

Identifizierung von Komponenten der *single-cell*
C4 Photosynthese in *Bienertia sinuspersici* durch
vergleichende Transkriptomik photosynthetischer
Gewebe und proteomische Untersuchung der
Hüllmembranen dimorpher Chloroplasten

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Dissertation

von

Matthias Erlinghäuser (M. Sc.)

(2018)

Referent: Dr. rer. nat. Sascha Offermann

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Hans-Peter Braun

Tag der Promotion: 14.02.2018

Zusammenfassung

Bei den meisten C₄-Spezies beruht die räumliche Trennung von primärer und sekundärer Kohlenstofffixierung auf der Interaktion von Mesophyll- und Bündelscheidenzellen. Im Gegensatz dazu betreibt *Bienertia sinuspersici single-cell* C₄-Photosynthese (SCC₄) innerhalb von einzelnen Chlorenchymzellen. Die räumliche Trennung der Fixierungsreaktionen wird dabei durch die Bildung von zwei intrazellulären Kompartimenten, dem zentralen und dem peripheren Kompartiment, gewährleistet. Diese beiden Kompartimente enthalten zwei physiologisch spezialisierte Chloroplastentypen, die unterschiedliche Sets kerncodierter Proteine akkumulieren. Des Weiteren wurde in früheren Studien gezeigt, dass sich das zentrale Kompartiment lichtabhängig innerhalb der Zelle bewegt, während die Chloroplasten des peripheren Kompartimentes ihre Position beibehalten. Bislang ist weitestgehend unklar, wie kerncodierte Proteine selektiv in die beiden Chloroplastentypen gelangen, und welche Mechanismen zur selektiven lichtabhängigen Bewegung des zentralen Kompartimentes führen.

Um Faktoren zu identifizieren, die an der SCC₄-Photosynthese beteiligt sind, wurden in dieser Arbeit vergleichende Transkriptomanalysen an Chlorenchym, Hydrenchym und Wurzeln mittels RNA-Sequenzierung durchgeführt. Hydrenchymzellen enthalten Chloroplasten, weisen aber nicht die Aufteilung in die beiden intrazellulären Kompartimente auf. Die Ergebnisse zeigen, dass SCC₄-Gene im Chlorenchym höher exprimiert sind, während photorespiratorische Gene höhere Expression im Hydrenchym zeigen. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die Hydrenchymzellen keine SCC₄- sondern C₃-Photosynthese betreiben. Es wurden 77 potenzielle SCC₄-spezifische Faktoren identifiziert, darunter die Co-Chaperone ROF1 und ROF2, welche an der Regulation des subzellulären Transportes von Proteinen beteiligt sind. Des Weiteren sind die Transkriptionsfaktoren GLK1 und GNC potenzielle Regulatoren der SCC₄-spezifischen Genexpression.

Zur Identifizierung von Proteinen, die an der Akkumulation kerncodierter Proteine in den beiden Chloroplastentypen sowie an der lichtabhängigen Bewegung des zentralen Kompartimentes beteiligt sind, wurde ein Verfahren zur Analyse von Chloroplastenhüllmembranproteinen durch Massenspektrometrie entwickelt. Es wurden 13 Hüllmembranproteine identifiziert, die in den beiden Chloroplastentypen unterschiedlich häufig vorkommen. Darunter befanden sich die Untereinheiten des TOC/TIC-Komplexes TOC159, TIC214 und TIC22, welche am Import kerncodierter Proteine in Chloroplasten beteiligt sind. Außerdem wurde die Assoziation der zytoplasmatischen Proteine WEB1, PMI2 und Myosin mit dem zentralen Kompartiment nachgewiesen. Diese Faktoren wurden bereits in anderen Spezies mit der lichtabhängigen Bewegung von Chloroplasten in Verbindung gebracht.

Schlagnworte: single-cell C₄ Photosynthese, Chloroplastenhüllmembran, vergleichende Proteom-Analyse, RNA Sequenzierung

Abstract

In the majority of C₄-species, the spatial separation of primary and secondary carbon-fixation relies on the interaction of mesophyll cells and bundle sheath cells. In contrast, *Bienertia sinuspersici* performs single-cell C₄ photosynthesis within individual chlorenchyma cells. Here, the spatial separation of the two carbon-fixing reactions is accomplished by the formation of two intracellular compartments, the central and the peripheral compartment. These compartments contain two physiologically specialized types of chloroplasts, which accumulate different sets of nuclear encoded proteins. In previous studies, it was shown that the central compartment moves within the cell in a light-dependent manner, while the chloroplasts of the peripheral compartment remain in fixed positions. To date, it is mostly unknown how nuclear encoded proteins accumulate selectively in the two chloroplast types and which mechanisms lead to the selective movement of the central compartment.

In order to identify crucial factors which contribute to SCC4-specific processes, comparative transcriptomic analysis of chlorenchyma, hydrenchyma and roots was performed by RNA-sequencing. Hydrenchyma cells contain chloroplasts, but exhibit no separation in two intracellular compartments. The results show that chlorenchyma cells exhibit higher expression of SCC4-related genes, while photorespiratory genes are higher expressed in the hydrenchyma. These results indicate that the hydrenchyma likely performs C₃-photosynthesis. 77 potential SCC4-related factors were identified, among others the co-chaperons ROF1 and ROF2, which contribute to subcellular proteintransport. Furthermore, the transcription-factors GLK1 and GNC were identified as potential regulators of SCC4-specific gene expression.

In order to identify proteins which contribute to the accumulation of nuclear encoded proteins in the two chloroplast types and the light-dependent movement of the central compartment, a protocol for the analysis of proteins in the chloroplast envelopes by mass spectroscopy was established. 13 envelope proteins with different abundances in the two chloroplast types were identified. Among these proteins were the subunits of the TOC/TIC complexes TOC159, TIC214 und TIC22, which perform the import of nuclear encoded proteins into the chloroplasts. Furthermore, the cytoplasmic proteins WEB1, PMI2 and myosin were shown to be associated with the central compartment. In previous studies on other plant species, these factors were shown to participate in the light-dependent movement of chloroplasts.

Keywords: single-cell C₄ photosynthesis, chloroplast envelope, comparative proteomics, RNA sequencing

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	iii
Abstract	iv
Inhaltsverzeichnis	v
Abbildungsverzeichnis	viii
Tabellenverzeichnis	ix
Abkürzungsverzeichnis	x
1. Einleitung	1
1.1 C4-Photosynthese	1
1.2 SCC4-Photosynthese	2
1.2.1 Blatt- und Zellmorphologie von SCC4-Spezies	3
1.2.2 Biochemie der SCC4-Photosynthese	4
1.2.3 Ausbildung der SCC4-Morphologie während der Chlorenchymzellentwicklung	7
1.2.4 Differenzielle Akkumulation kerncodierter Chloroplastenproteine	8
1.3 Transport kerncodierter Proteine in Chloroplasten	9
1.4 Bewegung und Positionierung von Chloroplasten	12
1.5 Identifizierung von C4-Genen durch RNA-Sequenzierung	14
1.6 Untersuchung von Chloroplastenhüllmembranen	15
1.7 Zielsetzung	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	17
2.2 Puffer und Lösungen	17
2.3 Oligonukleotide (Primer)	19
2.4 Kits	20
2.5 Enzyme	20
2.6 Antikörper	20
2.7 Pflanzenanzucht	21
2.8 Anzucht von <i>B. sinuspersici</i> in Hydrokultur	21
2.9 Probenentnahme zur Untersuchung der Blattentwicklung	21

2.10 Bestimmung der Osmolalität des Blattmaterials	22
2.11 Isolation von Chloroplasten und Zentralkompartimenten	22
2.12 Subfraktionierung von Chloroplasten.....	23
2.13 Proteinfällung	23
2.14 Proteinextraktion	23
2.15 SDS-PAGE und Western Blot.....	24
2.16 Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie.....	24
2.17 Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen durch Massenspektrometrie	25
2.18 Separation von Hydrenchym und Chlorenchymprotoplasten.....	25
2.19 RNA Isolation.....	26
2.20 RNA Sequenzierung	26
2.21 Reverse Transkription.....	27
2.22 Polymerasekettenreaktion.....	27
2.23 Klonierung von DNA-Fragmenten	28
2.24 Isolation und Transfomation von Protoplasten.....	29
2.25 Fluoreszenzmikroskopie	30
2.26 Bioinformatische Methoden	30
2.26.1 Referenztranskriptom	30
2.26.2 Analyse der RNA-Sequenzdaten	30
2.26.3 Analyse von MS-Daten.....	32
3. Ergebnisse	34
3.1 Vergleichende Transkriptomik von Chlorenchym, Hydrenchym und Wurzeln.....	34
3.1.1 Isolation von Chlorenchym und Hydrenchym	34
3.1.2 Sequenzierung der Transkriptome von Chlorenchym, Hydrenchym und Wurzeln.	36
3.1.3 Ausschluss von ESTs bei niedriger Expression.....	38
3.1.4 Charakterisierung der photosynthetischen Genexpression im Hydrenchym	39
3.2 Identifizierung von SCC4-Genen durch vergleichende Transkriptomik.....	41
3.2.1 Ermittlung der Filterkriterien zu Identifizierung von SCC4-Genen	42
3.2.2 Identifizierung potenzieller SCC4-Gene.....	45
3.3 Proteomik der Chloroplastenhüllmembranen von C- und P-Chloroplasten.....	48
3.3.1 Subfraktionierung von Chloroplasten	48
3.3.2 Untersuchung von Chloroplastensubfraktionen durch Massenspektrometrie	50
3.3.3 Isolation von C- und P-Chloroplasten.....	55

