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 7684-7689
- Kessler F, Blobel G, Patel HA, Schnell DJ** (1994) Identification of two GTP-binding proteins in the chloroplast protein import machinery. *Science* **266**: 1035-1039
- Kikuchi S, Bedard J, Hirano M, Hirabayashi Y, Oishi M, Imai M, Takase M, Ide T, Nakai M** (2013) Uncovering the protein translocon at the chloroplast inner envelope membrane. *Science* **339**: 571-574
- Kikuchi S, Oishi M, Hirabayashi Y, Lee DW, Hwang I, Nakai M** (2009) A 1-megadalton translocation complex containing Tic20 and Tic21 mediates chloroplast protein import at the inner envelope membrane. *Plant Cell* **21**: 1781-1797
- Kim DH, Lee JE, Xu ZY, Geem KR, Kwon Y, Park JW, Hwang I** (2015) Cytosolic targeting factor AKR2A captures chloroplast outer membrane-localized client proteins at the ribosome during translation. *Nat Commun* **6**: 6843



- Kim DH, Park MJ, Gwon GH, Silkov A, Xu ZY, Yang EC, Song S, Song K, Kim Y, Yoon HS, Honig B, Cho W, Cho Y, Hwang I** (2014) An ankyrin repeat domain of AKR2 drives chloroplast targeting through coincident binding of two chloroplast lipids. *Dev Cell* **30**: 598-609
- Kleffmann T, Russenberger D, von Zychlinski A, Christopher W, Sjolander K, Gruissem W, Baginsky S** (2004) The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. *Curr Biol* **14**: 354-362
- Kleffmann T, von Zychlinski A, Russenberger D, Hirsch-Hoffmann M, Gehrig P, Gruissem W, Baginsky S** (2007) Proteome dynamics during plastid differentiation in rice. *Plant Physiol* **143**: 912-923
- Kleine T, Leister D** (2016) Retrograde signaling: Organelles go networking. *Biochim Biophys Acta* **1857**: 1313-1325
- Köhler D, Dobritzsch D, Hoehenwarter W, Helm S, Steiner JM, Baginsky S** (2015a) Identification of protein N-termini in *Cyanophora paradoxa* cyanelles: transit peptide composition and sequence determinants for precursor maturation. *Front Plant Sci* **6**: 559
- Köhler D, Helm S, Agne B, Baginsky S** (2016) Importance of Translocon Subunit Tic56 for rRNA Processing and Chloroplast Ribosome Assembly. *Plant Physiol* **172**: 2429-2444
- Köhler D, Montandon C, Hause G, Majovsky P, Kessler F, Baginsky S, Agne B** (2015b) Characterization of chloroplast protein import without Tic56, a component of the 1-MDa TIC translocon. *Plant Physiol* **167**: 972-990
- Kouranov A, Chen X, Fuks B, Schnell DJ** (1998) Tic20 and Tic22 are new components of the protein import apparatus at the chloroplast inner envelope membrane. *J Cell Biol* **143**: 991-1002
- Kouranov A, Schnell DJ** (1997) Analysis of the interactions of preproteins with the import machinery over the course of protein import into chloroplasts. *J Cell Biol* **139**: 1677-1685
- Koussevitzky S, Nott A, Mockler TC, Hong F, Sachetto-Martins G, Surpin M, Lim J, Mittler R, Chory J** (2007) Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science* **316**: 715-719
- Kovacheva S, Bedard J, Patel R, Dudley P, Twell D, Rios G, Koncz C, Jarvis P** (2005) In vivo studies on the roles of Tic110, Tic40 and Hsp93 during chloroplast protein import. *Plant J* **41**: 412-428
- Kovacs-Bogdan E, Benz JP, Soll J, Bölder B** (2011) Tic20 forms a channel independent of Tic110 in chloroplasts. *BMC plant biology* **11**: 133



