

Untersuchungen zur neuen Komponente Tic23 der chloroplastidären Proteinimportmaschinerie

D i s s e r t a t i o n

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

der Naturwissenschaftlichen Fakultät I
«Biowissenschaften»
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Frau M.Sc. Nadine Bauer, geb. Keilert

geboren am 30.11.1990 in Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. Sacha Baginsky
2. Prof. Dr. Ingo Heilmann
3. Prof. Dr. Ute Vothknecht

Tag der Verteidigung: 28.09.2022

Summary

The import of nuclear-encoded proteins into the chloroplast is of essential importance for the physiology of every plant cell. A decisive role for the import play import complexes of the outer (TOC) and inner chloroplast envelope membrane (TIC), which are built up as high-molecular protein complexes out of many subunits. In the study by Schäfer et al. (2019) a comparative analysis between the wild type of *Arabidopsis thaliana* and the *tic56-3* mutant was carried out. This mutant does not contain the Tic56 component of the 1 MDa TIC complex in its native form, resulting in down-regulation of the 1 MDa TIC complex. Further investigations revealed a previously undescribed protein, called Tic23, which could be associated with the TIC complex. Therefore, this thesis deals with the characterization of Tic23. In particular, the localization of the protein was investigated and comparative analyzes were carried out between wild type and the mutants *tic23-1* and *pss1* with regard to phenotype, protein import and heat stress response of the plants.

It was shown that Tic23 localizes in the inner envelope membrane, where it is anchored by a transmembrane domain, and thus represents a new component of the 1 MDa TIC complex.

Subsequently, the physiological function of Tic23 in plants was examined. To this end, various mutant lines were generated and then characterized. It was found that the T-DNA insertion mutant *tic23-1* develops a pale green phenotype, which is caused by a reduction in the protein abundance of Tic23. This effect could be reversed in the complementation line by transformation with external Tic23, which result in the recovery of the phenotype. By crossing *tic23-1* with a mutant of the homologue *pss1*, the phenotype could partially rescued, which show an increasing of the Tic23 protein level.

As a component of the protein import machinery, the import process could be affected by a mutation of Tic23. This assumption was checked with the help of *in vitro* import experiments. It was found that in the *tic23-1* mutant about 30% more substrate protein was imported into the chloroplasts than in the wild type within the observation period. The crossing of *tic23-1* and *pss1* only showed an import of 70 to 80% of the substrate amount of the wild type.

Finally, an association of Tic23 with the plant's heat response was discovered. It was shown that the mutant *tic23-1* was more resistant to heat stress and maintained the

Summary

ability to import proteins relevant to photosynthesis under heat stress. Furthermore, evidence was discovered that Tic23 interacts with the TOC-TIC supercomplex during heat stress treatment.

Thus, a new component of the 1 MDa TIC complex could be identified in this work, which is involved in the regulation of the complex during heat stress.

Zusammenfassung

Der Import kern-kodierter Proteine in die Chloroplasten ist von essenzieller Bedeutung für die Physiologie jeder Pflanzenzelle. Dabei spielen Importkomplexe der äußeren (TOC) und inneren Chloroplastenhülle (TIC) eine entscheidende Rolle, die als hochmolekulare Proteinkomplexe aus vielen Untereinheiten aufgebaut sind. In der Studie von Schäfer et al. (2019) wurde eine vergleichende Analyse zwischen dem Wildtyp von *Arabidopsis thaliana* und der *tic56-3* Mutante durchgeführt. Diese Mutante enthält die Tic56 Komponente des 1 MDa TIC-Komplexes nicht in ihrer nativen Form, was zur Herunterregulation des 1 MDa TIC-Komplexes führte. Bei weiterführenden Untersuchungen entdeckte man ein bisher unbeschriebenes Protein, genannt Tic23, welches mit dem TIC-Komplex assoziiert sein könnte. Daher befasst sich die vorliegende Arbeit mit der Charakterisierung von Tic23. Im Speziellen wurde die Lokalisierung des Proteins untersucht und vergleichende Analysen zwischen Wildtyp sowie den Mutationen *tic23-1* und *pss1* hinsichtlich Phänotyp, Proteinimport und Hitzestressantwort durchgeführt.

Dabei wurde nachgewiesen, dass Tic23 in der inneren Hüllmembran lokalisiert, in der es durch eine Transmembrandomäne verankert ist, und somit eine neue Komponente des 1 MDa TIC-Komplexes darstellt.

Anschließend wurde die physiologische Funktion von Tic23 in planta untersucht. Hierzu wurden verschiedene Mutantenlinien generiert und anschließend charakterisiert. Dabei wurde festgestellt, dass die T-DNA Insertionsmutante *tic23-1* einen hellgrünen Phänotyp ausbildet, der durch eine Reduzierung von der Proteinabundanz von Tic23 verursacht wird. Dieser Effekt konnte in der Komplementationslinie durch die Transformation mit externen Tic23 aufgehoben werden, so dass diese wieder einen Wildtypphänotyp aufweist. Durch die Kreuzung von *tic23-1* mit einer Mutante des Homologs Pss1 konnte eine partielle Wiederherstellung im Phänotyp sowie auf Proteinebene nachgewiesen werden.

Als Komponente der Proteinimportmaschinerie könnte der Importprozess durch eine Mutation von Tic23 beeinträchtigt werden. Diese Annahme wurde mit Hilfe von *in vitro* Importexperimenten überprüft. Dabei wurde festgestellt, dass in der *tic23-1* Mutante innerhalb des Beobachtungszeitraums circa 30 % mehr Substratprotein in die Chloroplasten importiert als im Wildtyp. Die Kreuzung von *tic23-1* und *pss1* wies lediglich einen Import von 70 bis 80 % der Substratmenge des Wildtyps auf.

Abschließend wurde ein Zusammenhang von Tic23 mit der Hitzeantwort der Pflanze entdeckt. Es zeigte sich, dass die Mutante *tic23-1* gegenüber Hitzestress resistenter war und hierbei zum Erhalt der Importfähigkeit von für die Photosynthese relevanten Proteinen unter Hitzestress sorgte. Des Weiteren wurden Hinweise entdeckt, dass Tic23 während der Hitzestressbehandlung in Interaktion mit den TOC-TIC Superkomplex tritt.

Somit konnte in dieser Arbeit eine neue Komponente des 1 MDa TIC-Komplexes identifiziert werden, die an der Regulation des Komplexes während Hitzestress beteiligt ist.

Inhaltsverzeichnis

Summary	II
Zusammenfassung	IV
Inhaltsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
Abbildungsverzeichnis.....	XI
Tabellenverzeichnis.....	XII
Anhangsverzeichnis	XIII
1. Einleitung	1
1.1 Die Bedeutung und Entwicklung des Chloroplasten	1
1.2 Proteinimport in den Chloroplasten	3
1.2.1 Cytosolische Faktoren für den Import in den Plastiden.....	5
1.2.2 Der TOC-Komplex der äußeren Plastidenhülle.....	6
1.2.3 Die TIC-Komplexe der inneren Plastidenhülle	8
1.3 Tic23 und seine Homologen.....	11
1.4 Modellierung der Importkomplexe bei Stress	16
1.5 Zielstellung	17
2. Material und Methoden	19
2.1 Material.....	19
2.1.1 Enzyme	19
2.1.2 Größenstandard.....	19
2.1.3 Antikörper.....	19
2.1.4 Kits.....	20
2.1.5 Geräte.....	21
2.1.6 Organismen	21
2.2 Methoden	22
2.2.1 Pflanzenanzucht	22

VI

Inhaltsverzeichnis

2.2.1.1	Herstellung von ½ MS (Murashige-Skoog)-Festmedien	22
2.2.1.2	Oberflächensterilisation der Samen.....	22
2.2.1.3	Anzucht der Pflanzen auf Erde	23
2.2.2	Hitzeschockstresstest	23
2.2.3	Chlorophyll-Messungen aus Pflanzenmaterial	23
2.2.4	Molekularbiologische Methoden.....	24
2.2.4.1	DNA Extraktion zur Genotypisierung.....	24
2.2.4.2	Generierung von Klonierungsplasmide	24
2.2.4.3	Polymerase-Kettenreaktion zur Genotypisierung	26
2.2.4.4	RNA-Isolation.....	26
2.2.4.5	cDNA Synthese	27
2.2.4.6	Quantifizierung der Transkriptmenge	27
2.2.5	Proteinbiochemische Methoden.....	28
2.2.5.1	Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial.....	28
2.2.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	28
2.2.5.3	Chloroform-Methanol-Fällung	29
2.2.5.4	Aceton-Methanol-Fällung.....	30
2.2.5.5	Elektrophoretische Trennung von denaturierten Proteingemischen	30
2.2.5.6	Coomassie-Blue Proteinfärbung.....	30
2.2.5.7	Antikörper Generierung	31
2.2.5.8	Immobilisierung der Proteine auf eine Membran per Western-Blot.....	32
2.2.5.9	Visualisierung von Protein beim Western-Blot	32
2.2.5.10	Identifikation von Interaktionspartner.....	32
2.2.5.11	Chloroplastenisolation aus Blattmaterial	34
2.2.5.12	Proteaseschutzversuch.....	35
2.2.5.13	<i>In Vitro</i> Importexperimente	36
2.2.5.14	Subzelluläre Fraktionierung und Membranextraktion.....	37
2.2.5.15	Darstellung nativer Proteinkomplexe durch eine 2D-BlueNative-PAGE	38
2.2.6	Generierung von eYFP Expressionsplasmiden.....	39
2.2.7	Protoplastierung und Protoplastentransformation	40
2.2.8	Massenspektrometrische Analyse plastidärer Proteinextrakte.....	41
3.	Ergebnisse	43

3.1	Tic23 ist eine Komponente des 1 MDa TIC-Komplexes	43
3.2	Tic23 ist ein Protein der inneren Chloroplastenhüllmembran	47
3.3	Die Abundanz von Tic23 ist abhängig von den Komponenten des 1 MDa TIC-Komplexes.....	51
3.4	Eine Mutation im <i>TIC23</i> Gen führt zu einem hellgrünen Phänotyp	53
3.5	Proteomänderung in der <i>tic23-1</i> Mutante	59
3.6	Der <i>tic23-1</i> Phänotyp kann komplementiert werden	64
3.7	Durch gezieltes <i>gene silencing</i> kann der <i>tic23-1</i> Phänotyp hervorgerufen werden	68
3.8	Der <i>in vitro</i> Import in isolierte Chloroplasten verbessert sich in der <i>tic23-1</i> Mutante	72
3.9	Die Kreuzung <i>tic23-1 x pss1</i> rettet partiell die <i>tic23-1</i> Mutationseffekte	73
3.10	Expressionsdaten für <i>TIC23</i> weisen auf eine Funktion in der Hitzetoleranz 78	
3.11	Vergleichende Expressions- und Proteinanalyse zum Hitzestress.....	82
3.12	Funktion und Aufbau des Proteinimportkomplexes während Hitzestress.	87
4.	Diskussion.....	92
4.1	Tic23 als Teil des 1 MDa TIC-Komplexes	92
4.2	Lokalisationsstudien zum Tic23 Protein und seinem Homolog Pss1	94
4.3	Eine Mutation von Tic23 beeinflusst die Entwicklung der Pflanzen	97
4.4	Tic23 beeinflusst den Proteinimport	100
4.5	Tic23 hat eine mögliche Funktion unter Hitzestress	102
	Literaturverzeichnis	109
	Appendix.....	118
	Lebenslauf.....	137
	Erklärung	138
	Danksagung	139

Abkürzungsverzeichnis

½ MS	½ Murashige & Skoog Medium
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AGI	<i>Arabidopsis genome initiative</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BN-PAGE	Blue Native – Polyacralamid – Gelelektrophorese
BSA	Bovines Serumalbumin
CaMV	Cauliflower mosaic virus
cDNA	complementary DNA
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GTP	Guanosintriphosphat
Hsc70	<i>heat shock protein cognate 70</i>
HSP	<i>heat shock protein</i> , Hitzeschockprotein
LHC	<i>light harvesting complex</i> , Lichtsammelkomplex
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIC	Protease-Inhibitor-Cocktail
PHD	Pyruvatdehydrogenase-Komplex
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>ppi1</i>	<i>plastid protein import mutant 1</i> ; toc33-Mutante
<i>ppi2</i>	<i>plastid protein import mutant 2</i> ; toc159-Mutante
ppm	parts per million [Konzentrationseinheit]

PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative <i>real time-PCR</i>
RbcL	<i>large subunit of RuBisCo</i> , große RuBisCo-Untereinheit
RbcS/SSU	<i>small subunit of RuBisCo</i> , kleine RuBisCo-Untereinheit
RT	Raumtemperatur
SALK	Salk Institute Genomic Analysis Laboratory
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAIR	<i>The Arabidopsis information resource</i>
T-DNA	transferierte DNA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TIC/Tic	<i>Translocon of the Inner envelope of the Chloroplast</i>
TOC/Toc	<i>Translocon of the Outer envelope of the Chloroplast</i>
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Proteinimport in den Chloroplasten.....	4
Abbildung 2 TOC-Komplex und die cytosolischen Faktoren.....	7
Abbildung 3 Die identifizierte Komponenten der TIC-Komplexe	9
Abbildung 4 Sequenzvergleich von Tic23 mit seinen publizierten Homologen.....	13
Abbildung 5 Evolution des Tic23 Proteins	14
Abbildung 6 Tic23 interagiert mit den Untereinheiten des 1 MDa TIC-Komplexes ...	44
Abbildung 7 Lokalisierung und Topologie von Tic23	48
Abbildung 8 Abundanz von Tic23 in Mutanten des Proteinimports.....	52
Abbildung 9 Phänotypische Analyse der T-DNA Insertionsmutanten	54
Abbildung 10 Vergleichende Altersentwicklung von den T-DNA Insertionsmutanten	56
Abbildung 11 Transkript- und Proteinmenge von Tic23 in den Tic23 Mutanten.....	57
Abbildung 12 vergleichende Proteomanalyse zwischen <i>tic23-1</i> und Wildtyp	60
Abbildung 13 Analyse der generierten Komplementationslinie <i>tic23+35S-TIC23</i> der <i>tic23-1</i> Mutation	65
Abbildung 14 Western-Blot Analyse der <i>tic23+35S-TIC23</i> Komplementationslinie ..	67
Abbildung 15 Charakterisierung einer Tic23 <i>silencing</i> Linie	70
Abbildung 16 <i>In vitro</i> Importexperiment mit zwei verschiedenen radioaktiven Substraten	72
Abbildung 17 Analysen der generierten Kreuzungslinie <i>tic23-1 x pss1</i>	74
Abbildung 18 Bestimmung der Proteinmenge von der <i>tic23-1 x pss1</i>	76
Abbildung 19 <i>In vitro</i> Importexperiment mit der Kreuzung <i>tic23-1 x pss1</i>	77
Abbildung 20 <i>Heat map</i> und phänotypische Analyse unter Hitzestress.....	81
Abbildung 21 Transkriptgehalt ausgewählter Gene während des Hitzestresses	84
Abbildung 22 Bestimmung der Proteinmengen während des Hitzestresses	86
Abbildung 23 <i>In vitro</i> Importexperiment unter Hitzestressbedingungen.....	89
Abbildung 24 Der 1 MDa TIC-Komplex bei Hitzestress.	90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Veränderungen der Proteinimportkomponenten	61
Tabelle 2 signifikant veränderte Komponenten der Lichtsammelkomplexe und der Photosysteme	62

Anhangsverzeichnis

Anhang 1 Spezifitätstest des hergestellten Tic23-Antikörpers.....	118
Anhang 2 identifizierte Proteine aus der Ko-Immunopräzipitation	119
Anhang 3 Lokalisierung des Volllängen-Proteins Tic23 und Pss1	121
Anhang 4 Bestimmung der Transkriptmenge von benachbarten Gene	122
Anhang 5 erhöhte Proteine (um den Faktor 2) der vergleichende Proteomanalyse	123
Anhang 6 reduzierte Proteine der vergleichende Proteomanalyse.....	125
Anhang 7 Ultrastruktur der Chloroplasten aus verschiedene Mutanten.....	128
Anhang 8 Zweites Replikat der 2D-BN-PAGE von Hitze gestressten und ungestressten Chloroplasten aus Wildtyp Col-0 und tic23-1 Pflanzen.	129
Anhang 9 ko-exprimierte Gene nach dem Server ATTED-II.....	130
Anhang 10 Segregationsanalyse der Komplementationslinie <i>tic23+35S-TIC23</i> und der silencing Linie <i>sil-tic23</i>	131
Anhang 11 Segregationsanalyse der Kreuzung <i>tic23-1 x pss1</i>	133
Anhang 12 Liste der verwendeten Primer.....	135

1. Einleitung

1.1 Die Bedeutung und Entwicklung des Chloroplasten

Pflanzen sind ein wichtiger Bestandteil des globalen Ökosystems. Als Primärproduzent von allen Kohlenstoffgerüsten der Biosphäre stehen sie an der ersten Stelle vieler Nahrungsketten. Daneben sind Pflanzen ebenfalls einer der Hauptproduzent für Sauerstoff. Dieser entsteht als Produkt des bedeutendsten Prozesses der Pflanzen, der Photosynthese. Bei diesem Vorgang wandeln Pflanzen Lichtenergie in chemische Energie um. Grüne Pflanzen, Algen, Phytoplankton und photosynthetisch aktive Bakterien sind in der Lage, Photosynthese zu betreiben, um anschließend die photoautotroph hergestellte Energie für ihr Wachstum und andere Stoffwechselwege zu nutzen. Dieser Prozess der Energiegewinnung findet in eukaryotischen Zellen in den Chloroplasten statt.

Die Chloroplasten sind von zwei Hüllmembranen umgeben, wodurch die innen liegende plasmatische Plastidenmatrix, das Stroma, vom Cytosol separiert wird. Die äußere und innere Hüllmembran werden durch einen Intermembranraum voneinander getrennt. In den Chloroplasten höherer Pflanzen wird das Stroma durch ein weiteres zusammenhängendes Membransystem aus Thylakoiden durchgezogen. Hierbei bilden die Thylakoide zwei morphologisch unterscheidbare Strukturen aus; zum einen Stapel aus mehreren übereinander gelagerten Thylakoidmembranen, die man Grana-Stapel nennt, und zum anderen ungestapelte Bereiche, die so genannten Stroma-Thylakoide (Nevo et al., 2012). In den Thylakoidmembranen sind die photosynthetischen Proteinkomplexe integriert. Zwei der Hauptkomplexe sind die beiden Photosysteme I und II. Das Photosystem II (PSII) bildet Dimere, die an den Grana-Stapeln lokalisiert sind, während das Photosystem I in den Stromathylakoide oder an den Enden der Grana-Stapel lokalisiert ist (Andersson & Anderson, 1980). Die beiden Photosysteme sind von den Lichtsammelkomplexen (*light harvesting complexes* LHCs) umgeben, die die Lichtenergie absorbieren und an die Reaktionszentren der Photosysteme leiten. Diese Antennenkomplexe bestehen aus verschiedenen Proteinen, wie zum Beispiel Lhcb4 oder Lhcb2, und Pigmenten, wie zum Beispiel Chlorophyll.

Die Chloroplasten sind nur eine Art von Plastiden, die in Pflanzen vorkommen kann. Hierbei bildet der Proplastid die undifferenzierte Vorläuferform. Je nach ihrem Verwendungszweck werden aus dem Proplastid die verschiedenen Plastidformen gebildet. Zum einen können sie in Speicherorganellen, wie Eleioplasten (Lipidspeicher) oder Amyloplasten (Stärkespeicher) differenziert werden, und zum anderen können die Plastiden Pigmente enthalten. Hierzu gehören die Chromoplasten, die überwiegend Carotinoide einlagern, oder Chloroplasten, die hauptsächlich Chlorophyll akkumulieren. Die Chlorophylle ermöglichen der Pflanze die Aufnahme der Lichtenergie zur weiteren Energiegewinnung. Der Chloroplast entwickelt sich durch Lichteinwirkung aus einem Proplastiden. Unter Lichtausschluss kann eine Vorform des Chloroplastens, der Etioplast, gebildet werden. Wenn nun Licht auf den Etioplasten trifft, wandelt er sich innerhalb von 12 Stunden in einen Chloroplasten um (Cortleven et al., 2016). Neben äußeren Einwirkungen kann auch die pflanzliche Entwicklung auf eine Umwandlung der Chloroplasten Einfluss nehmen. So formen sich die Chloroplasten bei der Fruchtreife zu Chromoplasten und bei der Seneszenz zu Gerontoplasten um. Neben der schon beschriebenen Photosynthese sind noch weitere essenzielle Stoffwechselfvorgänge in den Chloroplasten angesiedelt. Diese konnten sich die Pflanzen durch die Aufnahme von Plastiden erschließen und in ihren bestehenden Stoffwechsel integrieren. Beispiele hierfür sind die Prozesse des Lipidstoffwechsels und die Assimilation von Stickstoff und Schwefel in den Plastiden (Neuhaus & Emes, 2000).

Den Ursprung der Chloroplasten sieht man in einem Vorläufer der heutigen Cyanobakterien. Laut Endosymbiontentheorie wurden die Plastiden, wie auch die Vorläufer der Mitochondrien, vor ca. 1,2 Milliarden Jahren in die Wirtszelle aufgenommen (Parfrey et al., 2011). Hierbei geht man davon aus, dass ein zur Phagozytose befähigter und bereits mit einem Zellkern versehener Protist das prokaryotische Cyanobakterium aufnahm. Statt das phagozytierte Cyanobakterium lytisch abzubauen, wurde es in das intrazelluläre System aufgenommen (Martin, 2003). Als Indizien für diese Theorie zählen unter anderem die doppelte Hüllmembran der Plastide, die eigenständige ringförmige Geninformation und die chloroplastidäre Transkription- und Translationsmaschinerie. Man geht davon aus, dass alle Plastiden aus einem einzelnen primären endosymbiotischen Ereignis entstanden sind (Reyes-

Prieto et al., 2007). Als Resultat entwickelten sich drei Linien, welche die photoautotrophen Linien der Glaucophyta, Rhodophyta und Chlorophyta umfassen. Im Rahmen der Integration des Cyanobakteriums als Organell folgte ein massiver Gentransfer von den nun integrierten Chloroplasten in den Nukleus (Martin & Herrmann, 1998). Dieser endosymbiotische Gentransfer (EGT) erfolgte, um die Koordination und Regulation der Stoffwechselwege des Chloroplasten innerhalb seines neuen Umfelds zu gewährleisten. Das Ausmaß dieses Gentransfers wird bei der Betrachtung der im Plastidengenom kodierten Proteine offensichtlich. So geht man davon aus, dass das gesamte Chloroplastenproteom etwa 2100 bis 4500 Proteine umfasst (Leister & Kleine, 2008). Nur etwa 80 Gene davon werden in *Arabidopsis thaliana* direkt durch das Chloroplastengenom kodiert (Sato et al., 1999). Der größere Anteil der Proteine ist im Nukleus kodiert.

Somit mussten die Wirtszelle und der Endosymbiont Mechanismen entwickeln, um die kernkodierten Proteine zurück in den Chloroplasten zu transportieren. Dies kann auf verschiedenen posttranslationalen Importwegen in den Chloroplasten geschehen. Um eine korrekte Sortierung bzw. Adressierung der kernkodierten Plastidenproteine zu erreichen, besitzen die meisten Proteine eine N-terminale Erkennungssequenz, ein Transitpeptid.

1.2 Proteinimport in den Chloroplasten

Für kernkodierte Proteine wurden verschiedene Importwege in den Chloroplasten beschrieben. Nur etwa 10 % der kernkodierten Proteine, die für den Chloroplasten bestimmt sind, gelangen über non-kanonische Wege in den Chloroplasten (Armbruster et al., 2009). Dabei besitzen einige Proteine ein Signalpeptid für den ko-translationalen Transport in des Endoplasmatische Reticulum, um anschließend über das Golgi-System in den Chloroplasten zu gelangen (Villarejo et al., 2005). Ein weiterer Weg beschreibt den möglichen Import der Proteine in die äußere Hüllmembran. Hierbei besitzen die meisten Proteine kein abspaltbares Transitpeptid (Hofmann & Theg, 2005). Stattdessen werden sie mit Hilfe von den cytosolischen Sortierungsfaktoren AKR2 (ANKYRIN-REPEAT DOMAIN-CONTAINING 2) und HSP17.8 direkt an die Chloroplastenoberfläche transportiert (Bae et al., 2008), wo für die Integration der Proteine in die Membran vermutlich Toc75 benötigt wird (Inoue & Keegstra, 2003).

Ebenso wurde für einige Proteine, die an der inneren Hüllmembran des Chloroplasten lokalisiert sind, ein TOC (*translocon of the outer chloroplast envelop membrane*) unabhängiger Transportweg entdeckt, bei dem die Proteine kein abspaltbares Transitpeptid benötigen (Miras et al., 2007).

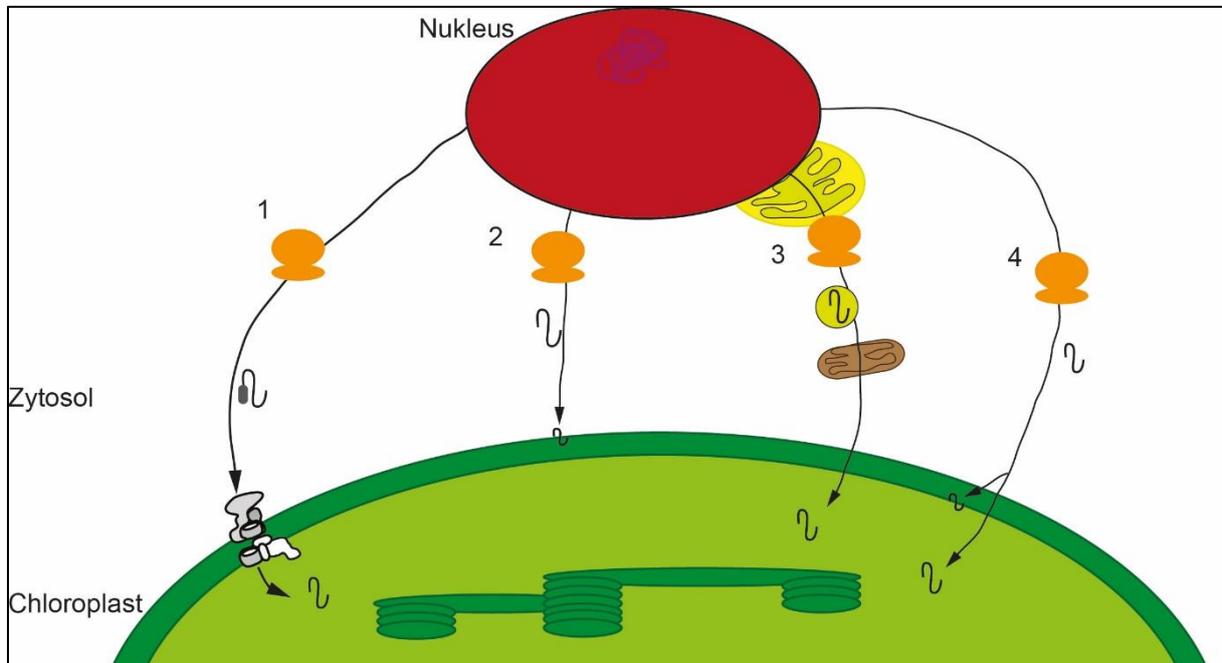


Abbildung 1 Proteinimport in den Chloroplasten. Es werden die bisherigen Erkenntnisse zum Proteinimport in den Chloroplasten beschrieben. 1 ist der Hauptweg über die TOC- und TIC-Komplexe. 2 ist der Transportweg in die äußere Hüllmembran über AKR2 und HSP17.8 (Inoue & Keegstra, 2003). 3 beschreibt den Transportweg über das ER und den Golgi Apparat (Villarejo et al., 2005). 4 zeigt den Importweg von Proteinen, die keine abspaltbaren Transitpeptide aufweisen (Miras et al., 2007). Abb. nach Andres et al. (2010).

Die beschriebenen Wege spielen aber nur eine untergeordnete Rolle für den Proteinimport in den Chloroplasten. Der Haupttransportweg der meisten chloroplastidären Proteine führt über die Translokationskomplexe der äußeren (TOC) und inneren (TIC) Hüllmembran (Paila et al., 2015). Die im Zellkern kodierten Chloroplastenproteine werden transkribiert und anschließend im Cytosol translatiert, um schlussendlich posttranslational über die Translokationskomplexe in die Chloroplasten transportiert werden zu können.

Bei Untersuchungen vom Proteinimport in Chloroplasten aus Erbsen zeigte sich, dass der Import von Vorläuferproteinen über die TOC-TIC-Importmaschinerie energetisch in drei Phasen abläuft (Schnell & Blobel, 1993): 1) Die reversible Bindung der Vorläuferproteine an die äußere Hüllmembran. Diese findet ATP unabhängig statt. 2) Die Initiation des Imports durch die Bildung eines stabilen Importsintermediats. Für diese wird eine geringe Konzentration von ATP benötigt. 3) Durch eine Zunahme der

ATP-Konzentration wird dann der Transport über die äußere und innere Hüllmembran ins Stroma induziert. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass neben ATP auch GTP für den Import und insbesondere zur Ausbildung des frühen Importintermediates benötigt wird (Young et al., 1999). Nach dem Import wird das Transitpeptid vom Vorläuferprotein durch die stromale prozessierende Peptidase (SPP) abgespaltet und das reife Protein liegt im Stroma vor (Richter & Lamppa, 1998). Anschließend können die Proteine in andere Subkompartimente des Chloroplasts weiter transportiert werden oder mit Hilfe von Chaperonen ihre korrekte Faltung einnehmen.

1.2.1 Cytosolische Faktoren für den Import in den Plastiden

Um den Proteintransport durch die Hüllmembranen zu initiieren, müssen die Importsubstrate zunächst zu den Chloroplasten transportiert werden. Durch *in vitro* Untersuchungen konnten cytosolische Proteine identifiziert werden, von denen angenommen wird, dass diese die potentiellen Importsubstrate vor Abbau schützen und sie während des Transports durch das Cytosol im ungefalteten Zustand halten (Flores-Perez & Jarvis, 2013, Lee et al., 2013). Hierfür wurden zwei Systeme identifiziert. In dem einen System wird ein Komplex aus Hsp90, dem Ko-Chaperon *Hsp70/Hsp90 organizing protein* (Hop) und dem Immunophilin FK506 *binding protein* 73 (FKBP73) gebildet, der die Vorläuferproteine an die äußere Hüllmembran transportiert (Fellerer et al., 2011). So konnte gezeigt werden, dass Hsp90-gebundene Vorläuferproteine von Toc64 über die *tetratricopeptide repeat* (TPR)-Domäne, die eine Interaktion mit den Chaperonen Hsp90 und Hsp70 vermittelt (Sohr & Soll, 2000, Panigrahi et al., 2013), erkannt werden und dieses die Proteine an Toc34 weiterreicht (Qbadou et al., 2006).

Alternativ kann ein zweiter *guidance* Komplex aus cytosolischen Hsp70 und 14-3-3 Proteinen gebildet werden. Um vom *guidance* Komplex erkannt zu werden, benötigen die Vorläuferproteine eine Phosphorylierung im Bereich des Transitpeptids. *In Vitro* konnte eine solche Phosphorylierung der Vorläuferproteine nachgewiesen werden und führte zu einem besseren Import der phosphorylierten Vorläuferproteinen (Fellerer et al., 2011, May & Soll, 2000, Kourtz & Ko, 1997, Ivey et al., 2000, Rial et al., 2000). Hierbei erfolgt der Transfer der Vorläufer direkt an Toc34 (Qbadou et al., 2006). *In vivo* hingegen beeinträchtigen etwaige Mutationen in den Phosphorylierungsstellen die

Translokation der Vorläuferproteine nicht (Nakrieko et al., 2004), doch könnten die Phosphorylierungen eine Bedeutung unter bestimmten Entwicklungs- oder Umweltbedingungen bekommen.

1.2.2 Der TOC-Komplex der äußeren Plastidenhülle

Nach dem Transport der Importsubstrate durch das Cytosol werden diese an der äußeren Hüllmembran von Vertretern der Toc159 und Toc34 Familie erkannt, die als Rezeptoren dienen (Kessler et al., 1994) und Komponenten des TOC-Kernkomplexes sind (Agne & Kessler, 2009)(Abb. 2). In *Arabidopsis thaliana* konnten vier Proteine der Toc159 Familie zugeordnet werden. Diese sind Toc159, Toc132, Toc120 und Toc90 (Soll & Schleiff, 2004, Shi & Theg, 2013). Alle Mitglieder weisen die gleiche Grundstruktur auf, die aus drei Domänen besteht. Am C-Terminus befindet sich eine Domäne, die die Proteine in der Membran verankert, die M-Domäne (Bauer et al., 2000). Davor liegt die G-Domäne, welche ein GTPase-Motiv umfasst. Die N-terminale A-Domäne reicht in das Cytosol und besitzt eine hohe Abundanz an sauren Aminosäuren. Während die G-Domäne und M-Domäne in allen vier Proteinen sehr ähnlich sind, existiert bei der A-Domäne eine hohe Variation in Bezug auf die Aminosäuresequenz und ihrer Länge (Bauer et al., 2000, Jackson-Constan & Keegstra, 2001, Kubis et al., 2004). Werden die Mutanten der Toc159-Familie betrachtet, so zeigt die *toc159*-Mutante *plastid protein import mutant 2 (ppi2)* einen deutlichen Albinophänotypen. Außerdem weisen die *ppi2* Mutanten eine verringerte Abundanz plastidärer Proteine und eine degenerierte Plastidenstruktur auf (Bauer et al., 2000, Kubis et al., 2004). In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass jeweils die Überexpression von Toc132 oder Toc120 den Phänotyp von *ppi2* nicht verbessert kann (Kubis et al., 2004, Ivanova et al., 2004). Dahingegen konnte eine Überexpression von Toc90 den Phänotypen von der *ppi2* Mutante teilweise regenerieren (Infanger et al., 2011). Somit deuten diese Ergebnisse auf eine überlappende Funktionalität von Toc159 und Toc90 hin, die bei Toc132 und Toc120 nicht ausgeprägt ist.

Eine weitere Komponente des TOC-Kernkomplexes ist Toc34. Die Toc34 Familie besteht aus zwei Vertretern: Toc33 und Toc34 (Jarvis et al., 1998). Diese setzen sich aus einer ins Cytosol reichenden N-terminalen G-Domäne und einer Membran-

verankerten Domäne zusammen (Kessler et al., 1994). Mutanten, die kein Toc33 aufwiesen (*plastid protein import mutant 1, ppi1*) zeigen einen hellgrünen Phänotyp, der durch die Beeinflussung der Biogenese in einem frühen Entwicklungsstadium der Pflanzen einhergeht (Jarvis et al., 1998, Gutensohn et al., 2000). Im Gegensatz dazu führt ein Verlust von Toc34 (*ppi3*) zu keinen veränderten Phänotypen im Vergleich zum Wildtyp (Gutensohn et al., 2000, Constan et al., 2004). Dahingegen ist eine Doppelmutante, die keines der beiden Proteine exprimiert, letal (Constan et al., 2004). Dies spricht für eine Überlappung der Funktion der beiden Proteine.

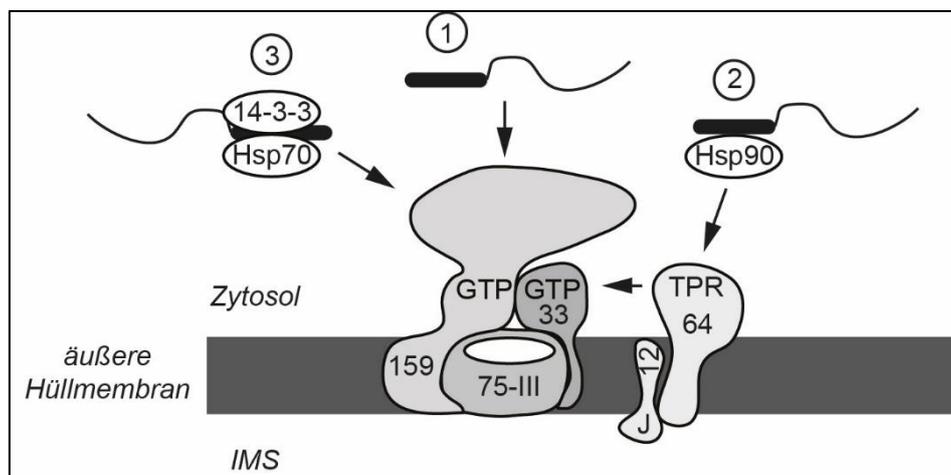


Abbildung 2 TOC-Komplex und die cytosolischen Faktoren. Nummer 1 zeigt den Weg, bei dem das Vorläuferprotein direkt mit Toc159 interagiert. Bei dem Weg mit der Nummer 2 bindet Hsp90 an dem Vorläuferprotein und transportiert dieses an die äußere Hüllmembran. Bei Nummer 3 bilden Hsp70 und 14-3-3 einen guidance Komplex am Vorläuferprotein und transportieren die Proteine so an die äußere Hüllmembran.

Ein weiteres Protein des TOC-Kernkomplexes ist das Protein Toc75. Es konnte gezeigt werden, dass Toc75 mit den Vorläuferproteinen interagiert (Kouranov & Schnell, 1997) und einen ionendurchlässigen Kanal bildet (Hinnah et al., 1997). Ebenso wurde durch die Letalität einer *knock-out* Mutante (Hust & Gutensohn, 2006) belegt, dass Toc75 einen essentiellen Importkanal darstellt. Zusammen mit Toc159 und Toc34 bildet Toc75 den TOC-Kernkomplex (Agne & Kessler, 2009). Zum Nachweis wurden die drei Proteine heterolog exprimiert und in Lipid-Vesikel rekonstituiert. Dabei bildeten die Proteine einen stabilen Komplex, der einen Import von Vorläufern in das Vesikel vermittelte (Schleiff et al., 2003).

Neben diesen TOC-Kernkomplexkomponenten wurde ein weiteres peripheres TOC-Protein entdeckt. Dieses Toc64 weist ein *tetratricopeptide repeat* Motive auf (Sohrt &

Soll, 2000), für welche eine Interaktion mit Hsp90 gezeigt werden konnte. Hinweise deuten darauf, dass Toc64 als Rezeptor für Hsp90-gebundene Vorläuferproteine fungiert (Qbadou et al., 2006) und diese Vorläuferproteine für den Transport an Toc34 weiterreicht (Sommer et al., 2013). Da unter physiologischen Wachstumsbedingungen die *knock-out* Mutante *toc64-1* keine Veränderung im Phänotyp aufweist, scheint Toc64 keine zentrale Rolle im Proteinimport auszuführen (Aronsson et al., 2007). Dahingegen bilden die Mutanten unter Stressbedingungen, insbesondere bei Salzstress, einen veränderten Phänotypen aus (Sommer et al., 2013). Somit ist es möglich, dass Toc64 den Import unter Stressbedingungen unterstützt.

Um eine Passage des Intermembranraums zwischen äußerer und innerer Hüllmembran zu ermöglichen, nähern sich TOC- und TIC-Komplex aneinander an und bilden den 1,25 MDa großen Superkomplex (Chen & Li, 2017). Als eine Komponente des Superkomplexes konnte aus Leukoplasten, welche aus Erbsenwurzeln isoliert wurden, das Intermembranraum durchspannende Protein Tic236 identifiziert werden (Chen et al., 2018b). Es bildet hierbei eine physikalische Verbindung zwischen TOC und TIC, indem es mit Tic20 und Toc75 interagiert. Wenn es durch eine *knock-out* Mutation fehlt, hat die Pflanze einen embryoletalen Phänotyp. Zusätzlich konnte durch eine Affinitätsreinigung mit einer TAP(*Tandem Affinitation Purification*)-tag Variante von Toc159 gezeigt werden, bei der nicht nur die TOC-Komponenten nachgewiesen werden konnten, sondern auch TIC-Komplexkomponenten, dass eine Assemblierung des Superkomplexes auch vom Import unabhängig geschieht (Kohler et al., 2015).

1.2.3 Die TIC-Komplexe der inneren Plastidenhülle

In der inneren Hüllmembran wurden für den Transport von Vorläuferproteinen zwei TIC-Komplexe identifiziert. Zuerst wurde ein Komplex aus Tic40 und Tic110 entdeckt (Abb. 3)(Schnell et al., 1994, Wu et al., 1994, Stahl et al., 1999). Für ein heterolog exprimiertes Tic110 konnte eine Ionenkanal-Aktivität nachgewiesen werden (Heins et al., 2002), was darauf hindeutet, dass es eine Pore in der inneren Hüllmembran bildet. Ebenso kann Tic110 mit stromalen importierten Proteinen interagieren (Inaba et al., 2003, Chou et al., 2006) und rekrutiert stromale Chaperone, wie das chloroplastidäre Hsp70 (cpHsp70), Hsp93 oder Hsp90C (Kessler & Blobel, 1996). So wird davon ausgegangen, dass diese Chaperone die treibende Kraft des Imports darstellen (Paila

et al., 2015). Die genauen Rollen dieser Chaperone bedürfen jedoch der weiteren Aufklärung. So wurde für cpHsp70 eine Funktion als Teil des Hauptimportmotors in *Physcomitrella patens* sowie in *Arabidopsis thaliana* und Erbse beschrieben (Su & Li, 2010, Shi & Theg, 2010). Ebenso wurde eine Motorfunktion für Hsp93 (ClpC) angenommen, da dieses unter anderem mit Importsubstraten interagiert und eine Inhibierung der Hsp90 ATPase-Aktivität zu einer Inhibierung des Imports führt (Inoue et al., 2013). Des Weiteren wurde gezeigt, dass es mit ClpP interagiert, was auf eine Funktion in der Qualitätskontrolle der importierten Substrate weist (Flores-Pérez et al., 2016).

Daneben wurde für Tic40 eine Funktion als Ko-Chaperon beschrieben (Chou et al., 2003). Für den Gesamtkomplex wird vermutet, dass dieser in späteren Phasen des Imports an den Faltungsprozessen und der Qualitätskontrolle der importierten Proteine beteiligt ist.

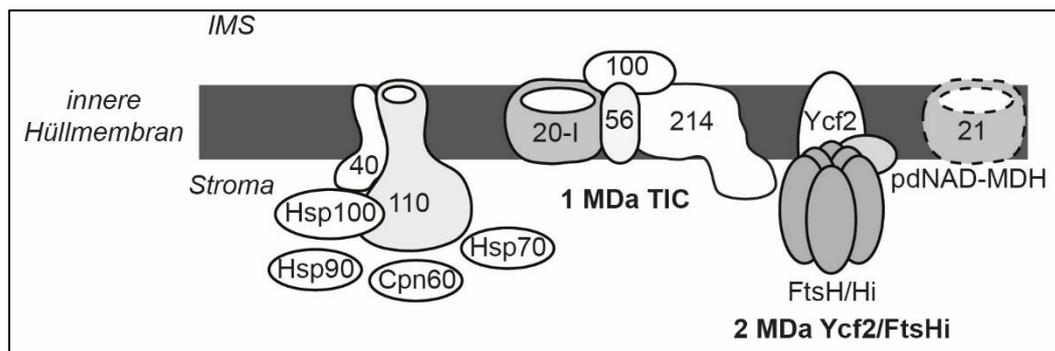


Abbildung 3 Die identifizierte Komponenten der TIC-Komplexe. Im klassischen Modell wurde Tic110 als Importkanal in der inneren Hüllmembran beschrieben. Dieses Protein interagiert mit Tic40, wobei für Tic40 eine Funktion als Ko-Chaperon beschrieben wurde. Als weitere Interaktionspartner dieses Komplexes wurden verschiedene Proteine von unterschiedlichen stromalen Chaperonfamilien identifiziert. Des Weiteren wurde ein unabhängiger Komplex in der inneren Hüllmembran entdeckt, der als möglicher Porteinimportkomplex beschrieben wurde. Dieser 1 MDa großer Komplex besteht aus den Komponenten Tic20-I, Tic214, Tic100 und Tic56. Daneben wurde ein weiterer Komplex identifiziert. Für diesen 2 MDa großen Komplex aus Ycf2, pdNAD-MDH und verschiedenen FtsHs und FtsHis wurde eine Motorfunktion nachgewiesen.

Der zweite Komplex, der in der inneren Hüllmembran entdeckt wurde, ist der 1 MDa TIC-Komplex (Abb. 3)(Kikuchi et al., 2009). Die Komponenten dieses Komplexes konnten über eine Isolation mit einem Affinitätstag tragenden Imports substrat bestimmt werden (Kikuchi et al., 2009).

Hierbei zeigte sich, dass der Komplex aus Tic214, Tic100, Tic56, Tic20, und Tic11 besteht, wobei Tic21 lose mit dem Komplex assoziiert ist. Ebenfalls konnte für den

gesamten Komplex eine Ionenkanalaktivität festgestellt werden (Kikuchi et al., 2013). Bereits vorher wurde aber für die Proteine Tic20 und Tic21 alleine eine Kanalaktivität beschrieben (Kovacs-Bogdan et al., 2011, Chen et al., 2002, Teng et al., 2006) und somit ist die Rolle der anderen Komponenten im Komplex unbekannt. Insgesamt wurden in *Arabidopsis thaliana* vier Isoformen von Tic20 identifiziert: Tic20-I, -II, -IV und -V (Hirabayashi et al., 2011). Hierbei ist Tic20-I die Komponente des 1 MDa TIC-Komplexes. Durch einen Sequenzvergleich wurde gezeigt, dass Tic20-IV die größte Sequenzähnlichkeit zu Tic20-I hat. Ebenfalls wurde beschrieben, wie Tic20-IV partiell einen Defekt von Tic20-I komplementieren konnte (Hirabayashi et al., 2011). Anhand von Importstudien wurde festgestellt, dass Tic20-I für den Import von Proteinen, die für die Photosynthese (zum Beispiel die kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase) relevant sind, eine wichtige Rolle spielt, während der Import mit E1 α (eine Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase) weitestgehend unverändert ist (Kikuchi et al., 2009). Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass der 1 MDa TIC-Komplex für den Import von photosynthetischen Proteinen zuständig ist und ein anderer Komplex um Tic20-IV für den Import von anderen Plastidproteinen verantwortlich ist (Nakai, 2015).

Die *knock-out* Mutanten von den Genen *TIC20-I*, *TIC56* und *TIC100* weisen einen albinotischen Phänotypen auf (Kikuchi et al., 2013, Hirabayashi et al., 2011), der auf die wichtige Rolle des 1 MDa TIC-Komplexes hindeutet. Dahingegen führt eine Doppelmutation von *tic20-I* mit *tic56* bzw. *tic100* zu keinem im Vergleich zu den Einzelmутanten veränderten Erscheinungsbild. Da sich der Phänotyp nicht verschlechtert, bestätigt diese Analyse eine funktionelle Zusammengehörigkeit, die auf eine gestörte Assemblierung des 1 MDa TIC-Komplexes hindeutet.

Die Tic214 Komponente des Komplexes wird durch das Plastidengen *YCF1* (*hypothetical chloroplast open reading frame 1*) kodiert. Es ist die erste Komponente, die im Plastidgenom kodiert vorliegt und dabei noch eine essentielle Rolle in der Entwicklung von *A. thaliana* spielt (Bolter & Soll, 2017). Daher konnte durch die Inhibierung der Plastidentranslation durch Spectinomycin (Wirmer & Westhof, 2006) gezeigt werden, dass der Import nicht von Ycf1 abhängt (Bolter & Soll, 2017). Ferner wurde eine Funktion von Tic214 in der Biogenese photosynthetischer Komplexe in der Thylakoidmembran beschrieben (Yang et al., 2016).

Eine weitere Komponente des 1 MDa TIC-Komplex ist Tic56. Für dieses Protein wird eine importunabhängige Funktion beschrieben. So zeigte die hellgrüne *tic56-3* Mutante, die kein natives Tic56 Protein exprimiert, keine Veränderung vom Import im Vergleich zum Wildtyp (Kohler et al., 2015). Durch weitere Untersuchung der *knock-out* Mutante *tic56-1* konnte der albinotischen Phänotyp der Mutante auf einen Defekt in der Assemblierung der chloroplastidären Ribosomen zurückgeführt werden (Kohler et al., 2016).

Der Proteinimport in den Chloroplasten benötigt in der letzten Phase des Importprozesses eine hohe Konzentration an ATP. Die Hydrolyse des ATPs findet im Stroma des Chloroplasts statt (Pain & Blobel, 1987, Theg et al., 1989). Daher ist davon auszugehen, dass der Motor der Importmaschinerie dort lokalisiert vorliegt. Neben dem beschriebenen Importmotor aus cpHsp70 und Hsp90 wurde noch ein weiterer Motor identifiziert; der 2 MDa Ycf2-FtsHi-Komplex. Dieser Proteinkomplex interagiert mit dem 1 MDa TIC-Komplex und interagiert ebenfalls mit Importintermediaten (Kikuchi et al., 2018). Der Komplex setzt sich aus einer heterohexamerschen AAA-ATPase und einer NAD-malate dehydrogenase (NAD-MDH) zusammen. Die sechs ATPasen sind Ycf2, welches im Plastidengenom kodiert ist, FtsHi1, FtsHi2, FtsHi4, FtsHi5, und FtsH12.

In einer vorangegangenen Studie konnte gezeigt werden, dass offenbar auch gefaltete Proteindomänen in den Chloroplasten transportiert werden können (Ganesan et al., 2018), während bei Mitochondrien bisher ausschließlich der Import ungefalteter Proteine beschrieben ist. Es liegt die Vermutung nahe, dass dieser Importprozess von gefalteten Proteinen einen stärkeren Motor benötigen könnte. So könnte der Importmotor um cpHsp70 den generellen Importmotor darstellen (Thomson et al., 2020). Dahingegen bringt der 2 MDa Ycf2-FtsHi Proteinkomplex mehr Kraft auf. Da der Importvorgang über den Ycf2-FtsHi Proteinkomplex deutlich langsamer ist und mehr Energie in Form von ATP benötigt, wird er möglicherweise nur unter sehr spezifischen Bedingungen eingesetzt. Hierbei wäre es denkbar, dass der 2 MDa Ycf2-FtsHi Importmotor für den Import von gefalteten Proteinen zum Einsatz kommt (Thomson et al., 2020).

1.3 Tic23 und seine Homologen

In der Studie von Schäfer et al. (Schafer et al., 2019) wurde in einer vergleichende Analyse zwischen der *tic56-3* Mutante und dem Wildtyp die nativen Proteinkomplexe aus Chloroplasten isoliert. Dabei wurde eine kombinierte Methode aus einer BlueNative-PAGE und einer anschließende massenspektrometrischen Analyse angewendet. Somit war es möglich, Aussagen über die Stöchiometrie und die Ko-Lokalisierung von den untersuchten Komplexen zu treffen. In dieser Studie wurde unter anderem der 1 MDa TIC-Komplex analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Komponenten in denselben Proben ko-immigrieren und dass die Abundanz der Komponenten auf 10 % des Wildtyps in der *tic56-3* Mutante reduziert sind. Zusätzlich konnte über diese Untersuchung ein bis dato unbekanntes Protein identifiziert werden, das in denselben Proben wie die Komponenten des 1 MDa TIC-Komplex migrierte und ebenso eine Abnahme der Abundanz in der *tic56-3* Mutante zeigte. In der massenspektrometrischen Analyse wurden die Peptide des unbekanntes Proteins dem Protein mit der AGI Locus Nummer AT2G43630 zugeordnet. Eine Analyse der Datenbank *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR10, www.arabidopsis.org) zeigte, dass es sich um ein Protein mit einem Glycin-reichen Bereich handelt, dessen Funktion in der Zelle unbekannt ist.

Dem Protein mit der Nummer AT2G43630 wurde aufgrund der Größe seines reifen Proteins die Bezeichnung Tic23 gegeben. Das Vorläuferprotein ist 274 Aminosäuren lang und besitzt ein Molekulargewicht von 30,7 kDa. Nach Angaben des ChloroP Servers (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>, Emanuelsson et al., 2007) ist sein Transitpeptid 67 Aminosäuren (score 0,571) lang. Tic23 hat eine Transmembranhelix zwischen den Aminosäuren 163 bis 183 und durch eine Proteom-Studie (AT-Chloro, (Ferro et al., 2010)) wurde eine Lokalisation in der inneren Hüllmembran des Chloroplasts vorhergesagt.