3.3.4 Identifizierung differenziell abundanter Hüllmembranproteine	56
3.4 Expressionsmuster von Hüllmembranproteinen während der Blattentwicklung	60
3.5 Expressionsmuster von Hüllmembranproteinen in Chlorenchym, Hydrenchym und Wurzeln	63
3.6 Subzellulärer Transport von Hüllmembranproteinen	64
4. Diskussion	67
4.1 Evaluation der Methoden zur Identifizierung von SCC4-Faktoren.....	67
4.2 C- und P-Chloroplasten enthalten unterschiedlich aufgebaute Proteinimportkomplexe	68
4.3 CC-spezifisch lokalisierte Proteine sind möglicherweise an der selektiven Chloroplastenbewegung beteiligt	71
4.4 Photosynthesegene zeigen im Hydrenchym ein C3-artiges Expressionsmuster	73
4.5 Die mögliche Funktion potenzieller SCC4-Faktoren	75
4.6 Der subzelluläre Transport von Chloroplastenhüllmembranproteinen	80
4.7 Fazit	82
Literaturverzeichnis.....	83
Anhang	93
Lebenslauf	102

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zellmorphologie von <i>B. sinuspersici</i> Chlorenchym- und Hydrenchymzellen....	4
Abbildung 2: Biochemie der SCC4-Photosynthese	6
Abbildung 3: Ausbildung der SCC4-Morphologie während der Entwicklung von Chlorenchymzellen.....	8
Abbildung 4: Isolation von Chlorenchym und Hydrenchym.....	36
Abbildung 5: Hauptkomponentenanalyse von Transkriptomdaten aus Chlorenchym, Hydrenchym und Wurzeln	37
Abbildung 6: Relation von Variationskoeffizient und Expressionsstärke im Chlorenchymtranskriptom.....	38
Abbildung 7: Expression photosynthetischer und respiratorischer Gene in Hydrenchym und Wurzel	39
Abbildung 8: Expression photosynthetischer Gene in Hydrenchym und Chlorenchym	41
Abbildung 9: Anteil photosynthetischer ESTs abhängig vom Grenzwert FC C/W	44
Abbildung 10: Subfraktionierung von Chloroplasten.....	50
Abbildung 11 : Hauptkomponentenanalyse von MS-Daten aus Thylakoiden, Stroma und Chloroplastenhüllmembranen	51
Abbildung 12: Western-Blot Analyse isolierter Chloroplasten	56
Abbildung 13: Hauptkomponentenanalyse von MS-Daten aus TC- und CC-Hüllmembranen.....	57
Abbildung 14: Genexpression von Hüllmembranproteinen während der Blattentwicklung..	62
Abbildung 15: Expression von GFP-Fusionsproteinen in Protoplasten	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen	17
Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide	19
Tabelle 3 : Übersicht über die verwendeten Reaktionskits	20
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Enzyme	20
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Antikörper	20
Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten PAGE-Gele	24
Tabelle 7: PCR-Ansätze und -Programme	28
Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Konstrukte	29
Tabelle 9: Filterkriterien zur Identifizierung von SCC4-Genen	32
Tabelle 10: Expression von Genen des C4- und CBB-Zyklus in Chlorenchym und Hydrenchym	43
Tabelle 11: Kandidatenliste potenzieller SCC4-Gene.....	46
Tabelle 12: Anreicherung ausgewählter chloroplastidärer BIN-Kategorien in chloro- plastidären Subfraktionen.....	52
Tabelle 13: Identifizierung von Chloroplastenhüllmembranproteinen	53
Tabelle 14: Subzelluläre Lokalisation differenziell abundanter Proteine	58
Tabelle 15: Differenziell abundante Chloroplastenhüllmembranproteine	59
Tabelle 16: Differenziell in TC- und CC-Hüllmembranen abundante Zytoplasmaproteine...	60
Tabelle 17: Expression ausgewählter Hüllmembranproteine in Chlorenchym, Hydrenchym und Wurzeln	64
Tabelle 18: Identifizierte ESTs potenzieller SCC4-Gene	93
Tabelle 19: Differenziell in TC- und CC-Hüllmembranen abundante ESTs	96
Tabelle 20: Gewebsspezifische Genexpression von Chloroplastenhüllmembranproteinen..	100

Abkürzungsverzeichnis

AKR	<i>ankryn repeat-containing protein</i>
ALA-AT	<i>alanine aminotransferase</i>
ANOVA	<i>analysis of variation</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ARC	<i>accumulation and replication of chloroplasts</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BASS	<i>bileacid:sodium symporter</i>
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat
BSZ	Bündelscheidenzellen
CAM	<i>crassulacean acid metabolism</i>
cASP-AT	<i>cytosolic aspartate-aminotransferase</i>
CBB-Zyklus	Calvin-Benson-Bassham-Zyklus
CC	<i>central compartment</i>
C-Chloroplasten	Chloroplasten des CC
CC-HÜL	Hüllmembran der C-Chloroplasten
CDD	<i>conserved domain database</i>
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
CHUP	<i>chloroplast unusual positioning</i>
CV	<i>coefficient of variation</i>
DGE	<i>differential gene expression</i>
Disc-SDS-PAGE	<i>discontinuous sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis</i>
DTC	<i>di-tricarboxylate carrier</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	<i>ethylene diamine tetra acidic acid</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERD	<i>early response to dehydration</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FAX	<i>fatty acid export</i>
FC C/H	<i>fold change</i> Chlorenchym zu Hydrenchym
FC C/W	<i>fold change</i> Chlorenchym zu Wurzeln
FDR	<i>false discovery rate</i>
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
GLK	<i>golden-like</i>
GO	<i>gene ontology</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HSP	<i>heatshock protein</i>
IL	<i>intermediate leaf</i>
KOG	<i>eukaryotic orthologous groups</i>
LFQ	<i>label-free quantification</i>
LHC	<i>light harvesting complex</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
ML	<i>mature leaf</i>
MS	Massenspektrometrie
MZ	Mesophyllzellen
NAD-MDH	<i>NAD-malate dehydrogenase</i>

NAD-ME	<i>NAD-malic enzyme</i>
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADP-ME	<i>NADP-malic enzyme</i>
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NC	<i>normalized counts</i>
NDH	<i>NADPH-dehydrogenase</i>
OEP	<i>outer envelope protein</i>
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAR	<i>photosynthetic active radiation</i>
PBR	<i>photosystem biogenesis regulator</i>
PCA	<i>principle component analysis</i>
P-Chloroplasten	Chloroplasten des PC
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDV	<i>plastid division</i>
PEG	Polyethylenglycol
PEPC	<i>phosphoenolpyruvate carboxylase</i>
PEPCK	<i>phosphoenolpyruvate carboxykinase</i>
PMI	<i>plastid movement impaired</i>
PPDK	<i>pyruvate phosphate dikinase</i>
PPT	<i>phosphoenolpyruvate transporter</i>
PS	Photosynthese
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RBCL	ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RSSU	<i>ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit</i>
RuBisCO	<i>ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase/oxygenase</i>
SCC4	<i>single-cell C4</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SPP	<i>stromal processing peptidase</i>
TAT	<i>twin arginine translocation</i>
TC	<i>total chloroplasts (C- und P-Chloroplasten)</i>
TC-HÜL	Hüllmembran der TC
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIC	<i>translocon at the inner chloroplast membrane</i>
TOC	<i>translocon at the outer chloroplast membrane</i>
TP	<i>total protoplast</i>
TPI	<i>triosephosphate isomerase</i>
TPR	<i>tetratricopeptide repeat protein</i>
WEB	<i>weak chloroplast movement under blue light</i>
YL	<i>youngest leaf</i>

1. Einleitung

Fraction 1. So bezeichnete Samuel G. Wildman im Jahre 1944 ein soeben isoliertes, pflanzliches Protein (Wildman et al. 1949). Erst spätere Wissenschaftler erkannten die Bedeutung von Wildmans Entdeckung als „[...] *the protein on which all life ultimately depends*“ (Ellis 1979). Heute wird das von Wildman entdeckte Protein, gemäß seiner katalytischen Aktivität, als RuBisCO (Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase) bezeichnet. RuBisCO katalysiert die initiale Fixierung von CO₂ während der Photosynthese. Das Produkt dieser Reaktion ist 3-Phosphoglycerat, welches im CBB-Zyklus (Calvin-Benson-Bassham-Zyklus) zu Zucker reduziert wird (Weissbach et al. 1956).

Neben CO₂ akzeptiert RuBisCO jedoch auch O₂ als Substrat für die Fixierungsreaktion (Bowes et al. 1971). Dabei entsteht Phosphoglycolat, welches toxisch ist und keinen bekannten metabolischen Nutzen für die Pflanze hat (Anderson et al. 1971). Der Abbau von Phosphoglycolat erfordert eine komplexe Reihe biochemischer Reaktionen, die als Photorespiration bezeichnet werden. Dabei wird der im Phosphoglycolat enthaltene Kohlenstoff z.T. wieder dem CBB-Zyklus zugeführt. Letztlich führt Photorespiration jedoch zum Verlust von Energie, fixiertem Kohlenstoff und Stickstoff (Ogren 1984).