- Kubis S, Patel R, Combe J, Bedard J, Kovacheva S, Lilley K, Biehl A, Leister D, Rios G, Koncz C, Jarvis P** (2004) Functional specialization amongst the Arabidopsis Toc159 family of chloroplast protein import receptors. *Plant Cell* **16**: 2059-2077
- Lee DW, Kim JK, Lee S, Choi S, Kim S, Hwang I** (2008) Arabidopsis nuclear-encoded plastid transit peptides contain multiple sequence subgroups with distinctive chloroplast-targeting sequence motifs. *Plant Cell* **20**: 1603-1622
- Lee DW, Lee S, Lee GJ, Lee KH, Kim S, Cheong GW, Hwang I** (2006) Functional characterization of sequence motifs in the transit peptide of Arabidopsis small subunit of rubisco. *Plant Physiol* **140**: 466-483
- Lee DW, Lee S, Oh YJ, Hwang I** (2009a) Multiple sequence motifs in the rubisco small subunit transit peptide independently contribute to Toc159-dependent import of proteins into chloroplasts. *Plant Physiol* **151**: 129-141
- Lee DW, Woo S, Geem KR, Hwang I** (2015) Sequence Motifs in Transit Peptides Act as Independent Functional Units and Can Be Transferred to New Sequence Contexts. *Plant Physiol* **169**: 471-484
- Lee S, Lee DW, Lee Y, Mayer U, Stierhof YD, Jurgens G, Hwang I** (2009b) Heat shock protein cognate 70-4 and an E3 ubiquitin ligase, CHIP, mediate plastid-destined precursor degradation through the ubiquitin-26S proteasome system in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**: 3984-4001
- Li HM, Teng YS** (2013) Transit peptide design and plastid import regulation. *Trends Plant Sci* **18**: 360-366
- Ling Q, Huang W, Baldwin A, Jarvis P** (2012) Chloroplast biogenesis is regulated by direct action of the ubiquitin-proteasome system. *Science* **338**: 655-659
- Lübeck J, Soll J, Akita M, Nielsen E, Keegstra K** (1996) Topology of IEP110, a component of the chloroplastic protein import machinery present in the inner envelope membrane. *EMBO J* **15**: 4230-4238
- Machettira AB, Gross LE, Sommer MS, Weis BL, English G, Tripp J, Schleiff E** (2011) The localization of Tic20 proteins in Arabidopsis thaliana is not restricted to the inner envelope membrane of chloroplasts. *Plant Mol Biol* **77**: 381-390
- Martin T, Sharma R, Sippel C, Waegemann K, Soll J, Vothknecht UC** (2006) A protein kinase family in Arabidopsis phosphorylates chloroplast precursor proteins. *J Biol Chem* **281**: 40216-40223
- Martin W, Herrmann RG** (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? *Plant Physiol* **118**: 9-17



- Martin WF, Garg S, Zimorski V** (2015) Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **370**: 20140330
- May T, Soll J** (2000) 14-3-3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants. *Plant Cell* **12**: 53-64
- Miras S, Salvi D, Ferro M, Grunwald D, Garin J, Joyard J, Rolland N** (2002) Non-canonical transit peptide for import into the chloroplast. *J Biol Chem* **277**: 47770-47778
- Motohashi R, Rödiger A, Agne B, Baerenfaller K, Baginsky S** (2012) Common and specific protein accumulation patterns in different albino/pale-green mutants reveals regulon organization at the proteome level. *Plant Physiol* **160**: 2189-2201
- Nakai M** (2015) The TIC complex uncovered: The alternative view on the molecular mechanism of protein translocation across the inner envelope membrane of chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **1847**: 957-967
- Neuhaus HE, Emes MJ** (2000) Nonphotosynthetic Metabolism in Plastids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**: 111-140
- Nishimura K, Ashida H, Ogawa T, Yokota A** (2010) A DEAD box protein is required for formation of a hidden break in Arabidopsis chloroplast 23S rRNA. *Plant J* **63**: 766-777
- Oelmüller R, Levitan I, Bergfeld R, Rajasekhar VK, Mohr H** (1986) Expression of nuclear genes as affected by treatments acting on the plastids. *Planta* **168**: 482-492
- Oreb M, Hofle A, Mirus O, Schleiff E** (2008) Phosphorylation regulates the assembly of chloroplast import machinery. *J Exp Bot* **59**: 2309-2316
- Oreb M, Zoryan M, Vojta A, Maier UG, Eichacker LA, Schleiff E** (2007) Phospho-mimicry mutant of atToc33 affects early development of Arabidopsis thaliana. *FEBS Lett* **581**: 5945-5951
- Paila YD, Richardson LG, Schnell DJ** (2015) New Insights into the Mechanism of Chloroplast Protein Import and Its Integration with Protein Quality Control, Organelle Biogenesis and Development. *J Mol Biol* **427**: 1038-1060
- Parker N, Wang Y, Meinke D** (2014) Natural variation in sensitivity to a loss of chloroplast translation in Arabidopsis. *Plant Physiol* **166**: 2013-2027
- Parker N, Wang Y, Meinke D** (2016) Analysis of Arabidopsis Accessions Hypersensitive to a Loss of Chloroplast Translation. *Plant Physiol* **172**: 1862-1875
- Patron NJ, Waller RF** (2007) Transit peptide diversity and divergence: A global analysis of plastid targeting signals. *Bioessays* **29**: 1048-1058