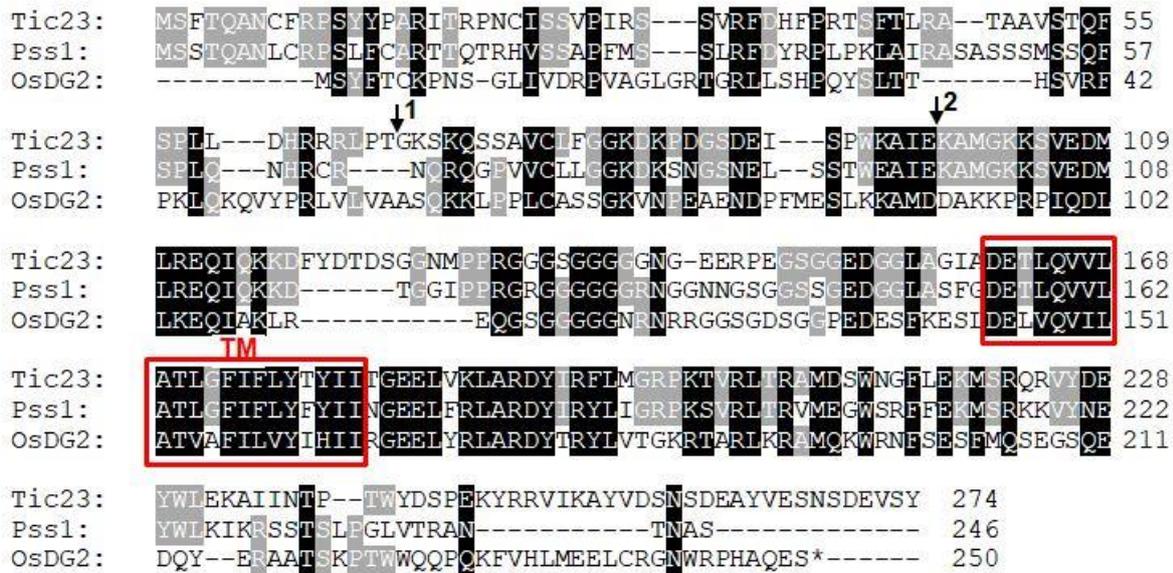


Abbildung 4 Sequenzvergleich von Tic23 mit seinen publizierten Homologen. Es wurde ein Alignment von Tic23 mit seinen zwei publizierten Homologen mit Clustal Omega durchgeführt. Pfeil 1 – vorhergesagte Transitpeptidschnittstelle von Tic23, Pfeil 2 – vorhergesagte Transitpeptidschnittstelle von Pss1, roter Kasten – Transmembrandomäne

Abbildung 4 zeigt ein Alignment der bekannten, publizierten Homologe von Tic23. Es ist zu erkennen, dass alle eine ähnliche Sekundärstruktur mit einem Glycin-reichen Bereich und einer Transmembrandomäne aufweisen. Das Homolog aus *A. thaliana* mit der AGI Locus Nummer AT3G59640 wurde als Pss1 (*Phytophthora sojae* susceptible 1) publiziert (Sumit et al., 2012) und weist eine Sequenzähnlichkeit von ungefähr 60 % auf. Das Vorläuferprotein ist 246 Aminosäuren lang und hat ein Molekulargewicht von 27,1 kDa. Nach dem Vorhersageserver TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>, (Emanuelsson et al., 2007)) wird dieses in den Chloroplasten (score 0,865) transportiert und besitzt ein Transitpeptid von 97 Aminosäuren (score 0,578, ChloroP). Im Kontrast zu den TargetP Vorhersagen wurde für Pss1 eine Lokalisation an der Plasmamembran publiziert und eine Funktion in der *non-host resistance* nachgewiesen. So sind *pss1* Mutanten anfällig für den Oomyzeten *Phytophthora sojae*, der ein Pathogen von Sojabohnen (*Glycine max*) darstellt und bei diesen zur Stamm- und Wurzelfäule führt (Wang et al., 2018a).

Weiterhin wurde bereits das Tic23 Homolog aus Reis (*Oryza sativa*) untersucht. Wie der Name nahe legt, zeigt die Mutante *osdg2* (*Oryza sativa delayed greening 2*) ein späteres Ergrünen als der Wildtyp und spielt somit eine wichtige Rolle in der Chloroplastenentwicklung von jungen Pflanzen (Jiang et al., 2014).

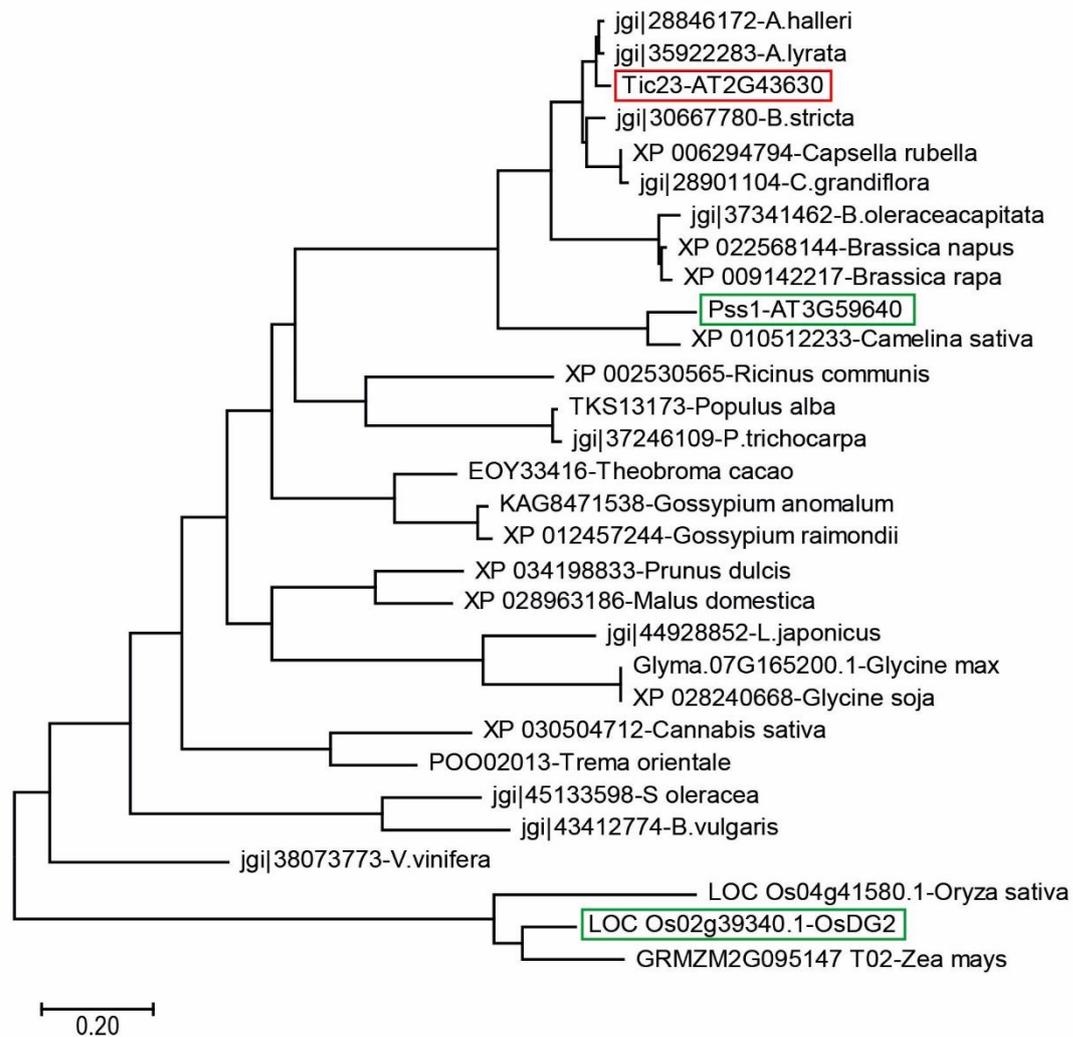


Abbildung 5 Evolution des Tic23 Proteins. Es wurde ein Stammbaum für das Tic23 Protein erstellt. Hierbei wurde das Alignment mit MAFFT v7.311 software mit der Maximum-Likelihood Methode durchgeführt. Anschließend wurde der Stammbaum mit MEGA 11 dargestellt. Rot – Tic23, grüne Kästen – publizierte Homologe

Neben diesen beschriebenen Proteinen konnte durch eine phylogenetische Analyse weitere Homologe aus unterschiedlichsten Arten identifiziert werden (Abb. 5). Alle Proteine haben ein ähnliches Molekulargewicht und weisen einen konservierten Bereich aus einer Glycin-reichen Sequenz direkt vor einer Transmembrandomäne auf. Darüber hinaus konnte den meisten Proteinen noch keine Funktion zugeordnet werden. In der Evolution des Glycin-reichen Proteins zeigte sich, dass die Proteine aus den *Poaceae* (Süßgräsern) wie *Oryza sativa* oder *Zea mays* mit Tic23 die geringste Ähnlichkeit hatten. So bilden die Süßgräser eine eigene Gruppe, die früh eine eigenständige Entwicklung zeigte. Ebenfalls wird deutlich, dass Pss1 ein Paralog von Tic23 darstellt. Dieses bildet zusammen mit einem Ortholog aus *Camelina sativa* eine

eigene Gruppe, die aus den Brassicales (Kreuzblütlerartigen) hervorgegangen ist und sich divergent entwickelt hat. Tic23 weist die größte Ähnlichkeit mit Proteinen aus *Arabidopsis* und *Capsella* Gattung auf. Während der Analyse der Evolution konnte weder in Cyanobakterien noch in einer Algengattung ein Homolog für Tic23 entdeckt werden. Somit entwickelte sich dieses Protein erst deutlich später als die Komponenten des Proteinimports. Für die Komponenten des 1 MDa TIC-Komplexes wurden Homologe in der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* nachgewiesen, die ebenfalls miteinander interagieren (Ramundo et al., 2020). Bei Tic20 reicht die Evolution bis zurück in die Cyanobakterien. Hierbei konnte eine Sequenzähnlichkeit von Tic20 mit LivH Proteinen entdeckt werden (Mirus & Schleiff, 2012, Bodyl et al., 2010, Sommer & Schleiff, 2014). So zeigen diese Ergebnisse, dass Tic23 sich unabhängig von den 1 MDa TIC-Komplexkomponenten zu einem späteren Zeitpunkt entwickelt hat.

Alle Homologe von Tic23 weisen einen konservierten Glycin-reichen Bereich direkt vor einer Transmembrandomäne auf und könnten somit der Proteinklasse der Glycin-reichen Proteine (GRP) angehören. Die GRPs zeichnen sich alle durch einen hohen Glycingehalt (40-70 %) aus und weisen eine sich wiederholende Sequenzen aus Glycin und anderen Aminosäuren auf (Czolpinska & Rurek, 2018). Durch die hohe Variation der Expressionsmuster, der subzellulären Lokalisation und der Beteiligung an verschiedenen physiologischen Prozessen ist es umstritten, ob sie als eine Familie klassifiziert werden können oder nur ein Motiv teilen (Sachetto-Martins et al., 2000). Trotzdem können die Proteine dieser Proteinfamilie in fünf strukturell unterscheidbare Klassen eingeteilt werden. Diese Einteilung beruht auf der Anordnung der Glycin-wiederholenden Sequenzen und konservierten Motive innerhalb der Proteine (Mangeon et al., 2010).

In vielen Studien wurde die Beteiligung von GRPs in unterschiedlichen unabhängigen physiologischen Prozessen in Pflanzen gezeigt (Ortega-Amaro et al., 2014). Allgemein sind die GRPs wichtige Bestandteile der Pflanzenabwehr vor abiotischen und biotischen Einflüssen. So konnte gezeigt werden, dass GRPs an der Antwort auf Temperaturstress beteiligt sind; ein Beispiel hierfür ist GRP7 in der *Arabidopsis thaliana* (Kim et al., 2008, Wienkoop et al., 2008). Die Proteinmenge dieses GRP7 erhöhte sich bei einer Kältebehandlung und lag bei Hitze reduziert vor. Auch konnte weiterhin eine deutliche Erhöhung der Transkriptmengen von NtGRP-1a und NtGRP-

3 bei und nach der Hitzestressbehandlung von Tabak beobachtet werden (Xuan et al., 2010).

1.4 Modellierung der Importkomplexe bei Stress

Da Pflanzen sessile Lebewesen sind, sind sie vielen abiotischen und biotischen Umwelteinflüssen ausgesetzt. Während Tiere ihren Standort wechseln können, um Umwelteinflüssen, wie zum Beispiel Wärme und Kälte auszuweichen, mussten Pflanzen andere Strategien entwickeln. So beeinflussen Temperaturen, die über das Optimum der Pflanzen liegen, deren Wachstum und Entwicklung (Janni et al., 2020). Hohe Temperaturen wirken sich negativ auf viele physiologische Vorgänge aus, wie zum Beispiel Photosynthese und Respiration. Hierbei ist das Photosystem II die Komponente des Photosyntheseapparats, die am anfälligsten gegenüber Hitze ist (Wang et al., 2018b). Insbesondere wird durch die Hitze der Elektronentransport des PSII gestört. Dabei wird zum einem die Thylakoidmembran instabiler, was zur Verdrängung der *light harvesting* Komplexe des PSII führt, und zum anderen ist die PSII Integrität von der Elektronendynamik abhängig (Mathur et al., 2014).

Neben der Photosynthese ist auch der Proteinimport vom Hitzestress beeinflusst. Hierbei wurde gezeigt, dass sich die im Nukleus kodierten Proteine im Cytosol bereits bei moderaten Temperaturen akkumulieren (Heckathorn et al., 2002). Zwar ist diese Anhäufung an Vorläuferproteinen nach wenigen Stunden aufgehoben und somit reversibel. Dabei wurde gezeigt, dass der Import der Proteine unter hohen Temperaturen reduziert ist (Dutta et al., 2009). Somit führt die Reduzierung der Importrate zu einer Akkumulation von Vorläufern im Cytosol, die zelltoxische Aggregate bilden könnten (Balchin et al., 2016). In der gleichen Studie von Dutta et al. (2009) konnte gezeigt werden, dass die Expression von Toc159 in hitzestressierten Erbsen abnimmt und somit der Rückgang des Imports mit der Abnahme der Bindung von Vorläuferproteinen an Toc159 zusammenhängt. Neben Toc159 wird auch die Expression der TOC Komplexkomponenten Toc75 und der TIC Komponenten Tic20, Tic56, Tic32, Tic55 und Tic62, von dem stromalen Hsp93 und der stromalen Prozessierungspeptidase herunterreguliert (Dutta et al., 2009).

Die Abwehrmechanismen der Pflanzen gegen Hitzestress bestehen aus Ausweich- und Toleranzmechanismen. Um sich kurzfristig anzupassen, können Pflanzen zum

Beispiel ihre Blattausrichtung ändern, sich durch eine erhöhte Transpiration abkühlen oder die Lipidzusammensetzung ihrer Membranen ändern (Saidi et al., 2010). Neben diesen kurzfristigen Akklimatisierungen müssen auch Proteine vor der Degradation und Aggregation geschützt werden.

Bei einer umfassenden qualitativen und quantitativen Proteomanalyse von stromalen Proteinen in *Agave americana* wurde eine massive Herunterregulierung von Proteinen nachgewiesen, die eine Rolle im Rahmen des Transports oder der Photosynthese spielen. In der gleichen Studie wurde ebenso eine Hochregulierung von Proteinen gemessen, die im Zusammenhang mit Hitzestress oder biotischem Stress stehen (Shakeel et al., 2013). Somit vollführt der Chloroplast eine immense Neu-Modellierung seiner Expression, um sich vor Schäden durch Hitze zu schützen. Diese Modellierung der Expression konnte auch in Importmutanten gesehen werden. So akkumuliert mehr Hsp70 Protein in der *ppi1* Mutante unter rezidivierendem Hitzestress (Paul et al., 2020). Ebenso konnte in *toc64-1* Mutante eine größere Menge an Proteinen nachgewiesen werden, die eine Rolle in der Ausprägung der Thylakoidstruktur spielen.

Bei hohen Temperaturen wird auch die Expression von schützenden Chaperonen induziert (*heat shock proteins*, HSP), die die Proteine vor Degradation und Aggregation schützen (Dickinson et al., 2018, Barua et al., 2003). Es ist bekannt, dass in der Hitzestressantwort HSPs, wie Hsp101, Hsp100 oder auch *small HSPs* (sHsp) eine entscheidende Rolle spielen. Es wurde gezeigt, dass HSP101 essentiell für die Thermotoleranz der Pflanze und das Überleben der Pflanzen ist (Hong & Vierling, 2001, Mathur et al., 2014, Myouga et al., 2006). Dieser Aspekt wurde durch Analysen der *hot1* Mutante, eine *knock-out* Mutante von Hsp101, bestätigt. Die *hot1* Mutante war gegenüber hohen Temperaturen sensitiv (Hong & Vierling, 2001), während eine Hsp101 Überexpressionslinie eine höhere Toleranz gegenüber Hitze zeigte (Queitsch et al., 2000). So helfen HSPs zwar nicht bei der Reparatur von Schäden, die durch die Hitze entstanden sind, aber sie verhindern Schäden an den Proteinen und deren Aggregation.

1.5 Zielstellung

Tic23 wurde bereits im Interaktionsnetzwerk von Toc159 entdeckt (Kohler et al., 2015) und durch die Studie von Schäfer et al. (2019) wurde eine mögliche Interaktion mit dem 1 MDa TIC-Komplex konkretisiert. Im Rahmen dieser Dissertation wurde untersucht, ob Tic23 eine Komponente des 1 MDa TIC-Komplexes darstellt. In diesem Zusammenhang sollten auch die Charakteristika des Tic23 Proteins untersucht werden. Da ihm über einen Hydrophobizitätsbestimmung eine Transmembrandomäne vorhergesagt wurde, konnte angenommen werden, dass Tic23 in einer Membran liegt. So wurde die konkrete Lokalisierung von Tic23 bestimmt, um anschließend die Topologie des Proteins in der Membran zu analysieren.

Als mögliche Komponente des Proteinimports in den Chloroplasten sollte der Einfluss von Tic23 auf die Pflanzen und insbesondere auf den Import untersucht werden. Hierfür wurden verschiedene Mutanten generiert, um anschließend ihren Phänotyp sowie den proteinbiochemischen Einfluss von Tic23 zu bestimmen.

Neben Tic23 wurde in dieser Dissertation ebenfalls das Homolog Pss1 in *A. thaliana* berücksichtigt, dass durch seine Sequenzähnlichkeit die mögliche Funktion von Tic23 übernehmen könnte. Daher sollte eine Doppelmutante aus Tic23 und Pss1 charakterisiert werden. Hierbei wurde die phänotypische Ausprägung, die durch die Doppelmutation verursacht wurde, sowie in einem vergleichenden *in vitro* Importexperiment die Importfähigkeit der Doppelmutante bestimmt.

Im Laufe der Arbeit konnte festgestellt werden, dass Tic23 einen möglichen Einfluss auf die Hitzestressantwort von *A. thaliana* hat. Daher wurde dieser Aspekt mit Hilfe von physiologischen Experimenten vertiefend beleuchtet. Durch weiterführende Experimente sollte dieser Einfluss von Tic23 näher analysiert werden und eine mögliche Verbindung zwischen den Proteinimport und der Hitzestressantwort der Pflanzen gezeigt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Enzyme

Anwendung	Bezeichnung	Firma
Zellaufschluss	Cellulase "Onozuka" R10 Macerozym R10	Duchefa Biochemie Duchefa Biochemie
Protease	Thermolysin (<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>)	Sigma-Aldrich
	Trypsin (Bovine Pankreas)	Sigma-Aldrich
	Trypsin (Sequencing Grade Modified)	Promega
Proteaseinhibitoren	Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	Sigma-Aldrich
	Phenylmethylsulfonyl-fluorid (PMSF)	Carl-Roth
	Soybean Trypsin Inhibitor	Serva Electrophoresis GmbH
Polymerase	Taq Polymerase	New England BioLabs

2.1.2 Größenstandard

Bezeichnung	Anwendung	Firma
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	DNA-Marker	Fermentas
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Protein-Marker	Fermentas
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Protein-Marker	Fermentas

2.1.3 Antikörper

	Bezeichnung	Verdünnung	Herkunft
Primäre Antikörper	anti-Toc159	1:5.000	Bauer et al., 2000
	anti-Tic40	1:4.000	Agrisera

	anti-Tic20	1:2.500	(Teng et al., 2006)
	anti-Tic56	1:4.000	(Kohler et al., 2015)
	anti-Tic23	1:3.000	Vorliegende Arbeit
	anti-GFP	1:4.000	Sigma Aldrich G6795
	anti-AtpB	1:5.000	Agrisera AS05085
	anti-LhcB4		Agrisera AS04045
	anti-Toc33	1:500	Prof. Dr. Felix Kessler, Schweiz
	anti-Tic110	1:4000	Prof. Dr. Felix Kessler, Schweiz
	anti-Actin	1:5.000	Sigma Aldrich A0480
	anti-Toc75	1:4.000	(Hiltbrunner et al., 2001)
	anti-cpHsp70	1:5.000	Agrisera AS08 348
Sekundäre Antikörper	Goat-anti-Rabbit HRP	1:10.000 1:7.000	Agrisera
	Goat-anti-mouse HRP	1:15.000	Agrisera

2.1.4 Kits

Bezeichnung	Anwendung	Firma
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	cDNA Synthese	Thermo Scientific
BCA Protein Macro Assay Kit	Bestimmung der Proteinkonzentration	Serva Electrophoresis GmbH
Roti®-Quant	Bestimmung der Proteinkonzentration	Carl-Roth
Luna® Universal qPCR Master Mix	qRT-PCR	New England BioLabs

2.1.5 Geräte

Bezeichnung	Anwendung	Firma
Quantum ST4	Geldokumentation	Peqlab
Nanodrop2000	DNA-/RNA-Konzentrationsbestimmung	Thermo Scientific
FUSION-FX7 Advance	Western-Blot-Dokumentation Geldokumentation	Peqlab
peqSTAR	Thermocycler	Peqlab
EASY-nLC 1000 liquid chromatography system QExacte Plus mass spectrometer	Massenspektrometrie (Tic23 Co-Immunopräzipitation)	Thermo Scientific
NanoAcquity LTQ Orbitrap Velos Pro	Massenspektrometrie (Tic23 Chloroplasten Proteomics – Bochum)	Waters Thermo Scientific
PCR-Thermocycler Rotor Gene Q	qRT-PCR	Qiagen
Sorvall MTX 150	Ultrazentrifuge	Thermo Scientific

2.1.6 Organismen

In dieser Arbeit wurde der Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* mit dem Ökotyp Columbia-0 verwendet. Neben dem Wildtyp (WT Col-0) wurde mit folgenden transgenen Pflanzenlinien gearbeitet, die alle ebenfalls im Col-0 Ökotyp vorlagen.

Name		
<i>tic23-1</i>	SALK150111C	T-DNA Insertionsmutante
<i>tic23-2</i>	SAIL12_H07	T-DNA Insertionsmutante
<i>pss1</i>	SALK090245C	T-DNA Insertionsmutante
<i>tic23+35S-TIC23</i>	<i>tic23-1 + pEG205-tic23</i>	Komplementationslinie

<i>tic23-1 x pss1</i>	<i>tic23-1 x pss1</i>	Kreuzung
<i>sil-tic23</i>	<i>WT Col-0 + pTEI106-Tic23</i>	amiRNA <i>silencing</i> Linie

2.2 Methoden

2.2.1 Pflanzenanzucht

Die Pflanzen wurden entweder auf Erde oder auf Platten mit ½ Murashige-Skoog (MS)-Festmedium angezogen.

2.2.1.1 Herstellung von ½ MS (Murashige-Skoog)-Festmedien

Die *in vitro* Anzucht erfolgte auf ½ MS-Platten (0,22 % (w/v) Murashige-Skoog inklusive Vitamine, 0,05 % (w/v) MES monohydrat, 0,8 % (w/v) Saccharose). Das Medium wurde auf ein pH-Wert von 5,8 mit 2 - 5 M Kaliumhydroxid eingestellt. Anschließend wurde 1 % (w/v) Plantagar dem Medium zugegeben. Nach dem Autoklavieren wurde das handwarme Medium unter der Sterilbank in Petrischalen gegossen.

2.2.1.2 Oberflächensterilisation der Samen

Bevor die Pflanzen auf die Platten ausgesät wurden, wurden die Samen abgewogen (circa 5 mg pro Platte) und sterilisiert. Hierbei wurden die Samen in ein Eppendorfgefäß gefüllt, 1 ml 70 % Ethanol dazugegeben, gemischt und für 5 min geschüttelt. Danach wurde das Ethanol abgenommen und 1 ml der Sterilisationslösung (12 % Natriumhypochloridlösung 1:1 mit sterilem Wasser, 0,1 % TritonX-100) hinzugegeben. Die Samen wurden erneut gemischt und nachfolgend die Lösung abgenommen. Es folgten drei Waschschriff mit 1 ml sterilem Wasser. Die Samen wurden gemischt, 3 min auf dem Überkopfschüttler inkubiert und den Überstand entfernt. Zum Schluss wurden 500 µl einer 0,15 % Plantagar-Lösung hinzugegeben. Die Samen wurden mit sterilen Glaspasteurpipetten auf die ½ MS-Agarplatten ausgesät. Danach wurden die Platten für 48 h bei 4 °C stratifiziert. Anschließend wurden die Pflanzen in den Kurztag-Phytoschrank, in dem 8 h Licht mit

den Lichtverhältnisse $150 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ bei $21 \text{ }^\circ\text{C}$ und 16 h Dunkelheit bei $18 \text{ }^\circ\text{C}$ eingestellt waren, angezogen.

Für die Induzierung der *gene silencing* Linien wurden den $\frac{1}{2}$ MS Platten $1 \mu\text{M}$ Dexamethason hinzugegeben. Dafür wurde eine 5 mM Stammlösung hergestellt, für die 2 mg Dexamethason (D4902, Sigma Aldrich) in 1 mL DMSO gelöst wurden. Nach dem Autoklavieren des Festmediums wurden $160 \mu\text{L}$ der Dexamethason-Stammlösung bzw. DMSO in die Lösung gegeben und die Platten gegossen.

2.2.1.3 Anzucht der Pflanzen auf Erde

Die Anzucht auf Erde erfolgte auf einem feuchten Erde/Vermiculit-Gemisch. Für die Stratifizierung wurden die Samen für 48 h bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Anschließend wurden die Pflanzen in einem Phytoschrank unter Kurztagbedingungen mit 8 h Licht ($150 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $21 \text{ }^\circ\text{C}$) und 16 h Dunkelheit ($18 \text{ }^\circ\text{C}$) kultiviert.

2.2.2 Hitzeschockstresstest

Die Hitzeschockstress-Experimente wurden nach Larkindale (Larkindale et al., 2005) durchgeführt. Für die basale Thermotoleranz wurden die Samenoberflächen zuerst sterilisiert und anschließend die Samen auf $\frac{1}{2}$ MS-Agarplatten mit $0,8 \%$ Sucrose ausgesät. Die Samen wuchsen für 7 d in dem Kurztag-Phytoschrank. Zur Überprüfung der Thermotoleranz wurden die Pflanzen bei $45 \text{ }^\circ\text{C}$ für 120 min erhitzt. Nach dem Test kamen die Pflanzen für 5 d in den Kurztag-Phytoschrank zur Erholung. Anschließend wurden die Pflanzen nach ihrem Phänotyp klassifiziert und gezählt.

2.2.3 Chlorophyll-Messungen aus Pflanzenmaterial

In einem 2 mL -Reaktionsgefäß wurden $200 \mu\text{L}$ Wasser, sechs Glaskugeln mit einem Durchmesser von 3 mm und ca. 300 mg Glaskugeln mit einem Durchmesser von $1,28 \text{ mm}$ vorgelegt. Anschließend wurde das grüne Pflanzenmaterial geerntet und direkt die Frischmasse bestimmt. Der Aufschluss erfolgte mit Hilfe einer Kugelmühle. Die Reaktionsgefäße wurden bei einer Geschwindigkeit von 30 Bewegungen pro Sekunde für zweimal 20 s mit einer Pause von 5 s zwischen den Durchgängen gemischt. Zu

dem aufgeschlossenen Pflanzenmaterial wurde anschließend 800 µl 100 % Aceton hinzugegeben. Nach einer 30 minütigen Inkubation wurden die Proben bei 4 °C und 6.000 g für 5 min zentrifugiert.

Schließlich wurde die Absorption A der Überstände bei den Wellenlängen 470 nm, 663 nm und 470 nm gemessen. Mit diesen Werten konnte der Pigmentgehalt der Pflanzen mit den folgenden Formeln errechnet werden (Lightenthaler, 1987):

$$\text{a) Chlorophyll a: } c_a (\mu\text{g/ml}) = 12,25 A_{663\text{nm}} - 2,79 A_{647\text{nm}}$$

$$\text{b) Chlorophyll b: } c_b (\mu\text{g/ml}) = 21,5 A_{647\text{nm}} - 5,1 A_{663\text{nm}}$$

$$\text{c) Carotinoiden: } c_{(x+c)} (\mu\text{g/ml}) = (1000 A_{470\text{nm}} - 1,82 c_a - 85,02 c_b)/221$$

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 DNA Extraktion zur Genotypisierung

Für die Genotypisierung der Pflanzen wurde zuerst die DNA aus den Pflanzen extrahiert. Hierfür wurden die Pflanzenblätter geerntet und im flüssigen Stickstoff eingefroren. Danach wurden sie gemörsert und 500 µl Shorty Puffer (0,2 M Tris/HCl (pH 9); 0,4 M Lithiumchlorid; 25 mM EDTA; 1 % SDS) hinzugegeben. Anschließend wurde das Gemisch für 10 min bei 4 °C und 16.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt. Nach kurzer Inkubationszeit wurden die Proben für 30 min bei 4 °C und 16.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 400 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 5 min bei 4 °C und 16.000 g wurde das DNA Pellet getrocknet und zu einem späteren Zeitpunkt in 30 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl (pH 8); 1 mM EDTA) resuspendiert.

2.2.4.2 Generierung von Klonierungsplasmide

Das Plasmid für die Komplementationslinie wurde von Dr. Birgit Agne generiert und für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Generierung erfolgte durch eine Gateway Klonierung. Hierfür wurde die Tic23 cDNA-Sequenz mit den attB1 und attB2 amplifiziert, bei der die Primer Tic23-GWS und Tic23-GWR

verwendet wurden, und die cDNA wurde durch die BP clonase in den pDONR223 Vektor kloniert. Anschließend wurde die Tic23 cDNA Sequenz in dem pDONR223-Tic23 Vektor mit Hilfe der LR clonase in den pEarlyGate205 Vektor kloniert. In diesem Konstrukt ist Tic23 unter der Kontrolle vom CaMV35S Promoter und direkt hinter der Tic23 Sequenz wurde ein Stopp-Codon kloniert, um die Expression des TAP-Tags von pEarlyGate205 Vektors zu verhindern.

Das induzierbare *gene silencing* Konstrukt gegen das *TIC23* Gen wurde von Dr. Johannes Stuttmann wie folgt kloniert:

Für die Generierung des Konstrukts wurde das Kit *The Modular Cloning Toolkit and Plant Parts* verwendet (Engler et al., 2014). Hierbei wurden die Golden Gate Reaktionen nach Weber et al. (Weber et al., 2011) durchgeführt. Es wurde eine pnos:PAT_tnos Selektionsmarker Kasette (pTEI98) von pICSL70005 in pICH47802 zusammgebaut. Das Modul, bestehend aus Op6, das von einem 35S Promoter und der 5'UTRs von CMV und TMV (pTEI99) flankiert wurde, wurde durch eine PCR aus den zuvor beschriebenen Modul 6xLacIOP (Sarrion-Perdigones et al., 2013) aus pICH44222 mit den Primer JS1666/1667 amplifiziert. Anschließend wurden das Modul in den Plasmid pAGM1251 mit den Primern JS1664/1665 eingebaut.

Der amiRNA Rückgrat wurde als ein anpassbares Modul mit CCAT-GCTT Überhänge (pTEI100) aus pMDC32B (Carbonell et al., 2014) mit den Primer JS1364/1365 amplifiziert. Eine induzierbare amiRNA Kasette, pTEI101 wurde in pICH47751 aus pTEI99, pTEI100 und pICH72400 zusammgebaut. Das Intron-enthaltene GUS Gen wurde aus dem Plasmid pICH75111 mit den Primer TI236/237 mit CAT-GCTT Überhänge amplifiziert (pTEI102). Um das Plasmid pTEI103 zu generieren, wurde das GUS Gen mit den ocs Terminator (pICH41432) in pICH47811 kloniert. LhGR wurde in verschiedenen Fragmenten mit Hilfe der Primern TI238 bis TI243 aus dem Plasmid pOpOff (Wielopolska et al., 2005) amplifiziert und in pICH41308 (pTEI104) eingefügt. LhGR wurde mit dem 35S Promoter (pICH51266) und 35S Terminator (pICH41414) in pICH47761 kloniert (pTEI105). Das induzierbare *silencing* Plasmid pTEI106 wurde in pAGM4723 mit pTEI98, 101, 103, 105 and pICH41780 zusammengefügt. Die amiRNA gegen Tic23 wurde in das Plasmid pTEI106 nach dem Protokoll von Carbonell et al. (Carbonell et al., 2014) kloniert.

2.2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion zur Genotypisierung

Für die Genotypisierung wurde standardmäßig das folgende Programm für die PCR Reaktion durchgeführt. Nach der Reaktion wurde zu den Proben 5 µl 6x Orange Loading Dye (10 mM Tris-HCl (pH 7,6); 0,15 % Orange G; 60 % Glycerol; 60 mM EDTA) gegeben. Anschließend wurden 10 µl Proben auf ein 1 % Agarosegel geladen und mit Hilfe des 1x TAE Laufpuffer (1 mM EDTA (pH 8); 20 mM Essigsäure; 4 mM Tris) aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurden die Gele mit der QUANTUM™ von Peqlab dokumentiert.

95° C	4 min
Start Loop	30x
95 °C	30 s
60 °C	30 s
68 °C	1 min
Ende Loop	
68 °C	4 min
4 °C	∞

2.2.4.4 RNA-Isolation

Für jede Probe wurden mindestens 30 mg Pflanzenmaterial geerntet und in flüssigen Stickstoff eingefroren. Der Mörser und der Pistill wurden vor der RNA Extraktion mit Hilfe von flüssigem Stickstoff gekühlt. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial in flüssigen Stickstoff gemörsert. Mit einem kleinen vorgekühlten Spatel wurde das feine pulverisierte Material zusammengekratzt und mit 1 mL Trizol-Lösung (38 % Phenol (gesättigt mit 0,1 M Citratpuffer, pH 4,3); 0,8 M Guanidiniumthiocyanat; 0,4 M Ammoniumthiocyanat; 0,1 M Natriumacetat (pH 5); 5 % Glycerin) versetzt. Nachdem die Trizol-Pflanzenextrakte aufgetaut waren, wurden diese in 2 mL-Reaktionsgefäße überführt und anschließend wurden die Proben bei 21.000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µL Chloroform versetzt. Die Proben wurden mit der Hand für 15 s geschüttelt und anschließend für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 21.000 g und 4 °C für 10 min wurde die wässrige

(obere) Phase in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und diese mit einem halben Probenvolumen 100 % (v/v) Isopropanol und einem halben Probenvolumen *High Salt Precipitation Buffer* (0,8 M Natriumcitrat; 1,2 M Natriumchlorid) versetzt. Nach mehrmaligem Invertieren wurden die Proben für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 21.000 g und 4 °C für 15 min. Der Überstand wurde entfernt und der Niederschlag mit 900 µL 75 %-igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 21.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die Wasch- und Zentrifugationsschritte wurden wiederholt. Danach wurde der Überstand entfernt und der Niederschlag im Reaktionsgefäß trocknen gelassen. Abschließend wurden das Pellet in 20 µL steriles, bidestilliertes Wasser resuspendiert und mit Hilfe des Nanodrop2000 die Konzentration bestimmt.

2.2.4.5 cDNA Synthese

Aus der RNA wurde die cDNA mit Hilfe des Kits „RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit“ von Thermo Scientific synthetisiert. Die Synthese wurde unter Verwendung von *random-hexamer* Primer nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurde für jede Pflanzenlinie die gleiche Menge RNA für die Synthese verwendet.

2.2.4.6 Quantifizierung der Transkriptmenge

Für die Quantifizierung der Transkriptmenge wurde eine quantitative Real Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) durchgeführt. Zuerst wurde die RNA extrahiert und dann die cDNA synthetisiert. Anschließend wurde die qRT-PCR durchgeführt. Hierfür wurde das Substrat LUNA von New England Biolabs in allen Experimente verwendet. Dieses beinhaltet einen Farbstoff der an dsDNA bindet und somit eine Quantifizierung über das gebildete Produkt während der Amplifizierung ermöglicht. Jedes untersuchte Gen wurde über eine Dreifachbestimmung analysiert. Ein 20 µL Ansatz sah wie folgt aus:

10 µl 2x LUNA

0,5 µl Primer-Mastermix (0,25 mM je Primer)

7,5 µl Wasser
+ 2 µl cDNA

Die cDNA wurde 1:5 verdünnt in jedem Ansatz eingesetzt. Die anschließende qRT-PCR Messung erfolgte mit dem PCR-Thermocycler Rotor Gene Q (Qiagen, Hilden, Deutschland). Das Amplifikationsprogramm sah wie folgt aus:

Phase	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
30x Zyklen	95 °C	10 s
	60 °C	20 s
	72 °C	30 s
Schmelzkurve	72 °C auf 95 °C	

Im Anschluss an die PCR wurde eine Schmelzkurve der gebildeten Produkte ermittelt, wobei die Proben von 72 °C auf 95 °C (1 °C/s) erhitzt wurden.

Die anschließend exportierten Daten wurde mit dem Programm LinRegPCR (Ramakers et al., 2003) analysiert. Hierbei wurden die Daten auf Aktin 7 normalisiert.

2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.2.5.1 Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial

Das Pflanzenmaterial wurde mit einem Pistill in einem Eppendorf-Gefäß unter flüssigen Stickstoff gemörsert. Danach wurden 500 µL Aufschlusspuffer (100 mM NaCl; 50 mM Tris HCl pH 7,5; 4 % SDS; 0,4 % Protease Inhibitor Cocktail) zugegeben. Die auf Eis aufgetauten Proben wurden erneut gemörsert und für 20 min bei 70 °C inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit. Danach wurde die Proteinkonzentration der Proben über einen Bicinchoninsäure (BCA) Test bestimmt. Die aliquotierten Proteine wurden über eine Chloroform-Methanol- oder einer Aceton-Methanol-Präzipitation gefällt.

2.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.2.5.2.1 Bradford-Test

Die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) erfolgte mit der 5x Roti®-Quant. Hierbei wurde die zu untersuchende Probe in einem Gesamtvolumen von 800 µL mit bidestilliertem Wasser verdünnt. Anschließend wurden 200 µL Roti®-Quant hinzugegeben und die Lösung kurz invertiert. Nach einer 5 minütigen Inkubationszeit wurden die Absorption der Proben mit dem UV/Vis Spektrometer Ultrospec 2100 pro bei 595 nm gemessen. Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt und anschließend mit der vorher ermittelten Gleichung der Standardkurve die Proteinkonzentration berechnet.

2.2.5.2.2 Bicinchoninsäure (BCA) Test

Des Weiteren wurde die Proteinkonzentration auch mit dem Bicinchoninsäure (BCA) Test nach Smith (Smith et al., 1985) bestimmt. Hierfür wurde ein Kit mit vorbereiteten Lösungen von Serva Electrophoresis GmbH verwendet und nach Herstellerangaben eine BSA Standardkurve hergestellt. Dafür wurden zu einem 50 µL Probenvolumen 1 mL Arbeitslösung aus einer 50:1 Mischung der Lösungen A und B hinzugegeben. Die Proben wurden invertiert und für 10 min bei 60 °C erhitzt. Nach dem Erhitzen wurde die Absorption mit dem UV/Vis Spektrometer Ultrospec 2100 pro bei 562 nm gemessen und anschließend mit der vorher ermittelten Gleichung der Standardkurve die Proteinkonzentration berechnet.

2.2.5.3 Chloroform-Methanol-Fällung

Die Chloroform-Methanol-Fällung wurde nach Wessel und Flügge (Wessel & Flügge, 1984) durchgeführt. Einer 200 µL Probe wurden 480 µL Methanol und 160 µL Chloroform zugegeben. Nach dem gründlichen Mischen wurden 640 µL Wasser hinzugefügt und erneut gemischt. Die Proben wurden für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um anschließend die obere Phase abzunehmen und zu verwerfen. Danach wurden 480 µL Methanol zu den Proben gegeben und erneut gemischt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei maximaler Geschwindigkeit für 5 min.

Der Überstand wurde abgegossen und das Proteinpellet getrocknet. Die Proteinpellets wurden in 1x SDS-Ladepuffer für die SDS-PAGE resuspendiert.

2.2.5.4 Aceton-Methanol-Fällung

Den Proteinproben wurden ein Probevolumen Methanol und 8 Probenvolumen Aceton zugegeben und anschließend über Nacht bei -80 °C gefällt. Am nächsten Tag wurden die Proben bei 16.000 g und einer Temperatur von 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zu den Proteinlösungen wurde 1 mL eines Methanol (10 %)-Aceton (80 %)-Gemisches zugegeben. Die Proben wurden gemischt und erneut bei 16.000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Vorgang des Waschens wiederholt. Danach wurden die Pellets getrocknet.

2.2.5.5 Elektrophoretische Trennung von denaturierten Proteingemischen

Die Auftrennung der denaturierten Proteine nach ihrer Größe wurde mit Hilfe einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) durchgeführt. Standardmäßig wurden 12 % SDS-Trenngel [6 mL Acrylamid/Bis-Lösung (40 %; 37,5:1); 5 mL Tris/HCl (1,5 M; pH 8,8); 200 µL SDS (10% (w/v)) 8,8 mL H₂O; 60 µL APS] mit einem 5 % SDS-Sammelgel [625 µL Acrylamid/Bis-Lösung (40 %; 37,5:1); 1,25 mL Tris/HCl (0,5 M; pH 6,8); 50 µL SDS (10 % (w/v)) 3,1 mL H₂O; 25 µL APS (10 % (w/v)); 20 µL TEMED (10 % (w/v)); 15 µL TEMED] verwendet.

Die Proben wurden vor der Auftrennung in 1x SDS-Ladepuffer (62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8); 2 % (w/v) SDS; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau; 10 % Glycerin; 0,1 M Dithiothreitol) resuspendiert und anschließend für 10 min bei 70 °C erhitzt. Die Gele wurden in die Laufapparatur eingespannt und mit 1x Laemmli-Laufpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS) aufgefüllt (LAEMMLI, 1970). Pro Gel wurden für die Auftrennung 20 mA angelegt.

2.2.5.6 Coomassie-Blue Proteinfärbung

Nach der Auftrennung mit Hilfe der SDS-PAGE oder BN-PAGE wurden die Gele für 30 min in die Coomassie-Blue-Färbelösung [0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250; 0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250; 42 % (v/v) Ethanol; 5 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure] gelegt und danach in mehreren Schritten mit der Coomassie-Entfärbelösung [45 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure] behandelt, um die Hintergrundfärbung zu reduzieren.

2.2.5.7 Antikörper Generierung

Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurde der Antikörper gegen Tic23 aus *A. thaliana* benötigt. Zur Herstellung wurde die Vollängen cDNA mit den Primern Tic23_pETs und Tic23_pETrev amplifiziert und BspHI/NotI in das NcoI/NotI-geschnittene pET-21d Plasmid kloniert. Das Antigen wurde mit einem His-Tag in *Escherichia coli* BL21(DE3) überexprimiert. Die entstanden *inclusion bodies* wurden nach Palmer & Wingfield (Palmer & Wingfield, 2012) aufgereinigt und die isolierten Proteine auf einem SDS-PAGE Gradientgel aufgetrennt. Für die polyklonale Antikörperproduktion in Kaninchen wurden die Banden ausgeschnitten und zu der Firma Eurogentec (Seraing, Belgium) gesendet. Um eine hohe Qualität des Antikörpers zu erreichen, wurden die Präimmunseren von verschiedenen Kaninchen auf einem Western-Blot mit Gesamtzellenextrakt von Wildtyp getestet. Die Präimmunseren von den Kaninchen SA8419 (Prä-Immun: 9720) und SA8420 (Prä-Immun: 9722) zeigten keine Kreuzreaktionen im Wildtyp auf Höhe des Molekulargewichts von Tic23 auf und wurden daher für die Herstellung des Antikörpers verwendet. Nach Beendigung des Immunisierungsprogramms wurden die generierten Antikörper getestet. Im Weiteren wurden die Antikörper vom Kaninchen SA8420 verwendet.

Zur Detektion von Tic20 wurde ein anti-Peptid-Antikörper bei der Firma Eurogentec in Auftrag gegeben. Das Peptid (ASKDVPSSFRFPMTKKPQ+C) entsprach dabei dem von Teng et al. (Teng et al., 2006) verwendeten. Nach Testung der Präimmunseren wurden die Kaninchen SA9118 und SA9119 für das Immunisierungsprogramm verwendet. Der anti-Peptid-Antikörper wurde aus Serum des Kaninchens SA9119 von der Firma aufgereinigt und 1:2.500 verdünnt verwendet.

2.2.5.8 Immobilisierung der Proteine auf eine Membran per Western-Blot

Nach der SDS-PAGE wurden Proteine mit Hilfe eines Western-Blots auf eine Membran immobilisiert. In allen Fällen wurde als Methode das Tank-Blotting System verwendet. Hierbei kamen der Dunn-Carbonat-Puffer (10 mM Natriumhydrogencarbonat; 3 mM Natriumcarbonat; 20 % Methanol) sowie eine PVDF-Membran zum Einsatz. Das Blotting erfolgte über Nacht, bei dem eine Spannung von 12 V und eine Stromstärke zwischen 40 bis 80 mA angelegt wurden.

2.2.5.9 Visualisierung von Protein beim Western-Blot

Nach der Immobilisierung der Proteine auf eine Membran konnten die Proteine durch verschiedene Antikörper visualisiert werden. Standardmäßig wurden die Membranen zuerst für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Puffer und 5 % Milchpulver blockiert, um die unspezifische Bindung der Antikörper zu reduzieren. Je nach dem welcher Antikörper verwendet wurde, wurde für die Antikörperentwicklung zwei verschiedene Puffer verwendet: entweder PBS (*phosphate buffered saline*; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄) oder TBS (*Tris-buffered saline*; 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl). Alle verwendeten Antikörper mit den dazugehörigen Verdünnungen wurden in der Tabelle unter 2.1.3 aufgelistet. Nach dem Blockieren wurde der primäre Antikörper über Nacht bei 4 °C hinzugegeben. Nach drei Waschschrritten mit dem jeweiligen Puffer folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal mit Puffer gewaschen, um schlussendlich die Entwicklung mit dem Substrat *Aceglow enhanced chemiluminescence* (ECL) durchzuführen. Die Bilder wurden mit der Fusion FX7 der Firma Peqlab aufgenommen.

2.2.5.10 Identifikation von Interaktionspartner

Um Interaktionspartner von Tic23 zu identifizieren, wurde eine Immunopräzipitation von Dr. Daniel Köhler durchgeführt. Für diese wurden aufgereinigte Tic23 Antikörper an

ProtA-Sepharose *beads* (CL-4B Sepharose, GE Healthcare) mit Dimethylpimelimidat gekoppelt. Parallel wurden isolierte Chloroplasten aus 21 d alten *A. thaliana* Wildtyp Pflanzen in eine lösliche Fraktion und eine Membranfraktion aufgetrennt. Dieses erfolgte durch den Aufschluss der Chloroplasten mit Hilfe des Aufschlusspuffers (50 mM Tris pH 7,5; 100 mM NaCl; 1 mM PMSF; 1 % (v/v) *protease inhibitor cocktail*) und einem anschließenden Ultrazentrifugationsschritt bei 100.000 g und 4 °C für 1 h. Die Membranfraktion wurde im Solubilisierungspuffer (50 mM Tris pH 7,5; 100 mM NaCl; 1 % (w/v) Digitonin) resuspendiert und auf eine Proteinkonzentration von 2,5 µg/µL eingestellt. Nach Inkubation der Proben bei 4 °C für 30 min, wurden die nicht solubilisierten Proteine durch einen erneuten Ultrazentrifugationsschritt abgetrennt. Der Überstand, der die solubilisierten Proteine enthielt, wurde mit antiTic23-ProtA-Sepharose *beads* (CL-4B Sepharose, GE Healthcare) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die *beads* mehrere Male mit dem Solubilisierungspuffer gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden mit Hilfe eines sauren Glycinpuffers (pH 2,5) von den *beads* eluiert.

Für weitere Analysen wurden die Proteine aus dem Eluat tryptisch in-Lösung verdaut und anschließend, wie von Majovsky et al. (Majovsky et al., 2014) beschrieben, entsalzt. Die getrockneten Peptide wurden in 5 % Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure (FA) gelöst, um darauffolgend über eine EASY-nLC 1000 *liquid chromatography system* (Thermo Fisher Scientific) aufgetrennt zu werden. Hierbei wurde die Probe über eine C18 Säule unter Einsatz eines 180 minütigen Gradienten, bei dem die Acetonitrilkonzentration von 5 % auf 40 % in 0,1 % FA anstieg und einen Durchfluss von 250 nL/min eingestellt wurde, voneinander getrennt. Die eluierten Peptide wurden on-line in das Massenspektrometer QExactive Plus (Thermo Fisher Scientific) mit Hilfe einer Elektrosprayionisation injiziert. Hierbei betrug die Spannung 1,9 kV, die Kapillartemperatur 275 °C und die Z-Lens Spannung 240 V. Ein vollständiger Massenspektrometer Lauf wurde mit einer chromatographischen Peak Weite von 15 s, einer Auflösung von 70.000, einer *automatic gain control* (AGC) von 3E+06 und einer maximalen Injektionszeit (IT) von 100 ms gefahren. Für die MS/MS Scans wurde die Top10 DDA scan Strategie mit der HCD Fragmentierung genutzt. Bei den MS/MS Scans wurde eine Auflösung von 17.500, AGC 1E+05, IT 200 ms, Isolationsweite von 1.6 m/z, normalisierte Kollisionsenergie 28, dynamische *exclusion* Dauer von 50 s und einem Intensitätsschwellenwert von 7.5E+03 verwendet.

Peptide und Proteine wurden mit der Mascot Software v2.5.0 (Matrix Science) in Verbindung mit der Proteome Discoverer v2.1 Software (Thermo Fisher Scientific) identifiziert. Trypsin wurde als Enzym eingestellt. Als *precursor mass tolerance* wurden 5 ppm und als *fragment tolerance* von 0,02 Da toleriert bei der Suche in der TAIR10 Datenbank mit den häufigsten Kontaminationen.

Als *fixed modifications* wurde Carbamidomethylierung von Cystein eingestellt. Als *variable modifications* wurde die Oxidation von Methionin verwendet. Der *false discovery rate* (FDR) wurde über alle identifizierten Spektren, Peptiden und Proteinen mit Hilfe des *target-decoy database* Models kalkuliert. Die Signifikanz α wurde auf 0,01 für PSM und die Peptididentifikation und für die Proteinidentifikation auf 0,05 festgelegt. Die massenspektrometrischen Daten wurden bei der Datenbank PRIDE (Vizcaíno et al., 2014) hochgeladen und sind über den Link <https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/> erreichbar mit der Identifikationsnummer PXD011827.