1.1 C4-Photosynthese

Während der Evolution photosynthetischer Organismen haben sich zahlreiche Strategien zur Vermeidung der Sauerstofffixierung und der damit verbundenen Photorespiration entwickelt. Eine dieser Strategien ist die C4-Photosynthese. Diese basiert auf der selektiven Erhöhung der CO₂-Konzentration in der Umgebung von RuBisCO durch den sog. C4-Zyklus (Hatch & Slack 1966). Dabei wird das CO₂ zunächst in einer primären Fixierungsreaktion gebunden und anschließend der sekundären Fixierungsreaktion, dem CBB-Zyklus, zugeführt. Die räumliche Trennung von primärer und sekundärer Fixierungsreaktion ist dabei entscheidend (Dengler & Nelson 1999). In den meisten C4-Spezies wird diese Trennung durch die Kooperation zweier photosynthetischer Zelltypen, der Mesophyllzellen (MZ) und der Bündelscheidenzellen (BSZ) erreicht. Dabei sind die BSZ kranzförmig um das Leitgewebe angeordnet und ihrerseits von den MZ umgeben. Diese Anordnung wird als Kranz-Anatomie bezeichnet (Haberlandt et al. 1904). In den MZ findet die primäre CO₂-Fixierung statt. Phosphoenolpyruvat wird carboxyliert und die dabei entstehende C4-Säure diffundiert in die BSZ. Anschließend wird sie decarboxyliert, wodurch das zuvor fixierte CO₂ in den BSZ wieder freigesetzt wird. Da die primäre Fixierungsreaktion nicht sensitiv für O₂ ist, führt diese C4-Pumpe zur selektiven

Anreicherung von CO₂ in den BSZ. Dort findet schließlich die sekundäre CO₂-Fixierung durch RuBisCO statt (Hatch 1987).

C₄-Spezies werden in drei biochemische Subtypen unterteilt, die sich in Bezug auf die Decarboxylierungsreaktion in den BSZ unterscheiden. Die Decarboxylierung findet jeweils in einem anderen Zellkompartiment statt und wird von unterschiedlichen Enzymen katalysiert. Bei Spezies des NADP-ME Subtyps findet die Decarboxylierung in den Chloroplasten der BSZ statt und wird durch das NADP-abhängige Malatenzym katalysiert. Spezies des NAD-ME Subtyps decarboxylieren C₄-Säuren in den Mitochondrien durch das NAD-abhängige Malatenzym. In Spezies des PEPCK-Subtyps findet die Decarboxylierung in den Mitochondrien und im Zytoplasma statt. Letztere Reaktion wird durch PEPCK (Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase) katalysiert (Hatch 1987).

1.2 SCC4-Photosynthese

Seit der Entdeckung der C₄-Photosynthese wurde angenommen, dass die räumliche Trennung von primärer und sekundärer Kohlenstofffixierung in Mesophyll- und Bündelscheidenzellen ein essentielles Merkmal aller C₄-Spezies ist (Edwards & Walker 1983). Zu Beginn des 21. Jahrhunderts wurden einige im westlichen Asien beheimatete Spezies der Familie Amaranthaceae untersucht. Diese weisen C₄-artige Eigenschaften, wie z.B. eine von der O₂-Konzentration unabhängige Kohlenstoffassimilation sowie niedrige δ¹³C-Werte auf (Voznesenskaya et al. 2001). Allerdings weisen die photosynthetischen Gewebe dieser Pflanzenarten keine Kranz-Anatomie auf (Freitag & Stichler 2000). Stattdessen finden primäre und sekundäre CO₂-Fixierung hier zusammen in einem Zelltypus, den Chlorenchymzellen, statt (Voznesenskaya et al. 2001; Voznesenskaya et al. 2002). Diese Photosyntheseform wird als *single-cell* C₄-Photosynthese (SCC4-Photosynthese) bezeichnet. In SCC4-Spezies wird die Trennung von primärer und sekundärer CO₂-Fixierung durch die Bildung zweier intrazellulärer Kompartimente erreicht, die jeweils einen physiologisch spezialisierten Chloroplastentyp enthalten (Voznesenskaya et al. 2001; Voznesenskaya et al. 2002; Offermann et al. 2011). Damit sind SCC4-Spezies der erste dokumentierte Fall von intrazellulärer Differenzierung von Plastiden.

1.2.1 Blatt- und Zellmorphologie von SCC4-Spezies

Bislang wurden vier SCC4-Spezies identifiziert. In allen Fällen sind die voll entwickelten Laubblätter sukkulent und weisen eine äquifaziale Organisation auf. Das zentrale Blattgewebe stellt das wasserspeichernde Hydrenchym dar, welches vom Vaskulärsystem durchzogen ist. Die Chlorenchymzellen sind konzentrisch um das Hydrenchym angeordnet. Den äußeren Abschluss bildet die einzellschichtige Epidermis (Freitag et al. 2000; Freitag et al. 2002; Akhani et al. 2005; Akhani et al. 2012). Es wurde festgestellt, dass sowohl die Chlorenchym- als auch die Hydrenchymzellen von SCC4-Spezies Chloroplasten enthalten (Voznesenskaya et al. 2002; Voznesenskaya et al. 2003). In den Hydrenchymzellen sind die Chloroplasten einzeln entlang der Zellwände angeordnet. Die Chlorenchymzellen zeigen hingegen eine charakteristische Anordnung der Chloroplasten (Abbildung 1). Anhand dieser Anordnung werden zwei Subtypen von SCC4-Spezies unterschieden. *Suaeda aralocaspica* (früher: *Borszczowia aralocaspica*) verfügt über ein einschichtiges Chlorenchym aus lang gestreckten Zellen. Die Trennung von primärer und sekundärer Kohlenstofffixierung in den Chlorenchymzellen wird hier durch die Bildung zweier Kompartimente an den gegenüberliegenden Enden der Zellen erreicht (Voznesenskaya et al. 2001). Die übrigen SCC4-Spezies werden der Gattung *Bienertia* zugeordnet. *Bienertia cycloptera*, *Bienertia sinuspersici* und *Bienertia kavirense* verfügen über 2-3 Schichten von Chlorenchymzellen. In der Gattung *Bienertia* wird die Trennung von primärer und sekundärer CO₂-Fixierung durch die Bildung eines zentralen Kompartimentes (CC) und eines peripheren Kompartimentes (PC) erreicht (Voznesenskaya et al. 2002; Voznesenskaya et al. 2005, Offermann et al. 2011). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden die Chloroplasten des CC als C-Chloroplasten und die Chloroplasten des PC als P-Chloroplasten bezeichnet.

Die C-Chloroplasten bilden eine kugelförmige Struktur, die auch einen Großteil der Mitochondrien und Peroxisomen enthält (Chuong et al. 2006; Lung et al. 2010; Offermann et al. 2011; Dissertation D. Wimmer 2017). Die P-Chloroplasten hingegen sind einzeln in der Nähe der Zellwand angeordnet. Sie sind größer als die C-Chloroplasten und weisen eine abgeflachte Form auf. Des Weiteren enthalten P-Chloroplasten weniger Grana als C-Chloroplasten (Voznesenskaya et al. 2002; Offermann et al. 2011). Zentrales und peripheres Kompartiment werden durch die Vakuole voneinander abgegrenzt. Diese ist von zytoplasmatischen Kanälen durchzogen, welche wahrscheinlich den Stoffaustausch zwischen den beiden Kompartimenten ermöglichen (Park et al. 2009).

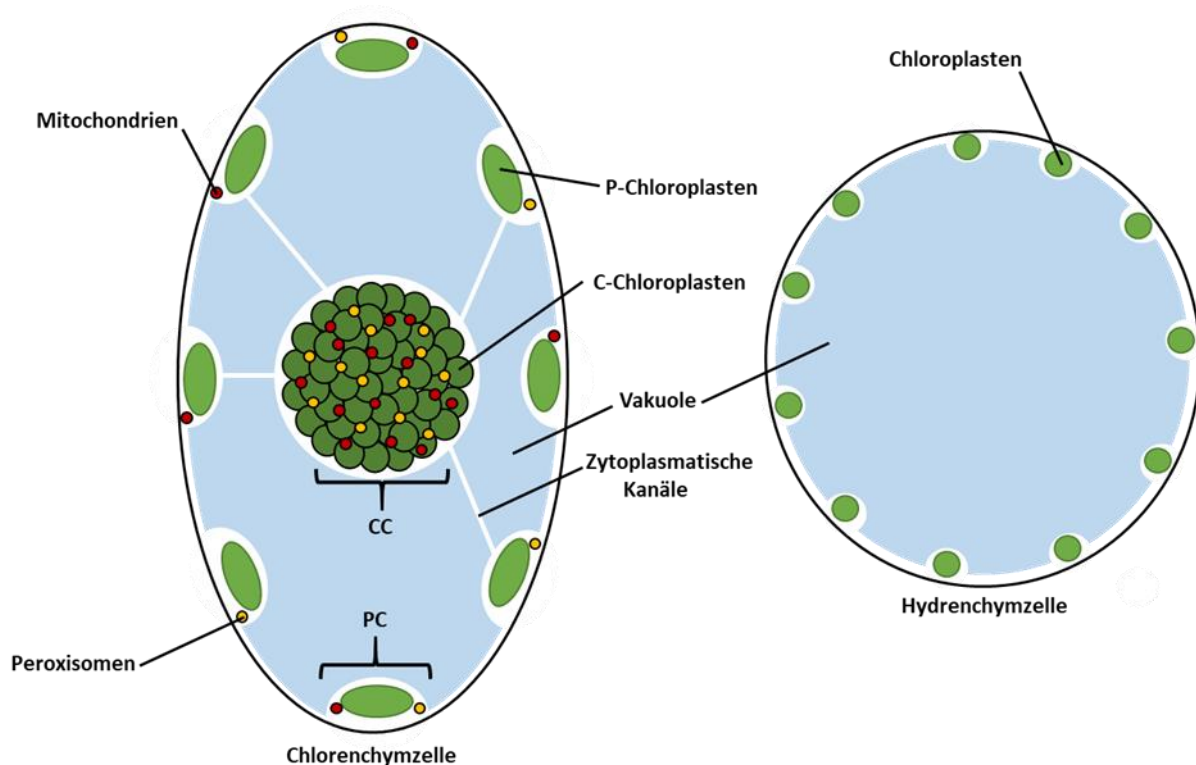


Abbildung 1: Zellmorphologie von *B. sinuspersici* Chlorenchym- und Hydrenchymzellen
 Chlorenchymzellen (links) sind intrazellulär in ein peripheres Kompartiment (PC) und ein zentrales Kompartiment (CC) unterteilt. Diese Kompartimente sind durch zytoplasmatische Kanäle miteinander verbunden. PC und CC enthalten jeweils einen Chloroplastentyp, die P-Chloroplasten bzw. die C-Chloroplasten. Der Großteil der Mitochondrien und Peroxisomen befindet sich im CC. Hydrenchymzellen (rechts) enthalten Chloroplasten, die entlang der Zellwand angeordnet sind. Vorkommen und Lage von Mitochondrien und Peroxisomen wurden bislang nicht untersucht.