- Pilon M, Wienk H, Sips W, Deswaaf M, Talboom I, Vanthof R, Dekortekool G, Demel R, Weisbeek P, Dekruijff B** (1995) Functional Domains of the Ferredoxin Transit Sequence Involved in Chloroplast Import. *J Biol Chem* **270**: 3882-3893
- Price DC, Chan CX, Yoon HS, Yang EC, Qiu H, Weber AP, Schwacke R, Gross J, Blouin NA, Lane C, Reyes-Prieto A, Durnford DG, Neilson JA, Lang BF, Burger G, Steiner JM, Löffelhardt W, Meuser JE, Posewitz MC, Ball S, Arias MC, Henrissat B, Coutinho PM, Rensing SA, Symeonidi A, Doddapaneni H, Green BR, Rajah VD, Boore J, Bhattacharya D** (2012) *Cyanophora paradoxa* genome elucidates origin of photosynthesis in algae and plants. *Science* **335**: 843-847
- Qbadou S, Becker T, Bionda T, Reger K, Ruprecht M, Soll J, Schleiff E** (2007) Toc64--a preprotein-receptor at the outer membrane with bipartite function. *J Mol Biol* **367**: 1330-1346
- Qbadou S, Becker T, Mirus O, Tews I, Soll J, Schleiff E** (2006) The molecular chaperone Hsp90 delivers precursor proteins to the chloroplast import receptor Toc64. *EMBO J* **25**: 1836-1847
- Radhamony RN, Theg SM** (2006) Evidence for an ER to Golgi to chloroplast protein transport pathway. *Trends Cell Biol* **16**: 385-387
- Richardson LG, Jelokhani-Niaraki M, Smith MD** (2009) The acidic domains of the Toc159 chloroplast preprotein receptor family are intrinsically disordered protein domains. *BMC Biochem* **10**: 35
- Richter S, Lamppa GK** (1998) A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7463-7468
- Rosenbaum Hofmann N, Theg SM** (2005) Toc64 is not required for import of proteins into chloroplasts in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J* **43**: 675-687
- Rudolf M, Machettira AB, Gross LE, Weber KL, Bolte K, Bionda T, Sommer MS, Maier UG, Weber AP, Schleiff E, Tripp J** (2013) In vivo function of Tic22, a protein import component of the intermembrane space of chloroplasts. *Mol Plant* **6**: 817-829
- Schleiff E, Jelic M, Soll J** (2003a) A GTP-driven motor moves proteins across the outer envelope of chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 4604-4609
- Schleiff E, Soll J, Kuchler M, Kuhlbrandt W, Harrer R** (2003b) Characterization of the translocon of the outer envelope of chloroplasts. *J Cell Biol* **160**: 541-551
- Schnell DJ, Blobel G** (1993) Identification of intermediates in the pathway of protein import into chloroplasts and their localization to envelope contact sites. *J Cell Biol* **120**: 103-115