2.2.5.11 Chloroplastenisolation aus Blattmaterial

Die Anzucht der Pflanzen für die Chloroplastenisolation erfolgte auf $\frac{1}{2}$ MS-Festmedien mit 0,8 % Saccharose. Wenn nicht anders in der Abbildungsschrift aufgeführt, wurden die Pflanzen 14 d unter Kurztagbedingungen kultiviert. Für die Ernte wurden die Pflanzen von vier bis fünf Platten verwendet. Das Pflanzenmaterial wurden in eine Petrischale ($\varnothing = 9$ cm) gegeben, die mit dem Verdauungspuffer (400 mM Sorbitol; 20 mM MES-KOH (pH 5,2); 0,5 mM Calciumchlorid) gefüllt war. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial zerkleinert und mit Verdauungspuffer gewaschen, um Verunreinigungen zu entfernen. Danach wurde in jede Petrischale 20 mL der Enzymlösung (1,5% Cellulase „onozuka“ R10; 0,375% Macerozym R10 in Verdauungspuffer gelöst) gegeben. Durch die Enzyme wurde die Zellwand innerhalb von 4 h bei Raumtemperatur verdaut.

Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4 °C. Durch das Schwenken wurden die Protoplasten aus dem Pflanzenmaterial herausgelöst und durch ein Nylonnetz mit einer Maschengröße von 200 μ m filtriert. Die gesammelten Protoplasten wurden für 10 min bei 130 g in einem Schwingrotor ohne Bremse pelletiert und der Überstand anschließend entfernt. Um die Protoplasten zu resuspendieren, wurde zu den Pellets insgesamt 5 mL Protoplasten-Resuspensionpuffer (Verdauungspuffer mit einem pH 6)

gegeben. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 5 min bei 130 g, wobei der Überstand erneut entfernt wurde.

Danach wurde das Pellet in insgesamt 5 mL Aufschlusspuffer (300 mM Sorbitol; 20 mM Tricine-KOH (pH 8,4); 5 mM EDTA; 5 mM EGTA; 10 mM Natriumhydrogencarbonat; 0,1 % BSA; 0,1 % Protease Inhibitor Cocktail) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension zweimal in eine modifizierte Spritze gegeben, um die Protoplasten durch einen mechanischen Aufschluss mit Hilfe von zwei Nylonnetze (Gittergröße 10 µm und 20 µm) aufzubrechen. Die Chloroplastenlösung wurde auf einen Percoll-Gradienten, der aus einer 85 % Schicht [6,25 mL 8x RB Puffer (2,4 M Sorbitol; 160 mM Tricine-KOH (pH 8,5); 20 mM EDTA; 40 mM Magnesiumchlorid); 42,5 mL Percoll; 1,25 mL H₂O] und einer 40 % Schicht [6,25 mL 8x RB Puffer; 20 mL Percoll; 23,75 mL H₂O; 0,1 % PIC] besteht, gegeben. Der Gradient wurde für 20 min bei 2600 g in einem Schwingrotor ohne Bremse und mit sanfter Beschleunigung zentrifugiert. Danach konnte die Bande der intakten Chloroplasten an der Interphase zwischen den beiden Percollschichten entnommen werden. Die Chloroplasten wurden mit circa 40 mL HS-Puffer (330 mM Sorbitol; 50 mM Hepes (pH 8)) gewaschen und anschließend durch einen Zentrifugationsschritt bei 700 g für 5 min sedimentiert. Für die anschließenden Bestimmungen von der Chlorophyllkonzentration und der Proteinkonzentration nach Bradford wurden die Chloroplasten in ein kleineres Volumen aufgenommen. Die Chlorophyllkonzentration wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$\frac{\text{optische Dichte} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{36} = \text{mg Chlorophyll/ml}$$

2.2.5.12 Proteaseschutzversuch

Für diesen Versuch wurden die Proteasen Thermolysin und Trypsin verwendet, um die Topologie eines Proteins an der Chloroplastenhüllmembran zu überprüfen (Froehlich, 2011). Hierfür wurden in einem 100 µL Ansatz isolierte Chloroplasten verwendet, die einer Chlorophyllmenge von 50 µg entsprachen. Zu den Ansätzen, in denen Thermolysin verwendet wurde, wurden jeweils 2,5 µL, 5 µL und 10 µL der Thermolysin-Stocklösung (1 mg/mL) zugegeben. Anschließend wurde 1 µL einer 5 mM CaCl₂ Lösung hinzupipettiert und das Volumen auf 100 µL mit HS-Puffer aufgefüllt. Durch die

besagte Zugabe der Thermolysin Protease wiesen die Ansätze eine Endkonzentration von 25 µg/mL, 50 µg/mL oder 100 µg/mL auf. Für Trypsin wurden ebenfalls 100 µL Ansätze vorbereitet, bei denen isolierte Chloroplasten verwendet wurden, die einer Chlorophyllmenge von 50 µg entsprachen. Zu diesen Ansätzen wurden 1 µL, 2,5 µL und 5 µL von der Trypsin-Stocklösung (1 mg/mL) hinzugegeben und somit betragen die Endkonzentrationen in den jeweiligen Reaktionen 10 µg/mL, 25 µg/mL und 50 µg/mL.

Nach dem Mischen der Ansätze folgte die Inkubation der Proben für 30 min auf Eis. Danach wurden die Thermolysinreaktionen durch die Zugabe von 1 mL eines 12 mM EDTA-HS Puffer und die Trypsinproben mit der Zugabe von 1 mL einer 200 µg/µL Soybean Trypsin Inhibitor Lösung gestoppt. Nach einer 5 minütigen Inkubation wurden die Chloroplasten bei 1000 g für 5 min zentrifugiert und anschließend der Überstand entfernt. Es folgte ein Waschschriff mit 500 µL HS-Puffer und ein erneutes Zentrifugieren. Die Chloroplasten wurden ohne Überstand bei -80 °C gelagert. Für die Analyse wurden die Proben auf eine 12 % SDS-PAGE gegeben und im Anschluss des Laufs auf eine PVDF-Membran transferiert. Hierfür wurden die Proben in 1x SDS-Ladepuffer resuspendiert. Jeweils 50 µg Protein wurden pro Spur auf die SDS-PAGE geladen und nach dem Lauf folgte ein Western-Blot mit Dunn-Carbonat Puffer über Nacht.

2.2.5.13 *In Vitro* Importexperimente

Für die *in vitro* Importexperimente wurden die intakten Chloroplasten aus der Chloroplastenisolierung verwendet. Jeder Ansatz umfasste ein Gesamtvolumen von 50 µL und bestand aus isolierten Chloroplasten, die einer Chlorophyllmenge von 15 µg entsprachen. Für die hellgrüne Mutante *tic23-1* wurde die Chloroplastenmenge an die Proteinmenge vom Wildtyp angepasst. Des Weiterem war in jedem 50 µL Ansatz 5 µL des 10x Importpuffers (40 mM Kaliumacetat, 20 mM Mg(CH₃COO)₂, 0,5 mM DTT, 330 mM Sorbitol, 50 mM Hepes-KOH (pH 7,5)), 5 mM ATP und 10 mM L-Methionin. Anschließend wurden die Ansätze auf 45 µL mit HS-Puffer aufgefüllt. Für die Importexperimente mit Hitze gestressten Chloroplasten wurden 200 µg der isolierten Chloroplasten bei 32 °C für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Chloroplasten

für 10 min auf Eis gestellt. Danach wurden die Chloroplasten auf die Ansätze aufgeteilt und der Import erfolgte, wie im Weiteren beschrieben wird.

Nachdem das *in vitro* Translat mit Hilfe des „TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System“ Kits und ^{35}S -Methionin hergestellt wurde, wurden die einzelnen Reaktionen mit 5 μL ebendieses Translats gestartet. Die Ansätze wurden durch Antippen gemischt und anschließend in einem Thermoshaker bei Raumtemperatur und 10 g für 0 min, 7 min oder 15 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch die Zugabe von 1 mL HS-Puffer gestoppt und auf Eis transferiert.

Die Proben wurden anschließend bei 800 g für 3 min zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen. Es folgte ein weiterer Waschschrift und die gewaschenen Chloroplasten wurden ohne Überstand in flüssigen Stickstoff eingefroren.

Mit jeweils einer 15-minütigen Probe der verschiedenen Pflanzenlinien wurde ein Thermolysin-Verdau durchgeführt. Hierfür wurden die gewaschenen Chloroplasten in 100 μL HS-Puffer aufgenommen. Es wurden dann 0,5 μL einer 1 mM CaCl_2 Lösung und Thermolysin hinzugegeben, um eine Endkonzentration von 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ im Ansatz zu erreichen. Die Proben wurden für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 5 mM EDTA in HS-Puffer abgestoppt. Danach wurden die Ansätze bei 1100 g für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Proben erneut gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand entfernt und die Chloroplasten eingefroren.

Zur Analyse der Proben wurde eine 12 %-ige SDS-PAGE durchgeführt. Hierfür mussten die Proben erneut in 50 μL HS-Puffer resuspendiert und anschließend mit Hilfe einer Chloroform-Methanol-Präzipitation gefällt werden. Die Proteinpellets wurden in 10 μL 1x SDS-Ladepuffer aufgenommen und auf die SDS-PAGE geladen. Nach dem Lauf wurde das Gel gefärbt und anschließend wieder entfärbt, um die Hintergrundfärbung zu reduzieren. Nach der Trocknung des Gels wurde mit Hilfe eines Phosphoimagers das Autoradiogramm des radioaktiv-markierten ^{35}S -Methionins im *in vitro* Translat detektiert.

2.2.5.14 Subzelluläre Fraktionierung und Membranextraktion

Für die subzelluläre Fraktionierung wurden isolierte Chloroplasten, die aus 2 Wochen alten Wildtyp Col-0 Pflanzen gewonnen wurden und einer Chlorophyllkonzentration von 200 µg entsprachen, verwendet. Vor dem Einfrieren bei -80 °C wurde zu den Chloroplasten ein 0,6 M Sucrose-TE-Puffer hinzugegeben und somit wies die Chloroplastensuspension eine Chlorophyllkonzentration von 1 mg/mL auf.

Für die Auftrennung wurde das Aliquot aufgetaut und mit der dreifachen Menge an TE Puffer verdünnt. Anschließend erfolgte die mechanische Auftrennung in einem Potter und die Probe wurde in drei Reaktionsgefäße aufgeteilt. Durch einen ersten Zentrifugationsschritt bei 800 g und 4 °C für 5 min wurden die noch intakten Chloroplasten abgetrennt. Der Überstand wurde erneut bei 100.000 g und 4 °C für 1 h zentrifugiert, um die löslichen Proteine von der Membranfraktion abzutrennen.

Anschließend wurden die Pellets in 100 µL Lysepuffer (50 mM HEPES-KOH pH 7,5; 5 mM Sorbitol; 5 mM MgCl₂; 2,5 mM EDTA; 0,1 % PIC) resuspendiert, in dem entweder mit 2 M NaCl, 100 mM Na₂CO₃ (pH 11,5) oder 1 % Triton X-100 als Zusatz enthalten waren. Erneut wurden die Proben bei 4 °C und 100.000 g für 1 h zentrifugiert. Sowohl die Proteine aus den Überständen als auch aus den Pellets wurden mit einer Chloroform-Methanol Präzipitation gefällt. Für die Beladung eines 12 % SDS-PAGE Gel wurden die Proteinpellets in 10 µL 1x Probenpuffer resuspendiert und für 10 min bei 70 °C erhitzt.

2.2.5.15 Darstellung nativer Proteinkomplexe durch eine 2D-BlueNative-PAGE

Für eine zwei-dimensionale BlueNative PAGE wurden zuerst die Chloroplasten aus den gewünschten Pflanzen isoliert. Im Anschluss wurden die Membranproteine solubilisiert. Hierfür wurden zu einem Chloroplastenaliquot, in dem 100 µg Chlorophyll enthalten war (entspricht der 4-fachen Menge an Protein), 2-facher Solubilisierungspuffer (100 mM BisTris-HCl (pH 7), 1 M ε-Aminocapronsäure, 20 % (v/v) Glycerin) mit 1 % PIC und 1 % Digitonin hinzugegeben. Die Aliquots wurden für 10 min bei 4 °C in einem Überkopfschüttler gemischt und anschließend für weitere 10 min auf Eis solubilisiert.

Um die gelösten Membranproteinen von den Membranresten und ungelösten Proteine zu trennen, wurden die Proben bei 100.000 g für 10 min zentrifugiert. Anschließend

wurde der Überstand abgenommen und mit 5 μ L BN-PAGE-Ladepuffer (5 % (w/v) Coomassie Blue G250, 500 mM 6-Aminocaprinsäure, 100 mM BisTris (pH 7,0)) versetzt. Im Anschluss wurden pro Spur 100 μ g Protein auf ein Precast SERVAGel N 3% - 12% (natives Gradientengel) aufgetragen. Bei der BN-PAGE wurden zwei verschiedene Puffer für die beiden Elektroden verwendet. Im Anoderraum wurde der Anodenpuffer (50 mM BisTris-HCl (pH 7,0)) eingefüllt und bei der Kathode entsprechend der Kathodenpuffer (50 mM Tricin, 15 mM BisTris, 0,01 % (w/v) Coomassie G250). Die Proben liefen bei 50 V in das Gel ein und der Gellauf wurde bei 200 V beendet. Bei circa zwei Drittel der Laufstrecke wurde der Kathodenpuffer gegen einen Coomassie G250 freien Kathodenpuffer gewechselt.

Nach dem Lauf wurde das Gel mit Coomassie-Blue gefärbt und anschließend entfärbt. Nach der Dokumentation wurden die Spuren der Aliquots ausgeschnitten und eingefroren. Für die zweite Dimension wurde ein 12 %-iges denaturierende SDS-PAGE gegossen. Über dem Sammelgel wurde die Spur von der BN-PAGE in 0,5 % (w/v) Agarose, das in Laufpuffer gelöst war, eingegossen.

2.2.6 Generierung von eYFP Expressionsplasmiden

Für die *in vivo* Importanalysen in *A. thaliana* Protoplasten wurden die Plasmide wie folgt kloniert: Die ersten 100 Basen von Tic23 und Pss1 wurden mit jeweils dem Primer-Paar Tic23_pRTS/Tic23_1-100R oder 59640-pRTS/Tic23_2_1-100R amplifiziert. Anschließend wurden die PCR Produkte mit den Restriktionsenzymen BglII/BamHI oder BspHI/NcoI verdaut. Die Ligation erfolgte in den pRT100 Ω /Not/Asc_eYFP Vektor, der vorher mit BamHI oder NcoI behandelt wurde. Dieser Vektor ist identisch zu dem Vektor pRT100 Ω /Not/Asc-eGFP (Kohler et al., 2015, Überlacker & Werr, 1996), mit Ausnahme des Fluoreszenzmarkes; hier weist der Vektor statt eines eGFPs ein eYFP auf.

In einem weiteren Konstrukt wurden das komplette Gen von Tic23 und Pss1 verwendet. Es wurde die cDNA von Pss1 mit den Schnittstellen von NcoI und BspHI amplifiziert. Für die Klonierung des Tic23 Volllänge Proteins in den Expressionsvektor wurde das Volllängeprodukt mit den Primern Tic23_pRTs und Tic23_pRTrev amplifiziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt sowie der pRT100mod-eYFP Vektor mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut. Es folgte die Ligation des

PCR-Produkts in den Vektor. Die Isolation und Transformation der *A. thaliana* Mesophyll Protoplasten wurden im folgenden Kapitel beschrieben. Nach 20 h Expression wurden die Fluoreszenzaufnahmen mit einem Plan-Apochromat 40x/0.95 Objektiv am LSM-780 Konfokalmikroskop (Zeiss) durchgeführt. Die Anregungswellenlängen lagen bei 633 nm für Chlorophyll und bei 514 nm für eYFP. Die Emission wurde im Bereich von 647 bis 721 nm für Chlorophyll und 518 bis 620 nm für eYFP gemessen. Anschließend wurden die Bilder mit der Carl Zeiss ZEN lite 2012 Software bearbeitet.

2.2.7 Protoplastierung und Protoplastentransformation

Die Isolierung und Transformation von den *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten wurden unter Verwendung einer Polyethylenglykol basierten Methode durchgeführt, die von den Protokollen von Jin et al. (Jin et al., 2001) and Yoo et al. (Yoo et al., 2007) adaptiert wurden. Für die Experimente wuchs der Wildtyp Col-0 auf ½ MS-Festmedien mit 0,8 % Saccharose für 28 Tagen. Die Pflanzen wurden in einem Enzympuffer ohne Enzyme (400 mM Sorbitol, 5 mM MES, 8 mM CaCl₂, pH 5,6) geerntet. Nach dem Zerkleinern des Pflanzenmaterials wurde der Puffer durch denselben Puffer mit 1,5 % (w/v) Cellulase Onozuka R-10 (Serva) und 0,375% (w/v) Macerozyme R-10 (Serva) gewechselt. Anschließend wurden zwei Vakuuminfiltrationsschritte bei -800 mbar für 5 min durchgeführt. Die Pflanzen wurden für 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Protoplasten durch leichtes Schütteln aus dem Pflanzenmaterial gelöst und durch ein Nylonnetz mit einer Maschenweite von 50 µm filtiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 100 g für 5 min wurden die Protoplasten mit W5 Waschpuffer (154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 5 mM Glucose, 1,5 mM MES, pH 5,6) vermengt und anschließend in diesem Puffer zu einer finalen Konzentration von 2 x 10⁶ Protoplasten mL⁻¹ resuspendiert. Nach einer 30 minütigen Inkubation und einem Sedimentationsschritt wurden die Protoplasten im gleichen Volumen des MaMg Puffers (400 mM Sorbitol, 15 mM MgCl₂, and 5 mM MES, pH 5,6) resuspendiert. Für jede Transformation wurden 400 µL Protoplastensuspension mit 40 µg Plasmid und 440 µL PEG-CMS Lösung (1 g Polyethylenglykol 4000, 375 µL H₂O, 1 mL 500 mM Sorbitol, 250 µL 1 M Ca(NO₃)₂) gemischt. Anschließend wurden die Transformationsansätze für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach wurden

diese mit W5 Puffer gewaschen. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 100 g für 5 min wurden die Protoplasten in 4 mL Protoplastenkulturmedium (4,4 g L⁻¹ MS Medium, 350 mM Sorbitol, 50 mM Glucose, 3 mM CaCl₂, and 50 µg mL⁻¹ Ampicillin, pH 5,8) gewaschen und anschließend in 2 mL des Puffers resuspendiert. Nach mindestens 20 Stunden Expression wurden die Fluoreszenzaufnahmen mit einem Plan-Apochromat 40x/0.95 Objektiv am LSM-780 Konfokalmikroskop (Zeiss) durchgeführt. Zur weiteren Analyse wurden die Protoplasten zentrifugiert bei 500 g für 5 min und danach in einem Resuspensionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10 mM Dithiothreitol, 0,2 % (v/v) Protease Inhibitor Cocktail) aufgenommen, um die Proteine mit einer Chloroform-Methanol Präzipitation zu fällen. Die Proteinpellets wurden in 1x SDS-Ladepuffer resuspendiert und anschließend wurden 50 µg Protein auf einer SDS-PAGE aufgetrennt. Durch einen darauffolgenden Western-Blot konnte das anti-GFP Signal detektiert werden.

2.2.8 Massenspektrometrische Analyse plastidärer Proteinextrakte

Die Plastidenproteine wurden für die massenspektrometrische Analysen in tryptische Peptide verdaut. Aliquotierte Chloroplasten, die einer Proteinmenge von 100 µg entsprechen, wurden in 221 µL NH₄HCO₃ resuspendiert. Die Chloroplastensuspension wurde mit 12,5 µL RapiGest versetzt und für 10 min bei 80 °C und 30 g im Thermoshaker inkubiert. Anschließend wurden 6,2 µL DTT hinzugegeben und für 10 min bei 60 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben für 2 min abgekühlt, mit 6,2 µL Iod-Acet-Amid versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Für den Verdau der Proteine wurden 4 µL Trypsin hinzugefügt und anschließend für 16 h bei 22 °C und 30 g inkubiert. Der Verdau wurde nach 16 h durch Zugabe von 0,5 µL HCl (37% (v/v)) gestoppt. Die Proben wurden für 3 min bei 13.000 g zentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die tryptischen Peptide wurde anschließend für 2 h bei Raumtemperatur im Eppendorf Concentrator 5301 eingetrocknet und bei -20 °C gelagert.

Für die massenspektrometrische Analyse der Proben wurde die LTQ Orbitrap Velos Pro von Thermo Scientific verwendet, wobei die Messung der drei biologischen Replikate zusätzlich in drei technischen Replikaten erfolgte. Die getrockneten Peptide wurden in 40 µL Acetonitril (ACN, 2% (v/v)) und Ameisensäure (FA, 0,1% (v/v)) gelöst,

wobei 3 μL der Probe für die Messungen verwendet wurde. Als HPLC wurde für die Massenspektrometer die nanoAcquity von Waters verwendet. Als Vorsäule wurde die ACQUITY UPLC® M-Class Symmetry® C18 Trap Column, als Hauptsäule die ACQUITY UPLC® M-Class HSS T3 C18 angeschlossen. Eine Messung betrug 180 min mit einem Gradienten aus Wasser (MS-Grade) mit 0,1% FA und Acetonitril mit 0,1% FA. Als Ionisierungsmethode wurde eine *nano spray ionisation* (NSI) eingesetzt. Für die Messungen wurde als Programm *data dependent acquisition* (DDA) eingestellt, wobei die 20 abundantesten Ionen jedes MS-Scans mittels *collision induced dissociation* (CID) fragmentiert wurden. Für die Auswertung der Rohdaten wurde die Software MaxQuant (v.1.6.10.43) mit dem Andromeda Algorithmus verwendet (Cox & Mann, 2008). Bei den Proben wurden die Standardeinstellungen des Programms mit einer *False Discovery Rate* (FDR) von 1% verwendet. Die Funktion *Match between runs* wurde mit einem *matching time window* von 0,7 min zugelassen. Als Protein-Datenbank für *A. thaliana* wurde Araport11 (<https://www.arabidopsis.org/>) mit den häufigsten Kontaminanten verwendet. Die *Precursor mass tolerance* wurde auf 20 ppm, die *Fragment ion mass tolerance* auf 0,5 Da gesetzt. Als *fixed modifications* wurde Carbamidomethylierung von Cystein eingestellt. Als *variable modifications* wurden Oxidation von Methionin, N-terminale Acetylierung und Phosphorylierung von Serin und Threonin eingestellt. Es wurden zwei *missed cleavages* durch Trypsin akzeptiert. Für die Proteinquantifizierung durch den MaxLFQ Algorithmus (Cox & Mann, 2008) muss ein *minimum ratio count* von mindestens zwei unique oder razor peptides erfüllt sein.

3. Ergebnisse

3.1 Tic23 ist eine Komponente des 1 MDa TIC-Komplexes

Durch die Studie von Schäfer et al. (Schafer et al., 2019) wurde ein Protein mit bisher unbekannter Funktion (im Folgenden als Tic23 bezeichnet) identifiziert. In der Studie wurde gezeigt, dass dieses in derselben BN-PAGE-Bande wie der 1 MDa TIC-Komplex auftrat. Des Weiteren nahm die Proteinmenge von Tic23 in der hellgrünen Mutante *tic56-3*, die kein Vollängen Tic56 aufweist (Agne et al., 2017), im gleichen Maße wie die anderen Komponenten des 1 MDa TIC-Komplexes ab.

Daher lag die Annahme nahe, dass Tic23 direkt mit dem 1 MDa TIC-Komplex interagiert. Um dies zu überprüfen, wurde zunächst ein polyklonaler Antikörper gegen Tic23 hergestellt, um eine Detektion des Proteins zu ermöglichen. Dieser wurde anschließend mit rekombinanten Protein und einem Proteingemisch aus Wildtyp-Gesamtzelle auf seine Sensitivität getestet (Anh. 1). Der hergestellte Antikörper konnte das rekombinante Protein, das in *E. coli* exprimiert wurde, bei einer Konzentration von 5 ng detektieren und an dem denaturierten Protein aus der Pflanze binden. Somit war eine Detektion von Tic23 für die weiteren Experimente möglich.

Die Proteinsequenz von Tic23 weist keine charakterisierten Domänen auf, bis auf eine Transmembrandomäne zwischen den Aminosäuren 163 bis 183 (Abb. 6 A), die durch einen Hydrophobizitätsplot über TMHMM Server v. 2.0 (Krogh et al., 2001) vorhergesagt werden konnte. Da anhand des Plots nicht bestimmt werden kann, ob Tic23 mit Hilfe dieser vorhergesagten Transmembrandomäne in der Membran integral verankert oder nur peripher an der Membran assoziiert ist, sollte die Eigenschaft des Proteins überprüft werden. Hierfür wurden Chloroplasten aus zwei Wochen alten Wildtyp Pflanzen isoliert. Nach der Auftrennung der Chloroplasten in ihre subzellulären Kompartimente wurde die Membranfraktion mit verschiedenen Puffern behandelt. Hierbei wurde ein alkalischer Puffer mit einem pH-Wert von 11,5 sowie ein hochkonzentrierter salzhaltiger Puffer verwendet, um zu überprüfen, ob Tic23 leicht von der Membran abgetrennt werden kann und somit nur peripher an der Membran assoziiert ist. Des Weiteren wurde die Membranfraktion mit einem Puffer mit dem Detergens Triton X-100 behandelt, welches auch integrale Proteine aus der Membran herauslösen kann. Nach der Behandlung mit den verschiedenen Puffern wurden die Proben erneut in eine Membranfraktion und einen Überstand aufgetrennt. Die

Ergebnisse

Ergebnisse zeigten, dass Tic23 durch die Verwendung von hochkonzentriertem Natriumchlorid oder von einem alkalischen Puffer mit Natriumkarbonat nicht aus der Hüllmembran gelöst werden konnte und somit die Signale von Tic23 in den Pelletfraktionen zu detektieren waren (Abb. 6 B). Hingegen wurden die Tic23 Signale nach der Behandlung der Hüllmembranfraktion mit dem Detergens Triton X-100 im Überstand detektiert. Es war also erst mit Hilfe eines Detergens möglich, Tic23 aus der Membran zu lösen. Als Kontrollen wurden die Signale der integralen Proteinen Toc75 und dem *light harvesting complex b 4* (Lhcb4) detektiert. Hierbei konnte für beide Proteine das gleiche Signalmuster detektiert werden. So zeigte dieses Ergebnis, dass Tic23 integral in der Membran verankert ist wie zum Beispiel Toc75.

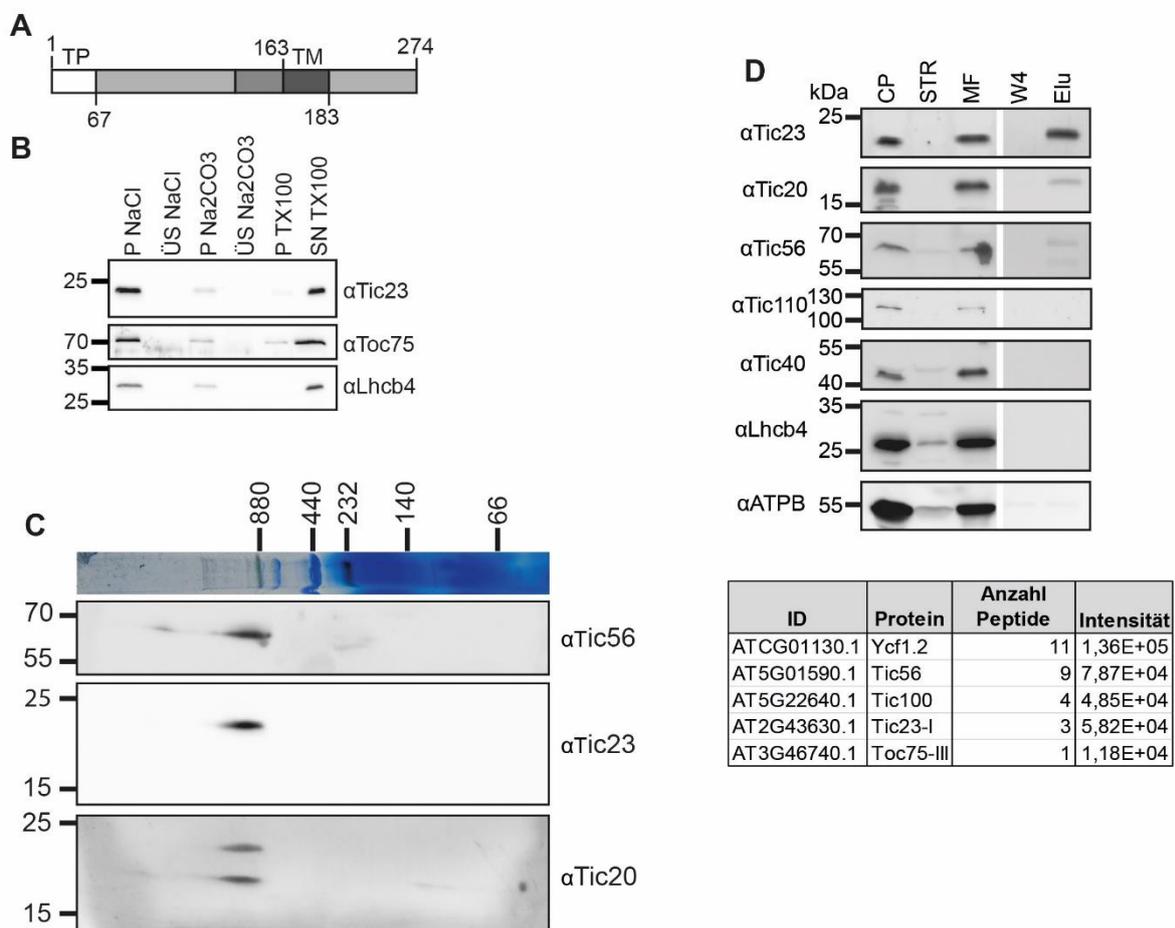


Abbildung 6 Tic23 interagiert mit den Untereinheiten des 1 MDa TIC-Komplexes. (A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Tic23. TP - Transitpeptid, TM - Transmembrandomäne, dunkelgraue Box – Glycin-reicher Bereich (B) Wildtyp Col-0 Chloroplasten aus zwei Wochen alten Pflanzen wurden aufgeschlossen und anschließend in Stroma und Membranfraktion aufgetrennt. Die Membranfraktion wurde mit den aufgeführten Puffern behandelt und erneut in eine Pelletfraktion (P) und einen Überstand (ÜS) aufgetrennt. Die Proben wurden über einen Western-Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert.

Fortsetzung Abb.6: (C) repräsentative 2D-BN-PAGE mit solubilisierten Membranproteinen aus Wildtyp Col-0 Chloroplasten. In drei biologischen Replikaten wurden die Proteine mit einem Solubilisierungspuffer mit 1 % Digitonin solubilisiert und über ein Precast Gradientengel mit einer Konzentration von 3 % - 12 % aufgetrennt. Der BN-PAGE-Streifen wurde dann auf eine 12 % SDS-PAGE präpariert und die Proteine aufgetrennt. Darauffolgend wurde ein Western-Blot angeschlossen und nacheinander wurden die angegebenen Antikörper-Entwicklungen durchgeführt. (D) Immunopräzipitation mit Tic23-Antikörper gekoppelten Protein A-Sepharose *beads*. Die Proben wurden mit einem Western-Blot analysiert und mit Antikörpern gegen verschiedene Importkomponenten sowie Lhcb4 und AtpB getestet. Das Eluat wurde aufgeteilt und weiter mit Hilfe von Massenspektrometrie analysiert. Die unterstehende Tabelle enthält die nachgewiesenen Importkomponenten mit ihrer Anzahl an eindeutig identifizierten Peptiden. Das Experiment wurde einmalig durchgeführt. CP - gesamte Chloroplasten; STR – Stromafraktion; MF – Membranfraktion; W4 – vierter Waschschrift; Elu - Eluat

Proteinkomplexe können nativ über eine BlueNative-PAGE aufgetrennt werden. Durch eine anschließende zweite denaturierende Dimension kann nach der Auftrennung die Zusammensetzung der Komplexe analysiert werden. Um nun Tic23 als Komponente des 1 MDa TIC-Komplexes nachzuweisen, wurde eine zweidimensionale BN-PAGE (2D-BN-PAGE) verwendet. Hierfür wurden die solubilisierten Membranproteine aus 2 Wochen alten Wildtyp Chloroplasten in der ersten Dimension über eine BN-PAGE aufgetrennt und anschließend wurden die Komplexe der ersten Dimension denaturierend in einer SDS-PAGE in ihre Komponenten zerlegt.

Die Ergebnisse zeigten, dass auf Höhe von circa 1 MDa in der BN-PAGE ein Signal für Tic23 zu detektieren war (Abb. 6 C). Auf dem gleichen Molekulargewicht wurden ebenso starke Signale für Tic56 und Tic20 detektiert. In diesem Bereich kann man den 1 MDa TIC-Komplex in der BN-PAGE erwarten. Somit deutet dies darauf, dass Tic23 mit dem 1 MDa TIC-Komplex mitläuft bzw. assoziiert ist. Ebenfalls zeigten die detektierten Signale der Komponenten zueinander die gleiche Form. Dieses spricht auch dafür, dass die Komponenten im gleichen Komplex vorkommen. Des Weiteren war zu erkennen, dass für die Antikörper gegen Tic56 und Tic20 ein weiteres Signal bei einem höheren Molekulargewicht detektiert werden konnte. Diese Signale könnten zum TOC-TIC Superkomplex gehören, der sich bei dem Proteinimport in den Chloroplasten bildet. Um eine eindeutige Identifikation des Superkomplexes zu ermöglichen, wurde der Western-Blot mit Antikörper gegen Komponenten des TOC-Komplexes getestet. Leider konnten keine Signale für TOC-Komponenten detektiert werden. In früheren Studien konnte aber gezeigt werden, dass über eine 2D-BN-PAGE der Superkomplex in einem höheren molekularen Bereich nachgewiesen werden kann. Dabei weist er ungefähr ein Molekulargewicht von 1,25 MDa auf (Chen & Li, 2017). In

diesem höheren Molekulargewicht wurden dagegen keine Tic23 Signale detektiert, was daraufhin deutet, dass Tic23 kein Teil dieses Superkomplexes ist. Bei Betrachtung des niedrigmolekularen Bereichs wurden für keine der untersuchten Antikörper Signale detektiert, die auf einzelne Monomere hinweisen würden. Um eine direkte Assoziation von Tic23 mit dem 1 MDa TIC-Komplex zu zeigen, wurde anschließend eine Immunopräzipitation mit Antikörpern gegen Tic23 durchgeführt. Hierfür wurden die Tic23 Antikörper an Protein A-Sepharose *beads* kovalent gekoppelt. Die präparierten *beads* wurden dann mit solubilisierten Proteinen aus einer Membranfraktion von isolierten Wildtyp-Chloroplasten inkubiert. Nach mehreren Waschschritten, um mögliche unspezifische Bindungspartner abzuwaschen, wurde eine saure Elution durchgeführt. Über einen Western-Blot konnten die Aufreinigung und der generelle Ablauf der Ko-Immunopräzipitation analysiert werden (Abb. 6 C). Nach der Lyse der Chloroplasten wurde Tic23 sowie die anderen Membranproteine, wie zum Beispiel Tic40 und Lhcb4, in der Membranfraktion (MF) nachgewiesen. In der dazugehörigen Stromafraktion (STR) wurden nur schwache Signale von den Membranproteinen Tic56, Tic40, Lhcb4 und AtpB detektiert, welche Verunreinigungen durch die Membranfraktion darstellen könnten. Die stärkeren Signale dieser Proteine in der Membranfraktion bewiesen ein gutes Ergebnis der technischen Auftrennung beider Kompartimente. Anschließend wurden die Proteine aus der Membranfraktion mit Digitonin solubilisiert und mit den Protein A-Sepharose *beads*, an denen die Tic23-Antikörper quervernetzt wurden, inkubiert. In den nachfolgenden Waschschrritten wurden die Proteine, die unspezifisch an Tic23 gebunden waren, abgewaschen. Nach der sauren Elution von Tic23 von den *beads* konnte ein deutliches Signal, das genauso stark wie in der Membranfraktion war, von Tic23 detektiert werden. Neben diesem Signal wurden auch für Tic20 und Tic56 Signale detektiert, was auf eine eindeutige Interaktion der Proteine hindeutet. Da durch die Western-Blot Analyse nicht alle Proteine auf ihre Präsenz geprüft werden konnten, wurde ein Teil der Elutionsfraktion aufgearbeitet, um weitere Interaktionspartner über eine massenspektrometrische Analyse zu identifizieren. Hierfür wurden die Proteine tryptisch in-Lösung verdaut und anschließend wie von Majovsky et al. (Majovsky et al., 2014) beschrieben entsalzt. Die präparierten Peptide wurden mit der QExactiv Plus gemessen. Durch dieses Vorgehen wurden in dem Eluat weitere Importkomponenten identifiziert, die in der Tabelle in Abb. 6 D aufgeführt wurden (Anh. 2). Somit konnte eine Interaktion von

Tic23 mit Tic214, Tic100, Tic56 und Toc75-III nachgewiesen werden. Daneben wiesen die Proben nur wenige Proteine auf, die als Kontaminationen angesehen werden können, da es sich dabei um Proteine handelt, die in der Pflanze generell hoch abundant auftreten. Unter anderem wurden die große Untereinheit von RubisCO (RbcL) und verschiedene Untereinheiten von der ATPase (ATPA und ATPB) mit mehreren eindeutigen Peptiden in den Proben nachgewiesen (Anh. 2). Um weitere Kontaminationen des Immunopräzipitationsexperiments herausfiltern zu können, wäre es sinnvoll, das Experiment mit Protein A-Sepharose *beads* zu wiederholen, an denen unspezifische Antikörper wie etwa aus einem Prä-Immuns serum gekoppelt wurden.

3.2 Tic23 ist ein Protein der inneren Chloroplastenhüllmembran

Nachdem gezeigt wurde, dass Tic23 mit dem 1 MDa TIC-Komplex in einer BN-PAGE läuft und mit den Komponenten des Komplexes interagiert, sollte durch eine Fluoreszenzmikroskopie die Lokalisation von Tic23 *in vivo* bestimmt werden. Zuerst wurden die Vollängenproteine von Tic23 und seinem Homolog Pss1 mit eYFP-Protein als Reporter fusioniert und anschließend in Protoplasten transformiert. Die Expression der Konstrukte wurde dann am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop untersucht. Mit den Vollängenproteinkonstrukten von Tic23 und Pss1 konnte keine eindeutige Lokalisierung der Proteine nachgewiesen werden (Anh. 3). Hierbei kam es lediglich zu Ansammlungen im Cytosol von den Fusionskonstrukten, die nicht in den Chloroplasten transportiert werden konnten.

Um eine Aggregatbildung zu verhindern, wurden in einem weiteren Experiment nur die ersten 100 N-terminale Aminosäuren von Tic23 sowie Pss1 mit eYFP-Protein fusioniert und anschließend in Protoplasten transformiert. Erneut wurde die Expression der Konstrukte am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop untersucht. Hierbei wurde zum einen die Autofluoreszenz der Chloroplasten sowie die eYFP Fluoreszenz detektiert. In einem Überlagerungsbild wurden beide Signale kombiniert, um eine mögliche Ko-Lokalisation beider Signale zu erkennen.

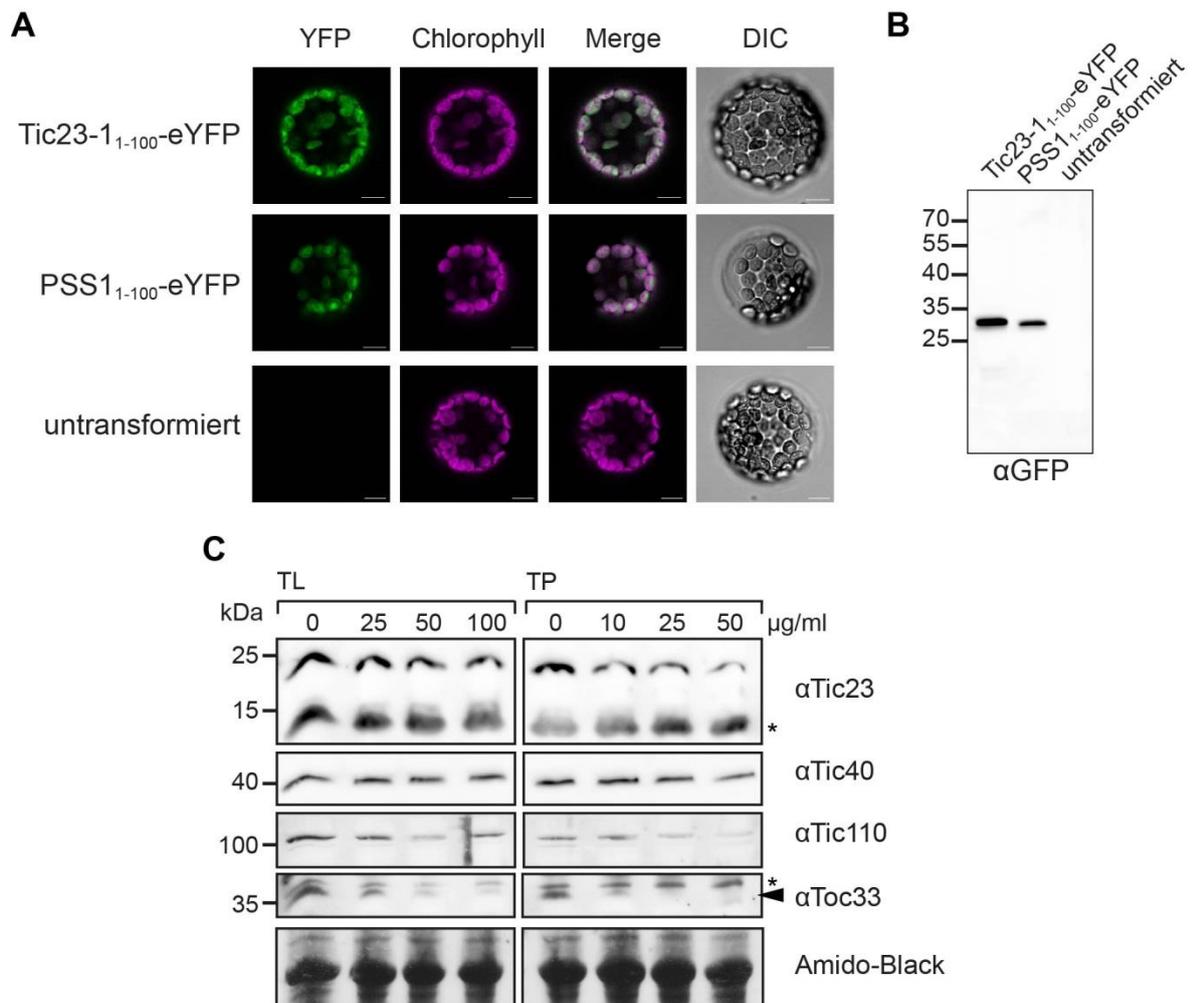


Abbildung 7 Lokalisierung und Topologie von Tic23 (A) Fluoreszenzmikroskopie. Protoplasten aus Wildtyp Col-0 wurden mit Plasmiden, in denen die ersten 100 Aminosäuren von Tic23 bzw. Pss1 mit einem eYFP fusioniert waren, transformiert und mittels Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie analysiert. eYFP Fluoreszenz wurde auf der linken Seite (grün) und Chlorophyll Autofluoreszenz auf der mitte-linken Seite (magenta) gezeigt. Eine Überlagerung von den beiden Signalen von eYFP und Chlorophyll sieht man auf dem dritten Bild (Merge) und eine Differentialinterferenzkontrast Aufnahme (DIC) auf dem vierten Bild. Die Abbildungen sind repräsentativ. Maßstab 10 μM (B) Western-Blot Analyse der transformierten Protoplasten mit anti-GFP Antikörper. Die Fusionsproteine von Tic23 und Pss1 befinden sich bei dem gleichen Molekulargewicht. (C) Proteaseschutzverdau. Isolierte Chloroplasten aus 2 Wochen alten Wildtyp Col-0 Pflanzen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Thermolysin (TL) und Trypsin (TP) behandelt. Proben wurden mit Hilfe eines Western-Blots und den angegebenen Antikörpern analysiert. Das Experiment wurde in drei biologischen Replikaten durchgeführt. Die Abbildung ist repräsentativ. Der schwarze Pfeil weist auf das Toc33 Signal. Sternchen markieren Kreuzreaktionen der Antikörper.

Für beide Fusionskonstrukte von Tic23 und Pss1 wurden deutliche Signale detektiert (Abb. 7 A). Durch die Überlagerung der Signale mit der Autofluoreszenz der Chloroplasten konnte eine Ko-Lokalisation beider Signale gesehen werden. Wie zu erwarten, wurde in der Kontrolle von den untransformierten Protoplasten, kein Signal

für das eYFP detektiert, sondern nur die Autofluoreszenz der Chloroplasten. Damit wiesen beiden Proteine Tic23 und Pss1 ein funktionales Transitpeptid auf, welches zum Import der Fusionskonstrukte in den Chloroplasten führte.

Um die Prozessierung der Fusionsproteine zu bestätigen, wurde eine Western-Blot Analyse mit den Proteinextrakten aus den transformierten Protoplasten durchgeführt (Abb. 7 B). Bei der Detektion der Fusionskonstrukte mit Antikörpern gegen GFP waren Signale für Tic23₁₋₁₀₀-eYFP bei einem Molekulargewicht von 31 kDa und für Pss1-eYFP bei einem Gewicht von 27,2 kDa zu erwarten. Es wurde ein Signal für das Fusionskonstrukt von Tic23₁₋₁₀₀-eYFP auf der erwarteten Höhe von circa 31 kDa detektiert. Für Pss1₁₋₁₀₀-eYFP befand sich das Signal über der erwarteten Höhe. Damit weist Pss1 vermutlich ein kleineres Transitpeptid auf, als es vom TargetP Programm vorhergesagt wurde. Insgesamt bestätigten die Ergebnisse, dass die Proteine in den Protoplasten prozessiert vorlagen.

Somit deuten die Ergebnisse auf einen Konflikt mit den publizierten Daten zu Pss1 hin. Für Pss1 wurde eine Lokalisation an der Plasmamembran von epidermalen Zellen aus Tabakpflanzen (*N. benthamiana*) postuliert (Wang et al., 2018a).

Durch die vorherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Tic23 in der Hüllmembran der Chloroplasten verankert ist. Da es nur eine Transmembrandomäne aufweist, ist die Frage zu beantworten, in welcher Orientierung Tic23 in der Membran vorliegt. Tic23 könnte auf zwei Arten in die Membran inseriert werden: Zum einen könnte Tic23 zuerst vollständig in den Chloroplasten importiert werden, um dann nach der Prozessierung in die innere Hüllmembran eingebracht zu werden. Über diese Variante wäre der N-Terminus von Tic23 im Intermembranraum. Zum anderen könnte Tic23 während seiner Translokation direkt in die innere Hüllmembran integriert werden und damit würde der N-Terminus vom Protein in das Stroma reichen. Ein Beispiel für diesen Importweg ist Toc75 an der äußeren Hüllmembran. Toc75 weist eine poly-Glycin Sequenz auf, die wichtig für seine Lokalisierung an der äußeren Hüllmembran ist (Inoue & Keegstra, 2003).

Daher wurde die Topologie von Tic23 in der Membran experimentell ermittelt. Hierfür wurden isolierte Wildtyp-Chloroplasten mit verschiedenen Konzentrationen der Proteasen Thermolysin und Trypsin behandelt. Durch die unterschiedliche Membrangängigkeit der Proteasen sollten Aussagen über das vorhandene Tic23 in der inneren Hüllmembran getroffen werden. Thermolysin kann die äußere

Hüllmembran der Chloroplasten nicht durchdringen und verdaut daher nur Proteine an seiner Außenseite. Hingegen kann Trypsin die äußere Hüllmembran überwinden und schneidet Proteine, die in den Intermembranraum hineinreichen oder sich in diesem befinden. Die Proben dieses Experiments wurden über einen Western-Blot analysiert. In allen Versuchsansätzen konnten Signale für Tic23 detektiert werden (Abb. 7 C). In den Trypsin Proben ist aber mit zunehmender Konzentration der Protease eine Abnahme des Tic23 Signals zu erkennen. Außerdem wurde kein weiteres Signal für Tic23 im niedrigmolekularen Bereich detektiert, was ein Fragment von Tic23 darstellen könnte. Um verifizieren zu können, ob die Chloroplasten während der Isolation intakt geblieben sind, wurden die Proben mit verschiedenen Antikörpern getestet. Mit der Detektion von Toc33 wurde die Funktionalität von Thermolysin überprüft. Toc33 befindet sich in der äußeren Hüllmembran und seine GTPase Domäne zeigt in das Cytosol. Damit ist Toc33 anfällig für die Trypsin- und Thermolysin-Behandlung (Gutensohn et al., 2000). Hierbei wurden die stärksten Signale von Toc33 in den beiden unbehandelten Proben detektiert. In den Thermolysin behandelten Proben wurde eine deutliche Abnahme von Toc33 bei höheren Konzentrationen von der Protease beobachtet. Durch die Einbettung in den TOC-Komplex und in der Membran kam es aber zu keinen vollständigen Abbau von Toc33 (Abb. 7 C, Pfeil zeigt Toc33 an). In den mit Trypsin behandelten Chloroplasten wurde kein Toc33 detektiert, was den erwartete Verdau von Toc33 durch Trypsin zeigte. Da Tic40 und Tic110 in der inneren Hüllmembran liegen und in das Chloroplastenstroma hineinreichen, sollten sie vor dem Verdau durch Thermolysin und Trypsin geschützt sein. In den Ergebnissen zeigten die Detektionen beider Proteine in allen Proben Signale. Die Tatsache, dass für Tic110 eine geringe Abnahme bei höheren Trypsinkonzentrationen zu sehen war, deutet daraufhin, dass die Chloroplasten durch die Isolation leicht labil geworden sind. Im Vergleich wurde ein stärkeres Signal für Tic23 in den Proben, die mit einer höheren Trypsinkonzentration behandelt wurden, detektiert als bei den restlichen Antikörpernachweisen (α Tic40 und α Tic110). Dieser Unterschied deutet auf eine komplette Resistenz von Tic23 gegenüber der Degradation der Proteasen hin und bestätigt damit die Lokalisation von Tic23 in der inneren Chloroplastenhüllmembran. Da Tic23 eine Transmembrandomäne besitzt, könnte durch den gezielten Abbau eines Endterminus eine Aussage über die Orientierung des Proteins in der Membran getroffen werden. In diesem Experiment konnten keine kleineren Abbauprodukte des

Trypsinverdau von Tic23 detektiert werden. Somit konnte keine präzise Aussage bezüglich der Lokalisation des N- oder C-Terminus von Tic23 getroffen werden.

3.3 Die Abundanz von Tic23 ist abhängig von den Komponenten des 1 MDa TIC-Komplexes

In manchen Fällen ist die Stabilität eines Multiproteinkomplexes von der Präsenz seiner einzelnen Komponenten abhängig. Dies ist z.B. beim 1 MDa Tic-Komplex der Fall (Kikuchi et al., 2013). Um mögliche Auswirkungen verschiedener Mutationen im Proteinimportkomplex auf Tic23 zu untersuchen, wurde die Abundanz von Tic23 in unterschiedlichen Mutanten bestimmt. Hierfür wurde eine Western-Blot Analyse mit Gesamtzellextrakt aus den Mutanten *tic56-3*, *tic56-1*, *tic20-1*, *ppi2* und Spectinomycin behandelter Wildtyppflanzen durchgeführt. Zur Beschreibung der Mutanten: Die beiden Mutanten *tic56-3* und *tic56-1* weisen kein Vollängenprodukt von Tic56 auf. Dies resultiert in veränderten Phänotypen, wobei *tic56-3* einen hellgrünen und *tic56-1* einen Albinophänotyp aufweisen. In Pflanzen kann die chloroplastidäre Proteinsynthese durch Spectinomycin gehemmt werden und somit werden die in den Chloroplasten kodierten Proteine nicht mehr synthetisiert. Da Tic214 die einzige Komponente des 1 MDa TIC-Komplexes ist, die im Chloroplastengenom kodiert wird, hemmt Spectinomycin seine Synthese (Wirmer & Westhof, 2006). Eine weitere Mutante des 1 MDa TIC-Komplexes ist die *tic20-1* Mutante. In dieser wird kein Tic20-1 exprimiert, was sich als Albinophänotyp äußert. Als Mutante des TOC-Komplexes wurde die *ppi2* Mutante untersucht. Die *ppi2* Pflanzen weisen kein Toc159 Protein auf. Da Toc159 eine besondere Rolle im Import von kern-kodierten Proteinen spielt, zeigen die *ppi2* Pflanzen aus diesem Grund ebenfalls einen Albinophänotyp auf.