1.2.2 Biochemie der SCC4-Photosynthese

Die physiologische Funktion von C- und P-Chloroplasten in der SCC4-Photosynthese war Gegenstand zahlreicher bisheriger Studien. Es wird vermutet, dass der CBB-Zyklus überwiegend in den C-Chloroplasten stattfindet. So wurde gezeigt, dass die meisten Proteine des CBB-Zyklus in den C-Chloroplasten höher abundant sind, als in den P-Chloroplasten (Offermann et al. 2011; Offermann et al. 2015). Auch die Akkumulation von Stärke wurde überwiegend in den C-Chloroplasten beobachtet (Voznesenskaya et al. 2005). Studien an isolierten Chloroplasten von *B. sinuspersici* haben gezeigt, dass nur die C-Chloroplasten in Anwesenheit von HCO_3^- Sauerstoff freisetzen (Offermann et al. 2011). Die Regeneration von Phosphoenolpyruvat, dem Akzeptor der primären Kohlenstofffixierung, findet hingegen überwiegend in den P-Chloroplasten statt. Es wurde ermittelt, dass die vermutlich daran beteiligten Proteine höher abundant in den P-Chloroplasten sind (Offermann et al. 2011;

Offermann et al. 2015). Des Weiteren wurde gezeigt, dass isolierte P-Chloroplasten in der Lage sind, Pyruvat in Phosphoenolpyruvat umzuwandeln. Bei isolierten C-Chloroplasten konnte dies hingegen nicht festgestellt werden (Offermann et al. 2011).

Basierend auf diesen Studien, wurde ein vorläufiges Modell über die biochemischen Abläufe der SCC4-Photosynthese in *B. sinuspersici* formuliert (Offermann et al. 2011; Offermann et al. 2015) (Abbildung 2). Demnach gelangt atmosphärisches CO₂ in die Chlorenchymzellen und erreicht dort als erstes das PC. Dort wird es durch eine zytoplasmatisch lokalisierte Carboanhydrase in Bicarbonat umgesetzt. Anschließend erfolgt die primäre Fixierungsreaktion. Aus den P-Chloroplasten freigesetztes Phosphoenolpyruvat wird durch PEPC (Phosphoenolpyruvat-Carboxylase) carboxyliert. Das Produkt ist die C₄-Säure Oxalacetat, die wahrscheinlich durch die cASP-AT (zytoplasmatische Aspartat-Aminotransferase) transaminiert, und so zu Aspartat umgesetzt wird. Aspartat wird anschließend in die Mitochondrien transportiert, durch die mitochondriale Aspartat-Aminotransferase de-aminiert und durch NAD-MDH (NAD-abhängige Malatdehydrogenase) zu Malat reduziert. Im Anschluss erfolgt die Decarboxylierung durch NAD-ME. Das freigesetzte CO₂ diffundiert in die C-Chloroplasten und wird dort in der sekundären Kohlenstofffixierung durch RuBisCO dem CBB-Zyklus zugeführt. Das ebenfalls bei der Decarboxylierung entstandene Pyruvat gelangt zurück in das periphere Kompartiment. Dort wird es in die P-Chloroplasten transportiert. Der Transport erfolgt im Austausch mit Na⁺ durch BASS2 (Pyruvat/Natrium Symporter2). Die Natriumionen werden anschließend durch NHD1 (Na⁺/H⁺ Antiporter 1) zurück in das Zytoplasma transportiert. In den P-Chloroplasten erfolgt die Regeneration von Pyruvat zu Phosphoenolpyruvat durch PPK (Pyruvat Phosphat Kinkinase). Phosphoenolpyruvat wird anschließend ins Zytoplasma des peripheren Kompartimentes transportiert. Insgesamt gleichen diese biochemischen Abläufe denen in Kranz-C₄ Spezies des NAD-ME Subtyps (Offermann et al. 2011).

Es wurde gezeigt, dass sowohl C- als auch P-Chloroplasten lichtabhängig O₂ freisetzen und demnach die Lichtreaktion betreiben (Offermann et al. 2011). Wie bereits dargelegt, findet der CBB-Zyklus allerdings überwiegend in den C-Chloroplasten statt. Dies impliziert, dass die bei der Lichtreaktion gebildeten Reduktionsäquivalente in den P-Chloroplasten nicht durch den CBB-Zyklus abgebaut werden. Es wird vermutet, dass sie stattdessen durch die Reduktion von 3-Phosphoglycerat zu Dihydroxyacetonphosphat abgebaut werden. Letzteres wird vermutlich durch ein Triose-Phosphat-Shuttle dem CBB-Zyklus in den C-Chloroplasten zugeführt (Offermann et al. 2011, Offermann et al. 2015). Zusätzlich wird vermutet, dass die P-Chloroplasten während der Lichtreaktion vermehrt zyklischen Elektronentransport betreiben

(Offermann et al. 2015). Dieser ermöglicht die Produktion von ATP (Adenosintriphosphat), ohne die Bildung von Reduktionsäquivalenten (Hatch 1987).

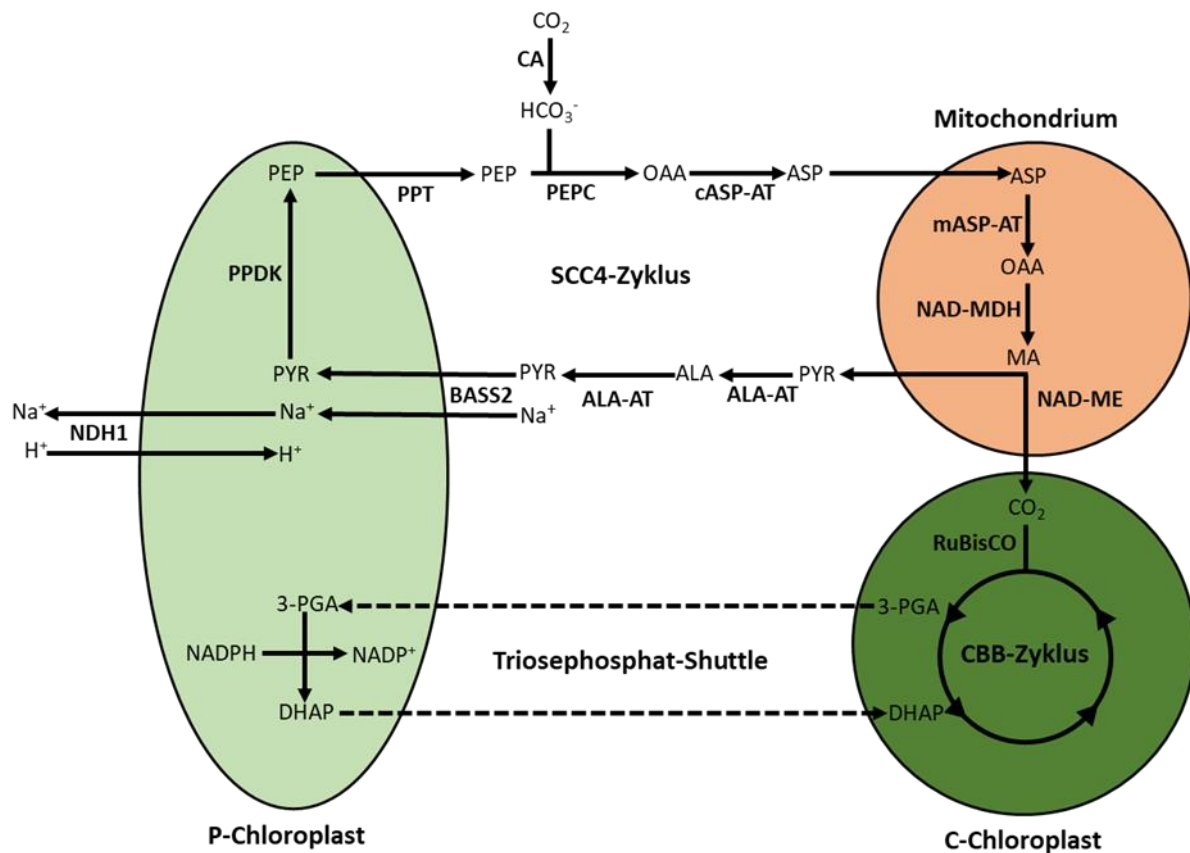


Abbildung 2: Biochemie der SCC4-Photosynthese

(Verändert nach: Offermann et al. 2011; Offermann et al. 2015). Abkürzungen Proteine: CA: Carboanhydrase; PEPC: Phosphoenolpyruvat-Carboxylase; cASP-AT: zytoplasmatische Aspartat-Aminotransferase; mASP-AT: mitochondriale Aspartat-Aminotransferase; NAD-MDH: NAD-abhängige Malat-Dehydrogenase; NAD-ME: NAD-abhängiges Malatenzym; ALA-AT: Alanin-Aminotransferase; BASS2: Pyruvat/Natrium Symporter2; NDH1: Na⁺/H⁺ Antiporter1; PPDK: Pyruvat Phosphat Dikinase; PPT: Phosphoenolpyruvat Transporter; RuBisCO: Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase. Abkürzungen Metabolite: PEP: Phosphoenolpyruvat; OAA: Oxalacetat; ASP: Aspartat; MA: Malat, PYR: Pyruvat, ALA: Alanin; 3-PGA: 3-Phosphoglycerat; DHAP: Dihydroxyacetonphosphat; NADPH: Nicotinamidadenindi-nukleotid-phosphat.