- Schnell DJ, Kessler F, Blobel G** (1994) Isolation of components of the chloroplast protein import machinery. *Science* **266**: 1007-1012
- Schönberg A, Baginsky S** (2012) Signal integration by chloroplast phosphorylation networks: an update. *Front Plant Sci* **3**: 256
- Schulte W, Topfer R, Stracke R, Schell J, Martini N** (1997) Multi-functional acetyl-CoA carboxylase from *Brassica napus* is encoded by a multi-gene family: indication for plastidic localization of at least one isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 3465-3470
- Shanklin J, DeWitt ND, Flanagan JM** (1995) The stroma of higher plant plastids contain ClpP and ClpC, functional homologs of *Escherichia coli* ClpP and ClpA: an archetypal two-component ATP-dependent protease. *Plant Cell* **7**: 1713-1722
- Shi LX, Theg SM** (2010) A stromal heat shock protein 70 system functions in protein import into chloroplasts in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* **22**: 205-220
- Shi LX, Theg SM** (2013) The chloroplast protein import system: from algae to trees. *Biochim Biophys Acta* **1833**: 314-331
- Sjuts I, Soll J, Bölter B** (2017) Import of Soluble Proteins into Chloroplasts and Potential Regulatory Mechanisms. *Front Plant Sci* **8**: 168
- Smith MD, Rounds CM, Wang F, Chen K, Afithile M, Schnell DJ** (2004) atToc159 is a selective transit peptide receptor for the import of nucleus-encoded chloroplast proteins. *J Cell Biol* **165**: 323-334
- Sohrt K, Soll J** (2000) Toc64, a new component of the protein translocon of chloroplasts. *J Cell Biol* **148**: 1213-1221
- Soll J, Schleiff E** (2004) Protein import into chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 198-208
- Sommer M, Rudolf M, Tillmann B, Tripp J, Sommer MS, Schleiff E** (2013) Toc33 and Toc64-III cooperate in precursor protein import into the chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **36**: 970-983
- Stahl T, Glockmann C, Soll J, Heins L** (1999) Tic40, a new "old" subunit of the chloroplast protein import translocon. *J Biol Chem* **274**: 37467-37472
- Steiner JM, Löffelhardt W** (2002) Protein import into cyanobacteria. *Trends Plant Sci* **7**: 72-77
- Steiner JM, Yusa F, Pompe JA, Löffelhardt W** (2005) Homologous protein import machineries in chloroplasts and cyanobacteria. *Plant J* **44**: 646-652



- Stengel A, Benz P, Balsera M, Soll J, Bölter B** (2008) TIC62 redox-regulated translocon composition and dynamics. *J Biol Chem* **283**: 6656-6667
- Su PH, Li HM** (2010) Stromal Hsp70 is important for protein translocation into pea and Arabidopsis chloroplasts. *Plant Cell* **22**: 1516-1531
- Sun X, Feng P, Xu X, Guo H, Ma J, Chi W, Lin R, Lu C, Zhang L** (2011) A chloroplast envelope-bound PHD transcription factor mediates chloroplast signals to the nucleus. *Nat Commun* **2**: 477
- Sun Y, Zerges W** (2015) Translational regulation in chloroplasts for development and homeostasis. *Biochim Biophys Acta* **1847**: 809-820
- Sveshnikova N, Soll J, Schleiff E** (2000) Toc34 is a preprotein receptor regulated by GTP and phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4973-4978
- Teng YS, Chan PT, Li HM** (2012) Differential age-dependent import regulation by signal peptides. *PLoS biology* **10**: e1001416
- Teng YS, Su YS, Chen LJ, Lee YJ, Hwang I, Li HM** (2006) Tic21 is an essential translocon component for protein translocation across the chloroplast inner envelope membrane. *Plant Cell* **18**: 2247-2257
- Tiller N, Bock R** (2014) The translational apparatus of plastids and its role in plant development. *Mol Plant* **7**: 1105-1120
- Tranel PJ, Froehlich J, Goyal A, Keegstra K** (1995) A component of the chloroplastic protein import apparatus is targeted to the outer envelope membrane via a novel pathway. *EMBO J* **14**: 2436-2446
- von Heijne G, Nishikawa K** (1991) Chloroplast transit peptides. The perfect random coil? *FEBS Lett* **278**: 1-3
- Walbot V, Coe EH** (1979) Nuclear gene *iojap* conditions a programmed change to ribosome-less plastids in *Zea mays*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 2760-2764
- Waters MT, Wang P, Korkaric M, Capper RG, Saunders NJ, Langdale JA** (2009) GLK transcription factors coordinate expression of the photosynthetic apparatus in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**: 1109-1128
- Wienk HL, Czisch M, de Kruijff B** (1999) The structural flexibility of the preferredoxin transit peptide. *FEBS Lett* **453**: 318-326