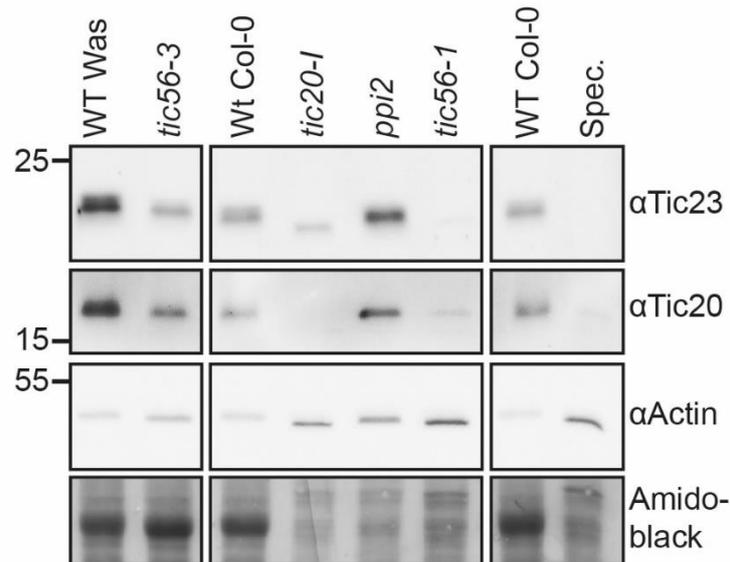


Abbildung 8 Abundanz von Tic23 in Mutanten des Proteinimports. Aus den verschiedenen Mutanten, die auf $\frac{1}{2}$ MS-Platten mit 3 % Sucrose für 2 Wochen gewachsen waren, wurde das Gesamtzellextrakt mit Hilfe eines Western-Blots aufgetrennt. Anschließend wurden die Signale der angegebene Antikörper detektiert. n = 1

In Abbildung 8 wurden die Ergebnisse für die Mutanten, die einen Defekt im Proteinimport zeigen, dargestellt. In vier dieser Mutanten konnte eine Abnahme in der Tic23 Proteinmenge nachgewiesen werden. Dabei lag Tic23 in der *tic20-1* und der *tic56-3* Mutante in deutlich reduzierter Menge vor. Zu einem vollständigen Verlust von Tic23 kam es in der *tic56-1* Mutante und in den Pflanzen, die mit Spectinomycin behandelt wurden. Das bedeutet, dass Tic23 möglicherweise bei den beiden letztgenannten Pflanzenlinien nicht in den 1 MDa TIC-Komplex eingebaut wird und somit instabil in der Pflanze vorliegt.

Wird im Gegensatz dazu die Tic23 Proteinmenge in der *ppi2* Mutante betrachtet, in der das Rezeptorprotein Toc159 des TOC-Komplexes fehlt, konnte keine Abnahme der Proteinmenge detektiert werden. Es zeigte sich, dass die Abundanz von Tic23 unabhängig von einer Mutation im TOC-Komplex auftrat. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Akkumulation von Tic23 und dem TOC-Komplex unabhängig voneinander erfolgt. Neben dieser Erkenntnis deuten die Daten daraufhin, dass die Proteine Tic214 und Tic56 für das Vorkommen von Tic23 benötigt werden, Tic20 dagegen nicht im gleichen Maße.

Da Tic20 das Kanalprotein des 1 MDa TIC-Komplexes darstellt, wurde anhand des Tic20-Antikörpers der Einfluss der Mutation auf den 1 MDa TIC-Komplex überprüft. Durch diese Kontrolluntersuchung war es möglich, einen Zusammenhang von Tic23

mit dem 1 MDa TIC-Komplex zu sehen. Es konnte erwartet werden, dass durch den Wegfall von Tic20 ebenfalls die Proteinmengen der 1 MDa TIC-Komplexkomponenten reduziert sind. Daher wurde zuerst die *tic20-1* Mutante betrachtet. In *tic20-1* wurde kein Signal für das Protein detektiert, welches die Mutation bestätigte. Eine deutliche Reduzierung der Proteinmenge von Tic20 wurde in den Pflanzen, die mit Spectinomycin behandelt wurden, sowie in *tic56-3* und *tic56-1* beobachtet. Demgegenüber wurde erneut ein Anstieg der Proteinmenge von Tic20 in der TOC-Komplexmutante *ppi2* detektiert. Zusammen bestätigten beide Ergebnisse, dass die Akkumulation des 1 MDa TIC-Komplexes unabhängig vom TOC-Komplex war. So führte die Reduzierung verschiedener Komponenten des 1 MDa TIC-Komplexes zum Rückgang der Tic23 Abundanz und zeigte damit eine Abhängigkeit von Tic23 vom Komplex. Zusammen mit den Daten der BN-PAGE und der Ko-Immunopräzipitation ließ sich eine direkte Interaktion von Tic23 mit dem 1 MDa TIC-Komplex zeigen.

3.4 Eine Mutation im *TIC23* Gen führt zu einem hellgrünen Phänotyp

Um Hinweise auf eine mögliche Funktion des Tic23 Proteins zu bekommen, wurde der Einfluss von Mutationen im *TIC23* Gen untersucht. Hierfür wurden verschiedene T-DNA Insertionsmutanten vom *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* bestellt. Diese Mutationslinien wurden durch eine ungerichtete Transformation, bei der ein 5 bis 25 kb großes T-DNA Stück in ein Gen inseriert wurde, generiert. Dadurch entstand eine Bibliothek an möglichen Mutanten und je nachdem, wo sich die Insertion im Gen befindet, können *knock-out* oder *knock-down* Mutationen entstehen (Krysan et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurden für das *TIC23* Gen (AT2G43630) zwei Mutantenlinien verwendet, die ihre Insertion entweder in der Promotorregion oder im letzten Exon des Gens aufweisen (Abb. 9 A). Hierbei wurde die Mutante mit der Insertion im Promotorbereich *tic23-1* genannt und die Mutante, die die Mutation im letzten Exon aufweist, *tic23-2*. Da eine überlappende Funktion von Tic23 mit seinem Homolog *PSS1* aus *A. thaliana* (AT3G59640) nicht ausgeschlossen werden kann, wurde *Pss1* in dieser Studie ebenfalls berücksichtigt.

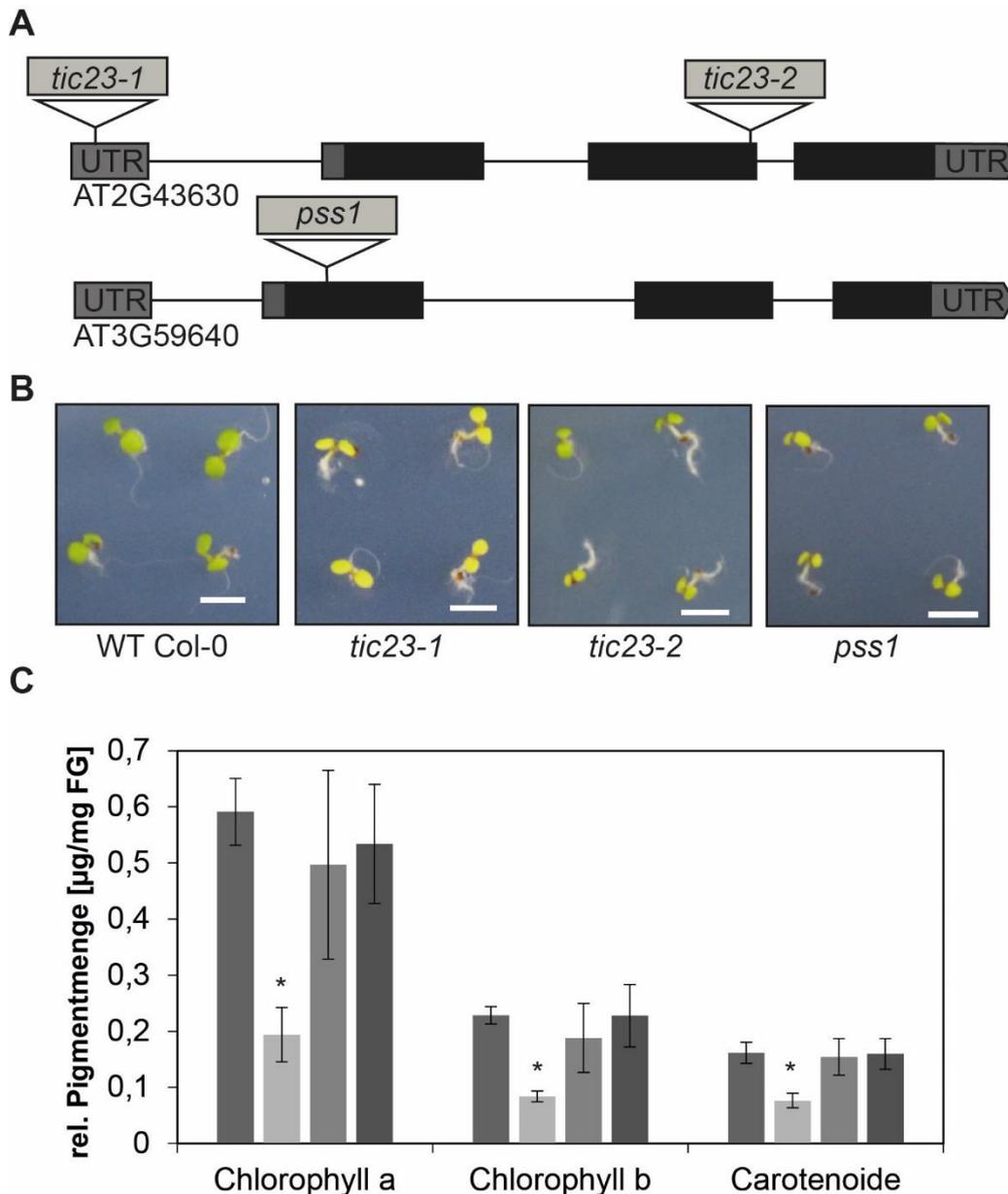


Abbildung 9 Phänotypische Analyse der T-DNA Insertionsmutanten. (A) Genstruktur von Tic23 und Pss1. Es wurden die vorhergesagten Insertionsstellen eingezeichnet. (B) Phänotypen der untersuchten Mutanten. Die Pflanzen sind für 1 Woche auf $\frac{1}{2}$ MS-Platten mit 0,8 % Sucrose gewachsen. Maßstab beträgt 3 mm. (C) Pigmentmengenbestimmung. Von 1 Woche alten Pflanzen wurden das Frischgewicht und die Pigmentmengen ermittelt. Die Pigmentmenge wurde normalisiert auf das Frischgewicht dargestellt. Die Balken zeigen die Standardabweichung. Sternchen zeigen eine signifikante Änderung gegenüber der Wildtyp-Kontrolle nach Auswertung über eine Student's T-test an, Sternchen – $p < 0,05$. $n=3$

Daher wurde die bereits beschriebene T-DNA Insertionsmutante *pss1* für die weiteren Untersuchungen verwendet (Sumit et al., 2012). Zuerst wurde geprüft, welchen Einfluss die Mutation auf den Phänotypen der Pflanzen hat. Es zeigte sich, dass die *tic23-1* Mutante einen hellgrünen Phänotyp im Alter von einer Woche aufwies. Die

Mutanten *tic23-2* und *pss1* hingegen schienen kleiner als der Wildtyp zu sein, aber zeigten keine Veränderung in der Blattfärbung zu diesem (Abb. 9 B).

Die Bestimmungen der Pigmentgehalte der einzelnen Mutanten bestätigten diesen optischen Eindruck und ergaben einen signifikanten Unterschied zwischen der *tic23-1* Mutante zu den anderen Pflanzenlinien (Abb. 9 C). So wurde in der *tic23-1* Mutante die geringste Chlorophyll a, Chlorophyll b und Carotinoid Menge gemessen, was den hellgrünen Phänotypen erklärte.

Während der Charakterisierung der *tic23-1* Mutanten wurde eine phänotypische Abhängigkeit vom Alter entdeckt. Daher wurde die Entwicklung der Pflanzen näher untersucht. Die Pflanzen wurden über einen Zeitraum von drei Wochen kultiviert und ihr Pigmentgehalt im Alter von ein, zwei und drei Wochen bestimmt (Abb. 10). Hierbei passte sich die äußere Erscheinung der *tic23-1* Mutante nach drei Wochen an den Wildtyp an. Die anschließenden Pigmentanalysen der Pflanzen bestätigten den optischen Eindruck. So konnte in der *tic23-1* Mutante zunächst eine Verminderung aller Pigmente gemessen werden, bis sich die Pigmentmengen nach drei Wochen dem Niveau des Wildtyps angleichen. Die signifikanten Unterschiede der Pigmentmengen, die in ein und zwei Wochen alten Pflanzen gemessen wurden, hoben sich dadurch ebenfalls auf. Nebendies wurde im direkten Vergleich sichtbar, dass die Mutantenlinien *tic23-1*, *tic23-2* und *pss1* im gleichen Wachstumsstadium kleiner als der Wildtyp waren. So wiesen die Mutantenlinien nach 2 Wochen Wachstum nur 4 Rosettenblätter auf, die sich noch nicht vollständig ausgedehnt haben. Im Vergleich konnten beim Wildtyp schon die Ansätze des fünften und sechsten Rosettenblatts wahrgenommen werden. Diese Entwicklung zeigte sich auch mikroskopisch in der Ultrastruktur der Chloroplasten. Hierfür wurden die Chloroplasten von ein und zwei Wochen alten Pflanzen von *tic23-1* und dem Wildtyp Col-0 mit einem Transmissionselektronenmikroskop von Dr. Gerd Hause aufgenommen (Anh. 7). In den Bildern war zu erkennen, dass sich in den Chloroplasten der *tic23-1* Mutante weniger Thylakoidmembranen befanden, welche einen großen weißlichen Bereich im Stroma einschlossen. Im Verhältnis zum Wildtyp war dieser Stromabereich deutlich vergrößert. Erst in den Chloroplasten aus zwei Wochen alten Pflanzen bildete sich diese Zone zurück und es formten sich mehr Thylakoidmembranen.

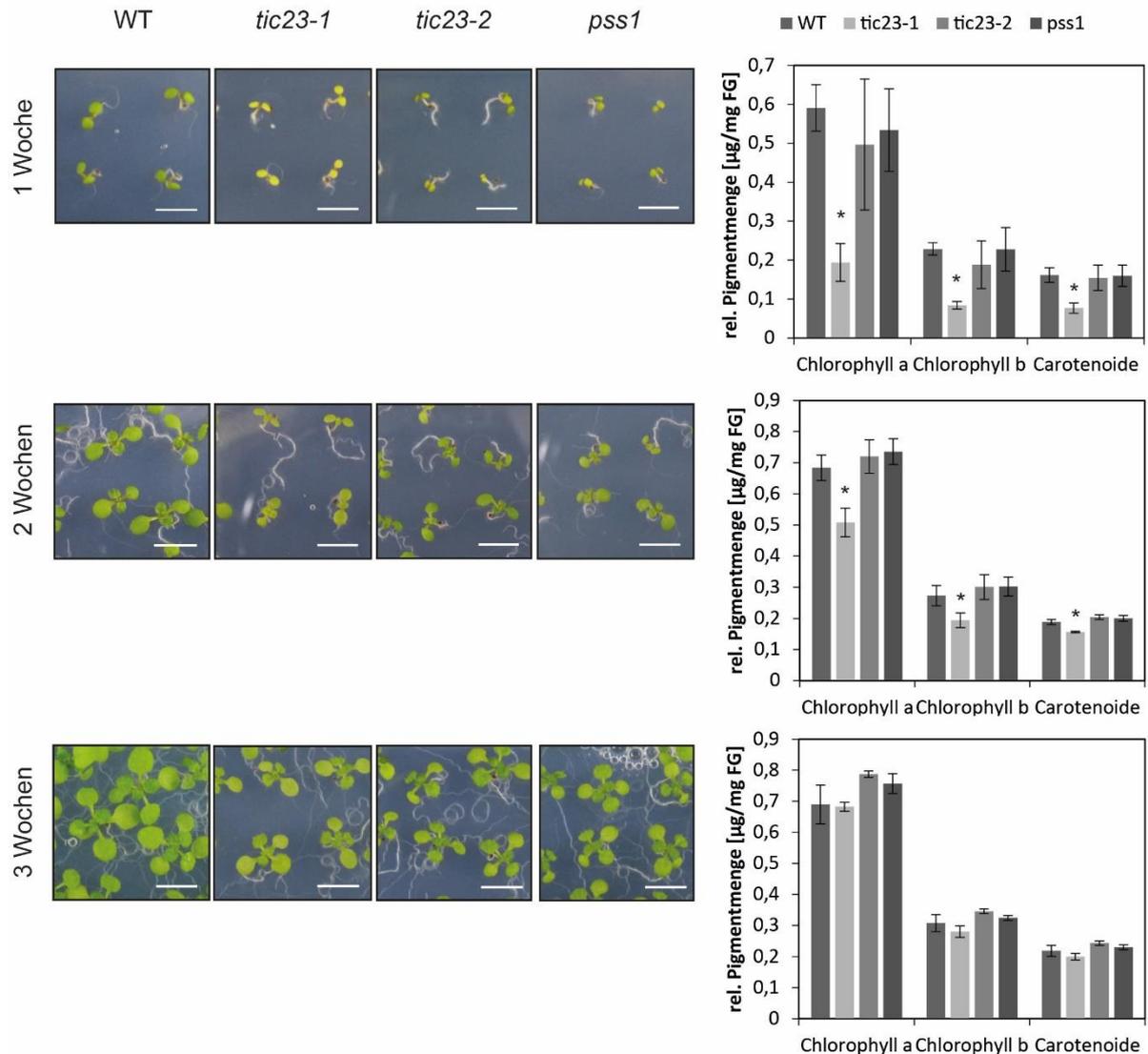


Abbildung 10 Vergleichende Altersentwicklung von den T-DNA Insertionsmutanten. Phänotyp und Pigmentbestimmung von 1 Woche, 2 Wochen und 3 Wochen alten Pflanzen der Mutanten *tic23-1*, *tic23-2* und *pss1* im Vergleich zum Wildtyp Col-0. n=3, Maßstab = 5 mm, Sternchen – p < 0,05

Durch die Zunahme an Thylakoiden könnten mehr Pigmententhaltene Komplexe in den Membranen der *tic23-1* Mutante eingelagert werden, woraus eine phänotypische Anpassung der Mutante resultierte. Durch die Untersuchungen zur Altersabhängigkeit konnte das ideale Alter für folgende Experimente ermittelt werden. Es zeigte sich, dass zwei Wochen alte Pflanzen die besten Voraussetzungen haben, um sowohl einen möglichst großen Effekt von der Mutation zu sehen, als auch vor dem Hintergrund der geringen Größe der einen Wochen alten Pflanzen, die die technische Handhabung der Pflanzen beeinträchtigt.

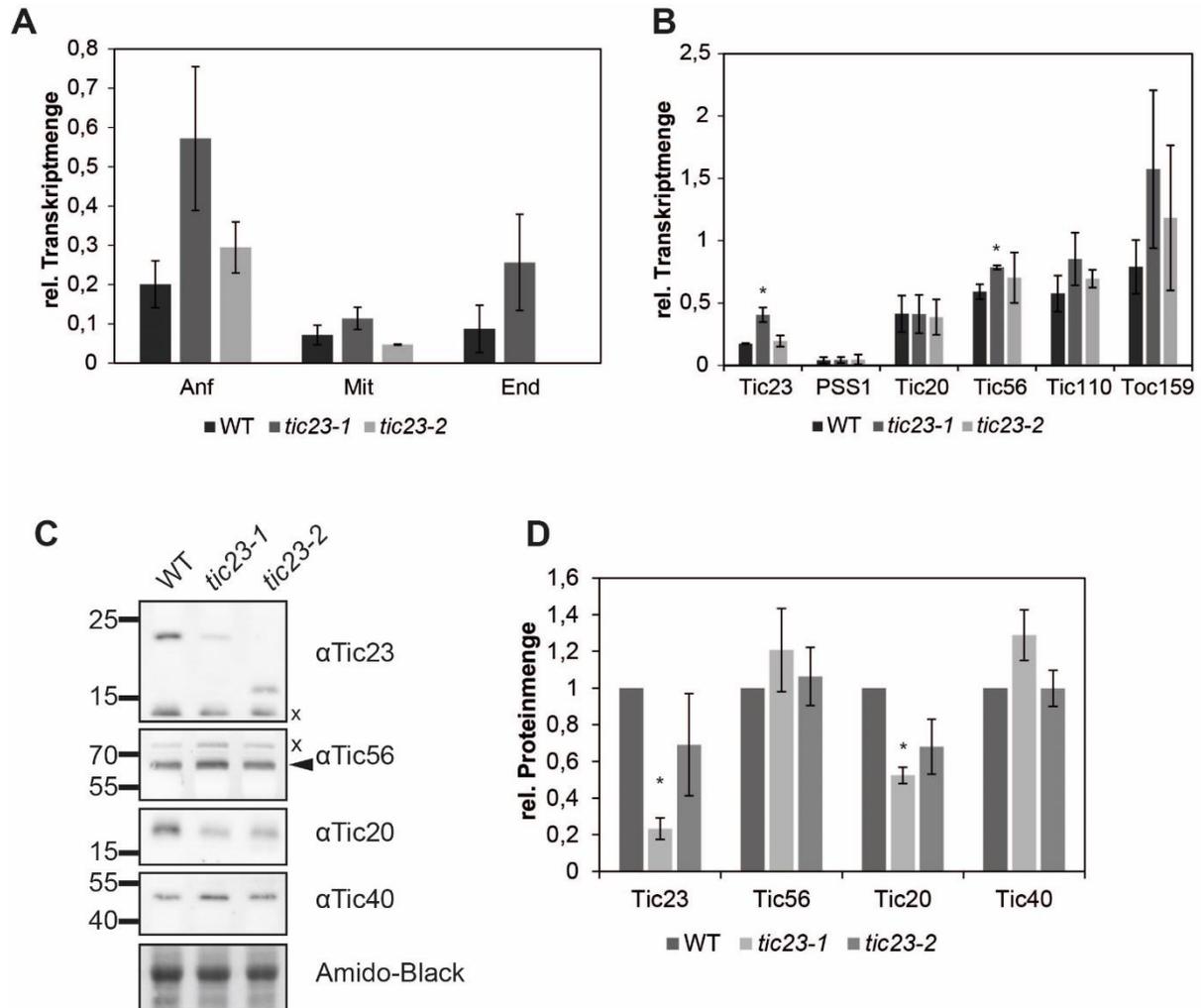


Abbildung 11 Transkript- und Proteinmenge von Tic23 in den Tic23 Mutanten. (A) Transkriptgehalt verteilt über das *TIC23* Gen. Es wurden verschiedene Primerpaare benutzt, die am Anfang, in der Mitte und am Ende des Gens verteilt waren. Die Transkriptmengen wurden auf die Transkriptmenge des Referenzgens Aktin 7 (AT5G09810) normalisiert. n=3 (B) Transkriptgehalt von Importkomponenten. Die Transkriptmengen wurden auf die Transkriptmenge des Referenzgens Aktin 7 (AT5G09810) normalisiert. n=3 (C) Western-Blot Analyse der Tic23 Mutanten. Die Abundanz der angegebenen Proteine wurde aus Gesamtzellextrakt aus 2 Wochen alten Pflanzenmaterial durch Immunodetektion ermittelt. Der schwarze Pfeil markiert das spezifische Antikörpersignal von Tic56. Die Kreuze markieren die Kreuzreaktionen der Antikörper. (D) Quantitative Auswertung der Western-Blot Analysen. Es wurden die Intensität der einzelnen Bandensignale mit der Software ImageJ gemessen und diese auf das Amido-Black Signal der RuBisCO Bande normiert. Sternchen – $p < 0,05$, n=3

Daher wurde die anschließende Analyse der Transkript- und Proteinmenge mit zwei Wochen alten Pflanzen durchgeführt. Hierbei wurde überprüft, ob sich die phänotypischen Unterschiede der *tic23-1* Mutanten ebenfalls in der Abundanz von Tic23 niederschlagen. Zuerst wurde eine Transkriptanalyse mit drei verschiedenen Primerpaaren durchgeführt, wobei die Primer über das gesamte *TIC23* Gen verteilt

waren. So konnten alle drei Exons des Gens amplifiziert werden. In der Analyse wurde das *TIC23* Transkript in der *tic23-1* Mutante von allen Primerpaaren in einem größeren Maße amplifiziert (Abb. 11 A).

Hierbei wurde ein Unterschied um den Faktor 2,8 bei allen Primerpaaren im Vergleich zum Wildtyp festgestellt. Die größte Transkriptmenge wurde für das Primerpaar gemessen, das im ersten Exon des Gens lag. Daher wurde dieses für die weiteren *TIC23* Transkriptanalysen verwendet. Des Weiteren wurde in der *tic23-2* Mutante kein Transkript für das Primerpaar im letzten Exon detektiert. Da durch die T-DNA Insertion der Bereich, der durch das gewählte Primerpaar umspannt wird, in der Mutante verlängert vorlag, reichte die Elongationszeit nicht für Amplifikation aus. Somit weist dieses Ergebnis darauf hin, dass der letzte Abschnitt von *TIC23* in der *tic23-2* Mutante durch die T-DNA Insertion verändert wurde und so eine Abweichung im Protein vorliegen könnte. Als weiteres wurden die Transkriptmengen vom Homolog *PSS1* sowie von weiteren Importkomponenten bestimmt (Abb. 11 B). Hierfür wurden Primerpaare ausgewählt und auf ihre Spezifität getestet. Anschließend wurden die Transkriptmengen in einer vergleichenden Analyse in drei biologischen Replikaten ermittelt. Hierbei konnte sowohl für *PSS1* wie auch *TIC20* keine Veränderung zwischen den Mutanten und dem Wildtyp festgestellt werden. Bei den Genen von *TIC56*, *TIC110* und *TOC159* wurde jeweils eine Erhöhung der Transkriptmengen gemessen. Diese Unterschiede fielen bei der *tic23-1* Mutante größer aus als bei der *tic23-2* Mutante. Die größte Zunahme wurde bei dem *TOC159* Transkript gemessen. So verdoppelte sich dieses Transkript in der *tic23-1* Mutante und in *tic23-2* um das 1,5-fache. Für *TIC56* wurde eine signifikante Erhöhung um den Faktor 1,3 in der *tic23-1* Mutante festgestellt. Im Vergleich zum Wildtyp war die Transkriptmenge in der *tic23-2* Mutante nur um den Faktor 1,2 erhöht. Für die Importkomponente *TIC110*, die nicht zum 1 MDa TIC-Komplex gehört, wurde eine Zunahme der Transkriptmenge von 1,5 in der *tic23-1* Mutante und von 1,2 in der *tic23-2* Mutante festgestellt.

In der anschließenden Proteinanalyse mit Hilfe eines Western-Blots wurden die Mengen von den 1 MDa TIC-Komplexkomponenten bestimmt. Hierbei wurde zum einen der Einfluss der Mutationen auf die Proteinebene überprüft. Im Speziellen könnte sowohl die Menge, als auch der Aufbau des Proteins durch die Mutation verändert sein. Zum anderen könnte durch eine Veränderung am Tic23 Protein, dem eine Interaktion mit dem 1 MDa TIC-Komplex nachgewiesen wurde, ein Effekt auf den TIC-Komplex

aufzutreten. Zuerst wurden die Tic23 Mengen in beiden Mutanten *tic23-1* und *tic23-2* betrachtet. So wurde eine deutliche Reduzierung von der Menge in beiden Mutanten nachgewiesen (Abb. 11 C). Gleichzeitig wurde in der *tic23-2* Mutante eine Verkürzung von Tic23 gezeigt, die dazu führte, dass das Tic23 Protein nur circa 17 kDa groß war. Durch die Quantifizierung der Western-Blots von drei biologischen Replikaten mit dem Programm ImageJ konnte der optische Eindruck verifiziert werden (Abb. 11 D). Die Messungen ergaben, dass die Proteinmenge der verkürzten Variante in der *tic23-2* Mutante nur circa 60 % des Wildtyps betrug. Des Weiteren zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen *tic23-1* und dem Wildtyp. So war im Vergleich zum Wildtyp nur 20 % von der Tic23 Proteinmenge in der *tic23-1* Mutante vorhanden.

Als weitere Komponenten des 1 MDa TIC-Komplexes wurden Tic56 und Tic20 getestet. Während für Tic56 ein stärkeres Signal in der *tic23-1* Mutante detektiert wurde, war in der *tic23-2* Mutante die Proteinmenge im Vergleich zum Wildtyp unverändert. Somit deutet das Ergebnis auf eine unabhängige Akkumulation von Tic56 zum Tic23 Protein hin. Im Gegensatz dazu wurden für das Tic20 Protein eine Reduzierung der Mengen festgestellt. In beiden Mutanten nahm die Tic20 Abundanz um circa die Hälfte im Vergleich zum Wildtyp ab. Somit war die Akkumulation von Tic20 abhängig von Tic23. Als vom 1 MDa TIC-Komplex unabhängiges Protein wurde Tic40 als Kontrolle in den Western-Blot Analysen genauer betrachtet. Tic40 ist eine Komponente des publizierten TIC-Komplexes, der aus Tic40 und Tic110 besteht (Chou et al., 2003), und ist nicht in seiner Stabilität abhängig von den 1 MDa TIC-Komplexkomponenten. In dieser vergleichenden Analyse zwischen den Mutanten und dem Wildtyp waren die Proteinmengen von Tic40 in den Mutanten *tic23-1* und *tic23-2* unverändert. Dieses Ergebnis zeigte die Unabhängigkeit von Tic23 von Tic40 und damit auch vermutlich von dem Komplex, in dem Tic40 enthalten war.

3.5 Proteomänderung in der *tic23-1* Mutante

Eine Mutation in einem Protein kann die komplette Physiologie einer Pflanze beeinflussen. Um einen Überblick über die Veränderung einzelner Proteine und somit über eine mögliche Änderung der Biogenese der *tic23-1* Mutante zu erhalten, wurde

eine vergleichende quantitative Proteomanalyse von Chloroplasten der *tic23-1* Mutante und dem Wildtyp Col-0 durchgeführt. Die Chloroplastenproteine wurden aus zwei Wochen alten Pflanzen in drei unabhängigen Experimenten (biologischen Replikaten) extrahiert und anschließend tryptisch in-Lösung verdaut. Die drei biologischen Replikate wurden in je drei technischen Replikaten massenspektrometrisch gemessen.

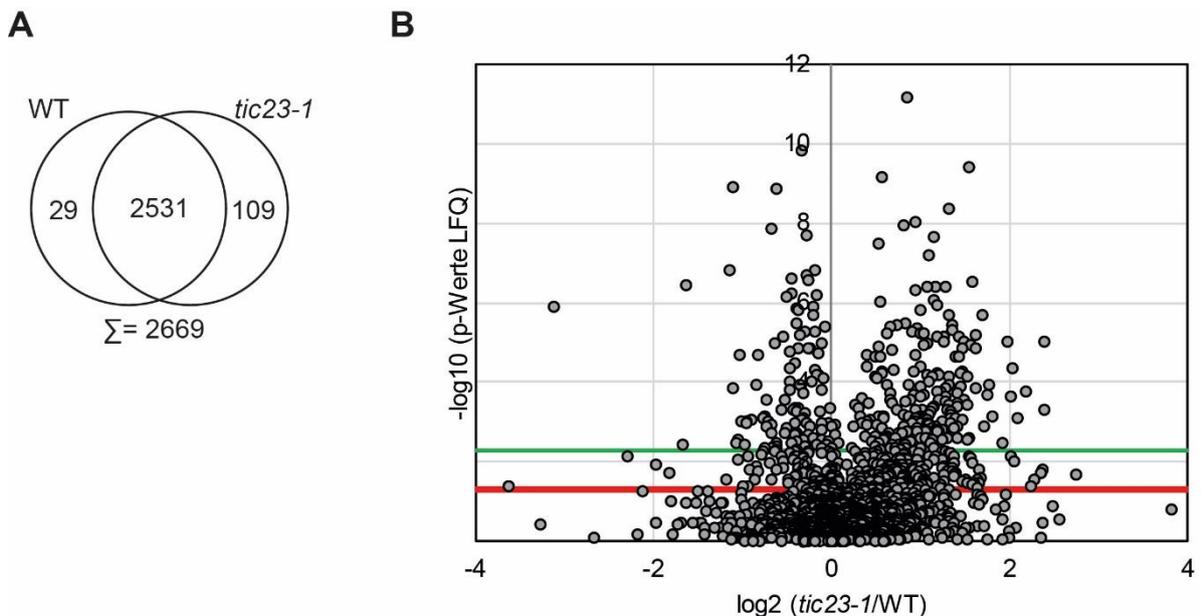


Abbildung 12 vergleichende Proteomanalyse zwischen *tic23-1* und Wildtyp. (A) Venn-Diagramm zur MS-Analyse des Chloroplastenproteoms von *tic23-1* im Vergleich zum Wildtyp Col-0 mit der Anzahl an identifizierten Proteinen. (B) Streudiagramm mit 2669 Proteine des Vergleichs von *tic23-1* und dem Wildtyp Col-0. Es zeigt die Regulation quantifizierter Proteine von *tic23-1* im Verhältnis zum WT in Abhängigkeit zum entsprechenden p-Wert (t-Test). Rote Linie markiert eine Signifikanz von 0,05. Die grüne Linie markiert die Bonferroni-korrigierte Signifikanz. Messungen erfolgten aus drei biologischen Replikaten mit jeweils drei technischen Replikaten.

So konnten insgesamt 2669 Arabidopsis Proteine identifiziert werden. Von diesen wurden 27 Proteine nur im Wildtyp gemessen und alleinig in *tic23-1* wurden 109 Proteine gefunden (Abb. 12 A). Um die Signifikanz der Veränderungen zu verdeutlichen, wurden die Verhältnisse der Proteinkonzentrationen von *tic23-1* zum Wildtyp in Abhängigkeit zu ihren p-Wert (t-Test) dargestellt (Abb. 12 B). Hierbei wurden zwei Signifikanzgrenzen gesetzt; zum einen dass der p-Wert kleiner oder gleich 0,05 (rote Linie in Abb. 12 B) war und zum anderen wurde der p-Wert 0,05 nach der Bonferroni-Holm Methode korrigiert (grüne Linie in Abb. 12 B). Durch diese Korrektur wurden signifikante Veränderungen der Proteine stringent identifiziert, da die

Kumulierung von Fehlern bei multiplen Vergleichen berücksichtigt wurde. Insgesamt wurden so 300 signifikant veränderte Proteine zwischen Wildtyp und *tic23-1* ermittelt; von diesen wurden 99 runter- und 201 hochreguliert. Dabei waren die Proteinmengen von 8 der 99 runterregulierten Proteinen der Mutante im Vergleich zum Wildtyp um die Hälfte reduziert und die Proteinmengen von 47 der 201 hochregulierten Proteine zweifach erhöht.

Die Proteine aus dem Chloroplastenproteom wurden verschiedenen Funktionen zugeordnet. Zuerst wurden die Proteine des Proteinimports betrachtet (Tab. 1).

Tabelle 1 Veränderungen der Proteinimportkomponenten. Es wurde das Verhältnis der LFQ von der Mutante *tic23-1* zum Wildtyp Col-0 und anschließend die Signifikanz über einen T-Test bestimmt.

AGI Locus	Funktion	Peptide	<i>tic23-1</i> /WT LFQ	t-test LFQ
AT1G02280.2	Toc33	7	1,670	0,0015
AT3G46740.1	Toc75-III	17	1,334	0,0020
AT3G17970.2	Toc64-III	6	1,490	0,0158
AT5G05000.3	Toc34	2	1,036	0,4267
AT4G02510.4	Toc159	13	1,061	0,8008
AT2G43630.1	Tic23	1	0,395	0,1118
ATCG01130.1	Ycf1 protein	17	1,218	0,1786
AT5G22640.1	Tic100	8	1,003	0,9821
AT5G01590.1	Tic56	8	1,745	7,03E-06
AT2G24820.1	Tic55-II	16	0,938	0,2353
AT1G06950.1	Tic110	46	1,479	1,10E-08

Bei den Messungen konnten sowohl alle Komponenten des TOC-Kernkomplexes als auch des 1 MDa TIC-Komplexes detektiert werden. So zeigte sich, dass Toc33 und Toc75-III in der *tic23-1* Mutante erhöht vorlagen. Toc159 sowie Toc34 waren von dieser Veränderung nicht betroffen.

Die massenspektrometrischen Ergebnisse bestätigten die Western-Blot Analysen der 1 MDa TIC-Komplexkomponenten. Im Vergleich zum Wildtyp konnte eine geringere Menge von Tic23 in der *tic23-1* Mutante gemessen werden, die hier jedoch nur ein einzelnes Peptid identifiziert und zur Quantifizierung genutzt werden konnte. So ist der

Ergebnisse

Mengenvergleich zwischen Wildtyp und *tic23-1* Mutante unzuverlässig (siehe auch p-Wert in Tabelle 1). Neben diesen Ergebnissen konnte auch eine signifikante Erhöhung von Tic56 und Tic110 gemessen werden. Die Ergebnisse beider Proteine unterstützten ebenfalls die Western-Blot Analysen, die eine Erhöhung von Tic56 und Tic40 zeigten. Da Tic110 und Tic40 einen Komplex bilden, können diese bei einem Prozess im gleichen Maß reguliert werden. Somit ist davon auszugehen, dass bei der Erhöhung der einen Komponente auch die andere Komponente zunimmt. Für die anderen Komponenten des 1 MDa TIC-Komplexes wurden keine signifikanten Veränderungen in der *tic23-1* Mutante festgestellt.

Des Weiteren wurde die Photosynthese relevanten Proteine genauer betrachtet. Die signifikant veränderten Proteine in dieser Kategorie zeigten eine Reduzierung des Photosystems II (Tab. 2). Die berechneten Unterschiede zwischen der Mutante und dem Wildtyp erklärten ebenfalls den hellgrünen Phänotyp der *tic23-1* Mutante, die durch eine Reduzierung der Pigmente verursacht wurden. Damit einhergehend verringerte sich die Anzahl der Thylakoidmembranen (Anh. 7) und führte somit zur Abnahme der Proteinmengen der LHCs sowie auch die der Photosystemkomponenten. Über die Gesamtheit der Photosynthese-relevanten Proteine nahm ihre Abundanz um rund 20 % ab. Hierbei wurde die größte Reduzierung bei Lhcb4.3 (AT2G34430) gemessen. Die Proteinmenge von Lhcb4.3 betrug nur circa 40 % der detektierten Menge im Wildtyp. Im Gegensatz dazu zeigten die identifizierten, signifikant veränderten Proteine des Photosystems I entweder eine Erhöhung (AT1G49975.1) oder nur eine geringe Abnahme in der Proteinmenge (AT4G12800.1).

Tabelle 2 signifikant veränderte Komponenten der Lichtsammelkomplexe und der Photosysteme. Es wurde das Verhältnis der LFQ von der Mutante *tic23-1* zum Wildtyp Col-0 und anschließend die Signifikanz über einen T-Test bestimmt.

AGI Locus	Funktion	Peptide	<i>tic23-1</i> /WT LFQ	t-test
				LFQ
AT4G21280.1	photosystem II subunit QA light harvesting complex of	24	0,696	1,43E-10
AT4G10340.1	photosystem II 5	24	0,750	1,55E-06
AT3G08940.2	light harvesting complex photosystem II	16	0,740	5,42E-06

Ergebnisse

	photosystem II stability/assembly			
AT5G23120.1	factor%2C chloroplast (HCF136)	26	0,729	1,46E-05
AT1G77090.1	thylakoid lumenal protein	6	0,556	2,05E-05
AT5G01530.1	light harvesting complex photosystem II	13	0,694	3,27E-05
	light harvesting complex photosystem II			
AT1G15820.1	subunit 6	15	0,610	4,56E-05
ATCG00680.1	photosystem II reaction center protein B	24	0,885	6,36E-05
	photosystem II light harvesting complex			
AT2G05070.1	protein 2.2	12	0,702	9,63E-05
AT4G12800.1	photosystem I subunit I	9	0,730	9,85E-05
AT2G40100.1	light harvesting complex photosystem II	6	0,445	0,00013
AT3G50820.1	photosystem II subunit O-2	27	0,844	0,00052
AT4G05180.2	photosystem II subunit Q-2	16	1,312	0,00098
	light-harvesting chlorophyll-protein			
AT2G34430.1	complex II subunit B1	14	0,412	0,00101
AT1G49975.1	photosystem I reaction center subunit N	5	1,580	0,00103
AT5G11450.1	PsbP domain protein	5	1,395	0,00197
	photosystem II reaction center PSB28			
AT4G28660.1	protein	3	0,808	0,00557
AT4G21280.1	photosystem II subunit QA	24	0,696	1,43E-10

Um einen weiteren Eindruck der Veränderung in der Mutante zu erhalten, wurden die Proteine, die um den Faktor 2 erhöht waren, vertieft betrachtet (Anh. 5). Von den 47 Proteinen mit erhöhter Proteinmenge gehörten 17 der Proteinklasse der ribosomalen Proteine an. Hierbei waren Proteine der großen und der kleinen Untereinheit der Ribosomen gleichermaßen betroffen. Neben diesen Proteinen zeigten auch die chloroplastidär kodierten RNA-Polymerase Untereinheiten alpha und beta eine Verdoppelung der Proteinmenge in der *tic23-1* Mutante auf. Beide Proteinklassen deuteten auf eine mögliche Störung in der Chloroplastenentwicklung hin. Durch die Erhöhung dieser Proteine könnte die Pflanze versuchen, die Reduzierung von Tic23 zu kompensieren und wäre so in der Lage, sich in einem späteren Entwicklungsstadium dem Wildtyp anzupassen. Bei der Interpretation dieser Daten ist

jedoch Vorsicht geboten, da sich aus der Reduktion photosynthetischer Proteine Normalisierungseffekte ergeben, die konstitutiv exprimierte Proteine höher abundant erscheinen lassen (Motohashi et al., 2012). Im Weiteren wurden die Proteine, die reduziert in der *tic23-1* Mutante vorlagen, genauer betrachtet (Anh. 6). Insgesamt konnten 99 signifikant herunterregulierte Proteine identifiziert werden. Neben den bereits genannten Proteinen, die Bestandteile der Lichtsammelkomplexe oder der Photosysteme sind, wurden für weitere Photosynthese relevante Proteine eine Reduzierung festgestellt. So konnten 44 Proteine Reaktionen der Photosynthese zugeordnet werden. Die restlichen Proteine gehörten verschiedenen Stoffwechselwegen der Pflanzen an. Hierbei wurde den einzelnen Wegen nicht mehr als vier Proteinen zugewiesen. Diese Ergebnisse legten erneut eine Veränderung der Photosynthese in der *tic23-1* Mutante dar, die schlussendlich in einem hellgrünen Phänotyp resultierte.

3.6 Der *tic23-1* Phänotyp kann komplementiert werden

Von den untersuchten T-DNA Insertionsmutanten zeigte nur die *tic23-1* Mutante einen hellgrünen Phänotyp. Diese Mutante wies ihre Insertion in der Promotorregion des Gens auf, was, wie gezeigt, zu einer höheren Expression des Gens und eine Reduzierung der Proteinmenge führte. Das benachbarte Gen AT2G43620, das der Chitinase Proteinfamilie angehört, ist in *reverse* Richtung auf dem Chromosom kodiert und somit befinden sich die Promotorregionen von Tic23 und AT2G43620 im gleichen Genbereich. Daher wurde durch eine Transkriptmengenanalyse überprüft, ob die phänotypischen Effekte der *tic23-1* Mutante eventuell durch das benachbarte Gen hervorgerufen wurden. Hierfür wurde eine vergleichende qRT-PCR zwischen den Mutanten *tic23-1*, *tic23-2*, *pss1* und dem Wildtyp Col-0 durchgeführt. Untersucht wurden Tic23 sowie seine benachbarten Gene AT2G43620 und AT2G43640. In drei biologischen Replikaten zeigte sich, dass im Vergleich zum Wildtyp nur das Tic23 Transkript in der *tic23-1* signifikant erhöht war (Anh. 4). Für die benachbarten Gene AT2G43620 und AT2G43640 wurden in allen Mutanten keine signifikant erhöhten oder reduzierten Transkriptmengen gemessen. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass AT2G43620 einen Effekt in der *tic23-1* Mutante hatte.

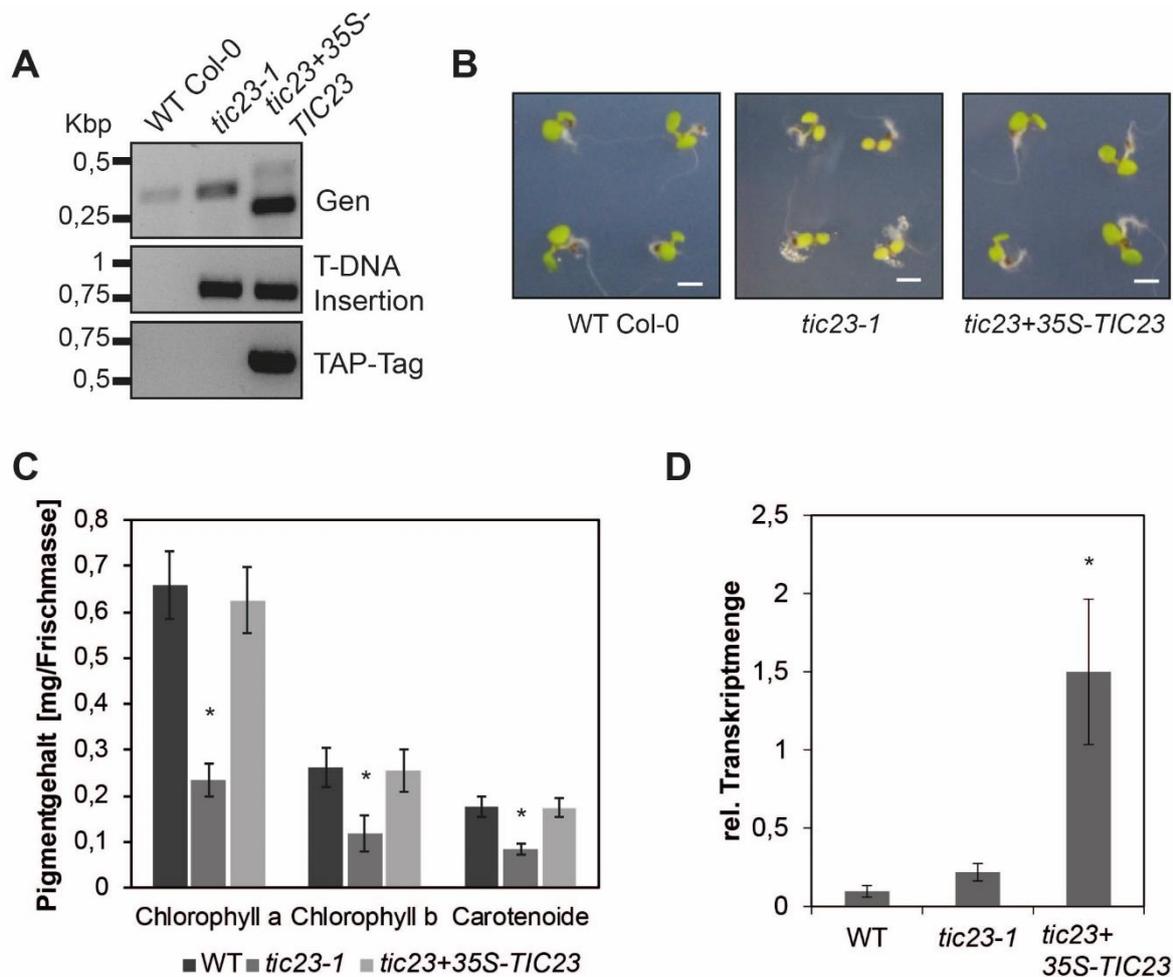


Abbildung 13 Analyse der generierten Komplementationslinie *tic23+35S-TIC23* der *tic23-1* Mutation. (A) Kontroll-PCR zur Homozygotie von *tic23+35S-TIC23*. (B) Phänotyp der homozygoten *tic23+35S-TIC23* Mutante im Vergleich mit *tic23-1* und Wildtyp. Die Pflanzen sind eine Woche auf ½ MS-Platten gewachsen. Maßstab 3 mm. (C) Pigmentbestimmung und (D) Analyse der Transkriptmenge der *tic23+35S-TIC23* Mutante im Vergleich mit *tic23-1* und Wildtyp Col-0. Von einen Wochen alten Pflanzen wurden zuerst das Frischgewicht und die Pigmentmengen ermittelt. Die Pigmentmenge wurde normalisiert auf das Frischgewicht dargestellt. Die Transkriptmengen wurden auf die Transkriptmenge des Referenzgens Aktin 7 (AT5G09810) normalisiert dargestellt. Die Balken zeigen die Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten. Sternchen – $p < 0,05$.

Durch das externe Einbringen von Tic23 in die *tic23-1* Mutante sollte überprüft werden, ob die Effekte der Mutation kompensiert werden können und die Mutante komplementiert wird. Hierfür wurde die *tic23-1* Mutante mit einem pEG205-*TIC23* Plasmid transformiert. Wie bereits die Ergebnisse zur Tic23 Lokalisation mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie (Anh. 3) darauf hinwiesen, beeinträchtigte ein C-terminaler Tag scheinbar den Import des exprimierten Tic23 Proteins in den Chloroplasten und führte so zur Aggregatbildung im Cytosol. Daher wurde für diese Komplementation ein Stopp-Codon vor dem TAP-Tag des Plasmids eingesetzt, um eine Expression des Tags zu verhindern. Nach der Transformation wurden in der folgenden Generation die

Pflanzen mit BASTA selektiert. Insgesamt wurden 15 resistente Pflanzen vereinzelt und zur Samenreife gebracht. In zwei Linien konnte die T-DNA-Insertion nachgewiesen werden. Diese Linien wurden weiter verwendet und in der folgenden Generation wurde eine 3:1 Verteilung von resistenten zu sensitiven Pflanzen bei einer Linie festgestellt. Von dieser wurden 10 Pflanzen vereinzelt. In der folgenden Generation konnte von vier Pflanzenlinien eine vollständige Resistenz gegenüber BASTA festgestellt werden (Anh. 9). Diese unterschieden sich phänotypisch nicht untereinander. Daher wurde in dieser Arbeit eine Linie näher charakterisiert und deren Homozygotie durch eine PCR bestätigt (Abb. 13 A). Hierfür wurden drei verschiedene Primerpaare genutzt. Das erste Primerpaar überspannte ein Intron im Gen. Zu erwarten war, dass im Wildtyp sowie in den Mutanten *tic23-1* und der Komplementationslinie *tic23+35S-TIC23* ein circa 300 bp großes DNA-Stück amplifiziert wird. In allen Pflanzenlinien wurde das erwartete DNA-Stück detektiert. Hierbei wies die Komplementationslinie hauptsächlich ein kleineres DNA-Stück auf, das circa 80 Basenpaare weniger aufwies und aus dem transformierten Konstrukt des Plasmids entstammte. Das zweite Primerpaar wurde für den Nachweis von der T-DNA Insertion verwendet. Hierbei bindet ein Primer in der T-DNA Insertion und der andere Primer im Gen. Somit konnte ein Produkt nur dann amplifiziert werden, wenn in der Pflanze eine Insertion vorliegt. Daher wurden für die *tic23-1* Mutante und die Komplementationslinie entsprechende Signale erwartet. Da lediglich im Wildtyp keine Insertion vorliegt, wurde in dieser Linie erwartungsgemäß kein Signal detektiert. Für die anderen Linien wurde ein Produkt für das Primerpaar amplifiziert. Das letzte Primerpaar überspannte den Übergang im Plasmid von der Tic23 cDNA zum TAP-Tag. Somit weist nur die Komplementationslinie ein Signal für dieses Primerpaar auf, da nur diese Linie diese Insertion besaß. Anhand der Genotypisierung wurde gezeigt, dass die generierte Komplementationslinie die gewünschte Insertion enthielt und durch die Selektion mit BASTA wurde eine homozygote Linie mit nur einer Insertion identifiziert.