1.2.3 Ausbildung der SCC4-Morphologie während der Chlorenchymzellentwicklung

In den Chlorenchymzellen von *B. sinuspersici* und *B. cycloptera* findet eine graduelle Entwicklung der SCC4-Morphologie statt (Voznesenskaya et al. 2005; Lara et al. 2008; Park et al. 2009; Koteyeva et al. 2016). Bei den jüngsten bislang untersuchten Chlorenchymzellen (Abbildung 3A) wurde keine intrazelluläre Aufteilung in CC und PC beobachtet. Alle Chloroplasten enthalten kleine Mengen von RuBisCO und Stärke. Dies deutet darauf hin, dass die Chlorenchymzellen in diesem Stadium nur einen Chloroplastentyp enthalten (Voznesenskaya et al. 2005; Park et al. 2009). Die Mitochondrien sind zu diesem Zeitpunkt verhältnismäßig klein und zufällig im Zytoplasma verteilt (Voznesenskaya et al. 2005). Im Laufe der weiteren Zellentwicklung findet die räumliche Trennung von CC und PC statt (Abbildung 3B&C). Dabei formt sich das CC aus einer Zusammenballung von Chloroplasten nahe dem Zellkern (Park et al. 2009). Nach der Trennung von CC und PC enthalten sowohl C- als auch P-Chloroplasten zunächst RuBisCO und Stärke (Voznesenskaya et al. 2005). Später enthalten die P-Chloroplasten jedoch deutlich weniger RuBisCO als die C-Chloroplasten. Auch die Akkumulation von Stärke findet ab diesem Zeitpunkt fast ausschließlich in den C-Chloroplasten statt (Voznesenskaya et al. 2005). In voll entwickelten Chlorenchymzellen (Abbildung 3D) ist eine klare Abgrenzung von CC und PC zu erkennen. RuBisCO akkumuliert fast ausschließlich in den C-Chloroplasten, während Proteine des C4-Zyklus, wie PPKK, überwiegend in den P-Chloroplasten abundant sind (Voznesenskaya et al. 2005; Offermann et al. 2011). Die Mitochondrien befinden sich zu diesem Zeitpunkt überwiegend im CC (Voznesenskaya et al. 2005; Offermann et al. 2011; Dissertation D. Wimmer 2017).

Während der Entwicklung der Chlorenchymzellen zeigen C3- und C4-Gene ein unterschiedliches Expressionsmuster. Beispielsweise sind die C4-Gene *pepc* und *ppdk* in der frühen Zellentwicklung sehr niedrig exprimiert, während ihre Expression nach der Ausbildung von CC und PC stark ansteigt. Die Expression der Untereinheiten von RuBisCO erfolgt hingegen bereits in frühen Stadien der Zellentwicklung (Lara et al. 2008). Dementsprechend zeigen C4-Proteine niedrige Abundanz in der frühen Zellentwicklung, während Proteine des CBB-Zyklus bereits höher abundant sind (Offermann et al. 2015).

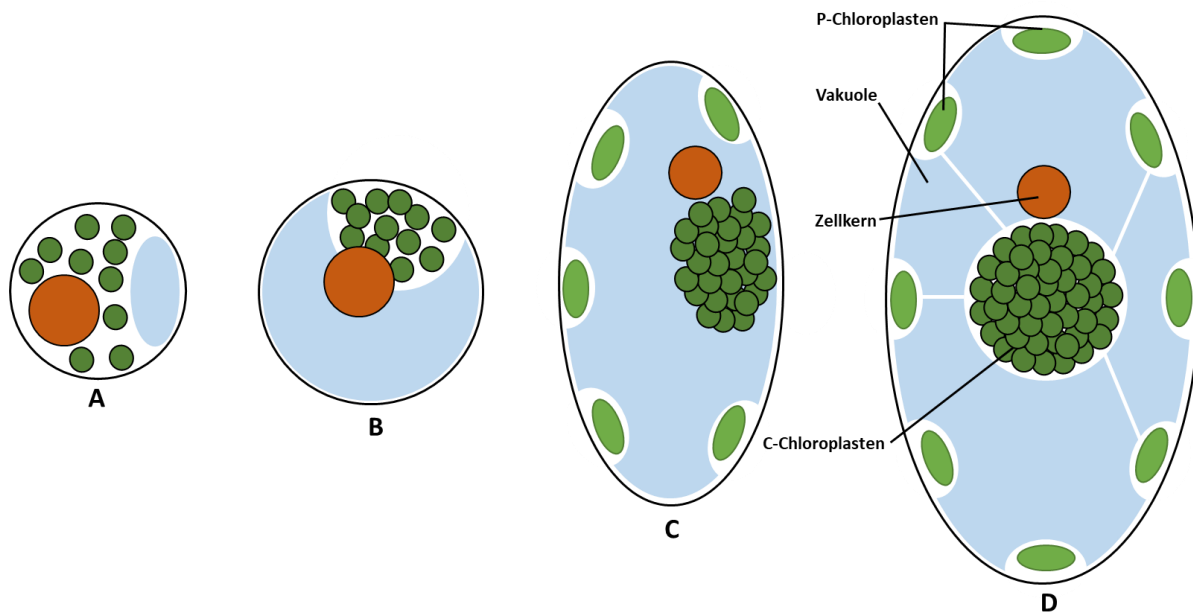


Abbildung 3: Ausbildung der SCC4-Morphologie während der Entwicklung von Chlorenchymzellen

Junge Chlorenchymzellen enthalten einen Chloroplastentyp, die unregelmäßig innerhalb der Zelle verteilt sind (A). Im Verlauf der Zellentwicklung finden die räumliche Trennung von CC und PC sowie die Differenzierung von C- und P-Chloroplasten statt. Dabei formt sich das CC aus einer Ansammlung von Chloroplasten nahe des Zellkerns (B-C). Nach Abschluss ihrer Entwicklung enthalten die Chlorenchymzellen voll entwickelte CC, die im Zentrum der Zelle positioniert sind. CC und PC sind durch zytoplasmatische Kanäle miteinander verbunden (D) (verändert nach: Park et al. 2009).

1.2.4 Differenzielle Akkumulation kerncodierter Chloroplastenproteine

Chloroplasten sind wahrscheinlich durch Endosymbiose, ehemals freilebender photosynthetischer Bakterien, entstanden (Mereschkowsky et al. 1905). Im Zuge dieser Endosymbiose, wurden die meisten bakteriellen Gene in den Zellkern der Wirtszelle verlagert (Bruce 2000). Diese Gene werden im Zellkern transkribiert und im Zytoplasma translatiert, gefolgt von ihrem Transport in die Chloroplasten. Dieser Transport beinhaltet die Interaktion mit zytoplasmatischen Proteinen, den Import in die Chloroplasten sowie Transport und Prozessierung des Proteins innerhalb der Chloroplasten (siehe 1.3).

Wie bereits erläutert, enthalten C- und P-Chloroplasten in *B. sinuspersici* unterschiedliche Proteine. Dies impliziert einen derzeit unbekanntem Mechanismus zur differenziellen Akkumulation kerncodierter Proteine in den beiden Chloroplastentypen. Es wurden drei denkbare Modelle für einen derartigen Mechanismus vorgeschlagen: Die differenzielle Proteindegradation, den Transport von mRNA sowie den differenziellen Proteintransport (Offermann et al. 2011a). Das Modell der differenziellen Proteindegradation basiert auf dem Import aller chloroplastidärer Proteine in beide Chloroplastentypen, gefolgt von der

Degradation der jeweils nicht benötigten Proteine. Die Voraussetzung hierfür wären selektive Proteasen, die differenziell in C- und P-Chloroplasten akkumulieren. In bisherigen proteomischen Studien, an isolierten C- und P-Chloroplasten, konnten allerdings keine derartigen Proteasen identifiziert werden (Offermann et al. 2015). Das Modell des mRNA-Transportes basiert auf dem aktiven Transport der mRNA der jeweiligen Proteine, in die räumliche Nähe des jeweiligen Chloroplastentypen. Dadurch werden die jeweiligen Proteine bevorzugt in räumlicher Nähe eines Chloroplastentypen translatiert und so deren differenzielle Akkumulation ermöglicht. Das dritte Modell, der differenzielle Proteintransport, basiert auf selektiver Erkennung und Transport der jeweiligen Proteine in die beiden Chloroplastentypen. Es konnte gezeigt werden, dass einige Proteine der P-Chloroplasten Sequenzmotive aufweisen, die für den differenziellen Transport kritisch sind. Des Weiteren konnte ausgeschlossen werden, dass die Erkennung dieser Sequenzen auf Ebene der mRNA erfolgt (Wimmer et al. 2017). Diese Befunde deuten darauf hin, dass die bisher untersuchten Proteine durch differenziellen Proteintransport in die P-Chloroplasten gelangen.