- Wienk HL, Wechselberger RW, Czisch M, de Kruijff B** (2000) Structure, dynamics, and insertion of a chloroplast targeting peptide in mixed micelles. *Biochemistry* **39**: 8219-8227
- Wirmer J, Westhof E** (2006) Molecular contacts between antibiotics and the 30S ribosomal particle. *Methods Enzymol* **415**: 180-202
- Wu C, Seibert FS, Ko K** (1994) Identification of chloroplast envelope proteins in close physical proximity to a partially translocated chimeric precursor protein. *J Biol Chem* **269**: 32264-32271
- Yamaguchi K, Subramanian AR** (2000) The plastid ribosomal proteins. Identification of all the proteins in the 50 S subunit of an organelle ribosome (chloroplast). *J Biol Chem* **275**: 28466-28482
- Yamaguchi K, von Knoblauch K, Subramanian AR** (2000) The plastid ribosomal proteins. Identification of all the proteins in the 30 S subunit of an organelle ribosome (chloroplast). *J Biol Chem* **275**: 28455-28465
- Yang XF, Wang YT, Chen ST, Li JK, Shen HT, Guo FQ** (2016) PBR1 selectively controls biogenesis of photosynthetic complexes by modulating translation of the large chloroplast gene *Ycf1* in *Arabidopsis*. *Cell Discov* **2**: 16003
- Young ME, Keegstra K, Froehlich JE** (1999) GTP promotes the formation of early-import intermediates but is not required during the translocation step of protein import into chloroplasts. *Plant Physiol* **121**: 237-244
- Yusa F, Steiner JM, Löffelhardt W** (2008) Evolutionary conservation of dual Sec translocases in the cyanelles of *Cyanophora paradoxa*. *BMC Evol Biol* **8**: 304
- Zhang DW, Yuan S, Xu F, Zhu F, Yuan M, Ye HX, Guo HQ, Lv X, Yin Y, Lin HH** (2016) Light intensity affects chlorophyll synthesis during greening process by metabolite signal from mitochondrial alternative oxidase in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* **39**: 12-25
- Zufferey M, Montandon C, Douet V, Demarsy E, Agne B, Baginsky S, Kessler F** (2017) The Novel Chloroplast Outer Membrane Kinase KOC1 Is a Required Component of the Plastid Protein Import Machinery. *J Biol Chem* **292**: 6952-6964
- Zybailov B, Rutschow H, Friso G, Rudella A, Emanuelsson O, Sun Q, van Wijk KJ** (2008) Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. *PLoS One* **3**: e1994



Appendix

4.1 Abkürzungsverzeichnis

AAA+	Proteinsuperfamilie Ringförmiger P-loop NTPasen die auch die Proteinfamilie der <i>ATPases associated with diverse cellular activities</i> (AAA) Proteine umfasst
Acc	Acetyl-CoA-Carboxylase
<i>accD</i> /AccD	D Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase
A-Domäne	<i>Acidic</i> -Domäne
ÄHM.....	äußere Hüllmembran
AKR2	<i>Ankyrin repeat protein 2</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Enzym mit der Fähigkeit Adenosintriphosphat zu hydrolysieren
ClpC	Untereinheit des caseinolytischen Proteasekomplexes mit Chaperonaktivität
ClpP.....	Untereinheit des caseinolytischen Proteasekomplexes mit Proteaseaktivität
C-terminal/Terminus	Ende einer Polypeptidkette mit Carboxygruppe
Cpn	Chaperonin
Cyt b6f.....	Cytochrom b6f Komplex
E3	Ubiquitin-ligierendes Enzym
E1 α	Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase
eGFP.....	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ER.....	endoplasmatisches Retikulum
FKBP.....	Tacrolimus (FK506) bindendes Protein
G-Domäne	GTPase-Domäne
GroEL.....	Prokaryotisches Chaperonin, homolog zum eukaryotischen Hsp60
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Enzym mit der Fähigkeit Guanosintriphosphat zu hydrolysieren
HOP.....	Hsp70/Hsp90 organisierendes Protein
Hsp	Hitzeschockprotein
IHM.....	innere Hüllmembran
IMR	Intermembranraum
KOC1	Kinase der äußeren (<i>outer</i>) Chloroplastenhüllmembran 1
M-Domäne	Membran-Domäne