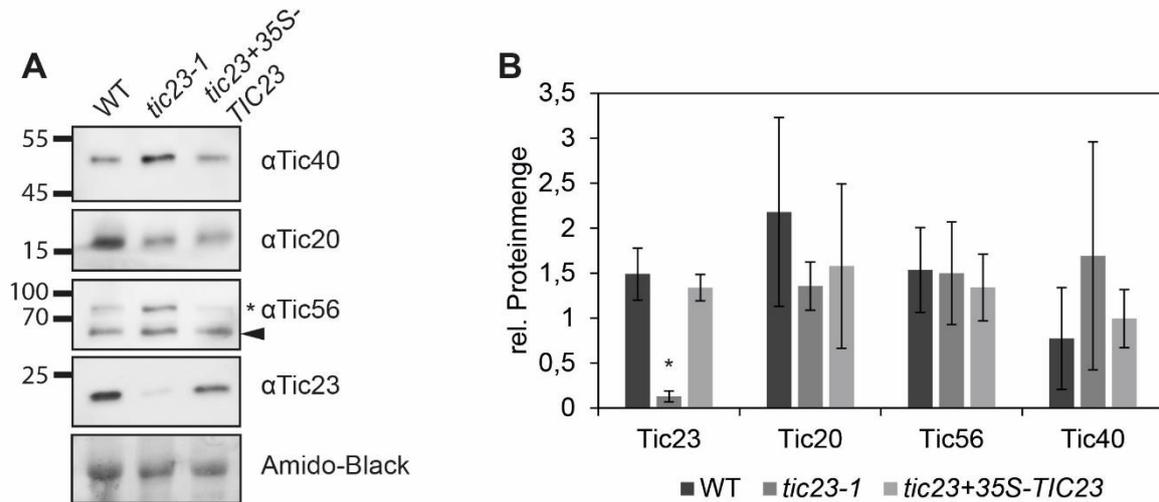


Abbildung 14 Western-Blot Analyse der *tic23+35S-TIC23* Komplementationslinie. (A) Western-Blot Analyse von unterschiedlichen Proteinen der TIC-Komplexe. Der Pfeil zeigte das spezifische Antikörpersignal an. Sternchen markiert die Kreuzreaktion der Antikörper. (B) Quantitative Auswertung der Western-Blot Detektionen. Es wurden die Intensitäten der einzelnen Bandensignale mit der Software ImageJ gemessen und diese auf das Amido-Black Signal der RuBisCO Bande normiert. Die Balken zeigen die Standardabweichung nach drei biologischen Replikaten an. Sternchen – $p < 0,05$

Zuerst wurde die Komplementationsmutante *tic23+35S-TIC23* phänotypischen mit der *tic23-1* Mutante und dem Wildtyp verglichen, wobei die *tic23+35S-TIC23* einen Wildtyp ähnlichen Phänotyp aufwies (Abb. 13 B). Eine anschließende Pigmentbestimmung bestätigte den optischen Eindruck, dass die *tic23+35S-TIC23* Mutante den gleichen Pigmentgehalt wie der Wildtyp Col-0 aufzeigte (Abb. 13 C). Daher wurde als nächstes die Transkriptmenge von *TIC23* in der *tic23+35S-TIC23* Linie untersucht. Die Transformation der Mutante mit dem pEG205-*TIC23*, in dem das Tic23 unter der Kontrolle des CaMV35S-Promoters stand, führte auf der Transkriptebene zu einer deutlich erhöhten Menge an *TIC23* in der Mutante (Abb. 13 D). Die *TIC23* Transkriptabundanz war in der Komplementationslinie um den Faktor 15 höher als im Wildtyp. In einer vergleichenden Western-Blot Analyse wurden die Proteinmengen der *tic23+35S-TIC23*, *tic23-1* und dem Wildtyp betrachtet (Abb. 14 A). Nach drei biologischen Replikaten wurde trotz hoher Transkriptmengen keine Erhöhung der Tic23 Proteinmenge in der *tic23+35S-TIC23* Mutante im Vergleich zum Wildtyp quantifiziert (Abb. 14 B). Somit schien die Proteinmenge von Tic23 gedeckelt zu sein. Diese Limitierung könnte verschiedene Gründe haben, wie beispielsweise die maximale Anzahl der 1 MDa TIC-Komplexe oder der Insertionsort von Tic23 in der

inneren Hüllmembran. Die anderen untersuchten Proteine im Western-Blot zeigten keine deutliche Veränderung zum Wildtyp. So wiesen alle Ergebnisse der Pigmentanalyse, des Phänotyps und der Proteinmengenbestimmung darauf hin, dass die *tic23-1* Mutante durch das externe Einbringen von Tic23 vollständig komplementiert wurde.

3.7 Durch gezieltes *gene silencing* kann der *tic23-1* Phänotyp hervorgerufen werden

Beim posttranskriptionellen *gene silencing* wird die mRNA des betroffenen Gens abgebaut. Somit wird in den betroffenen Pflanzen aus der mRNA des Zielgens wenig bis kein Protein synthetisiert. Hierbei kann entweder eine Suppression der Transkription (*transcriptional gene silencing* [TGS]) oder eine sequenzspezifische Degradation der mRNA (*posttranscriptional gene silencing* [PTGS]/RNA Interferenz [RNAi]) stattfinden (Agrawal et al., 2003). Die Pflanze nutzt diese Mechanismen für die Genregulation und für die Abwehr gegen eindringende Nukleinsäuren, Transposons und in vielen Kopien auftretend genomische Sequenzen (Bartel, 2004). Hierbei werden die Prozesse durch verschiedene kleine RNA Stücke in der Pflanze vermittelt. Ein gut untersuchtes Beispiel sind die *microRNAs*, die im Nukleus kodiert sind. In der Forschung wurden diese pflanzlichen Mechanismen ebenfalls verwendet, um spezifische Gene auszuschalten. Eine Möglichkeit stellen die *artificial microRNA* (amiRNA) dar, die so designt werden, dass sie komplementär zur Zielsequenz sind (Ossowski et al., 2008, Park et al., 2009). Mittels eines Plasmids wird die amiRNA amplifiziert und formt eine doppelsträngige RNA. Diese wird anschließend von DICER-LIKE1 erkannt und in einzelsträngige RNA gespaltet. Diese lagern sich an die mRNA des Zielgens an und führen zu der vollständigen Zerschneidung der mRNA. Dadurch kann das Zielprotein nicht synthetisiert werden.

Für diese Studie wurde ein Plasmid verwendet, in dem die amiRNA gegen das *TIC23* Transkript gerichtet war und das von Dr. Johannes Stuttmann zur Verfügung gestellt wurde. Die Besonderheit des Plasmids bestand darin, dass die amiRNA unter der Kontrolle eines Dexamethason induzierbaren Promotors stand und somit eine spätere Induzierung des *gene silencing* Effekts ermöglicht. Das Plasmid pTEI106-*TIC23* wurde stabil in Wildtyp Col-0 transformiert. Die nachfolgende Generation wurde auf BASTA

resistente Pflanzen selektiert. Insgesamt wurden 28 Pflanzen vereinzelt und zur Samenreifung gebracht. Die folgende Generation wurde auf BASTA-Platten ausgesät und anschließend über ihren Phänotypen gezählt. Von 15 ausgesäten Linien zeigten 11 Linien die erforderliche Segregation. Von diesen wurden jeweils 10 Pflanzen von fünf selektierten Linien vereinzelt und zur Samenreifung gebracht. In der nachfolgenden Generation wurden vier Pflanzen als homozygot identifiziert (Anh. 9). Hierbei gehörten jeweils zwei Pflanzen der gleichen Linie an. So zeigte nur eine Linie einen *silencing* Effekt bei den Induzierungsversuchen und wurde daher im Weiteren charakterisiert. Im Vergleich wurde anschließend die homozygote Linie mit *tic23-1* und dem Wildtyp auf ½ MS-Platten kultiviert, die entweder Dexamethason oder DMSO als Kontrolle enthielten. Nach einer Woche der Anzucht konnte ein veränderter Phänotyp der *sil-tic23* Linie auf den Dexamethason-Platten erkannt werden (Abb. 15 A). Diese Mutante zeigte auf den Dexamethason Platten, ebenso wie die *tic23-1* Mutante, einen hellgrünen Phänotyp. Auf den DMSO Platten wiesen die Mutante einen normal grünen Phänotyp auf. Somit konnte der *silencing* Effekt in der Mutante durch Dexamethason induziert werden.

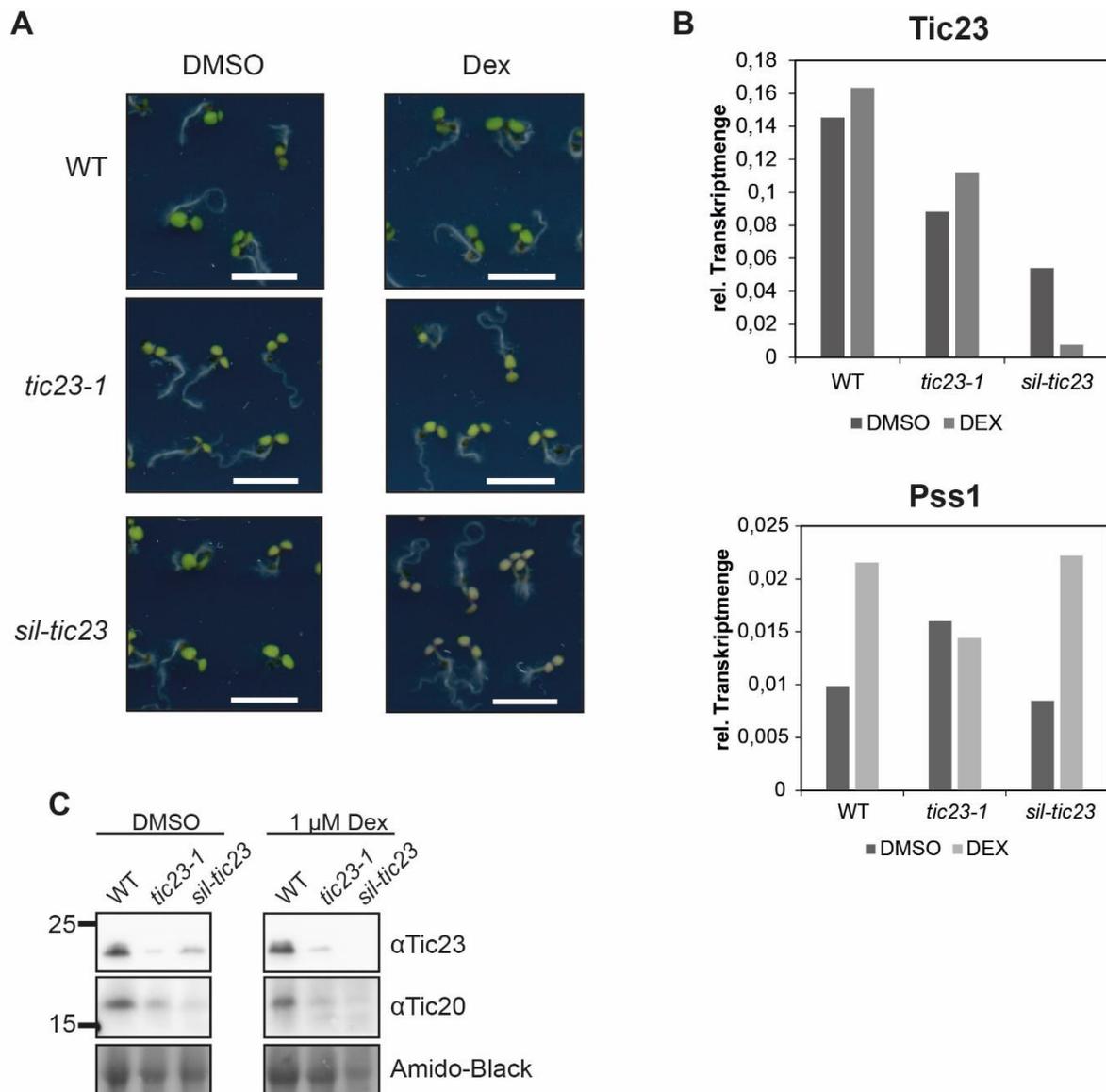


Abbildung 15 Charakterisierung einer Tic23 silencing Linie. (A) Phänotypische Analyse nach Induzierung des *silencing* Effekts. Die Linien *tic23-1*, *sil-tic23* und Wildtyp Col-0 wurden auf ½ MS-Platten mit 1 μM Dexmethason wachsen gelassen. Als Kontrolle wurden die Pflanzen auf Platten mit der gleichen Menge DMSO, die benötigt wurde, um 1 μM Dexamethason zu lösen, wachsen gelassen. (B) Analyse der Transkriptmenge während der Induzierung. Es wurden die Transkriptmengen von Tic23 und Pss1 in 2 Wochen alten Pflanzen *tic23-1*, *sil-tic23* und WT, die auf ½ MS-Platten mit Dexamethason bzw. DMSO gewachsen sind, bestimmt und anschließend auf die Transkriptmenge des Referenzgens Aktin 7 (AT5G09810) normalisiert dargestellt. n=1 (C) Western-Blot Analyse während der Induzierung. Es wurde die Tic23 und Tic20 Proteinmengen aus 2 Wochen alten induzierten Pflanzen mit den angegebenen Antikörpern bestimmt. Eine Amidoblack-Färbung diente als Ladekontrolle. n=1

Daher wurde als nächstes auf Transkriptebene der *gene silencing* Effekt untersucht (Abb. 15 B). Die Transkriptmengen von Tic23 und Pss1 wurden aus den induzierten Pflanzen mit den nicht induzierten Pflanzen verglichen. Hierbei wurde in der *sil-tic23*

Mutante eine geringere Tic23 Transkriptmenge als in der *tic23-1* Mutante ohne Induzierung gemessen. Die anschließende Induzierung führte zu einer deutlichen Reduzierung der Tic23 Transkriptmenge in der *sil-tic23* Mutante, wobei diese um mehr als die Hälfte reduziert war. Dahingegen führte die Induzierung in den Vergleichslinien zu einer geringen Zunahme des Transkripts.

Da das Homolog Pss1 die Funktion von Tic23 eventuell übernehmen könnte, wurde auch die Transkriptmenge von *PSS1* während der Induzierung überprüft. Hier konnte eine deutliche Erhöhung der Menge in der *sil-tic23* beobachtet werden, aber ebenso stieg die *PSS1* Transkriptmenge im Wildtyp an. Dies könnte ein Effekt der Induzierung sein oder aber ein Effekt von der Zugabe von DMSO, welches das Wachstum der Pflanzen negativ beeinflusst (Robison et al., 2006). In der *tic23-1* Mutante ist keine Veränderung des *PSS1* Transkripts zu messen.

Nachdem die Abnahme des *TIC23* Transkripts während der Induzierung in der *silencing* Mutante bewiesen wurde, wurde untersucht, ob sich der *silencing* Effekt auch auf die Proteinebene auswirkt. Hierfür wurden die induzierten Pflanzen und die nicht induzierten Pflanzen mit Hilfe eines Western-Blots analysiert. Pro Probe wurde eine Proteinmenge von jeweils 100 µg aufgetragen. Die Ladekontrolle des Blots mit Amido-Black weist nur bedingt die korrekte Lademenge an. Die Induzierung führte bei der *sil-tic23* Linie zu einem Albinophänotyp, mit dem eine Umwandlung des Stoffwechsels einherging. Somit weist die Ladekontrolle eine ungleichmäßige Verteilung der Proben nach. Während in den unbehandelten Pflanzen deutliche Signale für Tic23 detektiert werden konnten, wobei die *tic23-1* Mutante das schwächste Signal aufwies, wurde in der induzierten *sil-tic23* Mutante kein Tic23 Signal detektiert. Ebenso wurde eine Abnahme der Abundanz von Tic20 in der behandelten *sil-tic23* gemessen. Im Vergleich mit der nicht induzierten Probe wurde nur eine geringe Abnahme sichtbar, da schon in der unbehandelten *sil-tic23* Pflanzen weniger Tic20 vorhanden war als im Wildtyp. Trotz des anscheinend vollständigen Verlusts von Tic23 und der Reduzierung von Tic20, bis hin zu einem vollständigen Verschwinden, führte die Induzierung entgegen der Annahme nur zu einem hellgrünen Phänotyp, vergleichbar mit der *tic23-1* Mutante, oder einen noch stärker veränderten Phänotyp. Grundlegend müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die phänotypischen sowie biochemischen Veränderungen der Mutanten genauer bestimmen zu können.

3.8 Der *in vitro* Import in isolierte Chloroplasten verbessert sich in der *tic23-1* Mutante

In dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass Tic23 ein Teil des 1 MDa TIC-Komplexes ist. Ebenfalls hatte die *tic23-1* Mutante eine geringere Tic20 Menge, wobei Tic20 eine Pore in dem 1 MDa TIC-Komplex bildet. Daher sollte überprüft werden, ob die Mutation in *tic23-1* zu einem veränderten Import in der Mutante führt. Hierfür wurde ein radioaktives *in vitro* Importexperiment mit isolierten Chloroplasten aus zwei Wochen alten Pflanzen der *tic23-1* Linie und dem Wildtyp durchgeführt. Die Importkompetenz wurde mit zwei Standardsubstraten, der kleine Untereinheit von RuBisCO (SSU) und die E1 alpha Untereinheit von PHD (E1 α), getestet. Die Reaktionen der kinetischen Analyse wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend wurden die radioaktiven Signale der markierten Substrate über ein Phosphorimager ausgelesen.

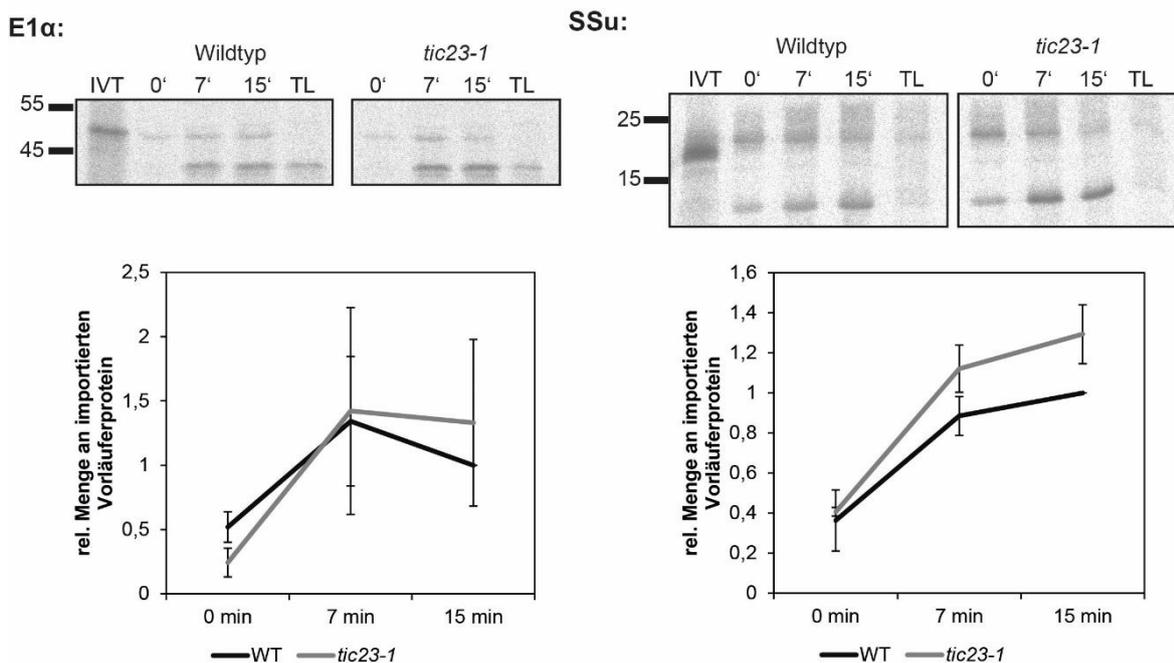


Abbildung 16 *In vitro* Importexperiment mit zwei verschiedenen radioaktiven Substraten.

Für das Experiment wurden Chloroplasten aus zwei Wochen alten Wildtyp Col-0 und *tic23-1* Pflanzen isoliert und diese wurden mit radioaktiv markierten E1 α und SSU Substraten (^{35}S -Methionin) in verschiedenen Zeitabständen inkubiert. Die Signale der Autoradiographie aus drei biologischen Experimenten wurden mit dem *BAS reader* aufgenommen und mit ImageJ quantifiziert. Anschließend wurden die Ergebnisse auf den 15 min Wert des importierten Substrats vom Wildtyp als 1 normalisiert. IVT – *in vitro* translatiertes Substrat, TL – Thermolysin behandelte Proben, n = 3

In den oberen Bildern der Abbildung 16 wurden die Phosphorimager Analysen des Importexperiments dargestellt. Im höheren molekularen Bereich des Gels waren die Signale des unprozessierten eingesetzten Vorläuferproteins zu sehen. Darunter konnten die importierten Proteine detektiert werden, die nach dem Import prozessiert wurden und durch die Entfernung des Transitpeptids ein geringeres Molekulargewicht aufwiesen. Zur Identifikation der importierten Form wurde zusätzlich eine 15 min Probe des Imports mit der Protease Thermolysin behandelt. Thermolysin kann aufgrund seiner Größe nicht durch die äußere Hüllmembran gelangen. Dadurch war die Protease in der Lage, die nicht importierten Vorläuferproteine an der Außenseite des Chloroplasts zu verdauen. Somit wiesen die Proben nur ein Signal für die importierte Form der beiden Substrate auf. Anschließend wurden die Signale der importierten Form für drei unabhängige Replikate mit dem *BAS reader* ausgelesen und mit ImageJ quantifiziert. Darauffolgend wurden die Daten auf den 15 min Wert der importierten Proteine des Wildtyps normalisiert und in einem Graphen dargestellt (untere Bilder in Abb. 16).

In den Graphen konnte die Zunahme an importierten Substraten über den untersuchten Zeitraum für alle Linien detektiert werden. Nach 15 min wurde insgesamt eine größere Menge der beiden Substrate in die *tic23-1* Mutante importiert als in den Wildtyp. Der Import vom E1 α Substrat sowie SSU Substrat war nach den 15 min Inkubationszeit in *tic23-1* um circa 30 % höher als im Wildtyp. Somit ließ sich feststellen, dass die *tic23-1* Mutante eine bessere Importrate im Vergleich zum Wildtyp aufwies.

3.9 Die Kreuzung *tic23-1* x *pss1* rettet partiell die *tic23-1* Mutationseffekte

Aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit besteht die Möglichkeit, dass Homologe einen Einfluss auf den gleichen Prozess haben und wären dabei in der Lage, die Funktion des jeweils anderen zu übernehmen. Für Pss1 bestand die Möglichkeit, dass es als einziges Homolog aus *A. thaliana* die Funktion von Tic23 übernehmen könnte. Somit könnte eine Doppelmutante von Tic23 mit seinem Homolog Pss1 zu einer größeren Veränderung der Pflanze führen.

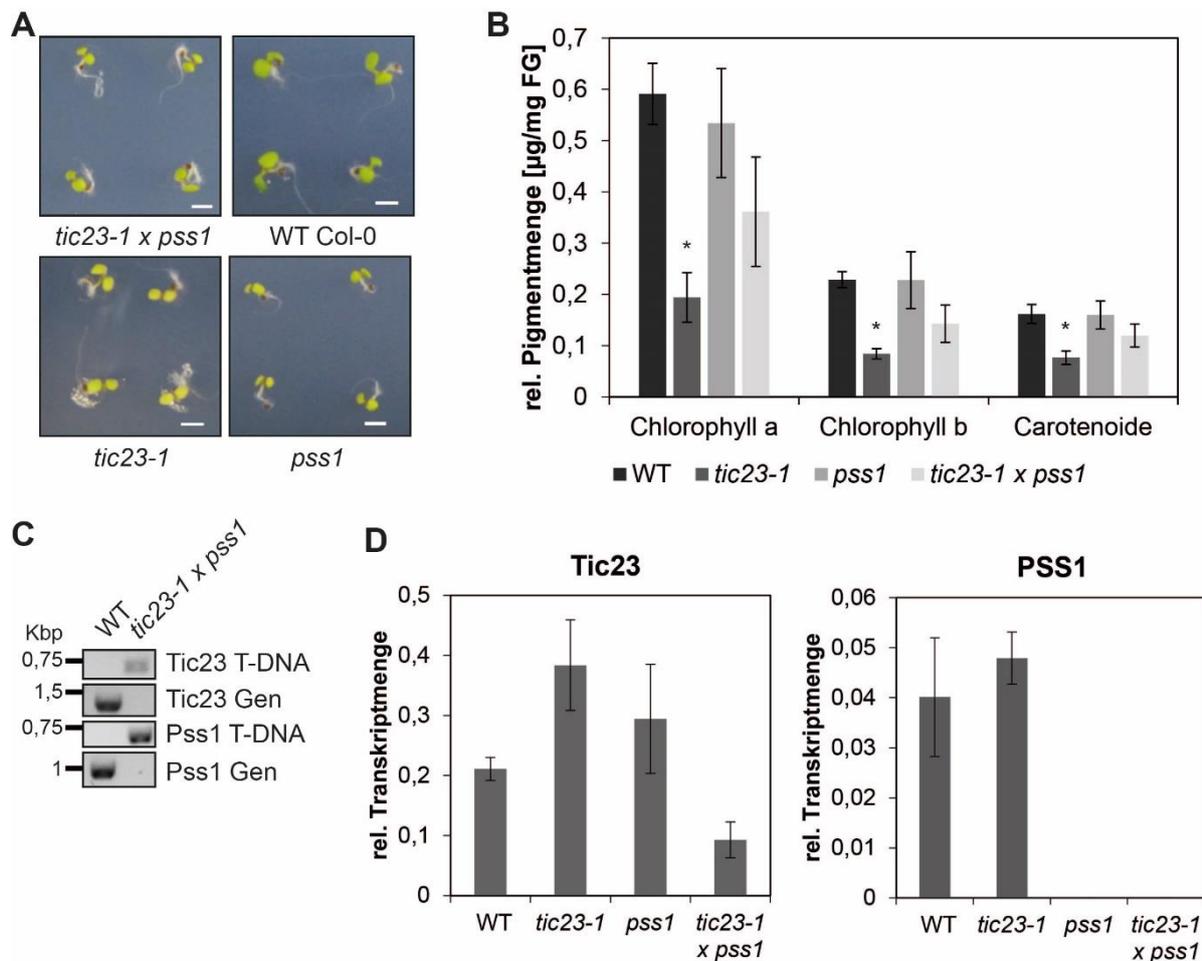


Abbildung 17 Analysen der generierten Kreuzungslinie *tic23-1 x pss1*. (A) Phänotyp der homozygoten *tic23-1 x pss1* Mutante im Vergleich zum Wildtyp und der Einzelmутanten. Pflanzen wuchsen auf $\frac{1}{2}$ MS-Platten für eine Woche. Maßstab beträgt 3 mm. (B) Genotypisierung der Doppelmutante. (C) Pigmentbestimmung. Das Frischgewicht und die Pigmentmengen wurden von einen Wochen alten Pflanzen ermittelt. Die Pigmentmenge wurde normalisiert auf das Frischgewicht dargestellt. $n=3$, Sternchen – $p<0,05$ (D) Transkriptmengenbestimmung. Die Transkriptmengen aus den 1 Woche alten Pflanzen wurden auf die Transkriptmenge des Referenzgens Aktin 7 (AT5G09810) normalisiert dargestellt. $n=3$, Sternchen – $p<0,05$

Daher wurden die beiden Mutanten *tic23-1* und *pss1* gekreuzt. In der folgenden Generation wurden 28 Pflanzen auf ihren Genotypen überprüft. Bis auf fünf waren alle Pflanzen doppelt heterozygot. Von den doppelt heterozygoten Pflanzen wurden vier Pflanzenlinien überprüft. Anhand einer Genotypisierung konnten doppelt homozygote Pflanzen identifiziert werden, die ab der folgenden Generation für weitere Experimente verwendet wurden (Anh. 10). Phänotypisch sowie in ihren Transkriptmengen und Proteinmengen von Tic23 unterschieden sich die Linien nicht voneinander. Daher wurde nur eine Linie in dieser Arbeit genauer charakterisiert. Für die Genotypisierung

wurden verschiedene Primerpaare verwendet. Zum einen wurden jeweils ein Paar eingesetzt, bei dem ein Primer in der T-DNA Insertion der Mutation und der andere Primer in der DNA-Sequenz des jeweiligen Gens banden. Zum anderen wurde ein Primerpaar verwendet, das den Insertionsbereich umspannt. Somit war zu erwarten, dass in der doppelt homozygoten Mutante nur Produkte für die T-DNA Insertionen amplifiziert werden können. Demzufolge würden in der Wildtyp Kontrolle nur Produkte für die Primerpaare amplifiziert werden, die in der originalen DNA-Sequenz der Gene *TIC23* und *PSS1* binden. Bei der Genotypisierung wurde gezeigt, dass die identifizierte Linie die zu erwartenden Produkte aufwies und somit doppelt homozygot war (Abb. 17 C). Phänotypisch schien die Doppelmutante *tic23-1 x pss1* etwas kleiner als der Wildtyp auszufallen, aber wies keine veränderte Pigmentierung auf (Abb. 17 A). Durch die Bestimmung der Pigmente konnte ermittelt werden, dass die Doppelmutante eine reduzierte Menge an Chlorophyll a, Chlorophyll b und Carotenoide im Vergleich zum Wildtyp und zu der Einzelmutante *pss1* aufwies (Abb. 17 B). Nur die Einzelmutante *tic23-1* hatte noch geringere Mengen an Pigmenten als die Doppelmutante. Dieses Ergebnis wies daraufhin, dass die *pss1* Mutation den Phänotyp von der *tic23-1* Mutante teilweise retten konnte. Durch eine qRT-PCR wurden die Transkriptmengen von *TIC23* und *PSS1* untersucht (Abb. 17 D). So wies die Kreuzung *tic23-1 x pss1* eine geringere Menge von *TIC23* auf als die *tic23-1*, *pss1* Linien und der Wildtyp auf. Im Wildtyp und der *tic23-1* Mutante konnte *PSS1* Transkript amplifiziert werden. Im Gegensatz dazu wurden in *pss1* sowie *tic23-1 x pss1* Produkte amplifiziert, die einen anderen Schmelzpunkt hatten als im Wildtyp und *tic23-1*. Damit konnten in der *pss1* Mutante und der Doppelmutante keine spezifischen Transkriptprodukte von *PSS1* gemessen werden und somit kann in diesen Mutanten kein Pss1 Protein exprimiert werden.

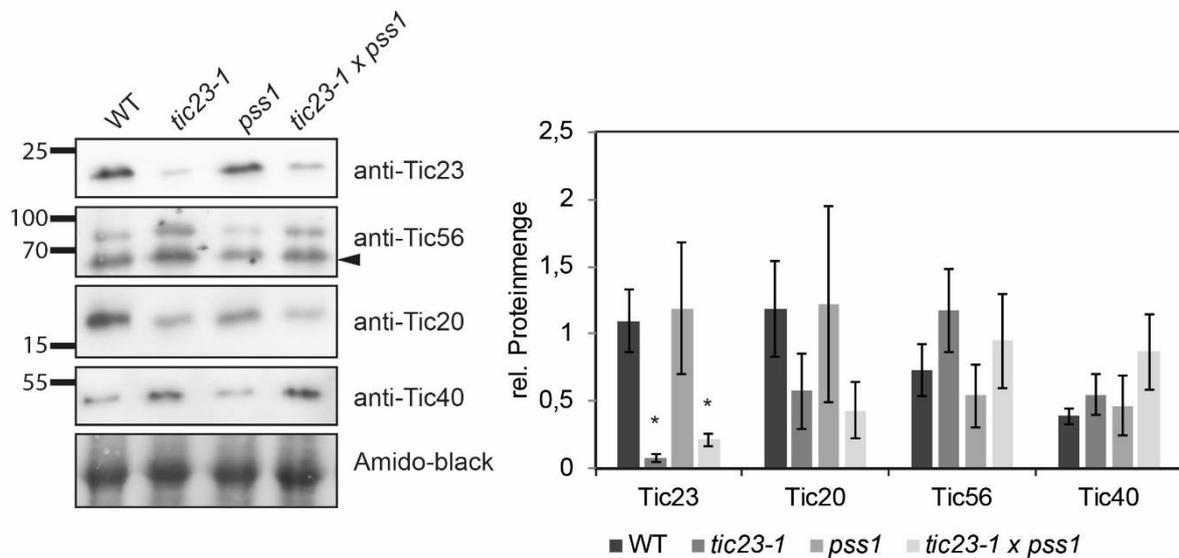


Abbildung 18 Bestimmung der Proteinmenge von der *tic23-1 x pss1*. Western-Blot Analyse von unterschiedlichen Proteinen des TIC-Komplexes. Der Pfeil zeigte das spezifische Antikörpersignal für Tic56 an. Anschließend wurden die Western-Blot Analysen aus drei biologischen Replikaten quantitative ausgewertet. Es wurden die Intensität der einzelnen Bandensignale mit der Software ImageJ gemessen und diese auf das Amido-Black Signal der RuBisCO Bande normiert. Die Balken zeigen die Standardabweichung an. Sternchen – $p < 0,05$

Um den Einfluss der Doppelmutation auf die Proteinabundanz der Importkomponenten zu untersuchen, wurde eine Western-Blot Analyse mit Gesamtzellextrakten aus den untersuchten Linien durchgeführt. Hier zeigte sich, dass auf Proteinebene die Doppelmutante ein Verhalten wie die *tic23-1* Einzelmutante aufweist (Abb. 18). Die Proteinmenge von Tic23 und Tic20 waren deutlich reduziert und hatten ungefähr ein Niveau wie in der *tic23-1* Mutante. In der Doppelmutante lag eine signifikante 2,5-fach höhere Menge von Tic23 vor. Für die Proteine Tic56 und Tic40 wurden ähnliche oder höhere Mengen im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen. Damit zeigte die Doppelmutante in Bezug auf die Proteinmengen keinen wesentlichen Unterschied zur Einzelmutante *tic23-1* auf. Hierbei war der Aspekt interessant, dass eventuell durch eine geringe Erhöhung der Tic23 Proteinmenge die phänotypischen Effekte der Mutation teilweise aufgehoben werden konnten.

So hat die Doppelmutante einen höheren Pigmentgehalt als die Einzelmutante *tic23-1*. Dies führte zu einer Ergrünung der Doppelmutante, die dadurch optisch nicht vom Wildtyp zu unterscheiden war. Ebenso ist in der Chloroplasten-Ultrastruktur eine Verbesserung der Thylakoid- und Granastrukturen zu erkennen (Anh. 7). So nimmt der stromale Zwischenraum, der in der *tic23-1* Mutante eine große Ausbuchtung bildet,

Ergebnisse

zwischen den Thylakoidmembranen in der Doppelmutante *tic23-1 x pss1* im Vergleich zur Einzelmutante *tic23-1* ab. Auf Proteinebene brachte die zweite Mutation eine leicht höhere Tic23 Menge, die dennoch deutlich niedriger als im Wildtyp war. Jedoch reichte die Erhöhung der Proteinmenge, um einen verbesserten Phänotypen der Pflanzen hervorzubringen.

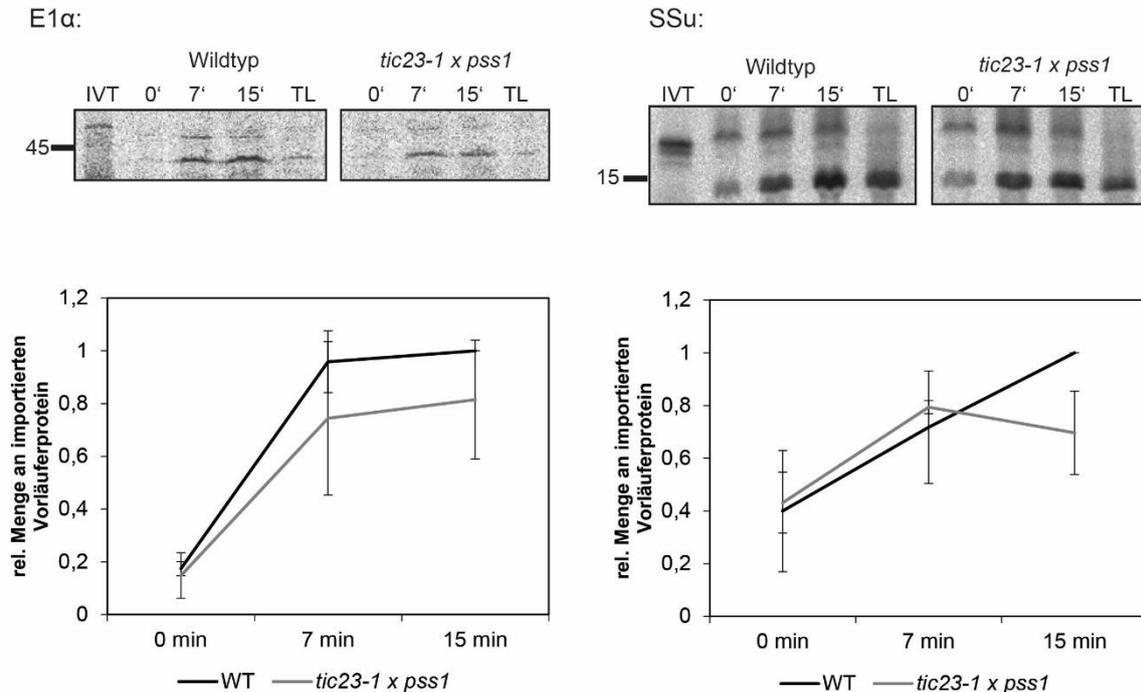


Abbildung 19 *In vitro* Importexperiment mit der Kreuzung *tic23-1 x pss1*. Für das Experiment wurden Chloroplasten aus zwei Wochen alten Wildtyp Col-0 und *tic23-1 x pss1* Pflanzen isoliert und diese wurden mit radioaktiv markierten E1α (links) und SSU Substraten (³⁵S-Methionin) (rechts) 0 min, 7 min und 15 min inkubiert. Die Signale der Autoradiographie aus drei biologischen Experimenten wurden mit dem *BAS reader* ausgelesen und mit ImageJ quantifiziert. Anschließend wurden die Ergebnisse auf den 15 min Wert des importierten Substrats von Wildtyp als 1 normalisiert. Balken zeigen die Standardabweichung an. IVT-*In vitro* translatiertes Substrat, TL – Thermolysin behandelte Proben

Daher sollten anschließend die Effekte der Doppelmutation auf die Importfähigkeit in einem *in vitro* Importexperiment überprüft werden. Hierfür wurden erneut Chloroplasten aus zwei Wochen alten Pflanzen der Doppelmutante *tic23-1 x pss1* und dem Wildtyp Col-0 isoliert und diese anschließend wie vorher beschrieben mit den radioaktiv-markierten Vorläuferproteinen der Standardsubstrate E1α und SSU inkubiert. Die oberen Bilder zeigten ein repräsentatives Replikat des *in vitro* Importexperiments (Abb. 19). In jedem Ansatz konnten die Signale für das Vorläuferprotein sowie deren importierte Form mit einem Phosphorimager detektiert

werden. Die Signale der Versuchsansätze wurden mit der *BAS Reader* ausgelesen und mit ImageJ quantifiziert. Darauffolgend wurden die Daten auf den 15 min Wert der importierten Proteine des Wildtyps normalisiert und in einem Graphen dargestellt, um eine Veränderung von der Doppelmutante zum Wildtyp deutlich zu visualisieren.

Die Ergebnisse lassen den Zuwachs der importierten Proteine im untersuchten Zeitraum deutlich erkennen. Es zeigte sich, dass die Doppelmutante weniger Vorläuferproteine importierte, als der Wildtyp: Sowohl das Substrat E1 α als auch SSU wurden nach 15 min Inkubationszeit im geringeren Maß von der *tic23-1 x pss1* Doppelmutante importiert. Die Differenz der Importrate zwischen den beiden Pflanzenlinien betrug für E1 α ungefähr 20 % und für SSU circa 30 %. So zeigte sich, dass die Doppelmutante *tic23-1 x pss1* einen schlechteren Import bei beiden Standardsubstraten aufweist als der Wildtyp und somit wahrscheinlich auch zur Einzelmutante *tic23-1*.

3.10 Expressionsdaten für *TIC23* weisen auf eine Funktion in der Hitzetoleranz

Tic23 besitzt eine Glycin-reiche Domäne und könnte somit der Proteinklasse der Glycin-reichen Proteine (GRP) zugeordnet werden. Für diese Proteinklasse wurde in vorherigen Studien eine Funktion in der Stressadaption von Pflanzen gezeigt.

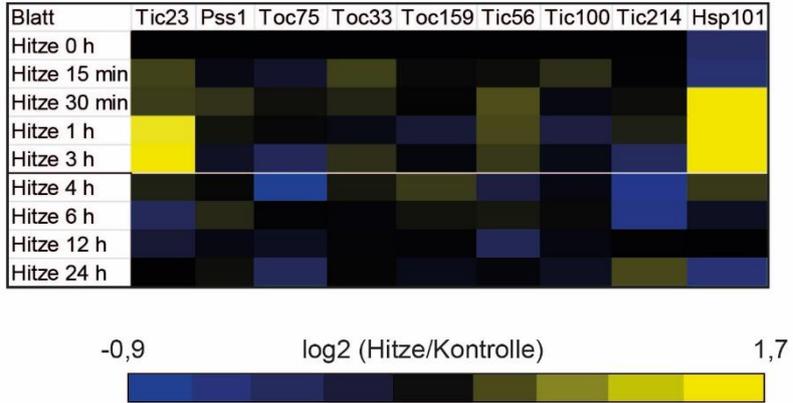
So wurde das Homolog Pss1 durch ein Mutantenscreening entdeckt, in dem mutierte *A. thaliana* auf eine Infektion mit dem Pathogen der Sojabohne *Phytophthora sojae* hin selektiert wurden (Sumit et al., 2012). Durch anschließende Untersuchungen wurde eine Funktion von Pss1 in der *non-host resistance* bestätigt (Wang et al., 2018a). Da Pss1 und Tic23 eine Homologie aufwiesen, bestand die Möglichkeit, dass Tic23 ebenfalls eine Funktion in der *non-host resistance* oder bei einer anderen Stressantwort innehatte. Daher wurde die Daten vom *Arabidopsis eFG Browser* (<http://bar.utoronto.ca/>), in dem verschiedene Studien und Untersuchungen zusammengefasst wurden, hinsichtlich einer Veränderung in der *TIC23* Expression analysiert. So wurden unter anderem *A. thaliana* Pflanzen bei verschiedenen abiotischen Wachstumsbedingungen kultiviert und dabei die Genexpression untersucht. Bei dieser Recherche konnte in der Studie von Winter et al. (Winter et al., 2007) eine Expressionsveränderung von *TIC23* während Hitzestress festgestellt

werden, weshalb diese Transkriptdaten für eine weitere Analyse verwendet wurden. In dieser Analyse wurden die Expressionsveränderungen der Hitzeexperimenten im Verhältnis zur Kontrolle errechnet und anschließend in einer *heat map* dargestellt (Abb. 20 A). Dadurch wurde sichtbar, dass das *TIC23* Transkript über den untersuchten Zeitraum des Hitzestress zunahm. Das Maximum wurde nach 1 Stunde Hitzestress erreicht und blieb auf diesem Niveau. Nach Beendigung der Hitzeanwendung konnten sich die Pflanzen erholen und ab diesem Zeitpunkt reduzierte sich die *TIC23* Expression auf ein Niveau, bei welchem die Pflanzen nicht gestresst waren. Insgesamt nahm das *TIC23* Transkript im Vergleich zu dem Kontrollwert um circa das 1,7-fache zu. Wenn man diese Expression mit einem Hitzeschockprotein, wie zum Beispiel *HSP101*, verglich, war zu erkennen, dass die HSPs den gleichen Anstieg der Expression bei Hitzestressbedingungen aufwiesen. Hierbei nimmt die Zunahme der Transkriptmenge um einen größeren Faktor (bei *HSP101* circa um den Faktor 8) zu. Im Gegensatz dazu konnte für das Homolog *PSS1* keine Expressionsveränderung unter Hitzestressbedingungen gemessen werden.

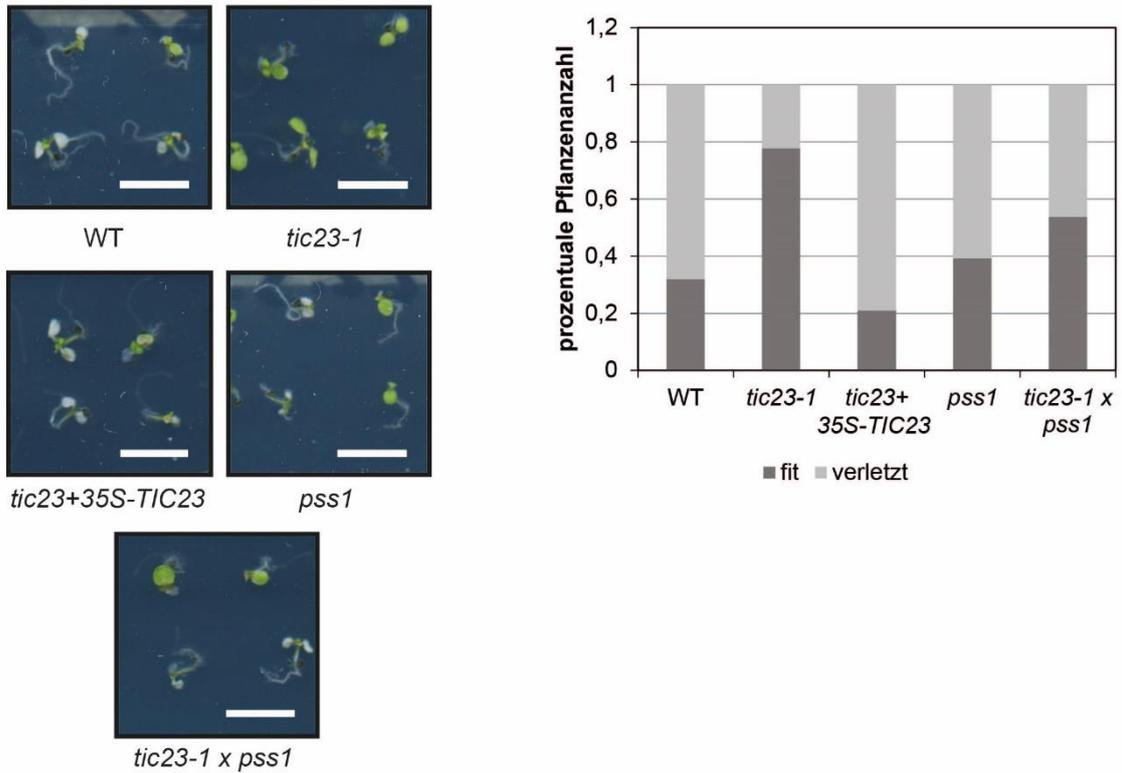
Da *Tic23* mit dem 1 MDa TIC-Komplex assoziiert ist, wurde ebenfalls die Expressionsveränderungen der 1 MDa TIC-Komplexkomponenten untersucht. Bei der *heat map* Auswertung der Genexpression unter Hitzestressbedingungen war für die Komponenten des 1 MDa TIC-Komplexes sowie des TOC-Komplexes keine größere Veränderung zu erkennen. Nur *TIC23* zeigte hierbei dieses besondere Verhalten und wies eine deutliche Zunahme der Expression bei Hitze auf.

Auf Grundlage dieser Erkenntnis wurde der Einfluss von Hitze auf die Mutanten von *Tic23* überprüft. Hierfür wurde eine Hitzestressmethode angewendet, die bereits für die Untersuchung von *A. thaliana* Pflanzen beschrieben wurde (Larkindale et al., 2005). Es wurde untersucht, wie die Mutanten auf ein einmaliges starkes Erhitzen reagieren. Dafür wurden 7 Tage alte Pflanzen für zwei Stunden in einen Inkubator bei 45 °C gestellt, in dem eine Lichtstärke von 0,27 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ (10 lux) herrschten. Es folgte eine 5-tägige Erholungsphase, in der sich die Pflanzen unter normalen Wachstumsbedingungen regenerieren konnten. In der anschließenden phänotypischen Analyse wurden die Pflanzen anhand ihrer Fitness unterschieden (Abb. 20 B).

A



B



C

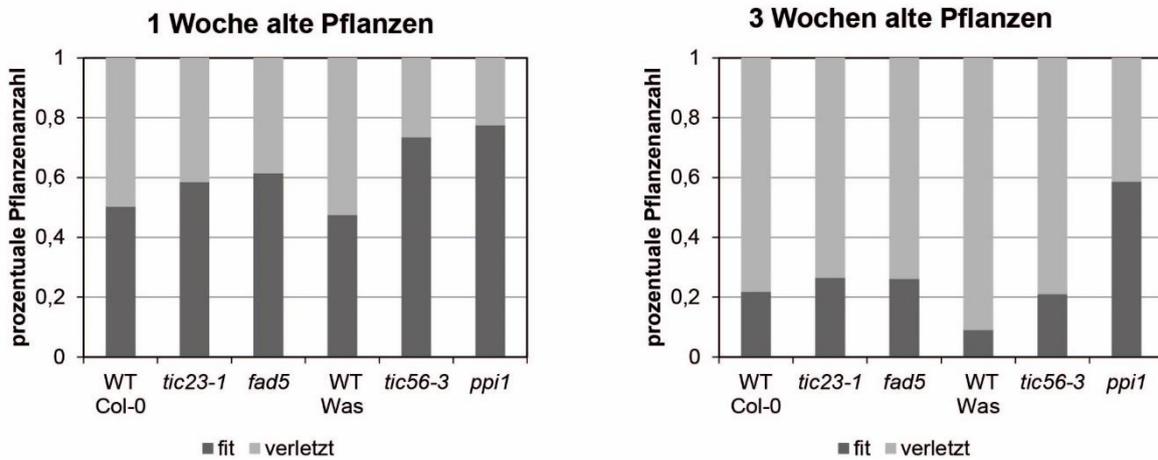


Abbildung 20 Heat map und phänotypische Analyse unter Hitzestress. (A) *Heat map* von der Expressionsveränderung der Importkomponenten unter Hitzestressbedingungen. Für die *heat map* wurden die Daten aus der Studie Winter et al. (Winter et al., 2007) verwendet. Hierfür wurden die Expressionsveränderungen unter Hitzestress in Bezug auf die Kontrollproben (\log_2 (Hitze/Kontrolle)) in einer Farbskala dargestellt. (B) Phänotypische Analyse verschiedener Pflanzenlinien unter Hitzestress. Die Pflanzen wurden einmalig bei 45 °C für 2 h bei einer Lichtstärke von 0,27 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ gestresst und anschließend erholten sie sich für 5 d bei normalen Wachstumsbedingungen. Die Pflanzen wurden kategorisiert und ausgezählt. $n = 3$, $N = 350 - 760$ (C) Hitzestress-Analyse in Abhängigkeit vom Alter. Die verschiedenen Pflanzenlinien wurden in einem Alter von 1 Woche oder 3 Wochen einmalig erhitzt. Nach der anschließenden Erholungsphase wurden die Pflanzen kategorisiert und ausgezählt. $n = 3$, $N = 330 - 360$

Die Experimente wurden in drei unabhängigen Replikaten durchgeführt. Durch vermutlich geringe Schwankungen der Temperatur oder andere technische Veränderungen fiel die Überlebensrate zwischen den Replikaten unterschiedlich aus. Die Tendenzen innerhalb der Replikate waren ähnlich. Daher wurden die Pflanzenanzahl der einzelnen Linien für die biologischen Replikate zusammengefasst und somit war keine statistische Auswertung möglich. Bei den Experimenten zeigten die nicht gesunden Pflanzen weiße Stellen an den Blättern im Vergleich zum gesunden Phänotyp, anhand derer die Pflanzen unterschieden werden konnten. In den Untersuchungen wiesen circa 80 % der *tic23-1* Pflanzen einen besseren Phänotypen auf. Im Vergleich dazu überstanden nur circa 30 % vom Wildtyp den Hitzestress. Bei der Komplementationslinie *tic23+35S-TIC23* überstanden nur circa 20 % der Pflanzen den Hitzestress. Somit wies sie ein ähnliches Verhalten wie der Wildtyp auf. Circa 50 % der Pflanzen der Kreuzungslinie *tic23-1 x pss1* zeigten keine Beschädigungen nach dem Hitzestress. Erneut lag die Reaktion der Kreuzung zwischen den Einzelmutanten *pss1*, bei der circa 40 % einen gesunden Phänotyp aufwiesen, und der *tic23-1* Mutante. Erneut kam es zu dem Effekt, dass die Doppelmutante partiell resistenter gegenüber den Hitzestress war als die Einzelmutante *pss1*, aber schlechter als *tic23-1*. Diese partielle Verbesserung könnte verschiedene Ursachen haben: Zum einen könnte die Verbesserung direkt auf die Mutation zurückzuführen sein, zum anderen könnte die Ursache aber auch im hellgrünen Phänotyp und dem damit einhergehenden geringeren Chlorophyllgehalt liegen.