1.3 Transport kerncodierter Proteine in Chloroplasten

Bisher ist nur wenig darüber bekannt, welche Prozesse die differenzielle Akkumulation von kerncodierten Proteinen in C- und P-Chloroplasten von *B. sinuspersici* ermöglichen. Wie bereits dargelegt, deuten bisherige Studien auf den differenzielle Proteintransport als möglichen Mechanismus hin (Wimmer et al. 2017).

Die Prozesse des Proteintransportes und die daran beteiligten Proteine wurden in zahlreichen vergangenen Studien an *Pisum sativum* und *Arabidopsis thaliana* sowie weiteren Spezies untersucht. Die meisten kerncodierten Chloroplastenproteine verfügen über ein N-terminales Transitpeptid, welches als Erkennungssequenz während des Transportes fungiert und nach dessen Beendigung abgespalten wird (Richter & Lamppa 1998). In den meisten bekannten Fällen erfolgt der Transport über zwei Proteinkomplexe in der äußeren bzw. inneren Chloroplastenhüllmembran (TOC: *translocon at the outer chloroplast membrane*; TIC: *translocon at the inner chloroplast membrane*). Der TOC-Komplex besteht aus dem β -Barrel Protein TOC75 sowie den Rezeptorproteinen TOC159 und TOC33 (Paila et al. 2014; Chotewutmotri et al. 2017). Während TOC33 überwiegend aus einer G-Domäne (GTPase-Domäne) besteht, weist TOC159 eine dreiteilige Struktur auf. Es besteht aus einer N-terminalen A-Domäne und einer C-terminalen M-Domäne, welche eine zentrale G-Domäne flankieren (Hirsch et al. 1994; Seedorf et al. 1995; Chen et al. 2000). Die A- und die G-Domänen von TOC159 und TOC33 interagieren mit dem Transitpeptid des pre-Proteins und initiieren dabei

den Transport des pre-Proteins durch TOC75 (Hirsch et al. 1994; Hinnah et al. 2002; Inoue et al. 2010). Diese findet unter Verbrauch von GTP (Guanosintriphosphat) durch die G-Domänen statt (Young et al. 1999). Der Proteintransport wird darüber hinaus von zytoplasmatisch lokalisierten Proteinen unterstützt. Die Chaperone HSP70 und HSP90 bilden Komplexe mit Co-Chaperonen, die mit dem Transitpeptid und mit dem Rest des pre-Proteins interagieren (May & Soll 2000; Fellerer et al. 2011). Es wird vermutet, dass diese Komplexe mit den Hüllmembranproteinen OEP61 (*outer envelope protein61*) und TOC64 interagieren und möglicherweise die Interaktion zwischen pre-Protein und TOC-Komplex initiieren (May & Soll 2000; Löffelholz et al. 2011). Auch die Existenz einer zytoplasmatischen Form von TOC159 und dessen Interaktion mit dem Transitpeptid wurden vorgeschlagen (Hiltbrunner et al. 2001; Smith et al. 2004).

Studien an *A. thaliana* haben gezeigt, dass verschiedene Homologe von TOC159 (TOC132, TOC120 und TOC90) sowie ein weiteres Homolog von TOC33 (TOC34) existieren (Li et al. 1997; Bauer et al. 2000; Gutensohn et al. 2000). Die TOC159-Homologe weisen hohe Variabilität in ihren A-Domänen auf und zeigen unterschiedliche organspezifische Expressionsmuster (Yu & Li 2001; Kubis et al. 2004; Inoue et al. 2010). So zeigt *toc159* höhere Expression in photosynthetischen als in heterotrophen Geweben, während seine Homologe in beiden Gewebstypen etwa gleich stark exprimiert sind (Kubis et al. 2004). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die verschiedenen TOC159-Homologe mit verschiedenen Transitpeptiden interagieren und so den substratspezifischen Proteintransport ermöglichen (Bauer et al. 2000; Ivanova et al. 2004; Smith et al. 2004). Dabei wurde zunächst vermutet, dass TOC159 und TOC132 jeweils spezifisch den Import von photosynthetischen bzw. nicht photosynthetischen Proteinen initiieren. Neuere Studien haben jedoch ergeben, dass die beiden Rezeptoren zwar spezifisch für bestimmte Proteine sind, jedoch beide sowohl den Import photosynthetischer, als auch nicht-photosynthetischer Proteine initiieren (Bishof et al. 2011; Dutta et al. 2014).

Der Transport am TIC-Komplex erfolgt wahrscheinlich durch komplementäre Funktion der Transmembranproteine TIC20 und TIC21 (Kouranov et al. 1998; Teng et al. 2006). Diese Funktion wird von TIC110 durch Interaktion mit dem Transitpeptid und HSP70 auf der Stromaseite unterstützt (Jackson et al. 1998; Inaba et al. 2003). Es wird vermutet, dass die TIC- und TOC-Komplexe während des Proteintransportes physisch miteinander verbunden sind (Qbadou et al. 2007). Es konnten zahlreiche potenzielle Komponenten des TIC-Komplexes identifiziert werden. Die genaue Funktion dieser Proteine ist jedoch meist noch nicht geklärt. TIC22 ist im Intermembranraum lokalisiert und unterstützt dort wahrscheinlich die Passage des pre-Proteins (Glaser et al. 2012; Kasmati et al. 2013). Weiterhin wird spekuliert, ob TIC22 eine

Rolle bei der Verbindung von TIC- und TOC-Komplex spielt (Qbadou et al. 2007). TIC214 ist die einzig bekannte plastidär codierte Untereinheit der TIC und TOC-Komplexe. Es ist nicht bekannt, ob TIC214 am Proteintransport beteiligt ist. Es gibt allerdings Hinweise, dass TIC214 die Expression von plastidär codierten Komponenten der Lichtreaktion reguliert (Yang et al. 2016). TIC62 enthält eine NADPH-Bindedomäne und interagiert mit dem TIC-Komplex in Abhängigkeit vom $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ Verhältnis in den Chloroplasten. Es wird daher vermutet, dass der Transport durch den TIC-Komplex über TIC62 redoxabhängig gesteuert wird (Küchler et al. 2002; Stengel et al. 2008). Nach dem Transport ins Stroma erfolgt die Abspaltung des Transitpeptides durch die SPP (*Stromal Processing Peptidase*). Während der Transport der Stromaproteine damit abgeschlossen ist, erfolgt der weitere Transport ins Thylakoidlumen durch das TAT- bzw. das SEC-System. Die Insertion von Proteinen in die Thylakoidmembran kann entweder über das SRP-System oder über Selbstinsertion von Transmembrandomänen erfolgen (Keegstra & Cline 1999; Jarvis 2004).

Neben der beschriebenen Route über TOC und TIC existieren weitere Möglichkeiten des Proteintransportes in Chloroplasten. Die Proteine der äußeren Chloroplastenhüllmembran weisen meist kein N-terminales Transitpeptid auf. Dennoch erfolgt die Insertion einiger dieser Proteine mit Hilfe des TOC-Komplexes (Tu & Li 2000). Die Insertion in die äußere Chloroplastenhüllmembran kann jedoch auch ohne Beteiligung weiterer Proteine erfolgen (Schleiff & Klösgen 2001). Neuere Studien deuten außerdem auf die Beteiligung des Chaperons AKR2 (*Ankryn Repeat-Containing Protein2*) an der Insertion von Proteinen in die äußere Hüllmembran hin (Kim et al. 2015). Das einzig derzeit bekannte Protein der äußeren Hüllmembran mit einem N-terminalen Transitpeptid ist TOC75. Es wurde gezeigt, dass der Import von TOC75 nach der Passage des TOC abgebrochen wird und die Insertion in die Hüllmembran vom Intermembranraum aus stattfindet (Inoue & Keegstra 2003).

Im Gegensatz dazu weisen die Proteine der inneren Chloroplastenhüllmembran meist ein N-terminales Transitpeptid auf. Ihr Transport erfolgt durch TOC und TIC (Tripp et al. 2007). Die Insertion in die innere Hüllmembran kann allerdings auf zwei Wegen erfolgen. Einige Proteine werden vom Intermembranraum aus in die innere Hüllmembran inseriert. Dies erfordert, ähnlich wie bei TOC75, den Abbruch des Imports nach Passage des TOC. Ein Beispiel hierfür ist der Triosephosphat-Translocator von *Spinacia oleracea* (Brink et al. 1995). In den meisten Fällen erfolgt die Insertion in die innere Hüllmembran jedoch nach der vollständigen Passage von TOC und TIC vom Stroma aus. So z.B. im Fall von TIC40 in *A. thaliana* (Tripp et al. 2007). Über den Transport von pre-Proteinen in den Intermembranraum ist hingegen nur sehr wenig bekannt. Es wurde gezeigt, dass das Transitpeptid von TIC22 durch

eine im Intermembranraum lokalisierte Protease abgespalten wird (Kouranov et al. 1999; Vojta et al. 2007). Ob der Transport von TIC22 zuvor durch TOC erfolgt, ist allerdings umstritten. Daneben gibt es Hinweise, dass einige chloroplastidäre Glycoproteine durch das Endomembransystem in die Chloroplasten gelangen. In diesem Fall erfolgt der Transport zunächst co-translational ins ER (Endoplasmatisches Reticulum). Die Proteine werden im Golgi-Apparat glykosyliert und gelangen in Vesikeln in die Chloroplasten (Gaikwad et al. 1999; Chen et al. 2004).