M&M-Modell.....	<i>multi-selection & multi-order</i> Modell
NADPH.....	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NDH.....	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid Dehydrogenase-ähnlicher Komplex
N-terminal/Terminus.....	Ende einer Polypeptidkette mit Aminogruppe
<i>ppi</i>	<i>plastid protein import</i>
PSI.....	Photosystem I
PSII.....	Photosystem II
RbcS.....	kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
RING.....	<i>really interesting new gene</i>
RNA.....	Ribonukleinsäure
rRNA.....	ribosomale Ribonukleinsäure
SEC.....	<i>secretory</i>
<i>SP1</i>	<i>suppressor of ppi1 locus 1</i>
spFNR.....	Ferredoxin-NADP+-Reduktase aus Spinat
SPP.....	stromale prozessierenden Peptidase
SSR.....	<i>small subunit ribosomal protein</i>
TAILS.....	<i>terminal amine isotopic labeling of substrates</i>
TAP.....	<i>tandem affinity purification</i>
TAT.....	<i>twin arginine translocation</i>
<i>TIC/tic/Tic/TIC</i>	Translokon an der inneren Hüllmembran des Chloroplasten
<i>TOC/toc/Toc/TOC</i>	Translokon an der äußeren (<i>outer</i>) Hüllmembran des Chloroplasten
TP.....	Transitpeptid
Ycf1.....	<i>hypothetical chloroplast open reading frame 1</i>



4.2 Unterstützendes Material

4.2.1 Unterstützende Abbildungen zu Manuskript 2

Supplemental Material zum Artikel:

**Characterization of Chloroplast Protein Import without Tic56, a Component of the
1-Megadalton Translocon at the Inner Envelope Membrane of Chloroplasts**

ist über die Internetplattform des Journals *Plant Physiology* online zu finde.



4.2.2 Unterstützende Abbildungen zu Manuskript 3

Supplemental Material zum Artikel:

**Importance of Translocon Subunit Tic56 for rRNA Processing and Chloroplast
Ribosome Assembly**

ist über die Internetplattform des Journals *Plant Physiology* online zu finde.



4.2.3 Übersicht über die unterstützenden Tabellen

Alle unterstützenden Tabellen sind über die Internetplattformen der entsprechenden Journale zu finden.

Unterstützende Tabellen zu Manuskript 1:

Supplemental Table S1: List of peptides identified by the TAILS-analysis of Köhler et al. (2015) for Arabidopsis thaliana.

Supplemental Table S2: Proteins identified and quantified from complete or Triton X-100 washed cyanelle preparations.

Supplemental Table S3: Analysis of supporting or conflicting evidence for gene model annotation.

Unterstützende Tabellen zu Manuskript 2:

Supplemental Table S1: Summary of all proteins identified in the TAILS experiment with the minimal starting positions.

Supplemental Table S2: Summary of all peptides identified in the TAILS experiments used for further analyses.

Supplemental Table S3: Summary of unique peptides identified in the proteome analysis of tic56-1 and wild-type plastids (thermolysin treatment).

Unterstützende Tabellen zu Manuskript 3:

Supplemental Table S1: Design of the probes for RNA-blot analyses.

Supplemental Table S2: Proteomics data obtained with plants from all analyzed genotypes.

Supplemental Table S3: GeneChip data obtained with tic56-1 mutants and a corresponding wild-type control.

Supplemental Table S4: Comparison of protein accumulation and transcript abundance in wild type and the different albino mutants.