Um dies zu überprüfen, wurde das gleiche Experiment mit den hellgrünen Mutanten *tic56-3*, *ppi1* und *fad5* (eine Mutante, die die Fettsäuredesaturase 5 nicht exprimiert) durchgeführt. In diesen Versuchen zeigte sich, dass alle hellgrünen Mutanten den Hitzestress besser überleben konnten, doch durch die bessere Überlebensrate des

Wildtyps im Vergleich zu den vorherigen Experimenten war die Interpretation der Ergebnisse schwierig (Abb. 20 B). Anhand der Tendenzen zeigte sich, dass *ppi1* die beste Überlebensrate der Pflanzen aufwies und die beiden Wildtyplinien die schlechteste Überlebensrate hatten. Von der *tic23-1* sowie der *fad5* Mutante prägten ungefähr die gleiche Anzahl einen normalen Phänotyp aus und somit verhielten sich beide Mutanten gleich. Das Experiment wurde anschließend mit 3 Wochen alten Pflanzen wiederholt und hierbei ließ sich generell feststellen, dass alle Pflanzenlinien anfälliger gegenüber Hitzestress waren. Erneut zeigten die Mutanten eine bessere Überlebensrate als die getesteten Wildtyplinien, wobei *tic23-1* und *fad5* lediglich einen leicht höheren prozentualen Anteil an unversehrten Pflanzen aufwiesen als der Wildtyp. Bei den *tic56-3* Mutanten blieben, ebenso wie beim Wildtyp, ungefähr 20 % der Pflanzen unversehrt. Die einzige Ausnahme bildete die *ppi1* Pflanzenlinie, bei der circa 60 % der Pflanzen überlebten.

Somit zeigten die Ergebnisse erste Indizien für eine mögliche Funktion von Tic23 in der Hitzestressantwort in einem frühen Entwicklungsstadium der Pflanze. Dabei wies die *tic23-1* Mutante eine größere Toleranz gegenüber Hitze auf als der Wildtyp und andere Tic23 Mutanten. Ebenso zeigte sich, dass diese Toleranz auf ein frühes Alter der Pflanze beschränkt war. Bei weiteren Proteinimportmutanten konnte gleichermaßen eine Hitzetoleranz festgestellt werden. Daher sollten weitere Aufklärungen zu den Mechanismen während des Hitzestresses durchgeführt werden.

3.11 Vergleichende Expressions- und Proteinanalyse zum Hitzestress

Nachdem *tic23-1* einen besseren Phänotyp unter Hitzestressbedingungen im Vergleich zu den anderen Tic23 Mutanten und dem Wildtyp zeigte, sollte untersucht werden, welche Veränderungen bei der Tic23 Abundanz während des Hitzestresses auftreten. Daher wurde zuerst eine mögliche Expressionsveränderung über eine qRT-PCR überprüft (Abb. 21). Dafür wurden 7 Tage alte Pflanzen während verschiedener Zeitpunkte des Hitzestressversuchs geerntet, um anschließend die Transkriptmengen zu bestimmen. Zuerst wurde über die Expression von *HSP101* die Induktion des Hitzestresses überprüft. Hsp101 ist ein Hitzeschockprotein, das die Pflanzen bei ihrer Antwort auf den Hitzestress benötigen. Schon in der Studie von Winter et al. (Winter et al., 2007) war ein circa 8-facher Anstieg der Expression von *HSP101* zu sehen. In

dem durchgeführten Experiment stieg die Expression ebenfalls deutlich an und wies damit auf die Induktion durch den Hitzestress hin. Hierbei fiel auf, dass in der *tic23-1* Mutante nach 30 min die Expression nur gering stieg, um nach 2 Stunden im Vergleich zum 0 min Wert des Wildtyps sogar zu sinken. Für die *TIC23* Expression konnte eine Zunahme der Transkripte im Vergleich zum Wildtyp gemessen werden, die nach einer Stunde den höchsten Wert erreichte; dieser war 3,5-fach höher als der 0 min Vergleichswert. In der Mutante stieg die *TIC23* Transkriptmenge sogar auf das circa 13-fache vom 0 min Wert des Wildtyps.

Das Transkript des Homologs *PSS1* blieb über den Zeitraum des Experiments im Wildtyp auf einem gleichen Niveau. Nach 2 Stunden wies der Wildtyp doppelt so viel Transkript auf wie zum 0 min Wert. In der Mutante hingegen war das Transkript zum Vergleichswert bei 0 min deutlich höher als im Wildtyp. Danach nahm die Transkriptmenge ab und erreichte nach 1 Stunde den doppelten Wert des 0 min Werts vom Wildtyp. Somit wurde dieser Wert in der *tic23-1* Mutante schneller erreicht als im Wildtyp.

Des Weiteren wurden die Transkriptmengen von ausgewählten 1 MDa TIC-Komplexkomponenten gemessen. Als Interaktionspartner von Tic23, das in der *tic23-1* Mutante abnimmt, war für *TIC20* eine starke Veränderung während der Hitzestressbehandlung zu erwarten. So konnte in beide Pflanzenlinien der erwartete Anstieg der Transkriptmenge gemessen werden. Im Wildtyp erhöhte sich die Menge um ungefähr das 2,5-fache. Die *tic23-1* Mutante hatte am Anfang des Experiments einen um das doppelte erhöhten Anfangswert und stieg dann auf einen 4-fach höheren Wert als der Anfangswert des Wildtyps. Als weitere Komponente des 1 MDa TIC-Komplexes wurde *TIC56* untersucht. Hierbei zeigten die Mutante und der Wildtyp ein gegenläufiges Verhalten. Im Wildtyp sank zuerst die Transkriptmenge, um nach 2 Stunden wieder auf circa 60 % des Anfangswerts zu steigen. In der *tic23-1* Mutante stieg zuerst die *TIC56* Expression, um am Ende des Hitzestresses auf den gleichen Wert zu sinken wie im Wildtyp.

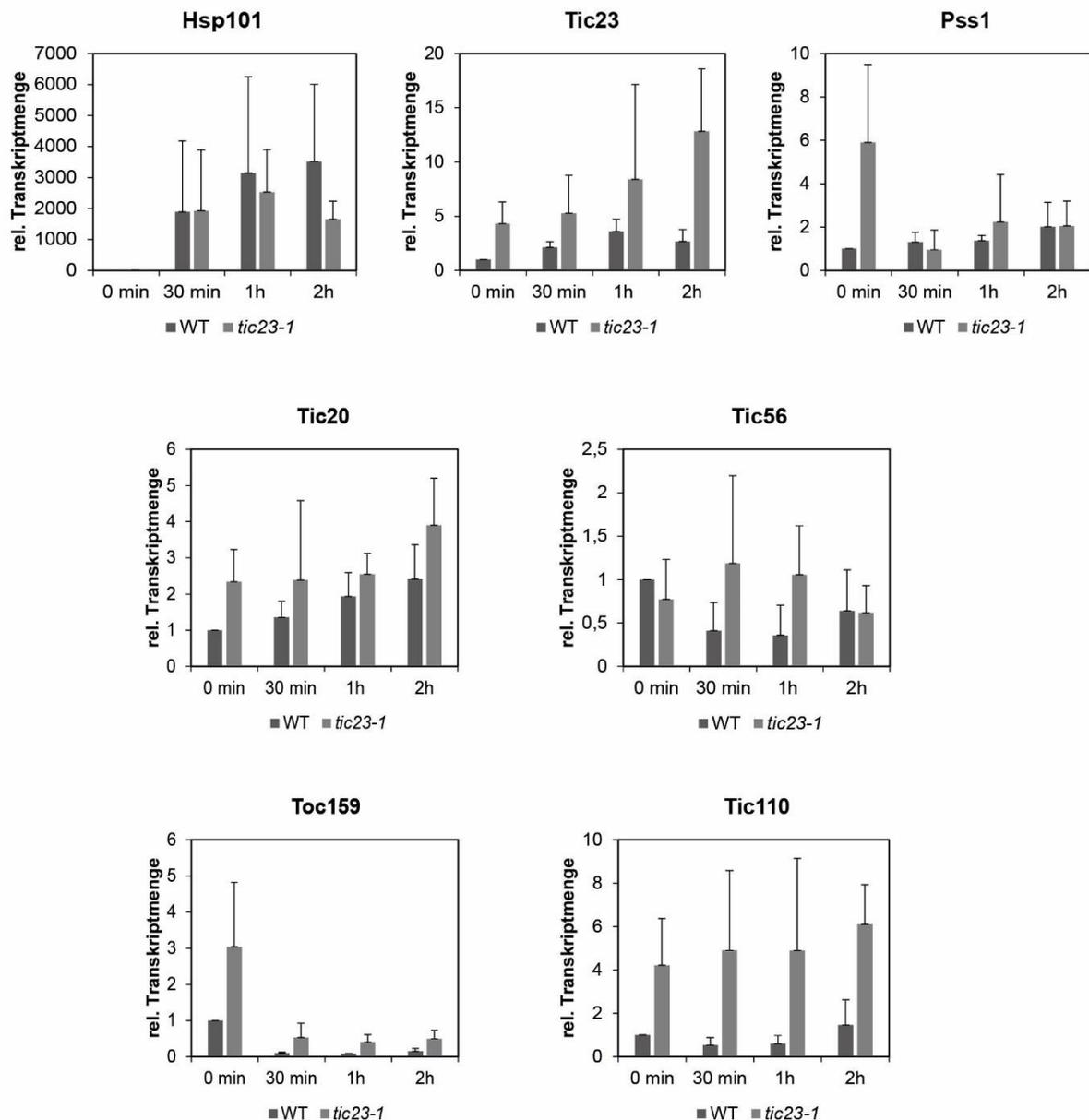


Abbildung 21 Transkriptgehalt ausgewählter Gene während des Hitzestresses. Es wurde die Transkriptmenge von ausgewählten Genen während des Hitzestresses in der *tic23-1* Mutante im Vergleich zum Wildtyp gemessen. Die Transkriptmenge wurden auf das Referenzgen Aktin 7 (AT5G09810) normalisiert und anschließend wurden alle Werte in Bezug auf den jeweiligen 0 min Wert aus Wildtyp dargestellt. Die Balken zeigen die Standardabweichung der Werte nach drei biologischen Replikaten.

Neben den 1 MDa TIC-Komplex wurde auch die *TOC159* Expression vom TOC-Komplex analysiert. In beiden Pflanzenlinien nahm die Expression von *TOC159* ab. So wiesen nach den 2 Stunden Hitzestress die Wildtyp Pflanzen nur noch 15 % der Anfangsmenge vom *TOC159* Transkript auf. Die *tic23-1* Mutante besaß vor dem Hitzestress die 3-fach höhere Menge an Transkript als der Wildtyp. Dieses sank nach

den 2 Stunden Hitzestress auf die Hälfte des 0 min Werts vom Wildtyp und somit kam es zu einer Reduzierung um den Faktor 6 bezüglich des Anfangswertes in der *tic23-1* Mutante.

Zwischen dem Wildtyp und der *tic23-1* Mutante konnte in den Transkriptdaten vom Hitzestress einige Unterschiede gefunden werden, die auf eine Reaktion des gesamten 1 MDa TIC-Komplexes hindeuteten. Unter anderem konnten große Abweichungen in den Mengen der einzelnen Transkripte zwischen den beiden Linien festgestellt werden. Insbesondere *TIC56* zeigte hierbei einen gegenläufigen Verlauf in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp.

Bei der Expression konnte die schnelle Reaktion der Pflanzen auf den Hitzestress beobachtet werden. Daher deuteten die Ergebnisse auf einen Umbau der Biogenese der Chloroplasten hin, sodass die Chloroplasten schnell auf die Stresssituation antworten können. Schlussendlich würde sich dieser Umbau auf Proteinebene ausdrücken und somit zu Veränderungen der Proteinabundanz führen. Zur Überprüfung, ob der Hitzestress eine Ummodellierung des 1 MDa TIC-Komplex auf Proteinebene mit sich brachte, wurden 1 Woche alte Pflanzen, die auf $\frac{1}{2}$ MS-Platte mit 0,8 % Saccharose wuchsen, einmalig bei 45 °C für 2 Stunden erhitzt. Anschließend wurde die Proteinmenge über einen Western-Blot analysiert. Die Western-Blot Signale wurden mit dem Programm ImageJ quantifiziert und auf die Amido-Black Färbung der RubisCO Bande des Blots normiert. In drei biologischen Replikaten wurden die Abundanzveränderungen der angegebenen Proteine ermittelt.

Bei der Bestimmung der Proteinmengen im Wildtyp zeigte sich, dass die Tic23 Menge leicht zunahm (Abb. 22). Dieser Effekt wurde gleichermaßen auch für Tic56 und Tic40 beobachtet. Wie in den Transkriptdaten nahm auch auf Proteinebene Tic56 erst im geringen Maß ab, bevor es dann anstieg, wobei sich die Menge fast verdoppelte. Über Tic40 wurde publiziert, dass dieses durch Hitze induziert wird (Dutta et al., 2009). In den hier durchgeführten Experimenten zeigte sich ebenfalls ein Anstieg für Tic40 in der Proteinabundanz während der Hitzeeinwirkung. Hierbei erreichte die Tic40 Proteinmenge nach 2 Stunden ungefähr die 4-fache Menge des 0 min Wertes. In den bisherigen Daten war Tic20 mit Tic23 auf Proteinebene ko-reguliert. Bei einer geringen Abundanz von Tic23 wurde auch Tic20 herunterreguliert.

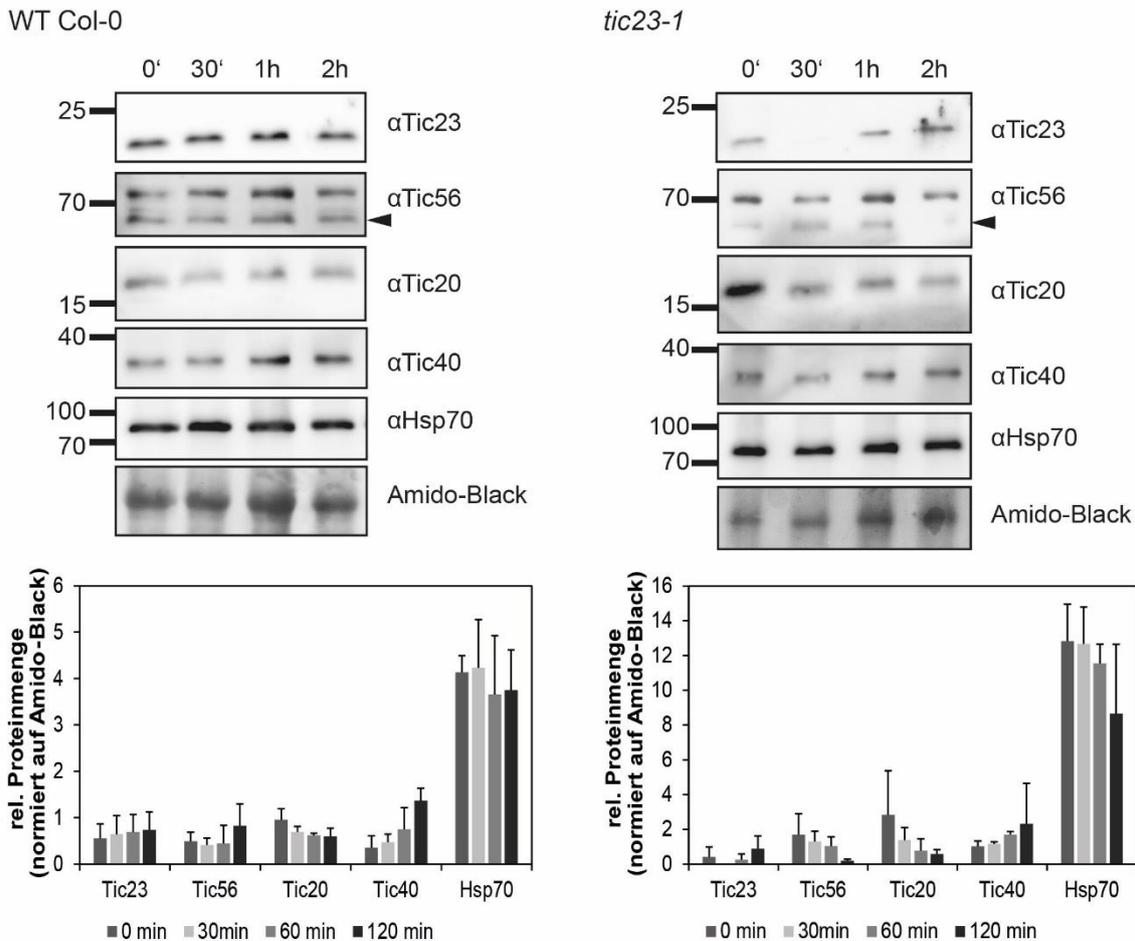


Abbildung 22 Bestimmung der Proteinmengen während des Hitzestresses. Nach 0 min, 30 min, 1 h und 2 h des Hitzestresses wurden Pflanzenproben genommen und aus ihnen Gesamtzellextrakt gewonnen. Anschließend wurden in einer Western-Blot Analyse die unterschiedlichen Proteine des TIC-Komplexes detektiert. Der Pfeil zeigt das spezifische Antikörpersignal von Tic56 an. Quantitative Auswertung der Western-Blot Analysen. Es wurden die Intensität der einzelnen Bandensignale mit der Software ImageJ gemessen und diese auf das Amido-black Signal der RuBisCO Bande normiert. Die Balken zeigen die Standardabweichung der Werte nach drei biologischen Replikaten. Sternchen – $p < 0,05$

Umso überraschender waren die Ergebnisse der Proteinabundanz von Tic20 während des Hitzestresses. Hierbei wurde eine Verringerung von der Tic20 Abundanz festgestellt, die gegenläufig zu Tic23 war. Als Kontrolle wurde das cp-Hsp70 (chloroplastidäre Hitzeschockprotein 70), das ein konstitutives Protein bei der Proteinfaltung in den Chloroplasten darstellt, in den Proben detektiert. Es wurde erwartet, dass keine Veränderung in seiner Proteinabundanz zu beobachten wäre. So blieb im Wildtyp die cp-Hsp70 Proteinmenge über den Zeitraum des Hitzestresses hinweg auf gleichem Niveau.

Die Ergebnisse der *tic23-1* Mutante unter Hitzestress wiesen Unterschiede zum Wildtyp auf. Unter anderem sank zunächst die Proteinmenge von Tic23, bevor nach 2 Stunden die doppelte Menge im Vergleich zum 0 min Wert gemessen werden konnte. Sowohl die Proteinmenge von Tic20, wie auch von Tic56 sank während der Hitzeeinwirkung. Nach den 2 Stunden war die Proteinmenge von Tic56 um das 9-fache reduziert. Für Tic20 wurde eine Verringerung der Proteinmenge um das 5-fache nach den 2 Stunden festgestellt. Ebenfalls konnte in der Mutante eine Erhöhung der Tic40 Proteinmenge über den untersuchten Zeitraum gemessen werden. Hierbei erhöhte sich die Menge in der *tic23-1* Mutante um das doppelte, wobei im Wildtyp sogar eine Mengenzunahme um den Faktor 4 zu beobachten war. Als Kontrolle wurde erneut die cp-Hsp70 Menge detektiert. Während diese im Wildtyp gleich blieb, wurde in der *tic23-1* Mutante zu Beginn ein höherer Anfangswert gemessen, der im Vergleich zum Wildtyp ungefähr 3-fach erhöht war. Im Verlauf der Hitzeanwendung nahm die cp-Hsp70 Menge ab und sank auf circa 60 % des Anfangswerts.

Im Zusammenhang mit den Transkriptdaten zeigten die Western-Blots von der *tic23-1* Mutante und des Wildtyps die gleichen Tendenzen. Sowohl die Transkript- als auch die Proteinmengen von Tic40 und Tic23 erhöhten sich. Im Gegensatz dazu sank Tic20 in beiden Fällen. Erneut zeigte Tic56 ein gegenläufiges Verhalten. Zum einem reduzierte sich die *TIC56* Transkriptmenge sowohl im Wildtyp wie auch in der *tic23-1* Mutante leicht nach 2 Stunden Hitzestress. Zum anderen verminderte sich die Proteinmenge in der *tic23-1* Mutante, wobei sie im Wildtyp nach einer kurzen Reduzierung über die Proteinmenge des Wildtyps anstieg.

3.12 Funktion und Aufbau des Proteinimportkomplexes während Hitzestress

In der Studie von Dutta et al. (Dutta et al., 2009) wurde unter Verwendung des Modellorganismus Erbse gezeigt, dass der Import unter Hitzestress verringert war und das ebenfalls die Abundanz der Importkomponenten abnahm. Da für die *tic23-1* Mutation ein positiver Einfluss auf die Hitzeresistenz in Verbindung mit einer leichten Erhöhung der Tic23 Proteinmenge nachgewiesen wurde, sollte der Einfluss der Mutation auf den Proteinimport in Hitze gestressten Pflanzen kontrolliert werden. Hierfür wurden Chloroplasten aus 2 Wochen alten Wildtyp und *tic23-1* Pflanzen isoliert

und diese vor dem *in vitro* Importexperiment mit den Substraten E1 α und SSU für 10 min bei 32 °C erhitzt. In den Ergebnissen von Dutta et al. wurde ebenfalls gezeigt, dass Chloroplasten bei schon leicht erhöhten Temperaturen labiler werden und dadurch weniger Substrat importiert wird. Daher wurde eine Temperatur gewählt, bei der die Chloroplasten noch eine gute Importfähigkeit in der Studie von Dutta et al. aufwiesen. Der Import wurde wie die vorherigen *in vitro* Importexperimente durchgeführt, um anschließend die Signal der prozessierten Form mit dem *BAS reader* zu detektieren und mit dem Programm ImageJ zu quantifizieren. Die Daten wurden auf die 15 min Probe des Wildtyps, die nicht Hitze behandelt wurde, normalisiert.

Im Vergleich importierte der Wildtyp unter Hitzestress fast genauso gut das E1 α Substrat wie unter normalen Bedingungen (Abb. 23). Die *tic23-1* Mutante zeigte ein ähnliches Verhalten, wobei der Import im Vergleich zum Wildtyp generell um 25 % reduziert war. Diese Reduzierung der Importfähigkeit von der Mutante war ein deutlicher Unterschied zu dem standardmäßig durchgeführten *in vitro* Importexperiment (Abb. 16). In diesem Experiment importierte die *tic23-1* Mutante die Substrate besser. Der Unterschied könnte durch die Änderungen in der technischen Durchführung zustande kommen. Interessanterweise konnte die Mutante das E1 α Substrat bei Hitze ebenso gut importieren wie unter Normalbedingungen, was ebenfalls beim Wildtyp beobachtet werden konnte. Bei dem zweiten Substrat konnte man größere Veränderungen messen. Der Wildtyp importierte unter Hitzestress 20 % des SSU Substrats weniger in den gestressten Chloroplasten als in unbehandelten Chloroplasten. Hingegen konnte die *tic23-1* Mutante das Substrat bereits in den unbehandelten Chloroplasten um 35 % schlechter importieren als der Wildtyp, jedoch kam es unter Hitzestress zu keiner Abnahme des Imports. Somit erlitt die *tic23-1* Mutante keine Einbußen bezüglich ihrer Importfähigkeit unter Hitzestress für ausgewählte Substrate, insbesondere für Photosynthese relevante Proteine.

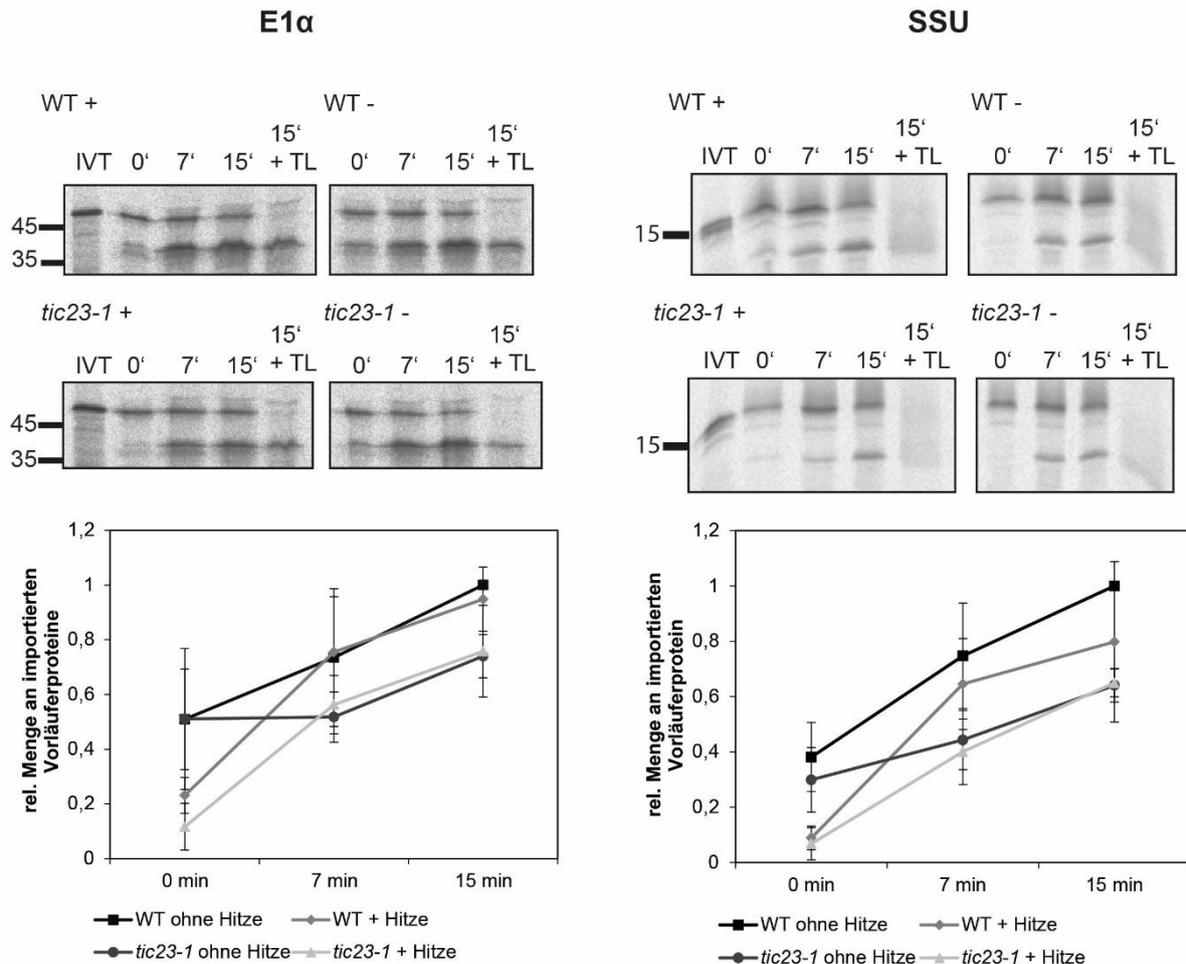


Abbildung 23 *In vitro* Importexperiment unter Hitzestressbedingungen. Für das Experiment wurden Chloroplasten aus zwei Wochen alten Wildtyp Col-0 und *tic23-1* Pflanzen isoliert und vor dem Importexperiment für 10 min bei 32 °C erhitzt. Die Chloroplasten wurden anschließend in verschiedenen Zeiträumen mit den radioaktiv markierten E1α und SSU Vorläuferproteine (³⁵S-Methionin) inkubiert. Die Signale der Autoradiographie aus drei biologischen Experimenten wurden mit ImageJ quantifiziert. Anschließend wurden die Ergebnisse auf den 15 min Wert des importierten Substrats von den unbehandelten Wildtypchloroplasten als 1 normalisiert. IVT-*In vitro* translatiertes Substrat, TL – Thermolysin behandelte Proben

Daran schloss sich die Frage an, ob und wie sich der 1 MDa TIC-Komplex während des Hitzestresses verändert. Hierfür wurden die gleichen behandelten und unbehandelten Chloroplasten aus Wildtyp Col-0 und *tic23-1* Pflanzen für eine 2D-BN-PAGE verwendet, um eine Veränderung des 1 MDa TIC-Komplexes beobachten zu können. Die Membrankomplexe wurden mit einem Puffer mit 1 % Digitonin aus den Membranen gelöst und anschließend über zwei Dimensionen aufgetrennt. Mit einem folgenden Western-Blot wurden die Proteine mit dem angegebenen Antikörper detektiert. Die Wiederholung des Experiments wurde im Anhang 8 dargestellt.

Ergebnisse

In allen Proben, sowohl unbehandelte als auch behandelte Chloroplasten, konnten die Signale von Tic20, Tic23 und Tic56 auf gleicher Höhe detektiert werden. Diese Signale befanden sich ungefähr bei dem Molekulargewicht von 1 MDa und gehörten somit zum 1 MDa TIC-Komplex. Durch die unveränderte Position im Gel sowie der Detektion aller Proteine im selben Komplex, konnte gezeigt werden, dass sich sowohl an der Zusammensetzung wie auch an der Komplexgröße unter der Hitzeeinwirkung keine Veränderungen auftraten. Hierbei zeigte die Mutante nur generell schwächere Signale als der Wildtyp Col-0 auf. Im höheren molekularen Bereich war in der Mutante sowohl in den unbehandelten wie auch in den behandelten Chloroplasten ein weiterer Komplex zu erkennen, in dem die Proteine Tic56 und Tic20 detektiert werden konnten.

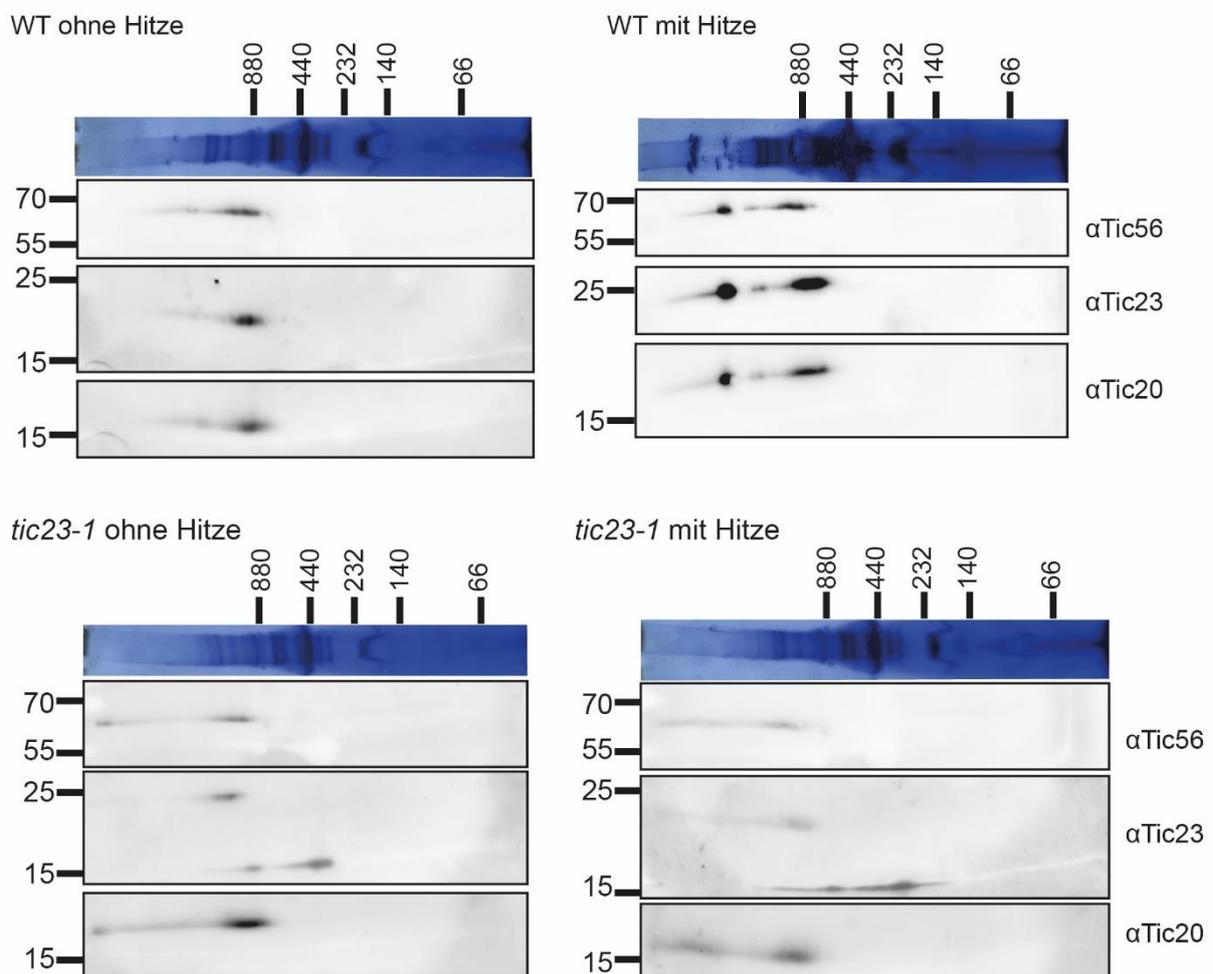


Abbildung 24 Der 1 MDa TIC-Komplex bei Hitzestress. Es wurden aus 2 Wochen alten Wildtyp und *tic23-1* Pflanzen die Chloroplasten isoliert und für 10 min bei 32 °C erhitzt. Die Proteinkomplexe wurden solubilisiert und über eine 2D-BN-PAGE analysiert. Anschließend wurden die Proteine über einen Western-Blot mit den angegebenen Antikörper detektiert.

Es war anzunehmen, dass es sich bei diesem Komplex um den Superkomplex, bestehend aus dem 1 MDa TIC-Komplex und dem TOC-Kernkomplex, handelt. Zwar

konnte der Komplex bei dieser Untersuchung nicht im Wildtyp nachgewiesen werden, jedoch wurde er bereits in vorherigen 2D-BN-PAGE dieser Arbeit im Wildtypchloroplasten detektiert werden. Es war also davon auszugehen, dass der Wegfall des Komplexes in diesem Fall durch ein technisches Problem entstanden war. In den hitze-behandelten Chloroplasten konnte der Superkomplex ebenfalls nachgewiesen werden und hierbei wurde ein Tic23 Signal in diesem Komplex sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante *tic23-1* detektiert. In den unbehandelten Proben wurde Tic23 nicht im Superkomplex nachgewiesen. Somit ist dieses Ergebnis ein erstes Indiz dafür, dass Tic23 unter Hitzestress ein Teil vom Superkomplex werden könnte und so eventuell zur besseren Hitzeresistenz der Pflanzen führt.

4. Diskussion

Mit der Entdeckung des 1 MDa TIC-Komplexes wurde das bisherige Verständnis vom Proteinimport grundlegend verändert. Bis dato galt der Komplex aus Tic40 und Tic110 als wesentlicher Bestandteil des Importkomplexes in der inneren Hüllmembran. Durch die Studie von Kikuchi et al. (Kikuchi et al., 2013) wurde durch eine Aufreinigung eines markierten Tic20-I's ein 1 MDa großer Translokationskomplex isoliert. Hierbei war es den Autoren möglich, den Import von Vorläuferproteinen durch den Komplex nachzuweisen sowie die Zusammensetzung aufzuklären. Erst eine kombinierte Methode von einer eindimensionalen BlueNative-PAGE und der massenspektrometrischen Analyse der im Gel isolierten Proteine identifizierte eine weitere potentielle Komponente des 1 MDa TIC-Komplexes (Schafer et al., 2019). Das zuvor unbekannte Protein, das in dieser Arbeit Tic23 genannt wurde, sollte im Rahmen dieser Arbeit durch weitere Untersuchungen charakterisiert und der mögliche Einfluss auf den Proteinimport in den Chloroplasten analysiert werden.

4.1 Tic23 als Teil des 1 MDa TIC-Komplexes

Zuerst sollten die Ergebnisse der Studie von Schäfer et al. (Schafer et al., 2019) validiert werden, um eine Bestätigung zu bekommen, dass Tic23 eine Komponente des 1 MDa TIC-Komplexes darstellt. Sowohl die Immunodetektion von Tic23 in einer zweidimensionalen BN-PAGE (Abb. 6 C) wie auch die Ko-Immunopräzipitation (Abb. 6 D) weisen auf die Beteiligung von Tic23 im 1 MDa TIC-Komplex hin. Umso erstaunlicher ist die Tatsache, dass Tic23 in der Studie von Kikuchi et al. (Kikuchi et al., 2013) nicht als Interaktionspartner identifiziert wurde. In der Kikuchi-Studie wurde die durchgeführte Aufreinigung des 1 MDa Komplexes über eine 2D-PAGE analysiert, die anschließend Silber-gefärbt wurde. Durch diese Färbung konnten die Autoren die Komponenten Tic214, Tic56, Tic100 und Tic20-I als Teil eines 1 MDa TIC-Komplexes identifizieren. Neben diesen Signalen konnte aber ein weiteres Signal im Bereich des 1 MDa TIC-Komplexes auf der Höhe von ungefähr 25 kDa in der SDS-PAGE erkannt werden. Dieses schwache Signal könnte potentiell Tic23 sein (Bachelorarbeit Adrian Goldspink, MLU). Ebenfalls wurde eine Reinigung mit Hilfe eines getaggen Vorläuferproteins durchgeführt. Erneut wurden durch eine Silberfärbung die

enthaltenen Proteine angefärbt. In diesem Experiment wurden einige weitere Signale entdeckt, die als unidentifizierte Proteine bezeichnet werden. Auch hierbei gibt es ein Signal auf Höhe des Molekulargewichts von circa 25 kDa. In beiden Fällen wurde das Protein in der Studie nicht weiter beachtet und untersucht

In der 2D-BN-PAGE konnte Tic23 nicht im größeren Superkomplex aus TOC und TIC nachgewiesen werden (Abb. 6 C). In dieser Arbeit konnte der größere Komplex nicht eindeutig bestimmt werden, da keine TOC-Komponenten nachgewiesen werden konnten. Doch in der massenspektrometrischen Analyse der Ko-Imunopräzipitation konnte neben den beschriebenen Komponenten des 1 MDa TIC-Komplexes auch ein Peptid von Toc75 detektiert werden, dass auf die Interaktion beider Komplexe deutet und somit auf eine Beteiligung von Tic23. Daneben wurde eine Interaktion von Tic23 mit den Komponenten des TOC-Kernkomplexes in einem weiteren Experiment nachgewiesen: bei einer *Tandem Affinity*-Reinigung mit einem fusionierten TAP-Toc159 und der massenspektrometrischen Analyse des Eluats wurden unter anderem Peptide von Tic23 gemessen (Kohler et al., 2015) (massenspektrometrischen Daten nicht veröffentlicht). Als eine weitere Methode wurde eine Komplexaufreinigung über einen Sucrose-Dichtegradienten verwendet, bei der ebenfalls eine Ko-Migration von Tic23 mit Komponenten des TOC- und des 1 MDa TIC-Komplexes belegt werden konnte (Dr. Birgit Agne, RUB, Daten nicht veröffentlicht). Diese Unterschiede können durch die Unterschiede der Methodik hervorgerufen werden oder deuten darauf, dass physiologische unterschiedliche Bedingungen die Assoziation von Tic23 beeinflusst. Somit wäre eine flexible Interaktion von Tic23 mit dem 1 MDa TIC-Komplex möglich und dieser interagiert mit dem TOC Komplex (Chen & Li, 2017).

Die Untersuchung der Tic23 Abundanz in den verschiedenen Importmutanten konnte darlegen, dass die Menge an Tic23 unabhängig von der Menge an TOC-Komplexkomponenten ist. Für die Mutanten des 1 MDa TIC-Komplexes, *tic20-1*, *tic56-1*, *tic56-3* und Spectinomycin behandelte Wildtyppflanzen (Mangel an Tic214), war zu sehen, dass die Menge an Tic23 abhängig von der Menge dieser Komponenten ist (Abb. 8). Somit führt die Reduzierung der TIC-Komplexkomponenten zu einer Reduzierung von Tic23. Es ist zu vermuten, dass Tic23 in diesen Mutanten instabil ist und es dadurch zu einem Abbau des Proteins kommt. Interessanterweise führte aber eine Reduzierung von Tic23 nicht zur Instabilität von allen 1 MDa TIC-Komplexkomponenten (Abb. 11 C und D). Daraus lässt sich eine Unabhängigkeit

einzelner Komponenten, hierbei insbesondere von Tic56, von Tic23 bzw. dem TIC-Komplex schließen. Somit weisen die Ergebnisse auf einen modularen Aufbau des 1 MDa TIC-Komplexes hin, bei dem die Module in ihrer Stabilität unabhängig voneinander sind (Agne et al., 2017). Besonders deutlich war der Einfluss von der Tic23 Abundanz auf die Menge an Tic20. Bei vergleichbaren Transkriptmengen ist Tic20 in der *tic23-1* Mutante gegenüber dem Wildtyp deutlich reduziert. Da Tic23 als Interaktionspartner fehlt, liegt Tic20 instabil in der Zelle vor und wird somit vermutlich abgebaut.

4.2 Lokalisationsstudien zum Tic23 Protein und seinem Homolog Pss1

Über eine Konfokale Laser Scanning Mikroskopie wurde bestätigt, dass die Transitpeptide von Tic23 und Pss1 den Transport von Reporterproteine in den Chloroplasten vermittelt können (Abb. 7 A). Diese Translokation war nur durch die Anwendung der ersten 100 N-terminale Aminosäuren möglich. Mit dem Tic23-Vollängenprotein, das an das Reporterprotein eYFP fusioniert war, wurden vorallem Signale im Cytosol festgestellt, die auf eine mögliche Aggregation von Tic23-eYFP hinweisen.

Diese Aggregatbildung kann verschiedene Ursachen haben. Als am wahrscheinlichsten wird das fusionierte eYFP die Translokation des Proteins durch die Membran blockieren. Dahingegen war für Pss1 eine deutliche Verteilung im Cytosol über den gesamten Protoplasten zu erkennen, doch kam es hierbei ebenfalls zu einer Signalakkumulation. Nach 48 Stunden bildete sich anscheinend zwischen diesen Strukturen ein Netz aus, das diese Anhäufungen miteinander verband. Bei dieser Struktur könnte es sich um ein Zellorganell handeln. Nach Form und Aufbau könnte es das Endoplasmatische Reticulum oder der Golgi Apparat sein (Kilgore et al., 2013). Das deutet daraufhin, dass sich das exprimierte Protein im ER ansammelt und nicht weitertransportiert wird oder dass es im ER loklasiert ist. Für den Proteinimport in den Chloroplasten wurden alternative Importwege neben dem TOC-TIC System entdeckt. So wurde ebenfalls ein Importweg über das ER und den Golgi-Apparat beschrieben (Villarejo et al., 2005). Die Tatsache, dass das Vollängen Fusionsprotein bei den Lokalisierungsexperimenten die beschriebenen Form aufwies und als vermeintliches

Aggregat vorlag, deutet auf einen möglichen Transport von Pss1 über das ER und den Golgi-Apparat hin.

Die Veränderung des Fusionsproteins führte zu einer veränderten Translokation der Proteine innerhalb der Protoplasten. Die Verkürzung auf die ersten 100 Aminosäuren bewirkte, dass annähernd nur das Transitpeptid und die 33 ersten Aminosäuren des Tic23 Proteins bzw. 3 Aminosäuren des Pss1 Proteins für die Transformation genutzt wurde. So war nun zu sehen, dass beide Proteine in den Chloroplasten vorlagen. Durch die Überlagerung mit der Autofluoreszenz der Chloroplasten ließ sich das Ergebnis eindeutig verifizieren.

In dem anschließenden Western-Blot konnte gezeigt werden, dass in den transformierten Protoplasten ausschließlich prozessiertes Protein enthalten war. Zum einen wurde aus dem Experiment verdeutlicht, dass Pss1 ein deutlich kleineres Transitpeptid ausweist, als es mit dem Server ChloroP vorhergesagt wurde. Für Pss1 wurde anhand der kodierenden Sequenz ein um 30 Aminosäuren längeres Transitpeptid erwartet als für Tic23. Dieser Unterschied konnte bei dem Signal im Western-Blot nicht beobachtet werden (Abb. 7 C) und zeigte, dass die Voraussage für das Transitpeptid ungenau ist. Zum anderen wurde durch die Prozessierung der Fusionskonstrukte bestätigt, dass die beiden Proteine Tic23 und Pss1 Transitpeptide für eine Lokalisation in Chloroplasten besitzen.

Der Unterschied der beiden Lokalisierungen könnte den Transportweg der beiden Proteine offenlegen. Somit würde Tic23 über das Cytosol direkt in den Chloroplasten transportiert werden und Pss1 über den publizierten Importweg über das ER und den Golgi-Apparat.

Im starken Kontrast zu diesen Ergebnissen stehen die publizierten Daten zu Pss1. Diese zeigten eine Lokalisierung von Pss1 in der Plasmamembran (Wang et al., 2018a). Hierfür wurde Pss1 mit GFP fusioniert und anschließend wurde das Konstrukt transient in *Nicotiana benthamiana* infiltriert. Neben der Verwendung eines Plasmamembran-Markers wurde durch die Autoren ebenfalls eine Plasmolyse durchgeführt, um die Lokalisierung in der Plasmamembran zu bestätigen. Ein Grund für die Unterschiede hinsichtlich der Lokalisierung könnte in den verschiedenen Methoden liegen. So verwendete Wang et al. ein heterologes System, in dem eine kodierende Sequenz für das PSS1 Homolog aus *Arabidopsis thaliana* in *Nicotiana benthamiana* Gewebe infiltriert wurde, wodurch sich eine abweichende Lokalisation

erklären ließe. In der vorliegenden Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass ein C-terminales Reporterprotein den Import des Volllängenproteins stört, und somit könnte auch eine korrekte Lokalisation von Pss1 nicht zu erwarten sein. Durch weitergehende Studien mit verschiedenen Markern beispielsweise für das endoplasmatisches Reticulum (als Beispiel GFP-HDEL) könnte der Transportweg beider Proteine genauer bestimmt werden, doch anhand der gezeigten Experimente zur Lokalisation sowie der Interaktionsstudien ist von einer Lokalisation von Tic23 in der inneren Hüllmembran auszugehen.

Für Tic23 wurde zwischen den Aminosäuren 167 bis 187 ein hydrophober Bereich, der eine Transmembrandomäne sein könnte, mit Hilfe von TMHMM vorhergesagt. In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob die Vorhersage zutrifft und welche Eigenschaften die Transmembrandomäne aufweist. So erfolgte vor der Ko-Immunoprecipitation eine Auftrennung von isolierten Chloroplasten in ihrer Kompartimente. Hier konnte ausschließlich ein Signal für Tic23 in der Membranfraktion detektiert werden (Abb. 6 C), was die Annahme der Transmembrandomäne bestätigt. Anschließend wurde die Membranfraktion aus Chloroplasten mit verschiedenen Puffern behandelt, um eine periphere Anlagerung des Proteins an der Membran auszuschließen. Hier zeigte sich, dass Tic23 nur durch den Einsatz eines Detergens aus der Membran gelöst werden konnte. Somit weist Tic23 eine membrandurchreichende Domäne auf, die das Protein in der inneren Hüllmembran verankert.

Durch einen anschließenden doppelten Proteaseverdau sollte die Topologie von Tic23 innerhalb der Membran ermittelt werden. Mit Hilfe der unterschiedlichen Membrangängigkeit der Proteasen Thermolysin und Trypsin lässt sich prüfen, welcher Terminus in den Intermembranraum hineinreicht. So war Tic23 Thermolysin resistent und zeigte eine geringere Resistenz gegenüber Trypsin (Abb. 7 C). Da Thermolysin die äußere Hüllmembran nicht passieren kann (Knopf et al., 2012), bestätigen die Ergebnisse erneut die Lokalisierung von Tic23 in der inneren Hüllmembran. Anhand der Detektion von Toc33 wurde die Funktionalität von Thermolysin gezeigt (Jarvis et al., 1998). Die Abnahme des Toc33 Signals bei höheren Konzentrationen zeigte, dass Thermolysin Toc33 an der äußeren Hüllmembran verdaut hatte und somit die Protease funktionsfähig war.

Durch die Membrangängigkeit von Trypsin (McAndrew et al., 2001) durch die äußere Hüllmembran konnte erwartet werden, dass diese Protease Tic23 entweder vollständig oder teilweise abbauen kann. Jedoch konnten in dem Experiment keine Abbauprodukte von Tic23 und nur eine geringe Abnahme der Proteinmenge detektiert werden. Da Tic23 nur eine Transmembrandomäne aufweist, die recht mittig im Protein lokalisiert ist, wäre es möglich, dass durch die proteolytische Funktion von Trypsin nur ein Terminus von Tic23 abgebaut worden ist. Da kein Abbauprodukt detektiert wurde, deutet das Ergebnis darauf hin, dass Tic23 vor dem proteolytischen Verdau geschützt in einem Komplex vorliegt.

4.3 Eine Mutation von Tic23 beeinflusst die Entwicklung der Pflanzen

Tic23 ist eine Komponente des 1 MDa TIC-Komplexes in der inneren Hüllmembran. Durch eine Mutation in den Komponenten des Komplexes werden die betroffenen Pflanzen erheblich in ihrem Wachstum eingeschränkt. So bilden Insertionsmutanten von den Genen *TIC20-1*, *TIC56* und *TIC100* einen albinotischen Phänotyp aus (Hirabayashi et al., 2011, Kikuchi et al., 2013).