In SCC4-Spezies hingegen ist bislang nur wenig über die Mechanismen des Proteintransportes bekannt. In *B. sinuspersici* wurden Homologe der TOC-Rezeptoren sowie von TOC75 identifiziert (Lung & Chuong 2012; Offermann et al. 2015). Lokalisationsstudien mit GFP-Fusionsproteinen deuten bislang darauf hin, dass die Rezeptoren TOC159, TOC132 und TOC34 sowohl in C-, als auch in P-Chloroplasten abundant sind (Lung & Chuong 2012). Auch durch bisherige proteomische Studien an isolierten C- und P-Chloroplasten, konnten keine differenziell abundanten Untereinheiten von TOC oder TIC identifiziert werden (Offermann et al. 2015). Allerdings konnte gezeigt werden, dass TOC159 in *B. sinuspersici* sowohl in der Chloroplastenhüllmembran, als auch im Zytoplasma lokalisiert ist und daher möglicherweise bereits im Zytoplasma mit pre-Proteinen interagiert. Des Weiteren wurde ermittelt, dass die Insertion von TOC159 in die Chloroplastenhüllmembran über eine C-terminale Erkennungssequenz erfolgt (Lung & Chuong 2012; Lung et al. 2014). Bislang ist allerdings unklar, ob diese Befunde im Zusammenhang mit dem differenziellen Proteintransport in C- und P-Chloroplasten stehen.

1.4 Bewegung und Positionierung von Chloroplasten

Die Bewegung von Chloroplasten wird in den meisten Fällen durch Licht ausgelöst. Es wird dabei zwischen zwei Arten von Bewegung unterschieden. Bei der Starklichtbewegung werden die Chloroplasten in entgegengesetzter Richtung zur Lichtquelle bewegt, um lichtbedingte Schäden zu vermeiden. Bei der Schwachlichtbewegung werden die Chloroplasten hingegen in Richtung der Lichtquelle bewegt, um die Photosynthese zu maximieren (Zurzycki et al. 1955). In beiden Fällen wird die Bewegung durch Photorezeptoren, wie z.B. Phototropine ausgelöst (Sakai et al. 2001; Briggs & Christie 2002). Phototropine sind durch blaues Licht aktivierbare Proteinkinasen, welche die Aktivität weiterer Proteine durch Phosphorylierung beeinflussen (Biggs & Christie 2002). Die Bewegung der Chloroplasten erfolgt letztlich durch das Zytoskelett. Es wurde ermittelt, dass sowohl Aktin, als auch Myosin daran beteiligt sind (Paves et al. 2007; Kadota et al. 2009). Welche Signale die Chloroplastenbewegung nach der

Photorezeption auslösen und welche Proteine daran beteiligt sind, ist jedoch noch weitestgehend unbekannt. Entsprechende Kandidatenproteine wurden u.a. durch Studien an *knock-out* Mutanten in *A. thaliana* identifiziert. Die zytoplasmatischen Proteine WEB1 (*weak chloroplast movement under blue light*) und PMI2 (*plastid movement impaired2*) sind an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt. Ihr *knock-out* führt zu verminderter Schwach- und Starklichtbewegung (Luesse et al. 2006; Kodama et al. 2010). Neuere Studien lassen vermuten, dass auch das Hüllmembranprotein OEP7 (*outer envelope protein7*) an der Chloroplastenbewegung beteiligt ist. Die Überexpression von *oep7* in *A. thaliana* führt zu veränderter Anordnung von Aktin-Strängen und beeinflusst die Expression anderer, in die Chloroplastenbewegung involvierter Gene. Des Weiteren wurde eine vermehrte Aggregation von Chloroplasten beobachtet (Wang et al. 2012). Das Hüllmembranprotein CHUP1 (*chloroplast unusual positioning1*) bewirkt hingegen die Verankerung von Chloroplasten an der Plasmamembran (Oikawa et al. 2008). Insgesamt verdeutlichen OEP7 und CHUP1, dass neben zytoplasmatischen, auch Proteine der Chloroplastenhüllmembran an Bewegung und Positionierung von Chloroplasten beteiligt sind.

In C4-Spezies sind die Mechanismen zur Bewegung und Positionierung von Chloroplasten ebenfalls noch weitestgehend unbekannt. In den MZ von Kranz-C4 Spezies sind die Chloroplasten entlang der gesamten Zellwand angeordnet und zeigen sowohl Schwach-, als auch Starklichtbewegung. Die Chloroplasten der BSZ hingegen sind entweder zentripetal (nahe des Leitgewebes) oder zentrifugal (nahe der MZ) angeordnet und zeigen keine lichtabhängige Bewegung (Dengler & Nelson 1999; Yamada et al. 2009). Dies impliziert, dass in MZ und BSZ unterschiedliche Mechanismen zur Positionierung aktiv sind. Bislang wurde jedoch lediglich gezeigt, dass die Bewegung der Chloroplasten in beiden Zelltypen vom Aktin-Myosin-System vermittelt wird (Kobayashi et al. 2009). Zudem wurde ermittelt, dass *chup1* in C4-Spezies höher exprimiert ist als in C3-Spezies. Dies könnte bedeuten, dass die feste Positionierung von Chloroplasten in den BSZ auf eine Verankerung durch CHUP1 zurück zu führen ist (Bräutigam et al. 2011).

In SCC4-Spezies werden Positionierung und Bewegung von Chloroplasten ebenfalls mit dem Zytoskelett in Verbindung gebracht. In *B. sinuspersici* wurde gezeigt, dass das CC von einem Netz aus Tubulin umgeben ist, während die P-Chloroplasten mit Aktin assoziiert sind (Chuong et al. 2006; Park et al. 2009). Des Weiteren wurde gezeigt, dass sowohl die Inhibition von Aktin, als auch von Tubulin zur Destabilisierung des Zentralkompartimentes führt. Weitere Studien ergaben, dass das Zentralkompartiment bei dauerhaft niedriger Lichtintensität Schwachlichtbewegung zeigt (Lara et al. 2008). Die P-Chloroplasten behalten ihre Position

unter diesen Bedingungen jedoch bei. Dies impliziert die Existenz eines derzeit unbekanntem Mechanismus zur selektiven Bewegung des CC in *B. sinuspersici*.

1.5 Identifizierung von C4-Genen durch RNA-Sequenzierung

C4-Photosynthese ermöglicht den effizienten Aufbau von Biomasse durch Vermeidung von Photorespiration sowie eine effizientere Nutzung von Wasser und Stickstoff gegenüber C3-Spezies (Schulze & Hall 1982; Oaks 1994). Es wird daher langfristig angestrebt, die biochemischen Eigenschaften von C4-Pflanzen auf C3-photosynthetische Nutzpflanzen zu übertragen (Matsuoka et al. 2001; Miyao et al. 2011). Dieses Vorhaben erfordert allerdings die Kenntnis sämtlicher in die C4-Photosynthese involvierter Gene. Während der phylogenetischen Entstehung der C4-Photosynthese wurde das Expressionsmuster vieler photosynthetischer Gene an die veränderten Anforderungen angepasst (Bräutigam et al. 2011). Dies ermöglicht die Identifizierung von C4-Genen durch den Vergleich ihrer Expression in C3- und C4-Spezies. Durch die komparative RNA-Sequenzierung ist ein umfassender Vergleich der Genexpression in C3- und C4-Spezies möglich. Auf diese Weise wurden bereits in früheren Studien potenzielle C4-Gene in Spezies der Gattungen *Flaveria* und *Cleome* identifiziert (Gowik et al. 2011; Bräutigam et al. 2011; Külahoglu et al. 2014). Eine weitere Strategie ist der Vergleich von C3- und C4-photosynthetischen Geweben bzw. Organen derselben Spezies. Der Vorteil dieser Strategie besteht darin, dass die Ergebnisse anhand einer einzigen Referenzdatenbank ausgewertet werden können. Auf diese Weise wurde z.B. die Genexpression in C3- und C4-photosynthetischen Blatttypen von *Zea mays* verglichen (Wang et al. 2013). Insgesamt haben diese Studien bestätigt, dass C4-Photosynthese mit umfassenden Veränderungen der Expression vieler photosynthetischer Gene verbunden ist. In besonderem Maße betrifft dies die Gene einiger, am C4-Zyklus beteiligter Proteine. Diese werden auch als Kern-C4 Gene bezeichnet. Es wurde gezeigt, dass besonders die Expression der Kern-C4 Gene *pepc*, *ppdk*, *nad-me*, *asp-at* und *ala-at* in C4-Spezies stark erhöht ist (Bräutigam et al. 2011). Darüber hinaus wurden Transkriptionsfaktoren wie *GLK1* (*golden-like2*) und *SCARECROW* als wichtige Regulatoren C4-typischer Genexpression identifiziert (Bräutigam et al. 2011; Wang et al. 2013).