4.3 Danksagung

Ich möchte mich als erstes bei Herrn Prof. Dr. Sacha Baginsky bedanken, der mich als Doktoranden beschäftigt hat. Er hat mir damit die Möglichkeit verschafft an Teilen des interessanten und komplexen Gebiets des plastidären Proteinimports zu arbeiten. Stets hat Er sich für die aktuelle Ergebnislage interessiert und war zur anregenden Diskussion neuer Daten bereit.

Danken möchte ich vor allem Frau Dr. Birgit Agne, die mir viel Vertrauen entgegengebracht hat, in dem Sie mich an einem Teil Ihres Forschungsgebietes arbeiten lies. Sie war eine gute Mentorin, die sich mit mir über meine Ergebnisse als auch deren Interpretation unterhalten hat. Bezüglich des plastidären Proteinimports war Sie eine stets behilfliche Quelle der Erfahrung und des Wissens.

Danken möchte ich auch Dr. Dirk Dobritsch, der mich bei seinen Analysen zu *Cyanophora paradoxa* mit einbezogen hat. Er hat mir damit die Möglichkeit verschafft mein Wissen über Transitpeptide Kern-codierter Plastidenproteine zu erweitern.

Auch allen anderen Kollegen möchte ich danken, welche als Co-Autoren einen wesentlichen Beitrag zur Entstehung der Artikel dieser Arbeit beigetragen haben. Ohne Ihre Unterstützung und Expertise auf Ihren Gebieten, wäre der Gewinn so vieler neuer Erkenntnisse in so kurzer Zeit nicht möglich gewesen.

An dieser Stelle möchte ich auch allen andern Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danken. Freundliche Gespräche haben den Arbeitsalltag aufgelockert aber auch zum Erkenntnisaustausch beigetragen. Es hat sich häufig als nützlich erwiesen, wenn bestimmte Sachverhalte von jemand anderen auch mal aus einer anderen Perspektive betrachtet wurden.

Auch den Studenten möchte ich danken, welche ich bei ihrem Werdegang begleiten konnte und die mich mit Ihrer Arbeit beim Vorankommen in meinen Analysen unterstützt haben.

Dank möchte ich an dieser Stelle auch noch meiner Familie zukommen lassen. Vor allem meiner Freundin Heike und unserem Sohn Luis, die mitunter abends geduldig auf den zerstreuten Papa warten mussten. Auch meiner Mutter danke ich, die mir das Studium der Biochemie und damit das Arbeiten an dieser Doktorarbeit ermöglicht hat.

Für finanzielle Unterstützung, möchte ich mich bei der DFG als auch der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt für die Gewährung eines Stipendiums bedanken.



4.4 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe. Die Arbeit wurde bislang nirgendwo in dieser oder einer abgewandelten Fassung zur Erlangung eines Doktorgrades eingereicht. Es wurden keine anderen Hilfsmittel und Quellen benutzt als die Ausgewiesenen. Stellen die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen oder Aussagen anderer stammen, wurden durch Quellenangaben kenntlich gemacht.

Daniel Köhler



4.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum/ -ort: 24. Juni 1986 in Löbau

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Familienstand: In Partnerschaft lebend, 1 Kind

Anschrift: Kellnerstraße 1, 06108 Halle (Saale)

Studium und beruflicher Werdegang

Seit 06/2017 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Baginsky (Abt. Pflanzenbiochemie)

04/2012-05/2017 Untersuchungen zum Proteinimport über die Plastidenhülle im Rahmen eines Promotionsstudium in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Baginsky (Abt. Pflanzenbiochemie)

10/2006-10/2011 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Baginsky (Abt. Pflanzenbiochemie) mit dem Titel: „Isolierung von TAP-Toc159 mit interagierenden Proteinen aus *Arabidopsis thaliana*“
Abschluss: Diplom der Biochemie

Zivildienst

11/2005-07/2006 ASB Löbau

Schulischer Werdegang

2002-2005 Wirtschaftsgymnasium BSZ-Löbau
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1996-2002 Andert-Mittelschule Ebersbach
Abschluss: Mittlere Reife

1992-1996 Grundschule

Daniel Köhler