Daher könnte eine Mutation im *TIC23* Gen ebenfalls zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Pflanzen und somit zu einem veränderten Phänotyp der Pflanzen führen. In dieser Arbeit wurden zwei T-DNA Insertionslinien genauer untersucht. Die *tic23-1* zeigte eine T-DNA Insertion im Promotorbereich des Gens, während die T-DNA Insertion von *tic23-2* im letzten Exon des Gens lokalisiert war. Nur die Mutante *tic23-1* wies aber einen hellgrünen Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp auf, der durch eine Chlorophyllbestimmung nachweisbar war (Abb. 9 B). Dieser Phänotyp war am stärksten im jungen Blattmaterial ausgeprägt. In einem Alter von ungefähr 3 Wochen passt sich der Phänotyp an den Wildtyp an und weist dann keine Reduzierung der Pigmentmengen mehr auf (Abb. 10). Die Ausprägung dieses Phänotypen war sowohl in der Chloroplastenstruktur durch eine vermeintlich optische Reduzierung der Thylakoidmembranen, wie auch in der vergleichenden Proteomanalyse durch eine Reduzierung der Abundanz von Photosynthese relevanten Proteinen sichtbar. Hierbei kann eine Parallele zum Reishomolog OsDG2 gebildet werden. Wie der Name *Oryza sativa delayed greening 2* schon nahelegt, führt eine Mutation in diesem Gen zu einem verspäteten Ergrünen der Pflanzen (Jiang et al., 2014). Daraus lässt sich schließen,

dass beide Proteine eine ähnliche Funktion in der Chloroplastenbiogenese in früheren Blattstadien haben könnten. Um den genauen Einfluss von Tic23 auf die Entwicklung des Chloroplastens zu erklären, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Durch die T-DNA Insertionen im *TIC23* Gen konnte von einer Transkriptionsänderung ausgegangen werden. Hierbei kann die Insertion zu einem möglichen *knock-out* oder *knock-down* führen. Innerhalb einer Analyse der Transkriptmenge würde man in beiden Fällen von einer Reduzierung der Menge ausgehen. Für die beiden Mutanten *tic23-1* und *tic23-2* wurde die Transkriptmenge von Tic23 über das gesamte Gen bestimmt. Zum einen wurde für die *tic23-2* Mutante vom Primerpaar im letzten Exon kein Transkript amplifiziert (Abb. 11 A). Das Primerpaar wurde so gewählt, dass es die potentielle Insertionsstelle umspannte. Durch die T-DNA Insertion vergrößerte sich der zu amplifizierende Bereich um ein Vielfaches, was durch die Amplifikation der qRT-PCR Methode nicht mehr abgedeckt werden konnte. Daher bestätigten die Ergebnisse nur die Position der Insertion. Im Weiteren musste überprüft werden, wie sich diese T-DNA Insertion in der *tic23-2* Mutante auf das Protein auswirkte.

Zum anderen konnte statt einer Reduzierung eine Erhöhung der Transkriptmengen in der *tic23-1* Mutante über das gesamte Gen festgestellt werden. Daher wurde als nächstes die Proteinmenge in den Mutanten überprüft.

In der Analyse der Proteinmengen ist zu erkennen, dass in der *tic23-1* Mutante insgesamt nur noch 20 % der im Wildtyp ursprünglichen Proteinmenge von Tic23 vorhanden war. Dieses geht einher mit einer Reduzierung von Tic20. Interessanterweise führt eine Erhöhung der Transkriptmenge zu einer reduzierten Proteinmenge von Tic23 in der Mutante. Es ist zu erwarten, dass eine höhere Menge an Transkript zu einer Erhöhung der Proteinmengen führt. Durch die T-DNA Insertion innerhalb der Promotorregion konnte davon ausgegangen werden, dass das Transkript verändert wurde und somit dieses in der *tic23-1* Mutante nicht mehr endogen vorliegt. So könnten verschiedene Prozesse dafür ursächlich sein, die zu der Herunterregulierung des Proteins führen. Zum einen könnte es zu einem *upstream open reading frame* kommen, der die Effizienz zum Ablesen des eigentlichen Start-Codons reduziert (Von Arnim et al., 2014). Zum anderen könnte das *capping* der transkribierten mRNA nicht funktionieren. So führt eine Störung im *capping* zu einem schnellen Abbau der mRNA im Cytosol, zu einem schlechteren Transport der mRNA ins Cytosol oder zu einer Inhibierung der Initiation der Translation (Cowling, 2010).

Durch eine Amplifikation des 5'-Bereichs vor dem Tic23 Transkript und insbesondere vor der T-DNA Insertion könnten weitere Schlussfolgerungen zu den Regulationsprozessen des Transkripts gezogen werden. Schlussendlich resultieren diese Prozesse in der Reduzierung der Proteinmenge von Tic23 in der Mutante.

In der *tic23-2* Mutante konnte lediglich eine Reduzierung der Tic23 Proteinmenge um 40 % gemessen werden. Hierbei wurde für Tic23 eine verkürzte Variante detektiert (Abb. 11 B). Diese Verkürzung wurde durch die Ergebnisse der Transkriptuntersuchung in der *tic23-2* Mutante bestätigt. Durch die T-DNA Insertion kommt es zu einem frühzeitigen Stopp der Transkription, was schlussendlich zu einer Reduzierung der Proteinelänge führt. Auch in der *tic23-2* Mutante wurde die Tic20 Proteinmenge geringer. Schlussendlich zeigte sich ein Zusammenhang von einer höheren Reduzierung der Tic23 Proteinmenge zum ausgeprägteren Phänotypen. Wenn die Proteinmenge von Tic23 einen gewissen Punkt unterschreitet, bildete die Pflanze einen veränderten/hellgrünen Phänotyp aus.

Durch das externe Einbringen eines Plasmids mit dem endogenen Tic23 war es möglich, den Phänotyp, wie auch die Effekte von der *tic23-1* Mutation zu komplementieren (Abb. 13). So wurden die gleichen Mengen an Chlorophyll und Tic23 Protein gemessen wie im Wildtyp. Hierbei zeigte sich, dass auf Transkriptebene die Menge an Tic23 um ein Vielfaches zunahm. Das eingebrachte Tic23 stand im Plasmid unter der Kontrolle des 35S-CaMV Promotors, der ein sehr starker Promotor ist, und so zu einer Überexpression des Tic23 führte. Durch die starke Expression des Gens war eine erhöhte Proteinmenge in der *tic23+35S-TIC23* Linie zu erwarten. Diese schlug sich in der Proteinmenge in der Komplementationslinie nicht nieder. So könnte die Menge posttranslational durch die Anzahl der 1 MDa-Komplexe oder deren Position innerhalb der inneren Hüllmembran begrenzt werden. Auch muss eine hohe Transkriptmenge nicht zwangsläufig in einer hohen Proteinmenge resultieren. So könnte beispielsweise durch einen beeinträchtigten Transport der mRNA aus dem Zellkern die Proteinmenge trotz hoher Menge an Transkript herabgesetzt sein.

Ein deutlich stärkeren Effekt einer *tic23-1* Mutation konnte durch das *gene silencing* mit Hilfe einer ami-RNA hervorgerufen werden (Abb. 15). Durch das Einbringen des induzierbaren Plasmids kam es in den generierten Mutanten nach der Behandlung mit Dexamethason zu einer Reduzierung der Transkript- sowie der Proteinmenge von Tic23. Ebenfalls zeigte sich, dass als Resultat die Mutanten einen hellgrünen Phänotyp

aufweisen. Hierbei bildeten die jüngeren Pflanzen einen stärkeren Phänotyp aus, der optisch mehr an einem Albinophänotyp heranreicht. Innerhalb des anschließenden Western-Blots konnte kein Tic23 Protein mehr nachgewiesen. Über eine sensitivere Methode könnte in einem weiteren Schritt überprüft werden, ob es in den generierten *silencing* Linien zu einem vollständigen Abbau des Tic23 Transkripts kommt. Zum jetzigen Zeitpunkt scheint es, dass durch das *gene silencing* eine induzierbare *knock-out* Mutante für Tic23 generiert werden konnte. Zusätzlich zeigte sich in weiteren Experimenten, dass in einem späteren Entwicklungsalter (+28 Tage) der Pflanzen das *gene silencing* weiterhin induzierbar war. In diesen Experimenten bildeten die älteren Pflanzen der *sil-tic23* einen hellgrünen Phänotypen aus (Ergebnisse nicht gezeigt). Somit wäre Tic23 nicht nur im jüngeren Alter der Pflanzen wichtig, sondern darüber hinaus im weiteren Lebenszyklus. Mit Hilfe dieser Mutante wären weitere Analysen zur Funktion von Tic23 im Zusammenhang mit dem Alter der Pflanze möglich. Ein besonderes Augenmerk kann dabei auf die Biogenese des Chloroplastens sowie das Wechselspiel der Biogenese mit dem 1 MDa TIC-Komplex gelegt werden.

4.4 Tic23 beeinflusst den Proteinimport

Als Komponente des 1 MDa TIC-Komplexes kann die Mutation im *TIC23* Gen zu einer Veränderung der Importfähigkeit führen. Zur Überprüfung des Einflusses von Tic23 wurde ein *in vitro* Importexperiment mit hellgrünen *tic23-1* Mutanten durchgeführt. So zeigte sich in diesen Experimenten, dass die Mutante eine bessere Importfähigkeit hatte, als der Wildtyp (Abb. 16). Hierbei gab es keinen Unterschied zwischen den untersuchten Substraten. Sowohl SSU wie auch E1 α wurden um jeweils 30 % besser importiert. Hierbei ist die Tatsache erstaunlich, dass in der *tic23-1* Mutante sowohl die Proteinmenge von Tic20 als auch der gesamte 1 MDa TIC-Komplex reduziert ist (Abb. 11 B). Der 1 MDa TIC-Komplex wurde als genereller Importkomplex für photosynthetische Proteine postuliert (Kikuchi et al., 2013). Somit sollte eine Reduzierung des Kanalproteins zu einer verringerten Importfähigkeit führen. Dieses konnte in der Mutante nicht beobachtet werden. Dies weist darauf hin, dass Tic23 eine regulatorische Funktion in dem 1 MDa TIC-Komplex übernehmen könnte. Ein Szenario hierbei könnte sein, dass durch die reduzierte Abundanz von Tic23 eine mögliche

inhibierende Funktion des Proteins auf den 1 MDa TIC-Komplex entfällt und damit eine bessere Importfähigkeit des Komplexes entsteht.

Ebenfalls sollte davon ausgegangen werden, dass bei Reduktion einer Komponente des 1 MDa TIC-Komplexes, die Stabilität des gesamten Komplexes beeinträchtigt wird und die weiteren Komponenten ebenfalls reduziert sind. Doch bleibt die Proteinmenge von Tic56 in der *tic23-1* Mutante auf demselben Level wie im Wildtyp. Somit sind die beiden Proteine voneinander unabhängig. Allgemein konnte für die Mutante *tic56-1* einen Defekt in der Ribosomassemblierung und in der plastidären Translation festgestellt werden, der darüber hinaus Import unabhängig zu sein scheint (Kohler et al., 2016). Es konnte keine Beeinträchtigung der Proteinimportaktivität in der *tic56-3* Mutanten festgestellt werden, trotz mangels an einem Vollängen Tic56 und einer verringerten Menge anderer Untereinheiten des 1 MDa TIC-Komplexes (Kohler et al., 2015). In diesem Zuge wurde für den 1 MDa TIC-Komplex ein modularer Aufbau postuliert, bei dem die einzelnen Module unabhängig voneinander stabil sind (Agne et al., 2017). Des Weiteren konnte in der *tic23-1* Mutante eine höhere Proteinmenge von Tic40 detektiert werden. Neben dem 1 MDa TIC-Komplex ist als weiterer Importkomplex ein Komplex aus Tic110 und Tic40 bekannt. In diesem wirkt Tic40 als Ko-Chaperon zusammen mit Tic110, wobei diesem eine Ionenkanalaktivität und eine Funktion als *scaffold* Protein nachgewiesen wurden (Chou et al., 2003). Dieser ist unabhängig von dem 1 MDa TIC-Komplex (Kikuchi et al., 2009) und somit besteht die Möglichkeit, dass dieser Komplex bei einer Reduzierung des 1 MDa TIC-Komplexes den Proteinimport übernimmt.

Anschließend wurde auch die Importfähigkeit von der Doppelmutante *tic23-1 x pss1* überprüft. In der Doppelmutante konnte eine partielle Wiederherstellung der Effekte, die durch die *tic23-1* Mutation ausgelöst werden, erkannt werden. So hat die Doppelmutante eine reduzierte Menge an Chlorophyll, doch bildeten die Pflanzen keinen sichtbar hellgrünen Phänotyp aus (Abb. 17 A). Molekular betrachtet zeigte sich, dass auf Transkriptebene beide Gene, *TIC23* sowie *PSS1*, herunterreguliert waren. Daraus folgte, dass auch die Proteinmenge von Tic23 reduziert war, jedoch im Vergleich zur Einzelmutante *tic23-1* fiel diese leicht höher aus (Abb. 17 D).

Da die *pss1* Mutation hier wie eine *extragenic suppressor* Mutation wirkt, legen die Ergebnisse nahe, dass Pss1 und Tic23 eine ähnliche Funktion haben. Als Homolog von Tic23, das ebenfalls in den Chloroplasten lokalisiert ist (Abb. 7 A), besteht die

Möglichkeit, dass Pss1 die Funktion von Tic23 übernehmen kann. Daher wurde überprüft, wie sich die Importfähigkeit der Doppelmutante verändert. So zeigten die durchgeführten Importexperimente, dass die Doppelmutante die Standardsubstrate SSU und E1 α schlechter importieren kann als die Einzelmutante *tic23-1* (Abb. 19). Somit führt die Doppelmutation zu einer Verschlechterung der Importfähigkeit. Die Ergebnisse weisen auf eine möglicherweise gegenläufige Funktion beider Proteine im 1 MDa TIC-Komplex hin. Da die Pflanzen vielen biotischen und abiotischen Faktoren ausgesetzt sind, muss sich der Proteinimport in den Chloroplasten diesen Umweltfaktoren anpassen. So konnte gezeigt werden, dass Pss1 die Resistenz gegenüber wirtsunspezifischen Pathogenen verbessert (Wang et al., 2018a). Daher könnten beide Proteine beispielsweise eine regulatorische Funktion für den Proteinimport in den Chloroplasten bei unterschiedlichen Bedingungen übernehmen. Daher wäre eine weitere Untersuchung des Pss1 im Bezug auf mögliche Interaktionspartner interessant. Anhand dieser könnte ein besserer Einblick gewonnen werden, an welcher Stelle Pss1 in den Prozessen von Tic23 einwirkt und somit Rückschlüsse getroffen werden, welche konkrete Funktion Tic23 erfüllt.

4.5 Tic23 hat eine mögliche Funktion unter Hitzestress

In den Daten von Winter et al. (Winter et al., 2007) wurde während einer Hitzestressbehandlung eine Expressionserhöhung von Tic23 beobachtet, die sich im Vergleich zur Expression der Komponenten des TOC- und des 1 MDa TIC-Komplexes als einzigartig erweist. Diese Expressionsänderung konnte in den Experimenten im Rahmen dieser Arbeit reproduziert und im Vergleich zu anderen Komponenten des Proteinimports betrachtet werden. Jedoch erhöhte sich hierbei nicht nur die Expression von Tic23, sondern auch die von Tic20. Erneut war eine gemeinsame Regulation von beiden Proteinen erkennbar. Im Gegensatz dazu sank die Expression von Tic56 und Toc159. Diese Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen von Dutta et al. (Dutta et al., 2009), die ebenfalls eine Reduzierung von einigen Importkomponenten und im Konkreten von Toc159 bei Hitze zeigten. Im Kontrast zu den Daten von Dutta et al. wurde eine Expressionserhöhung von Tic20 ermittelt bei einer Hitzebehandlung von 45 °C für 2 Stunden. Auf Proteinebene ist ein anderes Bild zu sehen. Im Kontrast zu den Transkriptdaten sank die Proteinmenge von Tic20 während der

Hitzestressbehandlung, insbesondere in der *tic23-1* Mutante war eine erhebliche Reduzierung zu sehen. Daneben wurde für Tic56 und Tic40 ein Anstieg der Proteinmengen im Wildtyp beobachtet. Im Unterschied wurde in der *tic23-1* Mutante nur einen Proteinmengenzunahme bei Tic40 gemessen. Somit scheint zuerst eine Anpassung des Proteinimports über die Erhöhung von Tic40 als Reaktion auf den Hitzestress zu geschehen. Im klassischen Modell wird ein Komplex aus Tic20, Tic40 und Tic110 als Translokationskomplex an der inneren Hüllmembran angenommen. Für diese Komponenten konnte eine Assoziation mit den Importintermediaten nachgewiesen und zusätzlich konnten diese ko-isoliert werden mit TOC-Komplexkomponenten (Kouranov et al., 1998, Chou et al., 2003, Kessler & Blobel, 1996). Daher könnte durch die Erhöhung des Ko-Chaperons mit einer parallelen Reduzierung des Kanalproteins Tic20 die Importmaschinerie geschützt werden, um einen effizienten Transport von entscheidenden, schützenden Proteinen zu ermöglichen.

Es ist bekannt, dass nach dem Hitzestress die Proteinmenge von Tic40 von der Protease FtsH11, einer ATP-abhängigen Metalloprotease, durch den Abbau von überschüssigen Kopien reguliert wird (Adam et al., 2019). Daneben wurde bei einer FtsH11 *knock-out* Mutante ebenfalls eine Zunahme an den Komponenten des 1 MDa TIC-Komplexes sowie den postulierten Import-Motor aus Ycf2-FtsHis Komplexes, der aus den Komponenten Ycf2, FtsHi1, FtsHi2, FtsHi4, FtsHi5, FtsH12 und der plastidären NAD-MDH (AT3G47520) besteht, festgestellt (Adam et al., 2019, Kikuchi et al., 2018). Somit könnte FtsH11 für die Dynamik der Importkomplexe zuständig sein. Ferner wurde gezeigt, dass FtsH11 für die angeeignete Thermotoleranz von Pflanzen benötigt wird (Chen et al., 2006, Chen et al., 2018a). So weisen FtsH11 Mutanten eine geringere photosynthetische Effizienz bei Hitzestress auf (Chen et al., 2018a). Durch den Einfluss von FtsH11 auf den Importmotor wird ebenfalls NAD-MDH, als Bestandteil des Komplexes, reguliert. Hierbei katalysiert NAD-MDH die Reduktion von Oxalacetat in Malat, wobei NADPH in NADP⁺ oxidiert wird. NADP⁺ wird wiederum benötigt, um die reduzierenden Elektronen in den Chloroplasten abzuführen (Heber et al., 1978). So scheint, FtsH11 eine Überproduktion von O₂⁻ zu verhindern und somit das Photosystem vor oxidativen Stress während des Hitzestress zu schützen. Ein ähnliche Funktion wurde ebenfalls für das TRXL1 Protein (*thioredoxin-like 1*) postuliert (Pant et al., 2020). Hierbei weist TRXL1 einen positiven Einfluss auf die Aktivität von

NADP-MDH auf. So erhöht sich deren Aktivität, um die Pflanzen vor oxidativen Stress sowie vor Pathogenen zu schützen. Es konnte gezeigt werden, dass TRXL1 von ClpC1 während Hitzeeinwirkung degradiert wird. In diesem Zusammenhang wird davon ausgegangen, dass TRXL1 einen Einfluss in der Reduzierung von NADP-MDH hat und somit die Funktionalität von NADP-MDH während Stressbedingungen gewährleistet werden kann (Pant et al., 2020).

Während des Hitzestresses konnten in der *tic23-1* Mutante einige Unterschiede zum Wildtyp detektiert werden. So nimmt die Transkriptmenge von Tic23 deutlich zu, wobei dies als Reaktion auf den Hitzestress zu betrachten ist. Da die Struktur der Tic23 mRNA, die in der *tic23-1* Mutante gebildet wird, unbekannt ist, konnte nicht davon ausgegangen werden, dass mehr Transkript zu einer Erhöhung der Proteinmenge führt. In dem zugehörigen Western-Blot konnte aber gezeigt werden, dass die Proteinmenge in der *tic23-1* Mutante um circa das Doppelte zunimmt. Ebenfalls konnte im Unterschied zum Wildtyp in der Mutante eine Reduzierung von Tic56 auf Proteinebene festgestellt werden. Zur Kontrolle wurde die Veränderung von cpHsc70 im Western-Blot betrachtet. Bei der Analyse wurde eine relative Reduzierung der Proteinmenge um circa 30 % in der *tic23-1* Mutante bei Hitzestress festgestellt. Im Wildtyp konnte keine Veränderung festgestellt werden. Interessanterweise konnte bei der vergleichenden Proteomanalyse der Mutante zum Wildtyp eher eine geringe Erhöhung (um den Faktor 1,2) gemessen werden. Dies deutet darauf, dass unter normalen Wachstumsbedingungen eine erhöhte Menge von cpHsc70 auftreten könnte und bei Hitze es zu einer Reduzierung in der *tic23-1* Mutante kommen könnte. Bei der Betrachtung der ko-regulierten Expression von Genen mit dem ATTED-II Browser wurde für beide cpHsc70 eine hohe Ko-Regulation festgestellt (Anh. 9)(Obayashi et al., 2022). Somit könnte anhand dieser Beobachtungen eine mögliche Beteiligung von Tic23 in den nachfolgenden Prozessen nach dem Proteinimport bestehen. cpHsc70 gehört zu der Hsp70 Familie und umfasst zwei stromale Proteine cpHsc70-1 und cpHsc70-2 (Su & Li, 2010). Hierbei interagiert cpHsc70-1 mit dem Translokonzonkomplex aus Tic110 und Tic40. Für die Hsp70 Proteinfamilie wurde eine Funktion als Hauptimportmotor in *Physcomitrella patens* sowie in *Arabidopsis thaliana* beschrieben (Su & Li, 2010, Shi & Theg, 2010). Des Weiteren wurde gezeigt, dass der C-Terminus der cpHsc70s für die Interaktion mit Ko-Chaperonen wie Tic40 wichtig ist. So ist davon auszugehen, dass die beiden cpHsc70s an verschiedene Ko-Chaperonen binden

können, die diese zu unterschiedlichen Substrate führen. Durch den Verlust von cpHsc70-1 kommt es in einer Mutante zu viele phänotypische Veränderungen. *Knock-out* Mutanten bilden unter anderem andersfarbige Keimblätter, missgebildete Blätter, reduzierter Chlorophyllgehalt, geringere Größe und verzögertes Wurzelwachstum, insbesondere nach Hitzeschockbehandlungen von keimenden Samen, aus (Su & Li, 2010).

Innerhalb dieses stromalen Chaperonsystem gibt es eine weitere Familie, die die Faltung von neu synthetisierten und importierten Proteinen durchführt. Dabei bilden sie eine Familie aus insgesamt sechs Proteinen, die jeweils den beiden Typen Cpn60 α und Cpn60 β zugeordnet werden können (Hill & Hemmingsen, 2001). Dabei bilden sie hetero-oligomere Komplexe aus den beiden Typen. Diese Cpn60s werden hierbei von Tic110 rekrutiert und unterstützen dann die Faltung der importierten Proteine (Ke et al., 2017). Interessanterweise konnte unter anderem ein Peptid von Cpn60 β 1 bei der Ko-Immunopräzipitation nachgewiesen werden und weist somit auf eine mögliche Interaktion mit Tic23 hin (Anh. 1). Ebenfalls wurde bei der vergleichenden Proteomanalyse einen Mengenerhöhung um den Faktor 2 von Cpn60 β 2 gemessen. Auch besteht von Tic23 zu Cpn60 β 2 die größte Ko-Expression in der ATTED-II Datenbank (Anh. 9). Für die Cpn60 Proteine wurde gezeigt, dass diese für die Proteinfaltung von insbesondere chloroplastidären Proteinen, die große Untereinheit von RubisCo in *Orzya sativa* und eine Untereinheit des NADH dehydrogenase-like Komplexes, von entscheidener Rolle sind (Peng et al., 2011, Kim et al., 2013).

Neben der Faltung der importierten Proteine wurde auch eine Funktion in der Faltung von stress-denaturierten Proteinen gezeigt. Da fünf von den Cpn60s durch Hitze induziert werden, könnten sie somit bei der Refaltung von durch Hitze denaturierenden Proteinen assistieren (Kim et al., 2013).

Die ermittelten Veränderungen der Transkript- sowie Proteinmengen von Tic23 während des Hitzestresses zeigten einen Einfluss auf die Hitzeresistenz der Pflanzen. Phänotypisch war zu sehen, dass die *tic23-1* Mutante im Vergleich mit den anderen Tic23 relevanten Mutanten den Hitzestress besser verträgt. Da sich der Phänotyp von *tic23-1* in der Chlorophyllmenge unterscheidet, wurden weitere chlorophyllarme Mutanten auf ihr Verhalten unter Hitzestressbedingungen untersucht. Hier zeigte sich, dass die weiteren Mutanten *tic56-3*, *ppi1* und *fad5*, die einen hellgrünen Phänotypen besaßen, ebenso die Hitzeeinwirkung überlebten wie die *tic23-1* Mutante. So wiesen

alle eine bessere Hitzeresistenz als der Wildtyp auf. Im Vergleich mit 3 Wochen alten Pflanzen waren die jüngeren Pflanzen resistenter gegenüber dem Hitzestress, was sich anhand der Anzahl an unverletzten Pflanzen zeigte. Hierbei bildet insbesondere die *ppi1* Mutante eine Ausnahme. Nur noch circa 60 % der 3 Wochen alten Pflanzen waren gegenüber Hitzestress resistent. So konnte für die Mutante aber eine generelle bessere Hitzeresistenz festgestellt werden, die schon genauer untersucht wurde. Dabei wurde keine Abnahme der Chloropyllmengen oder der photosynthetischen Aktivität festgestellt werden (Paul et al., 2020). Generell lässt sich feststellen, dass jüngere Pflanzen in der Lage sind, den Hitzestress besser zu überleben. Hierbei werden verschiedene Faktoren zusammen spielen. So könnte generell die Verdunstung von Wasser über die Blätter ein Problem darstellen, oder aber auch das Entwicklungsstadium der Pflanze.

Erstaunlicherweise führte eine *knock-down* Mutation von Tic23 zu einer besseren Hitzetoleranz. Dieses suggeriert einen regulatorischen Einfluss von Tic23 auf die Pflanzen. Der gleiche Effekt konnte ebenfalls bei einer *knock-out* Mutante von ClpC1 gesehen werden (Pant et al., 2020, Sjögren et al., 2004). ClpC1 gehört der Clp/Hsp100 Familie an, die in der Qualitätskontrolle von Proteinen beteiligt sind. Die Familie besteht aus 15 Proteinen, die im Nukleus kodiert vorliegen, und einem chloroplastidär kodierten Protein. Diese bilden einen proteolytischen Kernkomplex und einen ringförmigen Komplex aus ATP-abhängigen Chaperonen. In dieser Maschinerie erkennen die Chaperone die spezifischen Substrate, entfalten diese und transportieren diese an den proteolytischen Kernkomplex für die Degradation. In *A. thaliana* umfasst die Gruppe der ATP-abhängigen Chaperonen ClpD, ClpC1 sowie sein Paralog ClpC2 (Olinares et al., 2011). So wurde gezeigt, dass ClpC2 unter anderem mit Tic110 und mit einem Fusionsprotein aus dem Transitpeptid von Ferredoxin-NADP⁺ Reductase (aus Erbse) und GST interagiert (Rosano et al., 2011, Nielsen et al., 1997, Akita et al., 1997). Des Weiteren konnte ein modifiziertes Imports substrat, an dem Hsp70 als genereller Importmotor nicht binden konnte, weiterhin in den Chloroplasten importiert werden. Dieses Ergebnis verweist auf eine Importfunktion von ClpC (Bruch et al., 2012). Zusammengenommen wäre hierbei ein ClpC/Hsp70/Tic40 Komplex als Proteinimportmotor möglich (Sjögren et al., 2014). Darüber hinaus wurde in einem *in vitro* Experiment gezeigt, dass ClpC2 in der Lage ist ein hitzedenaturiertes Protein in einen funktionsfähigen Zustand zurückzufalten (Rosano et al., 2011). Im Zuge dieser

Arbeit wurde in der vergleichenden Proteomanalyse eine um den Faktor zwei höhere Proteinmenge von ClpC2 in der *tic23-1* Mutante gemessen als im Wildtyp. So führt eine Reduzierung von Tic23 zu einer Hochregulierung der Proteine der Qualitätskontrolle. Durch die Regulation ist eine schnellere Anpassung der Proteinimportkomplexe an den Hitzestress möglich und würde somit eine schnellere Adaption der Pflanze an den veränderten Bedingungen erlauben.

In bisherigen Studien wurde gezeigt, dass die Expression der TOC-Komplexkomponenten bei Hitzestress in Erbse reduziert waren (Dutta et al., 2009). Von diesem Effekt ausgenommen war Toc34. Nicht nur die Expression, als schnelle Reaktion der Pflanzen, wies diese Reaktion auf, sondern auch die Proteinmengen von den TOC-Komplexkomponenten lagen bei Hitzestress reduziert vor. Das spricht dafür, dass der Import bei Hitzestress gehemmt wird. In dieser Arbeit zeigte sich, dass auch die Proteinmenge von Tic20 während des Hitzestresses im Wildtyp abnimmt. Auch das deutet auf eine mögliche Reduzierung des Imports hin.

Daher wurde die Importfähigkeit vom Wildtyp im Vergleich mit der *tic23-1* Mutante unter Hitzestress untersucht. Während es bei dem Standardsubstrat E1 α zu keiner hitzestress-induzierten Reduzierung der Importfähigkeit kommt, zeigt sich für das Substrat SSU ein anderes Bild (Abb. 23). Der Wildtyp importiert nach der Hitzestressbehandlung das Substrat SSU schlechter. Im Vergleich dazu kommt es bei *tic23-1* zu keiner Verschlechterung des Imports. Somit scheint es, als hätte Tic23 einen Einfluss auf den Import unter Hitzestress. So stabilisiert eine Reduzierung der Tic23 Proteinmengen den Import während Hitzestress. Daher scheint es, dass Tic23 einen negativ regulatorischen Effekt auf den Import im Wildtyp hat. Schaut man auf die Importkomplexe nach der Hitzebehandlung, so scheint es, dass Tic23 vermehrt in den TOC-TIC Superkomplex wandert (Abb. 24). Dies ist im Wildtyp deutlich sichtbar, doch auch in der Mutante ist eine geringere Verschiebung zu sehen. Hierbei ist die Datenlage noch nicht ausreichend, um ein endgültiges Ergebnis zu erhalten. Durch eine erneute vergleichende Ko-Immunopräzipitation zwischen gestressten und ungestressten Pflanzen könnte gezeigt werden, ob TOC Komplexkomponenten nachgewiesen werden können. Anschließend müsste eine nähere Untersuchung der Veränderung der Proteinimportkomplexe durchgeführt werden, um die Anpassung des Proteinimports an den Hitzestress zu verstehen.

Zusammengenommen zeigen die Daten, dass Tic23 in einem frühen Entwicklungsstadium von *A. thaliana* Pflanzen benötigt wird und hierbei eine Rolle in der Chloroplastenbiogenese spielt. Unter Hitzeeinwirkung kommt es dann zu einer erheblichen Umformung der Chloroplasten, um diese vor dem Stress zu schützen. So werden in einem großen Netzwerk verschiedene Mechanismen aktiviert. Es scheint, dass Tic23 ein Teil dieses Netzwerk ist. Hierbei zeigten die Experimente, dass eine Reduzierung der Tic23 Proteinmenge zu einer besseren Hitzetoleranz der Pflanzen führte. Im Konkreten stabilisierte sich der Proteinimport in der *tic23-1* Mutante unter Hitzeeinwirkung. Somit hat Tic23 vermutlich eine regulatorische Funktion auf den Proteinimport in den Chloroplasten. Innerhalb der vorliegenden Arbeit konnten erste Indizien für eine mögliche Funktion von Tic23 in der Hitzestressantwort der Pflanzen gezeigt werden. Es bedarf aber noch einer Aufklärung über den genauen Einfluss von Tic23 bei diesen Mechanismen.

Literaturverzeichnis

- Adam Z, Aviv-Sharon E, Keren-Paz A, *et al.*, 2019. The chloroplast envelope protease FTSH11–interaction with CPN60 and identification of potential substrates. *Frontiers in plant science* **10**, 428.
- Agne B, Kessler F, 2009. Protein transport in organelles: The Toc complex way of preprotein import. *The FEBS journal* **276**, 1156-65.
- 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 Signaling & Behavior* **12**, 2429-44.
- Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK, 2003. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**, 657-85.
- Akita M, Nielsen E, Keegstra K, 1997. Identification of protein transport complexes in the chloroplastic envelope membranes via chemical cross-linking. *The Journal of Cell Biology* **136**, 983-94.
- Andersson B, Anderson JM, 1980. Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **593**, 427-40.
- Armbruster U, Hertle A, Makarenko E, *et al.*, 2009. Chloroplast proteins without cleavable transit peptides: rare exceptions or a major constituent of the chloroplast proteome? *Mol Plant* **2**, 1325-35.
- 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.
- Bae W, Lee YJ, Kim DH, *et al.*, 2008. AKR2A-mediated import of chloroplast outer membrane proteins is essential for chloroplast biogenesis. *Nature cell biology* **10**, 220-7.
- Balchin D, Hayer-Hartl M, Hartl FU, 2016. In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science* **353**, aac4354.
- Bartel DP, 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell* **116**, 281-97.
- Barua D, Downs CA, Heckathorn SA, 2003. Variation in chloroplast small heat-shock protein function is a major determinant of variation in thermotolerance of photosynthetic electron transport among ecotypes of *Chenopodium album*. *Functional Plant Biology* **30**, 1071-9.
- Bauer J, Chen K, Hiltbunner A, *et al.*, 2000. The major protein import receptor of plastids is essential for chloroplast biogenesis. *Nature* **403**, 203-7.
- Bodyl A, Mackiewicz P, Stiller JW, 2010. Comparative genomic studies suggest that the cyanobacterial endosymbionts of the amoeba *Paulinella chromatophora* possess an import apparatus for nuclear-encoded proteins. *Plant Biol (Stuttg)* **12**, 639-49.
- Bolter B, Soll J, 2017. Ycf1/Tic214 Is Not Essential for the Accumulation of Plastid Proteins. *Mol Plant* **10**, 219-21.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-54.
- Bruch EM, Rosano GL, Ceccarelli EA, 2012. Chloroplastic Hsp100 chaperones ClpC2 and ClpD interact in vitro with a transit peptide only when it is located at the N-terminus of a protein. *BMC plant biology* **12**, 1-8.

- Carbonell A, Takeda A, Fahlgren N, Johnson SC, Cuperus JT, Carrington JC, 2014. New Generation of Artificial MicroRNA and Synthetic Trans-Acting Small Interfering RNA Vectors for Efficient Gene Silencing in Arabidopsis. *Plant Physiology* **165**, 15-29.
- Chen J, Burke JJ, Velten J, Xin Z, 2006. FtsH11 protease plays a critical role in Arabidopsis thermotolerance. *Plant J* **48**, 73-84.
- Chen J, Burke JJ, Xin Z, 2018a. Chlorophyll fluorescence analysis revealed essential roles of FtsH11 protease in regulation of the adaptive responses of photosynthetic systems to high temperature. *BMC plant biology* **18**, 1-13.
- Chen L-J, Li H-M, 2017. Stable megadalton TOC-TIC supercomplexes as major mediators of protein import into chloroplasts. *The Plant Journal*.
- 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**, 641-54.
- Chen YL, Chen LJ, Chu CC, Huang PK, Wen JR, Li HM, 2018b. TIC236 links the outer and inner membrane translocons of the chloroplast. *Nature* **564**, 125-9.
- 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, *et al.*, 2003. Tic40, a membrane-anchored co-chaperone homolog in the chloroplast protein translocon. *EMBO J* **22**, 2970-80.
- 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.
- Cortleven A, Marg I, Yamburenko MV, *et al.*, 2016. Cytokinin Regulates the Etioplast-Chloroplast Transition through the Two-Component Signaling System and Activation of Chloroplast-Related Genes. *Plant Physiol* **172**, 464-78.
- Cowling VH, 2010. Regulation of mRNA cap methylation. *Biochemical Journal* **425**, 295-302.
- Cox J, Mann M, 2008. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized ppb-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature biotechnology* **26**, 1367-72.
- Czulpinska M, Rurek M, 2018. Plant Glycine-Rich Proteins in Stress Response: An Emerging, Still Prospective Story. *Front Plant Sci* **9**, 302.
- Dickinson PJ, Kumar M, Martinho C, *et al.*, 2018. Chloroplast signaling gates thermotolerance in Arabidopsis. *Cell Reports* **22**, 1657-65.
- Dutta S, Mohanty S, Tripathy BC, 2009. Role of temperature stress on chloroplast biogenesis and protein import in pea. *Plant Physiol* **150**, 1050-61.
- Emanuelsson O, Brunak S, Von Heijne G, Nielsen H, 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* **2**, 953-71.
- Engler C, Youles M, Gruetzner R, *et al.*, 2014. A golden gate modular cloning toolbox for plants. *ACS synthetic biology* **3**, 839-43.
- Fellerer C, Schweiger R, Schongruber K, Soll J, Schwenkert S, 2011. Cytosolic HSP90 cochaperones HOP and FKBP interact with freshly synthesized chloroplast preproteins of Arabidopsis. *Mol Plant* **4**, 1133-45.
- Ferro M, Brugiére S, Salvi D, *et al.*, 2010. AT_CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins. *Mol Cell Proteomics* **9**, 1063-84.

- Flores-Perez U, Jarvis P, 2013. Molecular chaperone involvement in chloroplast protein import. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 332-40.
- Froehlich J, 2011. Studying Arabidopsis envelope protein localization and topology using thermolysin and trypsin proteases. In. *Chloroplast research in Arabidopsis*. Springer, 351-67.
- Ganesan I, Shi LX, Labs M, Theg SM, 2018. Evaluating the Functional Pore Size of Chloroplast TOC and TIC Protein Translocons: Import of Folded Proteins. *Plant Cell* **30**, 2161-73.
- Gutensohn M, Schulz B, Nicolay P, Flugge UI, 2000. Functional analysis of the two Arabidopsis homologues of Toc34, a component of the chloroplast protein import apparatus. *Plant J* **23**, 771-83.
- Heber U, Egneus H, Hanck U, Jensen M, Köster S, 1978. Regulation of photosynthetic electron transport and photophosphorylation in intact chloroplasts and leaves of *Spinacia oleracea* L. *Planta* **143**, 41-9.
- Heckathorn SA, Ryan SL, Baylis JA, *et al.*, 2002. In vivo evidence from an *Agrostis stolonifera* selection genotype that chloroplast small heat-shock proteins can protect photosystem II during heat stress. *Funct Plant Biol* **29**, 935-46.
- Heins L, Mehrle A, Hemmler R, *et al.*, 2002. The preprotein conducting channel at the inner envelope membrane of plastids. *EMBO J* **21**, 2616-25.
- Hill JE, Hemmingsen SM, 2001. Arabidopsis thaliana type I and II chaperonins. *Cell stress & chaperones* **6**, 190.
- Hiltbrunner A, Bauer J, Alvarez-Huerta M, Kessler F, 2001. Protein translocon at the Arabidopsis outer chloroplast membrane. *Biochem Cell Biol* **79**, 629-35.
- Hinnah SC, Hill K, Wagner R, Schlicher T, Soll J, 1997. Reconstitution of a chloroplast protein import channel. *EMBO J* **16**, 7351-60.
- 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**, 469-78.
- Hofmann NR, Theg SM, 2005. Chloroplast outer membrane protein targeting and insertion. *Trends Plant Sci* **10**, 450-7.
- Hong S-W, Vierling E, 2001. Hsp101 is necessary for heat tolerance but dispensable for development and germination in the absence of stress. *The Plant Journal* **27**, 25-35.
- 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 Biol (Stuttg)* **8**, 18-30.
- 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**, 38617-27.
- 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. *Molecular plant* **4**, 252-63.
- 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**, 3173-8.
- Inoue K, Keegstra K, 2003. A polyglycine stretch is necessary for proper targeting of the protein translocation channel precursor to the outer envelope membrane of chloroplasts. *Plant J* **34**, 661-9.
- Ivanova Y, Smith MD, Chen K, Schnell DJ, 2004. Members of the Toc159 import receptor family represent distinct pathways for protein targeting to plastids. *Molecular biology of the cell* **15**, 3379-92.

- Ivey RA, 3rd, Subramanian C, Bruce BD, 2000. Identification of a Hsp70 recognition domain within the rubisco small subunit transit peptide. *Plant Physiol* **122**, 1289-99.
- Jackson-Constan D, Keegstra K, 2001. Arabidopsis genes encoding components of the chloroplastic protein import apparatus. *Plant Physiol* **125**, 1567-76.
- Janni M, Gulli M, Maestri E, *et al.*, 2020. Molecular and genetic bases of heat stress responses in crop plants and breeding for increased resilience and productivity. *Journal of Experimental Botany* **71**, 3780-802.
- 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**, 100-3.
- Jiang Q, Ma X, Gong X, *et al.*, 2014. The rice OsDG2 encoding a glycine-rich protein is involved in the regulation of chloroplast development during early seedling stage. *Plant Cell Rep* **33**, 733-44.
- Jin JB, Kim YA, Kim SJ, *et al.*, 2001. A new dynamin-like protein, ADL6, is involved in trafficking from the trans-Golgi network to the central vacuole in Arabidopsis. *The Plant Cell* **13**, 1511-26.
- Ke X, Zou W, Ren Y, *et al.*, 2017. Functional divergence of chloroplast Cpn60 α subunits during Arabidopsis embryo development. *PLoS genetics* **13**, e1007036.
- Kessler F, Blobel G, 1996. Interaction of the protein import and folding machineries of the chloroplast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7684-9.
- Kessler F, Blobel G, Patel HA, Schnell DJ, 1994. Identification of two GTP-binding proteins in the chloroplast protein import machinery. *Science* **266**, 1035-9.
- Kikuchi S, Asakura Y, Imai M, *et al.*, 2018. A Ycf2-FtsHi Heteromeric AAA-ATPase Complex Is Required for Chloroplast Protein Import. *Plant Cell* **30**, 2677-703.
- Kikuchi S, Bedard J, Hirano M, *et al.*, 2013. Uncovering the protein translocon at the chloroplast inner envelope membrane. *Science* **339**, 571-4.
- 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**, 1781-97.
- Kilgore JA, Dolman NJ, Davidson MW, 2013. A review of reagents for fluorescence microscopy of cellular compartments and structures, Part II: Reagents for non-vesicular organelles. *Current protocols in cytometry* **66**, 12.31. 1-12.31. 24.
- Kim JS, Jung HJ, Lee HJ, *et al.*, 2008. Glycine-rich RNA-binding protein 7 affects abiotic stress responses by regulating stomata opening and closing in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **55**, 455-66.
- Kim S-R, Yang J-I, An G, 2013. OsCpn60 α 1, encoding the plastid chaperonin 60 α subunit, is essential for folding of rbcL. *Molecules and cells* **35**, 402-9.
- Knopf RR, Feder A, Mayer K, *et al.*, 2012. Rhomboid proteins in the chloroplast envelope affect the level of allene oxide synthase in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* **72**, 559-71.
- Kohler D, Helm S, Agne B, Baginsky S, 2016. Importance of Translocon Subunit Tic56 for rRNA Processing and Chloroplast Ribosome Assembly. *Plant Physiol* **172**, 2429-44.
- Kohler D, Montandon C, Hause G, *et al.*, 2015. Characterization of chloroplast protein import without Tic56, a component of the 1-megadalton translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts. *Plant Physiol* **167**, 972-90.
- 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. *The Journal of Cell Biology* **143**, 991-1002.

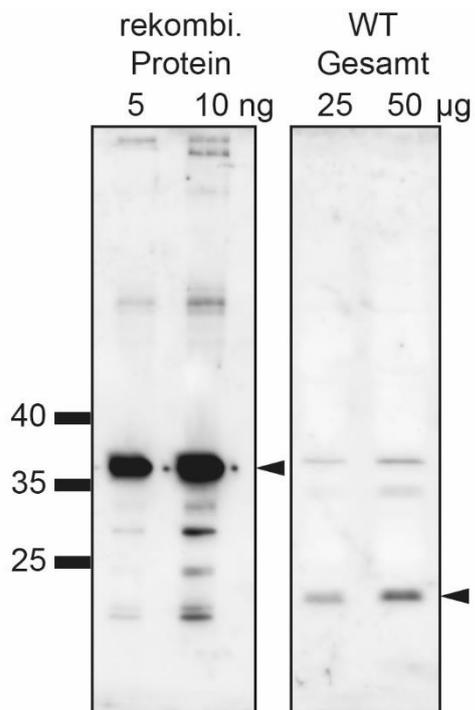
- Kouranov A, Schnell DJ, 1997. Analysis of the interactions of preproteins with the import machinery over the course of protein import into chloroplasts. *J Cell Biol* **139**, 1677-85.
- Kourtz L, Ko K, 1997. The early stage of chloroplast protein import involves Com70. *J Biol Chem* **272**, 2808-13.
- Kovacs-Bogdan E, Benz JP, Soll J, Bolter B, 2011. Tic20 forms a channel independent of Tic110 in chloroplasts. *BMC Plant Biol* **11**, 133.
- Krogh A, Larsson B, Von Heijne G, Sonnhammer EL, 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of molecular biology* **305**, 567-80.
- Krysan PJ, Young JC, Sussman MR, 1999. T-DNA as an insertional mutagen in Arabidopsis. *The Plant Cell* **11**, 2283-90.
- Kubis S, Patel R, Combe J, *et al.*, 2004. Functional specialization amongst the Arabidopsis Toc159 family of chloroplast protein import receptors. *Plant Cell* **16**, 2059-77.
- Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Larkindale J, Hall JD, Knight MR, Vierling E, 2005. Heat stress phenotypes of Arabidopsis mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiol* **138**, 882-97.
- Lee DW, Jung C, Hwang I, 2013. Cytosolic events involved in chloroplast protein targeting. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 245-52.
- Leister D, Kleine T, 2008. Towards a comprehensive catalog of chloroplast proteins and their interactions. *Cell Res* **18**, 1081-3.
- Lightenthaler H, 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology* **148**, 350-82.
- Majovsky P, Naumann C, Lee C-W, *et al.*, 2014. Targeted proteomics analysis of protein degradation in plant signaling on an LTQ-Orbitrap mass spectrometer. *Journal of proteome research* **13**, 4246-58.
- Mangeon A, Junqueira RM, Sabetto-Martins G, 2010. Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. *Plant Signal Behav* **5**, 99-104.
- Martin W, 2003. Gene transfer from organelles to the nucleus: frequent and in big chunks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8612-4.
- Martin W, Herrmann RG, 1998. Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? *Plant Physiol* **118**, 9-17.
- Mathur S, Agrawal D, Jajoo A, 2014. Photosynthesis: response to high temperature stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **137**, 116-26.
- May T, Soll J, 2000. 14-3-3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants. *Plant Cell* **12**, 53-64.
- McAndrew RS, Froehlich JE, Vitha S, Stokes KD, Osteryoung KW, 2001. Colocalization of plastid division proteins in the chloroplast stromal compartment establishes a new functional relationship between FtsZ1 and FtsZ2 in higher plants. *Plant Physiology* **127**, 1656-66.
- Miras S, Salvi D, Piette L, *et al.*, 2007. Toc159- and Toc75-independent import of a transit sequence-less precursor into the inner envelope of chloroplasts. *J Biol Chem* **282**, 29482-92.
- Mirus O, Schleiff E, 2012. Recycling and Tinkering: The Evolution of Protein Transport to and into Endosymbiotically Derived Organelles. In: Bullerwell CE, ed. *Organelle Genetics:*

- Evolution of Organelle Genomes and Gene Expression*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 175-216.
- Motohashi R, Rodiger 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**, 2189-201.
- Myouga F, Motohashi R, Kuromori T, Nagata N, Shinozaki K, 2006. An Arabidopsis chloroplast-targeted Hsp101 homologue, APG6, has an essential role in chloroplast development as well as heat-stress response. *The Plant Journal* **48**, 249-60.
- 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**, 957-67.
- Nakrieko KA, Mould RM, Smith AG, 2004. Fidelity of targeting to chloroplasts is not affected by removal of the phosphorylation site from the transit peptide. *Eur J Biochem* **271**, 509-16.
- Neuhaus HE, Emes MJ, 2000. Nonphotosynthetic Metabolism in Plastids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**, 111-40.
- Nevo R, Charuvi D, Tsabari O, Reich Z, 2012. Composition, architecture and dynamics of the photosynthetic apparatus in higher plants. *Plant J* **70**, 157-76.
- Nielsen E, Akita M, Davila-Aponte J, Keegstra K, 1997. Stable association of chloroplastic precursors with protein translocation complexes that contain proteins from both envelope membranes and a stromal Hsp100 molecular chaperone. *The EMBO Journal* **16**, 935-46.
- Obayashi T, Hibara H, Kagaya Y, Aoki Y, Kinoshita K, 2022. ATTED-II v11: A Plant Gene Coexpression Database Using a Sample Balancing Technique by Subagging of Principal Components. *Plant and Cell Physiology*.
- Olinares PDB, Kim J, Van Wijk KJ, 2011. The Clp protease system; a central component of the chloroplast protease network. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1807**, 999-1011.
- Ortega-Amaro MA, Rodriguez-Hernandez AA, Rodriguez-Kessler M, *et al.*, 2014. Overexpression of AtGRDP2, a novel glycine-rich domain protein, accelerates plant growth and improves stress tolerance. *Front Plant Sci* **5**, 782.
- Ossowski S, Schwab R, Weigel D, 2008. Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *The Plant Journal* **53**, 674-90.
- 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**, 1038-60.
- Pain D, Blobel G, 1987. Protein import into chloroplasts requires a chloroplast ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 3288-92.
- Palmer I, Wingfield PT, 2012. Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from Escherichia coli. *Current protocols in protein science* **70**, 6.3. 1-6.3. 20.
- Panigrahi R, Adina-Zada A, Whelan J, Vrielink A, 2013. Ligand recognition by the TPR domain of the import factor Toc64 from Arabidopsis thaliana. *PLoS One* **8**, e83461.
- Pant BD, Oh S, Lee H-K, Nandety RS, Mysore KS, 2020. Antagonistic regulation by CPN60A and CLPC1 of TRXL1 that regulates MDH activity leading to plant disease resistance and thermotolerance. *Cell Reports* **33**, 108512.
- Parfrey LW, Lahr DJ, Knoll AH, Katz LA, 2011. Estimating the timing of early eukaryotic diversification with multigene molecular clocks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 13624-9.

- Park W, Zhai J, Lee J-Y, 2009. Highly efficient gene silencing using perfect complementary artificial miRNA targeting AP1 or heteromeric artificial miRNA targeting AP1 and CAL genes. *Plant cell reports* **28**, 469-80.
- Paul P, Mesihovic A, Chaturvedi P, *et al.*, 2020. Structural and Functional Heat Stress Responses of Chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Genes* **11**, 650.
- Peng L, Fukao Y, Myouga F, Motohashi R, Shinozaki K, Shikanai T, 2011. A chaperonin subunit with unique structures is essential for folding of a specific substrate. *PLoS Biol* **9**, e1001040.
- 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**, 1836-47.
- Queitsch C, Hong S-W, Vierling E, Lindquist S, 2000. Heat Shock Protein 101 Plays a Crucial Role in Thermotolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **12**, 479-92.
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RHL, Moorman AF, 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience letters* **339**, 62-6.
- Ramundo S, Asakura Y, Salome PA, *et al.*, 2020. Coexpressed subunits of dual genetic origin define a conserved supercomplex mediating essential protein import into chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 32739-49.
- Reyes-Prieto A, Weber AP, Bhattacharya D, 2007. The origin and establishment of the plastid in algae and plants. *Annu Rev Genet* **41**, 147-68.
- Rial DV, Arakaki AK, Ceccarelli EA, 2000. Interaction of the targeting sequence of chloroplast precursors with Hsp70 molecular chaperones. *Eur J Biochem* **267**, 6239-48.
- Richter S, Lamppa GK, 1998. A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7463-8.
- Robison MM, Smid MP, Wolyn DJ, 2006. Organic solvents for the glucocorticoid inducer dexamethasone: are they toxic and unnecessary in hydroponic systems? *Botany* **84**, 1013-8.
- Rosano GL, Bruch EM, Ceccarelli EA, 2011. Insights into the Clp/HSP100 chaperone system from chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 29671-80.
- Sachetto-Martins G, Franco LO, De Oliveira DE, 2000. Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? *Biochim Biophys Acta* **1492**, 1-14.
- Saidi Y, Peter M, Finka A, Cicekli C, Vigh L, Goloubinoff P, 2010. Membrane lipid composition affects plant heat sensing and modulates Ca(2+)-dependent heat shock response. *Plant Signal Behav* **5**, 1530-3.
- Sarrion-Perdigones A, Vazquez-Vilar M, Palací J, *et al.*, 2013. GoldenBraid 2.0: A Comprehensive DNA Assembly Framework for Plant Synthetic Biology *Plant Physiology* **162**, 1618-31.
- Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, Asamizu E, Tabata S, 1999. Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res* **6**, 283-90.
- Schafer P, Helm S, Kohler D, Agne B, Baginsky S, 2019. Consequences of impaired 1-MDa TIC complex assembly for the abundance and composition of chloroplast high-molecular mass protein complexes. *PLoS One* **14**, e0213364.
- Schleiff E, Jelic M, Soll J, 2003. A GTP-driven motor moves proteins across the outer envelope of chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4604-9.
- 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**, 103-15.

- Schnell DJ, Kessler F, Blobel G, 1994. Isolation of components of the chloroplast protein import machinery. *Science* **266**, 1007-12.
- Shakeel SN, Aman S, Haq NU, Heckathorn SA, Luthe D, 2013. Proteomic and transcriptomic analyses of *Agave americana* in response to heat stress. *Plant Molecular Biology Reporter* **31**, 840-51.
- 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**, 205-20.
- Shi LX, Theg SM, 2013. The chloroplast protein import system: from algae to trees. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 314-31.
- SjöGren LL, Macdonald TM, Sutinen S, Clarke AK, 2004. Inactivation of the *clpC1* gene encoding a chloroplast Hsp100 molecular chaperone causes growth retardation, leaf chlorosis, lower photosynthetic activity, and a specific reduction in photosystem content. *Plant Physiology* **136**, 4114-26.
- Sjögren LL, Tanabe N, Lymperopoulos P, *et al.*, 2014. Quantitative analysis of the chloroplast molecular chaperone ClpC/Hsp93 in *Arabidopsis* reveals new insights into its localization, interaction with the Clp proteolytic core, and functional importance. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 11318-30.
- Smith PE, Krohn RI, Hermanson GT, *et al.*, 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* **150**, 76-85.
- Sohrt K, Soll J, 2000. Toc64, a new component of the protein translocon of chloroplasts. *The Journal of Cell Biology* **148**, 1213-22.
- 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**, 970-83.
- Sommer MS, Schleiff E, 2014. Protein targeting and transport as a necessary consequence of increased cellular complexity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**.
- Stahl T, Glockmann C, Soll J, Heins L, 1999. Tic40, a new "old" subunit of the chloroplast protein import translocon. *J Biol Chem* **274**, 37467-72.
- Su PH, Li HM, 2010. Stromal Hsp70 is important for protein translocation into pea and *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Cell* **22**, 1516-31.
- Sumit R, Sahu BB, Xu M, Sandhu D, Bhattacharyya MK, 2012. *Arabidopsis* nonhost resistance gene *PSS1* confers immunity against an oomycete and a fungal pathogen but not a bacterial pathogen that cause diseases in soybean. *BMC Plant Biol* **12**, 87.
- 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**, 2247-57.
- Theg SM, Bauerle C, Olsen LJ, Selman BR, Keegstra K, 1989. Internal ATP is the only energy requirement for the translocation of precursor proteins across chloroplastic membranes. *J Biol Chem* **264**, 6730-6.
- Thomson SM, Pulido P, Jarvis RP, 2020. Protein import into chloroplasts and its regulation by the ubiquitin-proteasome system. *Biochem Soc Trans* **48**, 71-82.
- Überlacker B, Werr W, 1996. Vectors with rare-cutter restriction enzyme sites for expression of open reading frames in transgenic plants. *Molecular Breeding* **2**, 293-5.
- Villarejo A, Buren S, Larsson S, *et al.*, 2005. Evidence for a protein transported through the secretory pathway en route to the higher plant chloroplast. *Nat Cell Biol* **7**, 1224-31.

- Vizcaíno JA, Deutsch EW, Wang R, *et al.*, 2014. ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination. *Nature biotechnology* **32**, 223-6.
- Von Arnim AG, Jia Q, Vaughn JN, 2014. Regulation of plant translation by upstream open reading frames. *Plant Science* **214**, 1-12.
- Wang B, Sumit R, Sahu BB, *et al.*, 2018a. Arabidopsis Novel Glycine-Rich Plasma Membrane PSS1 Protein Enhances Disease Resistance in Transgenic Soybean Plants. *Plant Physiol* **176**, 865-78.
- Wang Q-L, Chen J-H, He N-Y, Guo F-Q, 2018b. Metabolic Reprogramming in Chloroplasts under Heat Stress in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 849.
- Weber E, Engler C, Gruetzner R, Werner S, Marillonnet S, 2011. A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLoS One* **6**, e16765.
- Wessel D, Flügge U, 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical biochemistry* **138**, 141-3.
- Wielopolska A, Townley H, Moore I, Waterhouse P, Helliwell C, 2005. A high-throughput inducible RNAi vector for plants. *Plant Biotechnology Journal* **3**, 583-90.
- Wienkoop S, Morgenthal K, Wolschin F, Scholz M, Selbig J, Weckwerth W, 2008. Integration of metabolomic and proteomic phenotypes: analysis of data covariance dissects starch and RFO metabolism from low and high temperature compensation response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell Proteomics* **7**, 1725-36.
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ, 2007. An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* **2**, e718.
- 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**, 32264-71.
- Xuan C, Zeng Q-C, Lu X-P, Yu D-Q, Li W-Z, 2010. Characterization and expression analysis of four glycine-rich RNA-binding proteins involved in osmotic response in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi). *Agricultural Sciences in China* **9**, 1577-87.
- 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.
- Yoo S-D, Cho Y-H, Sheen J, 2007. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature protocols* **2**, 1565-72.
- 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**, 237-44.

Appendix

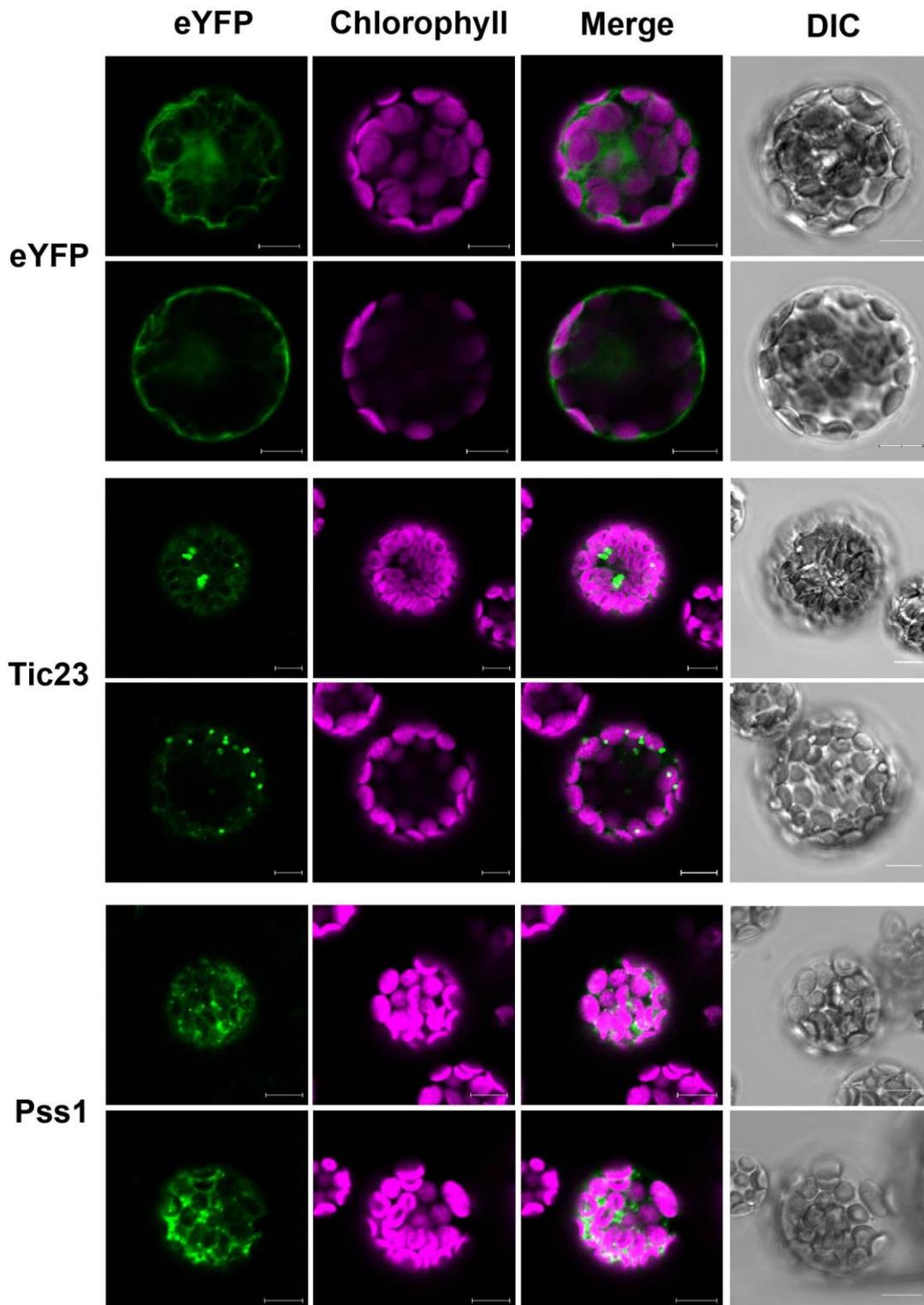
Anhang 1 Spezifitätstest des hergestellten Tic23-Antikörpers. Der Antikörper wurde auf einem Western-Blot getestet, auf dem das rekombinante Protein in den Konzentrationen von 5 und 10 ng und Gesamtzellextrakt aus Wildtyp Col-0 Pflanzen in den Konzentrationen von 25 µg und 50 µg über eine 12%-igen SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Die Pfeile markieren die spezifischen Antikörpersignale.

Anhang 2 identifizierte Proteine aus der Ko-Immunopräzipitation. Es wurden Tic23 Antikörper an Protein A-Sepharose *beads* mit DMP kovalent gekoppelt. Die Tic23-*beads* wurden mit solubilisierten Proteinen aus einer Membranfraktion von isolierten Chloroplasten aus 21 d alten Wildtyp Pflanzen inkubiert. Die Proteine aus dem Eluat wurde tryptisch in Lösung verdaut und anschließend wurden die Peptide mit der QExactive Plus gemessen.

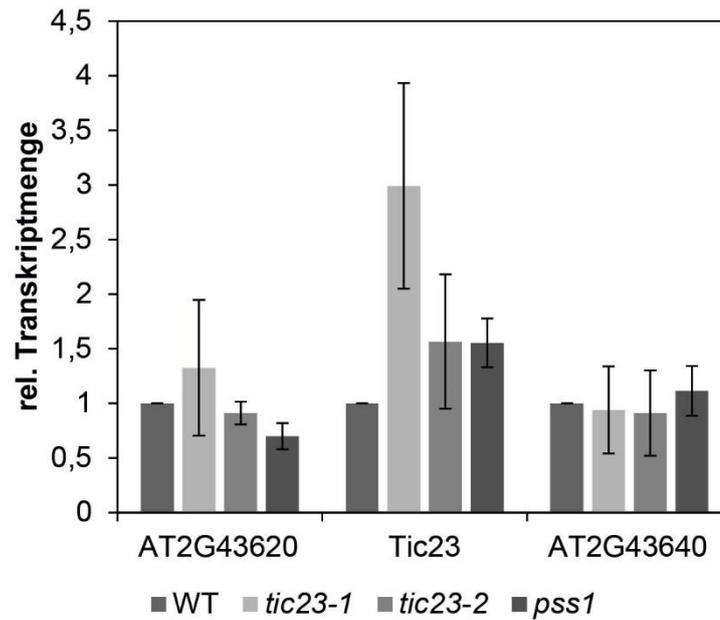
	AGI Locus	Beschreibung	Score	Unique Peps	% Cov	Anzahl AA
1	ATCG01130.1	Ycf1 protein	15,94	11	6,7	1786
2	ATCG00120.1	ATP synthase subunit alpha	11,58	7	15,4	507
3	ATCG00480.1	ATP synthase subunit beta	10,86	8	19,3	498
4	ATCG00490.1	ribulose-bisphosphate carboxylase	8,36	8	10,2	479
5	AT2G43630.1	Tic23 - nucleus envelope protein	6,11	3	16,1	274
6	AT5G22640.1	MORN (Membrane Occupation and Recognition Nexus) repeat-containing protein	5,72	4	4,4	871
7	AT5G01590.1	histone-lysine N-methyltransferase ATXR3-like protein	5,52	9	12,3	527
8	AT2G44640.1	TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL-like protein	5,49	3	6,9	451
9	AT1G54260.1	winged-helix DNA-binding transcription factor family protein	2,93	1	4,6	197
10	ATCG00340.1	Photosystem I%2C PsaA/PsaB protein	2,6	1	1,9	734
11	AT3G46740.1	translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts 75-III	2,43	1	1,8	818
12	ATCG00270.1	photosystem II reaction center protein D	2,34	1	3,7	353
13	AT5G26050.1	Plant self-incompatibility protein S1 family	2,14	3	3,7	160
14	AT4G26540.1	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein	2,04	1	0,9	1091
15	AT2G21330.1	fructose-bisphosphate aldolase 1	1,99	1	1,8	399
16	ATCG00540.1	photosynthetic electron transfer A	1,86	1	5	320
17	AT1G03130.1	photosystem I subunit D-2	1,29	1	14,2	204
18	AT2G21720.1	ArgH (DUF639)	1,27	1	1,1	734
19	ATCG00680.1	photosystem II reaction center protein B	1,04	2	5,9	508
20	AT4G20170.1	glycosyltransferase family protein (DUF23)	1,01	1	1	504
21	AT1G09340.1	chloroplast RNA binding protein	0,9	2	7,7	378
22	AT1G55490.1	chaperonin 60 beta	0,9	1	2,3	600
23	AT3G02290.1	RING/U-box superfamily protein	0,87	2	5,6	231
24	AT1G07320.1	ribosomal protein L4	0,85	2	7,8	282

Appendix

25	AT1G24150.1	formin homologue 4	0,83	1	0,8	763
26	AT2G42490.1	Copper amine oxidase family protein	0,82	1	2,1	776
27	AT5G03480.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	0,76	1	6,2	321
28	AT3G49740.1	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	0,66	1	0,8	737
29	AT3G24240.1	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein	0,66	2	1	1141
30	AT5G01530.1	light harvesting complex photosystem II	0,64	1	4,5	290
31	AT3G24150.1	hypothetical protein	0,62	1	4,1	343
32	AT2G43030.1	Ribosomal protein L3 family protein	0,62	1	5,2	271
33	AT3G51410.1	hypothetical protein (DUF241)	0,56	1	4,6	282
34	AT1G78580.1	trehalose-6-phosphate synthase	0,53	1	0,5	942
35	AT4G13000.1	AGC (cAMP-dependent%2C cGMP-dependent and protein kinase C) kinase family protein	0,52	2	4,6	372
36	AT5G52780.1	transmembrane protein%2C putative (DUF3464)	0,51	1	3,6	168
37	AT5G02320.1	myb domain protein 3r-5	0,51	1	1,1	548
38	AT2G07310.1	hypothetical protein	0,5	3	3,4	263
39	AT5G40950.1	ribosomal protein large subunit 27	0,49	1	6,6	198
40	ATCG00770.1	ribosomal protein S8	0,45	1	9	134
41	AT5G65220.1	Ribosomal L29 family protein	0,45	1	7,5	173
42	AT4G26300.1	Arginyl-tRNA synthetase%2C class Ic	0,44	2	0,8	642
43	AT3G18980.1	EIN2 targeting protein1	0,43	1	5,1	415
44	AT1G07550.1	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	0,43	1	1,3	864
45	AT3G26744.1	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	0,4	1	3,6	494



Anhang 3 Lokalisierung des Vollängen-Proteins Tic23 und Pss1. Protoplasten aus Wildtyp Col-0 wurden mit Plasmide, die aus den Vollängen Tic23 bzw. Pss1 fusioniert mit einem eYFP bestanden, transformiert und mit einer konfokalen Laser Scanning Mikroskopie analysiert. eYFP Fluoreszenz wurde auf der linken Seite (gelb) und Chlorophyll Autofluoreszenz auf der mitte-linken Seite (rot) gezeigt. Eine Überlagerung von den Signalen von eYFP und Chlorophyll sieht man auf dem dritten Bild (Merge) und eine Differentialinterferenzkontrast Aufnahme (DIC) auf dem vierten Bild.



Anhang 4 Bestimmung der Transkriptmenge von benachbarten Gene. Es wurde über eine qRT-PCR die Transkriptmengen der Gene *AT2G43620*, *TIC23* (*AT2G43630*) und Untereinheit von *SRP9/14* (*AT2G43640*) in den Mutanten *tic23-1*, *tic23-2* und *pss1* im Vergleich zum Wildtyp Col-0 bestimmt. Balken zeigen die Standardabweichung von drei biologischen Replikaten.

Anhang 5 erhöhte Proteine (um den Faktor 2) der vergleichende Proteomanalyse. Es wurden die Chloroplasten aus zwei Wochen alten Wildtyp Col-0 und *tic23-1* isoliert. Anschließend wurden die Proteine tryptisch in-Lösung verdaut und die Peptide mit der LTQ Orbitrap Velos Pro gemessen. Es wurden drei biologische Replikaten durchgeführt, wobei die Messungen dreimal realisiert wurde.

AGI Locus	Funktion	Peptides	tic23-1/WT Lfq	t-test Lfq
AT3G04550.1	rubisco accumulation factor-like protein	16	2,285	3,990E-10
ATCG00740.1	RNA polymerase subunit alpha	11	2,982	2,875E-07
AT1G33140.1	Ribosomal protein L6 family	10	2,418	3,956E-07
AT2G27530.2	Ribosomal protein L1p/L10e family	5	2,133	8,264E-07
AT5G51110.2	Transcriptional coactivator/pterin dehydratase	7	2,298	1,972E-06
AT5G02500.1	heat shock cognate protein 70-1	18	2,009	2,045E-06
AT2G44120.1	Ribosomal protein L30/L7 family protein	11	2,175	4,664E-06
AT4G31700.1	ribosomal protein S6	7	2,071	5,679E-06
ATCG00190.1	RNA polymerase subunit beta	21	2,465	6,285E-06
AT5G02960.1	Ribosomal protein S12/S23 family protein	3	2,412	7,385E-06
AT5G42980.1	thioredoxin 3	5	2,292	9,454E-06
AT5G24690.1	plant/protein%2C putative (DUF3411)	12	2,074	9,921E-06
AT3G03780.3	methionine synthase 2	26	2,164	1,042E-05
AT5G23890.2	GPI-anchored adhesin-like protein	8	2,608	1,206E-05
AT3G13470.1	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	47	2,113	1,219E-05
AT5G56030.1	heat shock protein 81-2	30	2,395	1,380E-05
AT1G33810.1	zinc finger/BTB domain protein	7	2,263	1,444E-05
AT5G27850.1	Ribosomal protein L18e/L15 superfamily protein	8	2,104	2,241E-05
AT1G26630.1	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 (eIF-5A 1) protein	6	2,423	5,204E-05
AT5G10360.1	Ribosomal protein S6e	9	2,041	5,382E-05
AT4G23940.1	FtsH extracellular protease family	8	2,068	6,442E-05
AT5G28060.1	Ribosomal protein S24e family protein	2	2,258	6,498E-05
AT2G37190.1	Ribosomal protein L11 family protein	5	2,316	7,070E-05
AT2G27710.3	60S acidic ribosomal protein family	7	2,420	7,649E-05
AT2G40510.1	Ribosomal protein S26e family protein	4	2,331	1,146E-04
AT1G02780.1	Ribosomal protein L19e family protein	3	3,000	1,381E-04
AT3G49910.1	Translation protein SH3-like family protein	5	2,726	1,721E-04
AT5G02870.2	Ribosomal protein L4/L1 family	15	2,280	1,901E-04
AT4G34830.1	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	2	2,123	2,066E-04
AT1G24020.2	MLP-like protein 423	3	3,364	2,299E-04
AT3G48870.2	Clp ATPase	52	2,015	2,704E-04
AT5G60390.3	GTP binding Elongation factor Tu family protein	19	2,142	2,760E-04
AT1G69200.1	fructokinase-like protein	8	2,427	3,805E-04
AT3G48930.1	Nucleic acid-binding%2C OB-fold-like protein	4	2,077	3,976E-04

Appendix

AT1G02150.1	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	6	2,533	4,264E-04
AT3G53560.2	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	10	2,669	5,116E-04
AT5G59970.2	Histone superfamily protein	6	2,108	5,272E-04
AT5G64050.1	glutamate tRNA synthetase	12	2,182	7,563E-04
AT3G52930.1	Aldolase superfamily protein	18	2,192	8,398E-04
AT2G17360.1	Ribosomal protein S4 (RPS4A) family protein	10	2,057	1,289E-03
AT3G04400.2	Ribosomal protein L14p/L23e family protein	4	2,491	1,296E-03
AT5G53460.3	NADH-dependent glutamate synthase 1	19	2,038	2,493E-03
AT2G27720.1	60S acidic ribosomal protein family	2	3,218	2,584E-03
AT5G18380.3	Ribosomal protein S5 domain 2-like superfamily protein	5	2,263	2,628E-03
AT1G78900.2	vacuolar ATP synthase subunit A	14	2,572	2,869E-03
AT1G57860.1	Translation protein SH3-like family protein	4	2,114	2,942E-03
AT3G14210.1	GDSL-like lipase/acylhydrolase superfamily protein	11	2,807	3,509E-03

Anhang 6 reduzierte Proteine der vergleichende Proteomanalyse. Es wurden die Chloroplasten aus zwei Wochen alten Wildtyp Col-0 und *tic23-1* isoliert. Anschließend wurden die Proteine tryptisch in-Lösung verdaut und die Peptide mit der LTQ Orbitrap Velos Pro gemessen. Es wurden drei biologische Replikaten durchgeführt, wobei die Messungen dreimal realisiert wurde.

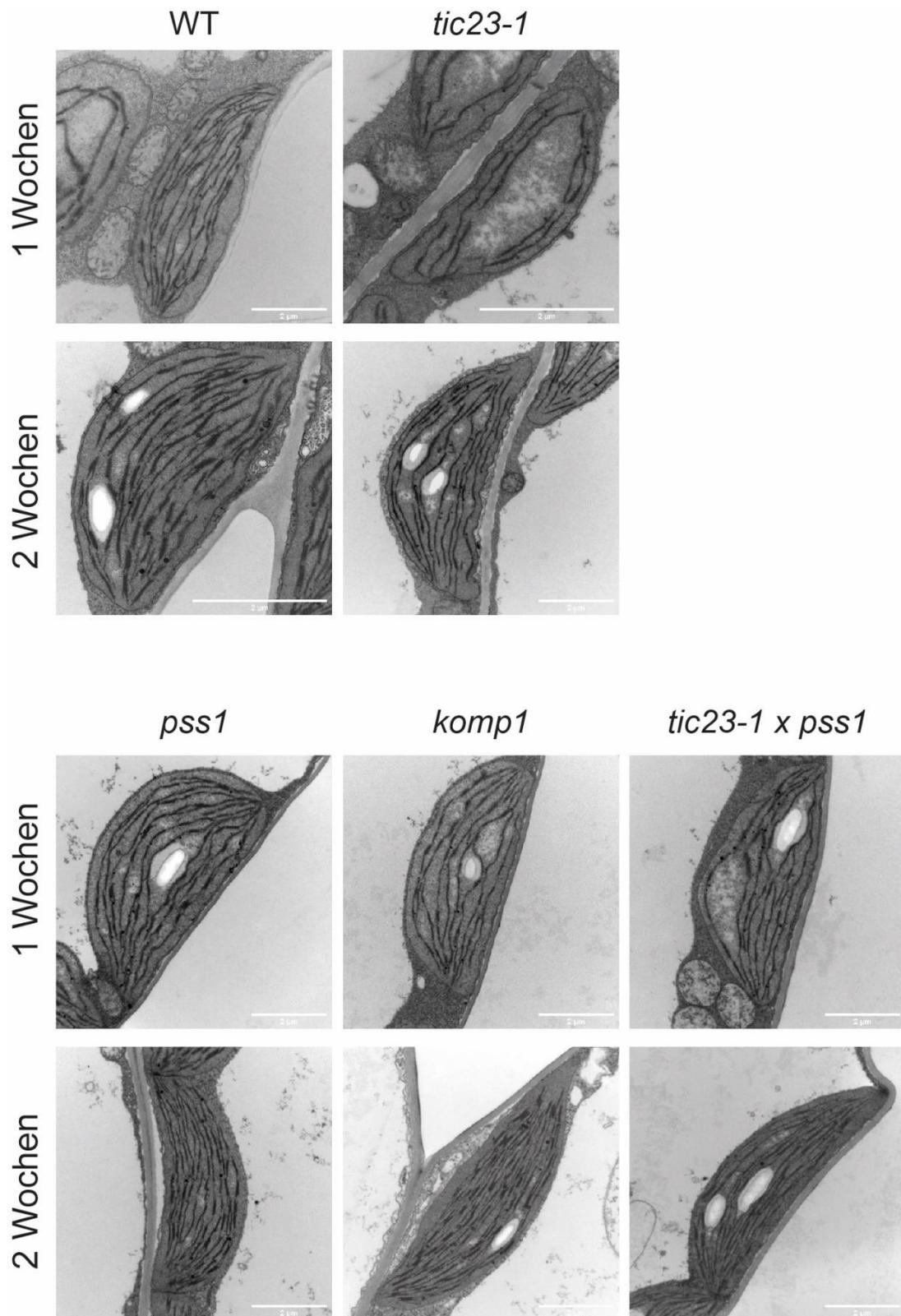
AGI Locus	Funktion	Peptides	tic23-1/WT Lfq	t-test Lfq
AT4G21280.1	photosystem II subunit QA	24	0,696	1,433E-10
AT5G17170.1	rubredoxin family protein	9	0,562	1,210E-09
AT1G44575.1	Chlorophyll A-B binding family protein	10	0,580	1,374E-09
AT5G23060.1	calcium sensing receptor	21	0,622	1,409E-08
AT5G38420.1	Ribulose bisphosphate carboxylase (small chain) family protein	26	0,760	1,968E-08
AT3G12780.1	phosphoglycerate kinase 1	37	0,806	1,542E-07
AT5G51720.1	2 iron%2C 2 sulfur cluster binding protein	5	0,452	1,587E-07
AT3G26060.3	Thioredoxin superfamily protein	17	0,771	2,043E-07
AT3G55800.1	sedoheptulose-bisphosphatase	26	0,729	2,346E-07
AT1G09340.1	chloroplast RNA binding protein	41	0,754	2,807E-07
AT4G22240.1	Plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family protein	14	0,415	3,462E-07
AT1G29930.1	chlorophyll A/B binding protein 1	16	0,648	5,900E-07
AT1G42970.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit	34	0,860	6,526E-07
AT1G55480.1	protein containing PDZ domain%2C a K-box domain%2C and a TPR region	26	0,707	7,395E-07
AT4G15530.4	pyruvate orthophosphate dikinase	6	0,343	1,296E-06
AT5G35630.3	glutamine synthetase 2	31	0,717	1,307E-06
AT1G56190.2	Phosphoglycerate kinase family protein	31	0,721	1,372E-06
AT4G10340.1	light harvesting complex of photosystem II 5	24	0,751	1,559E-06
AT2G39730.2	rubisco activase	44	0,773	2,013E-06
AT1G20020.1	ferredoxin-NADP[+]-oxidoreductase 2	28	0,700	3,432E-06
AT1G32060.1	phosphoribulokinase	24	0,829	3,977E-06
ATCG00490.1	ribulose-bisphosphate carboxylase	69	0,786	5,285E-06
AT3G08940.2	light harvesting complex photosystem II	16	0,741	5,426E-06
AT4G12830.1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	6	0,591	6,293E-06
AT3G26070.1	Plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family protein	8	0,628	7,191E-06
AT3G01510.1	like SEX4 1	7	0,600	1,089E-05
AT1G77490.2	thylakoidal ascorbate peroxidase	23	0,721	1,107E-05
AT3G60750.1	Transketolase	46	0,808	1,381E-05
AT3G63140.1	chloroplast stem-loop binding protein of 41 kDa	30	0,764	1,384E-05
AT5G23120.1	photosystem II stability/assembly factor%2C chloroplast (HCF136)	26	0,730	1,470E-05
AT1G16720.2	high chlorophyll fluorescence phenotype 173	20	0,689	1,679E-05
AT1G63770.7	Peptidase M1 family protein	37	0,841	1,957E-05

Appendix

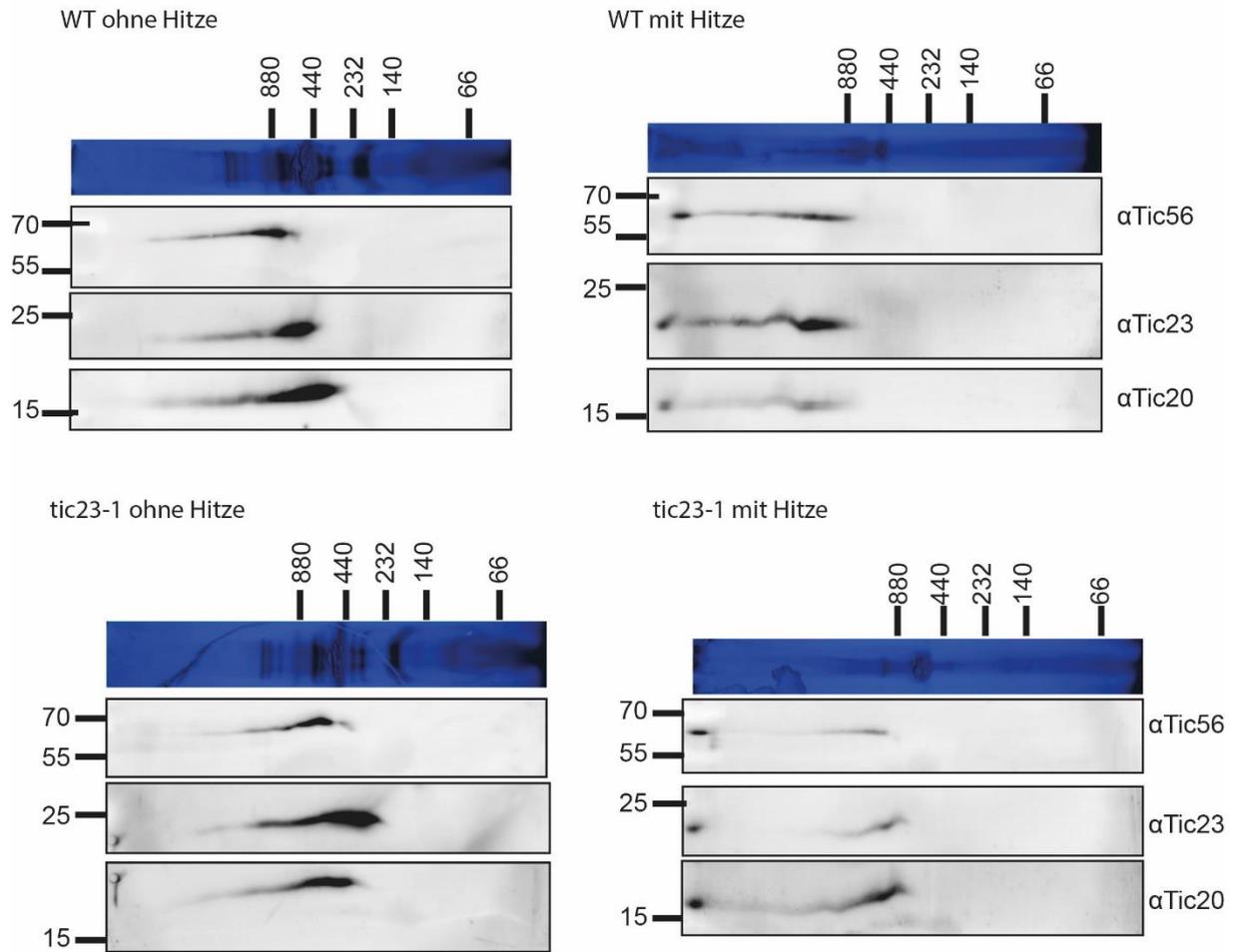
AT1G77090.1	thylakoid lumenal protein (Mog1/PsbP/DUF1795-like photosystem II reaction center PsbP family protein)	6	0,557	2,051E-05
AT3G19480.1	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	9	0,472	2,072E-05
AT5G01530.1	light harvesting complex photosystem II	13	0,695	3,275E-05
AT1G15820.1	light harvesting complex photosystem II subunit 6	15	0,611	4,565E-05
AT3G01500.2	carbonic anhydrase 1	30	0,803	5,071E-05
ATCG00680.1	photosystem II reaction center protein B	24	0,885	6,368E-05
AT3G01480.1	cyclophilin 38	16	0,851	6,596E-05
ATCG00120.1	ATP synthase subunit alpha	39	0,836	8,250E-05
AT2G05070.1	photosystem II light harvesting complex protein 2.2	12	0,703	9,640E-05
AT4G12800.1	photosystem I subunit I	9	0,730	9,856E-05
AT5G35170.2	adenylate kinase family protein	17	0,654	1,150E-04
AT1G70820.1	phosphoglucomutase%2C putative / glucose phosphomutase	13	0,574	1,157E-04
AT2G40100.1	light harvesting complex photosystem II	6	0,445	1,394E-04
AT1G56500.1	haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein	35	0,804	1,508E-04
AT5G51070.1	Clp ATPase	14	0,617	1,516E-04
AT1G54780.1	thylakoid lumen 18.3 kDa protein	13	0,712	1,838E-04
AT1G68010.1	hydroxypyruvate reductase	24	0,590	2,742E-04
AT1G71500.1	Rieske (2Fe-2S) domain-containing protein	16	0,856	2,772E-04
AT3G55330.1	PsbP-like protein 1	10	0,757	4,544E-04
AT4G04640.1	ATPase%2C F1 complex%2C gamma subunit protein	25	0,870	4,561E-04
AT3G59780.1	Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily protein	20	0,733	4,582E-04
AT4G24620.1	phosphoglucose isomerase 1	23	0,814	5,156E-04
AT1G34000.1	one-helix protein 2	6	0,679	5,264E-04
AT3G50820.1	photosystem II subunit O-2	27	0,845	5,277E-04
AT4G35250.1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	16	0,721	5,328E-04
AT4G09650.1	F-type H ⁺ -transporting ATPase subunit delta	22	0,768	6,056E-04
AT1G14980.1	chaperonin 10	3	0,977	7,381E-04
AT2G05620.2	proton gradient regulation 5	1	0,561	7,602E-04
AT4G04020.1	fibrillin	19	0,680	8,160E-04
AT2G13360.3	alanine:glyoxylate aminotransferase	21	0,610	8,232E-04
AT4G20850.1	tripeptidyl peptidase ii	26	0,683	8,852E-04
AT4G35090.1	catalase 2	25	0,574	9,125E-04
AT2G34430.1	light-harvesting chlorophyll-protein complex II subunit B1	14	0,413	1,019E-03
AT5G35100.1	Cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein	5	0,570	1,025E-03
AT5G12860.2	dicarboxylate transporter 1	3	0,516	1,026E-03
AT3G12345.1	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	3	0,660	1,044E-03

Appendix

AT1G02475.1	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein	2	0,568	1,070E-03
AT4G01050.1	thylakoid rhodanese-like protein	16	0,737	1,094E-03
AT3G54890.4	chlorophyll a-b binding protein 6	11	0,765	1,104E-03
AT4G27700.1	Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily protein	6	0,647	1,156E-03
AT3G55040.1	glutathione transferase lambda 2	9	0,803	1,229E-03
AT1G23310.1	glutamate:glyoxylate aminotransferase	35	0,700	1,307E-03
AT1G10760.3	Pyruvate phosphate dikinase%2C PEP/pyruvate binding domain-containing protein	43	0,810	1,328E-03
AT2G17695.1	outer envelope protein	5	0,680	1,432E-03
ATCG00540.1	photosynthetic electron transfer A	24	0,907	1,573E-03
AT3G15840.4	post-illumination chlorophyll fluorescence increase	5	0,708	1,900E-03
AT3G02730.1	thioredoxin F-type 1	6	0,738	1,953E-03
AT1G17050.1	solanesyl diphosphate synthase 2	8	0,661	1,965E-03
AT1G15980.1	NDH-dependent cyclic electron flow 1	14	0,794	2,039E-03
AT5G64290.1	dicarboxylate transport 2.1	4	0,733	2,186E-03
AT3G54050.2	high cyclic electron flow 1	17	0,840	2,581E-03
AT5G42650.1	allene oxide synthase	37	0,875	2,862E-03
AT5G13410.1	FKBP-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein	5	0,567	2,895E-03
AT3G47470.1	light-harvesting chlorophyll-protein complex I subunit A4	14	0,767	3,120E-03
AT3G14420.2	Aldolase-type TIM barrel family protein	26	0,692	3,342E-03
AT5G13650.1	elongation factor family protein	12	0,788	3,574E-03
AT2G33150.1	peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase 3	5	0,715	3,587E-03
AT3G16910.1	acyl-activating enzyme 7	4	0,389	3,692E-03
AT1G80380.3	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	20	0,829	3,711E-03
AT4G19170.1	nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 4	16	0,470	3,759E-03
ATCG00480.1	ATP synthase subunit beta	51	0,865	3,788E-03
ATCG00730.1	photosynthetic electron transfer D	5	0,608	4,302E-03
AT3G14415.3	Aldolase-type TIM barrel family protein	22	0,665	4,618E-03
AT1G79600.1	Protein kinase superfamily protein	11	0,675	4,666E-03
AT5G42070.1	hypothetical protein	3	0,694	5,090E-03
AT1G06430.3	FTSH protease 8	30	0,802	5,105E-03
AT1G76100.1	plastocyanin 1	1	0,544	5,381E-03



Anhang 7 Ultrastruktur der Chloroplasten aus verschiedene Mutanten. Die untersuchten Pflanzen wurden für den angegebenen Zeitraum auf ½ MS Festmedien mit 0,8 % Saccharose kultiviert. Die Präparation der Proben und die Aufnahmen der Bilder wurden durch Dr. Gerd Hause durchgeführt. Maßstab – 2 µm



Anhang 8 Zweites Replikat der 2D-BN-PAGE von Hitze gestressten und ungestressten Chloroplasten aus Wildtyp Col-0 und *tic23-1* Pflanzen.

Anhang 9 ko-exprimierte Gene nach dem Server ATTED-II. Die ersten zehn Einträge der ko-exprimierten Gene von Tic23 wurden anhand ihres *Mutual Rank* aufgelistet.

	Gene	AGI Locus	Beschreibung	Ko-Expressions (Mutual Rank)
1	Cpn60beta2	AT3G13470	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	9.0
2	cpHsc70-2	AT5G49910	chloroplast heat shock protein 70-2	9.0
3	EMB1241	AT5G17710	Co-chaperone GrpE family protein	7.5
4	AT3G12050	AT3G12050	Aha1 domain-containing protein	7.4
5	CPN20	AT5G20720	chaperonin 20	7.4
6	ROF1	AT3G25230	rotamase FKBP 1	7.2
7	CPN60A	AT2G28000	chaperonin-60alpha	6.8
8	cpHsc70-1	AT4G24280	chloroplast heat shock protein 70-1	6.4
9	HSP60	AT3G23990	heat shock protein 60	6.0
10	AT3G57810	AT3G57810	Cysteine proteinases superfamily protein	6.0

Anhang 10 Segregationsanalyse der Komplementationslinie *tic23+35S-TIC23* und der silencing Linie *sil-tic23*; die grau hervorgehobenen Zeilen sind die homozygote Pflanzenlinien

Linie	Pflanze	Generation	Selektions- marker	resistent	sensitiv	Prozent		
<i>sil-tic23</i>	1	T1	BASTA	6	112	5,1		
	2			3	119	2,5		
	3			94	26	78,3		
	4			88	33	72,7		
	5			87	34	71,9		
	6			8	112	6,7		
	7			94	27	77,7		
	8			94	27	77,7		
	9			86	34	71,7		
	10			97	23	80,8		
	11			90	29	75,6		
	12			90	31	74,4		
	13			77	42	64,7		
	14			96	21	82,1		
	15			0	117	0,0		
	3.1	T2	BASTA	120	0	100,0		
	3.2			92	26	78,0		
	3.3			96	25	79,3		
	3.4			92	28	76,7		
	3.5			85	34	71,4		
	3.6			91	28	76,5		
	3.7			90	31	74,4		
	3.8			97	22	81,5		
	3.9			88	31	73,9		
	3.10			116	1	99,1		
	5.1			83	34	70,9		
	5.2			83	38	68,6		
	5.3			91	27	77,1		
	5.4			77	42	64,7		
	5.5			101	19	84,2		
	5.6			85	32	72,6		
	5.7			86	33	72,3		
	5.8			96	19	83,5		
	5.9			82	39	67,8		
	5.10			93	28	76,9		
	7.2			83	35	70,3		
	7.4			90	26	77,6		
	7.7			96	23	80,7		
	9.1			89	32	73,6		
	9.2			114	1	99,1		
	9.3			90	29	75,6		
	9.4			87	35	71,3		
	9.5			121	0	100,0		
<i>tic23+35S-TIC23</i>	1			T1	BASTA	88	33	72,7
	2					82	36	69,5
	1.1	T2		120	0	100,0		

Appendix

	1.2			85	34	71,4
	1.3			118	0	100,0
	1.4			86	29	74,8
	1.5			95	24	79,8
	1.6		BASTA, per PCR	114	0	100,0
	1.7			89	31	74,2
	1.8			93	26	78,2
	1.9			116	0	100,0
	1.10			90	25	78,3
	1.11			83	30	73,5

Anhang 11 Segregationsanalyse der Kreuzung *tic23-1 x pss1*; die grau hervorgehobenen Zeilen sind die homozygote Pflanzenlinien

		Wildtyp	heterozygot		homozygot	
<i>tic23-1 x pss1</i>	T1		einfach	doppelt	einfach	doppelt
	1				x	
2				x		
3				x		
4				x		
5				x		
6		x				
7				x		
8				x		
9				x		
10				x		
11				x		
12				x		
13				x		
14				x		
15				x		
16					x	
17					x	
18				x		
19				x		
20				x		
21				x		
22				x		
23				x		
24				x		
25				x		
26					x	
27				x		
28					x	
Linie 13	T2					
	13.1					x
13.2		x				
13.3				x		
13.4				x		
13.5				x		
13.6		x				
13.7	x					
13.8						x
13.9				x		
13.10					x	
13.11				x		
13.12					x	
13.13					x	
13.14					x	
13.15		x				
13.16					x	
13.17				x		
13.18					x	
13.19					x	
13.20				x		
13.21					x	
13.22				x		

Appendix

	13.23			x	
	13.24		x		
	13.25			x	
	13.26			x	
	13.27			x	
Linie 27	27.1			x	
	27.2	x			
	27.3	x			
	27.4	x			
	27.5		x		
	27.6		x		
	27.7				x
	27.8			x	
	27.9			x	
	27.10			x	
	27.11			x	
	27.12				x
	27.13			x	
	27.14			x	
	27.15				x
	27.16			x	
27.17		x			
27.18		x			

Anhang 12 Liste der verwendeten Primer

	Primerbezeichnung	Sequenz
	Tic23-GWS	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTAAAAG ATGAGCTTTACTCAGGC 3'
	Tic23-GWR	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAGT AAGATACCTCATCAG 3
	Tic23_pETs	5' CTATATCATGAGCTTTACTCAGGC 3'
	Tic23_pETrev	5' CTTCAGCGGCCGCGTAAGATACCTCA TCAG 3'
	Tic23_pRTs	5' GTATAAGATCTAAACAATGAGCTTTACTCAGGC 3'
	Tic23_1-100R	5' CAAAGGATCCGCAGCTTTCTCTATTGC 3'
	59640-pRTS	5' CATATTCATGAGCTCTACGCAGGC 3'
	Tic23_2_1-100R	5' GTTTCATGGCTTTCTCAATAGCTTC 3'
	Tic23_pRTrev	5' CAAAGGATCCGCGTAAGATACCTCATCAG 3'
<i>silencing Plasmid</i>	JS1364_amiR-F	5' TTTGGTCTCACCATTATAGGGGGGAAAAAAGG 3'
	JS1365_amiR-R	5' TTTGGTCTCAAAGCGAGACTAAAGATGAGATCT 3'
	JS1664_pOpLac_F	5' TTTGAAGACATTGACTTGCGAAGATCGATC 3'
	JS1665_pOpLac_R	5' ATTTGAAGACTTATGGTCGACTAGAATAGTAAATT G 3'
	JS1666_UTR-CMV_L	5' TTTGAAGACATGGAGGGAATTACAAAGAAAAGAT TAAG 3'
	JS1667_UTR-CMV_R	5' TTTGAAGACTAGTCAGCAAGACCCTTCCTCTATAT AAGGAAGTTCATTTTCAATTTGGAGAGGAGTTTATTTA CAAGAGCGTAC 3'
	TI236_GUS-F	5' TTTGGTCTCAGGAGATGGGTCAGTCCCTTATG 3'
	TI237_GUS-R	5' TTTGGTCTCTAAGCTCATTGTTTGCCTCCCTGC 3'
	TI238_LhGR1F	5' TTTGAAGACATAATGGCTAGTGAAGCTCGAA 3'
	TI239_LhGR1R	5' TTTGAAGACATCATCTTCATGGGAGAAAATAATAC 3'
	TI240_LhGR2F	5' TTTGAAGACATGATGGTACGCGACTGGGCGTG 3'
	TI241_LhGR2R	5' TTTGAAGACATCTCGGTATCGTCGTATCCC 3'
	TI242_LhGR3F	5' TTTGAAGACATCGAGGACAGCTCATGTTATATCC 3'
	TI243_LhGR3R	5' TTTGAAGACTAAAGCTTACTCTTTTTTTGGGTTTG 3'
	qRT-PCR	Tic23-qRT2-anf
Tic23-qRT2-anr		5' GCGATGATCAAGAAGAGGCG 3'
Tic23-qRT2-mif		5' GCTATGGGGAAGAAATCGGTTG 3'

Appendix

	Tic23-qRT2-mir	5' TCAGGACGCTCCTCACCATT 3'
	Tic23-qRT-enf	5' ACTGTTCGATTGACCCGAGC 3'
	Tic23-qRT-enr	5' CACGTCTGTA CTCTCAGGGC 3'
	Chi3P-qRT_for	5' AGATTGCCGCTATGTTGGCT 3'
	Chi3P-qRT_rev	5' TGTGATTTGGATTGGACCGC 3'
	SRP9-su-for	5' GTGCAGAAGAGGAAACTGAGC 3'
	SRP9-su-rev	5' GGGCCTTAAGAATGGTGGCA 3'
	Act7-for	5' TCCTTAGTGTTAGCTGCTGCC 3'
	Act7-rev	5' ATCCTCACCATCGGCCATTTT 3'
	PSS1-qRT1-for	5' GGCGGTAGAAATGGTGGGAA 3'
	PSS1-qRT1-rev	5' GGAACA ACTCCTCCCCATTGA 3'
	Tic20-qRT1-for	5' GCAGCAGGACAGACTCAACA 3'
	Tic20-qRT1-rev	5' GCAGAGAAGACGAGGCTGAG 3'
	Tic56-qRT2-for	5' CATGGATGAATGGGCGCCTA 3'
	Tic56-qRT2-rev	5' TGGCTCTCGTCCCTTTAATGG 3'
	Tic110-qRT1-for	5' GAAAATGGGAAAGCCTGGCC 3'
	Tic110-qRT1-rev	5' CTTTGTTGTGATCTGGGCGC 3'
	Toc159-qRT1-for	5' CCTTCTACGCTTCTTCGGGG 3'
	Toc159-qRT1-rev	5' CCGAATTACCAGACACAGCCT 3'
	Hsp101-qRT1-for	5' AAGAGGAGTTGCTTTGGCAGT 3'
	Hsp101-qRT1-rev	5' TTCCTCACGCACAACCATCTT 3'
Genotypisierung der Komplementation sline	Tic23-qRT-mif	5' ATGATACTGACAGTGGCGGC 3'
	Tic23-qRT-lnr	5' ATCCATGGCTCGGGTCAATC 3'
	LBb1.3	5' ATTTTGCCGATTTTCGGAAC 3'
	SALK_150111_rev	5' TGCAGGATAGTAGGATGGTCTG 3'
	TAP-Tag1-rev	5'CGGTTTTGAGCTCACCCCTGA 3'
Genotypisierung der Kreuzung	SALK_150111-for	5' CCATTTTGTGTATGGAGGGTG 3'
	SALK_090245_for	5' TTGGTTTACCGTGGTTGCTAC 3'
	SALK_090245_rev	5' GAGCCTCCAGACCCATTATTC 3'

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Nadine Bauer, geb. Keilert
Geburtsdatum: 30. November 1990
Geburtsort: Berlin

Ausbildung

Seit 05/2016	Promotion Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, AG Pflanzenbiochemie, Prof. Dr. Sacha Baginsky und Prof. Dr. Ingo Heilmann
10/2014-02/2016	Master of Science , Biochemie Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg AG Pflanzenbiochemie Prof. Dr. Sacha Baginsky
10/2011-09/2014	Bachelor of Science , Biochemie Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg AG Pflanzenphysiologie Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen
2003-2010	allgemeine Hochschulreife Pasteur- Oberschule (seit 2007: Felix-Mendelssohn- Bartholdy-Gymnasium), Berlin

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich erkläre weiterhin, dass andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht wurden. Mit dieser Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades.

Halle (Saale), den 05.05.2022

Nadine Bauer

Danksagung

Meine letzte Seite widme ich allen Personen, die mich während dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Sacha Baginsky für sein Vertrauen und die Unterstützung bedanken, die er mir während der Erarbeitung dieser Arbeit, auch aus weiter Entfernung, entgegenbrachte. Durch Sein großes Interesse an neuen Daten war immer eine rege wissenschaftliche Diskussion möglich.

Des Weiteren bedanke ich mich auch bei Prof. Dr. Ingo Heilmann, der meine Betreuung an der Martin-Luther-Universität übernommen und mich unterstützt hat, dass diese Arbeit zu Ende gebracht wurde. Neben diesen beiden danke ich auch Prof. Dr. Ute Vothknecht für die Übernahme des Gutachtens.

Bei Dr. Birgit Agne, Dr. Daniel Köhler und Dr. Mareike Heilmann möchte ich mich für ihre zahlreichen Tipps und den regen wissenschaftlichen Austausch bedanken. Ebenso möchte ich bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der beiden Arbeitsgruppen bedanken, die mich herzlich aufgenommen und unterstützt haben. Freundliche Gespräche haben den Arbeitsalltag aufgelockert und der Energiehaushalt wurde durch Kuchen immer wieder aufgefüllt.

Des Weiteren danke ich Dr. Dirk Dobritsch und Dr. Anja Rödiger für die MS-Messungen und die Unterstützung in der Auswertung von den Daten.

Für die TEM Aufnahmen meiner Pflanzen und die erfolgreiche Zusammenarbeit möchte ich mich bei Dr. Gerd Hause sowie seiner Arbeitsgruppe bedanken.

Bei Dr. Johannes Stuttmann möchte ich mich für die Generierung des induzierbaren *silencing* Plasmids bedanken.

Außerdem möchte ich den Studenten Adrian Goldspink, Janik Telleria Marloth und Robert Säbel bedanken, die mir innerhalb ihrer Abschlussarbeit mit Ihrer Arbeit beim Vorankommen in meinen Analysen unterstützt haben.

Mit den letzten Worten dieser Arbeit möchte ich meinen Dank an meine Familie richten, insbesondere Lisa und Janosch. Sie haben mich immer mit Liebe und Geduld unterstützt und haben immer für gute Laune und Ablenkung gesorgt.