Auch *B. sinuspersici* wurde in vergangenen Studien bereits mittels komparativer RNA-Sequenzierung untersucht. Durch die Analyse der Blattentwicklung sowie dem Vergleich mit nahe verwandten Spezies der Gattung *Suaeda*, konnten potenzielle SCC4-Gene in *B. sinuspersici* identifiziert werden (Dissertation R. Sharpe 2014). In einer weiteren Studie, wurden durch Analyse der Skotomorphogenese von Kotyledonen, Gene identifiziert, die

wahrscheinlich zur Entwicklung von CC und PC in *B. sinuspersici* beitragen. Darunter befanden sich Regulatoren des Zytoskeletts sowie Transkriptionsfaktoren (Dissertation L. Hagenau 2017).

1.6 Untersuchung von Chloroplastenhüllmembranen

Chloroplasten sind aus drei strukturellen Kompartimenten aufgebaut. Die Thylakoide bilden ein inneres Membransystem, welches vom Stroma umgeben ist. Das Innere der Chloroplasten wird durch eine doppelte Hüllmembran (innere und äußere Hüllmembran) vom umgebenden Zytoplasma abgegrenzt. Methoden zur Isolation der Chloroplastenhüllmembran wurden in früheren Studien an *P. sativum* und *S. oleracea* etabliert. Die Chloroplasten wurden dazu osmotisch lysiert und die Hüllmembran durch Zentrifugation in diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten von Stroma und Thylakoiden getrennt (Douce et al. 1973; Mendiola-Morgenthaler et al. 1974; Joyard et al. 1982). Durch Massenspektrometrie wurde ermittelt, dass die Chloroplastenhüllmembran Proteine enthält, die den Austausch von Metaboliten mit dem Zytoplasma sowie den Transport kerncodierter Proteine katalysieren (Ferro et al. 2002; Ferro et al. 2003). Des Weiteren sind Hüllmembranproteine an der Positionierung von Chloroplasten beteiligt (Oikawa et al. 2008; Wang et al. 2012).

In Kranz-C4 Spezies weisen die Chloroplastenhüllmembranen in MZ und BSZ eine unterschiedliche Proteinzusammensetzung auf. So sind z.B. Metabolittransporter für Pyruvat (BASS2) und Phosphoenolpyruvat (PPT) in den MZ höher abundant als in den BSZ (Majeran et al. 2008; Manandhar-Shrestha et al. 2013). Des Weiteren wurde gezeigt, dass BASS2 und PPT in der Chloroplastenhüllmembran von C4-Spezies höher abundant sind, als es in C3-Spezies der Fall ist (Bräutigam et al. 2008). Dies zeigt, dass die Hüllmembran der MZ an den Transport von Metaboliten des C4-Zyklus angepasst ist.

In SCC4-Spezies wurden bisher keine Studien an isolierten Chloroplastenhüllmembranen durchgeführt. Durch die Analyse von isolierten C- und P-Chloroplasten von *B. sinuspersici* konnten allerdings die Homologe einiger Hüllmembranproteine identifiziert werden. Es wurde gezeigt, dass BASS2 und PPT höher abundant in P- als in C-Chloroplasten sind (Offermann et al. 2011; Offermann et al. 2015). Die Hüllmembran der P-Chloroplasten ist demnach, ähnlich wie in MZ von Kranz-C4 Spezies, an den Transport von Metaboliten des C4-Zyklus angepasst. Durch die Analyse von C- und P-Chloroplasten durch Massenspektrometrie, konnten allerdings nur besonders hoch abundante Hüllmembranproteine quantifiziert werden (Offermann et al. 2015). Daher ist bislang unklar, ob Proteine die z.B. in

die Chloroplastenpositionierung oder den Proteintransport involviert sind, differenziell abundant in den Hüllmembranen von C- und P-Chloroplasten sind.

1.7 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, Faktoren zu identifizieren, die an der SCC4-Photosynthese in *B. sinuspersici* beteiligt sind. Von besonderem Interesse sind dabei Proteine, die am subzellulären Proteintransport in C- und P-Chloroplasten beteiligt sind. Des Weiteren wird die Identifizierung von Faktoren angestrebt, welche die selektive, lichtabhängige Bewegung des CC sowie die SCC4-spezifische Genexpression in den Chlorenchymzellen regulieren.

Um diese Ziele zu erreichen, werden in dieser Arbeit zwei verschiedene experimentelle Ansätze verfolgt. Einerseits wird ein Verfahren zur Isolation von Chlorenchym und Hydrenchym entwickelt und die Transkriptome der beiden Zelltypen durch RNA-Sequenzierung miteinander verglichen. Auf diese Weise wird zunächst untersucht, ob die Hydrenchymzellen ein C3-artiges Expressionsmuster photosynthetischer Gene aufweisen. Anschließend werden auf Basis der beiden Transkriptome Faktoren identifiziert, die potenziell an SCC4-spezifischen Prozessen beteiligt sind.

Andererseits wird ein Verfahren zur Isolation der Chloroplastenhüllmembranen von C- und P-Chloroplasten etabliert und deren Proteinzusammensetzung durch Massenspektrometrie verglichen. So werden differenziell abundante Hüllmembranproteine identifiziert, die potenziell am subzellulären Proteintransport in C- und P-Chloroplasten sowie an der Bewegung des CC beteiligt sind.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die für diese Arbeit verwendeten gebräuchlichen Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wiesen mindestens den Reinheitsgrad p.a. auf und wurden von den folgenden Herstellern bezogen: AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Bio-Rad (Hercules, USA), Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Metabion (Martinsried, Deutschland), PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland), Promega (Madison, USA), Qiagen (Venlo, Niederlande), Roche (Basel, Schweiz), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA).

2.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Komponente	Menge
Zellpuffer	MES/NaOH pH 5,8	5 mM
	CaCl ₂	10 mM
	Betain	Isoosmotisch
Verdaupuffer	MES pH 5.8	5 mM
	CaCl ₂	10 mM
	Betain	Isoosmotisch
	Cellulase Onozuka	1,6 % w/v
	Macerase	0,25 % w/v
PEG-Puffer	CaCl ₂	200 mM
	PEG4000	40 % w/v
	Zellpuffer	850 µl
W5-Puffer	MES/NaOH pH 5,8	5 mM
	NaCl	155 mM
	CaCl ₂	125 mM
	KCl	5 mM
	Glukose	166 mM
	Betain	Isoosmotisch
Lysispuffer	Tricin/KOH pH 7,6	50 mM
	EDTA	2 mM
	DTT	2 mM
Saccharose-Gradient	Tricin/KOH pH 7,6	25 mM
	EDTA	1 mM
	DTT	1 mM
	Saccharose	0,93 M/ 0,6 M/ 0,3 M
Percoll-Gradient	Hepes/KOH pH 7,6	20 mM
	Percoll	40 % v/v
	PEG6000	1,2 % w/v

Puffer/Lösung	Komponente	Menge
	Ficoll	0,4 % w/v
	Betain	Isoosmotisch
Laemmli-Puffer	Tris/HCl pH 6.8	62,5 mM
	SDS	2 % w/v
	Glycerol	10 % w/v
	Beta-Mercaptoethanol	5 % v/v
Laufpuffer	Tris/HCl	25 mM
	Glycin	200 mM
	SDS	0,1 % w/v
Transferpuffer	Tris/HCl	25 mM
	Glycin	200 mM
	Methanol	20 % v/v
TBST-Lösung	Tris/HCl pH 7,5	20 mM
	NaCl	500 mM
	Tween 20	0,05 % w/v
Block-Lösung	Tris/HCl pH 7,5	20 mM
	NaCl	500 mM
	Tween 20	0,05 % w/v
	Magermilchpulver	3 % w/v
Aktivierungspuffer	Tris/HCl pH 9,5	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	10 mM
NBT/BCIP-Lösung	Tris/HCl pH 9,5	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	10 mM
	NBT	0,033 % w/v
	BCIP	0,017 % w/v
Fixierlösung	Ethanol	15 % v/v
	Essigsäure	10 % v/v
Coomassie Färbelösung	Phosphorsäure	1,6 % v/v
	Ammoniumsulfat	600 mM
	Ethanol	20 % v/v
	Coomassie Brilliant Blue G250	0,08 % w/v
Hoaglandlösung	KNO ₃	3 mM
	Ca(NO ₃) ₂	2 mM
	NH ₄ H ₂ PO ₄	1 mM
	MgSO ₄	0,5 mM
	KCl	25 µM
	H ₂ BO ₃	12,5 µM
	ZnSO ₄	1 µM
	CuSO ₄	0,25 µM
	MoNa ₂ O ₄	0,25 µM
	C ₁₀ H ₁₆ FeN ₂ NaO ₈	5 µM
Trizol	Phenol (wassergesättigt)	38 % v/v
	Natriumacetat	100 mM
	Ammoniumthiocyanat	400 mM
	Guanidinthiocyanat	800 mM
	Glycerol	5 % v/v

2.3 Oligonukleotide (Primer)

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide

Klonierung	
Insert	Primersequenzen 5'-3'
BASS2	ATACCCGGGATGGCGTCTATGCCTAGATGT GGAAGTAGTTTCCTTAAAATCATCCTTGTCATCAGCAGG
FAX3	GGGACTAGTACCGGTTGCCTCCCCATC AAACCCGGGATGTCTCATGCTGTATTCAAG
OEP7	GGGACTAGTTGCTTTGTTGACATTCTCAGAAGC AAACCCGGGATGAGTGGAGGTAGCACCAC
TIC20	ATACCCGGGATGAT GTAAATGGATGCACTATG ATAACTAGTATCGTATGGAATTTGGATGTAAGCAGC
TIC22-IV TP	TTTACTAGTGGAGATAAGATTGCTGGCAAGTTTGCG AAACCCGGGATGGAATCTCCAAAAACCC
qPCR	
Gen	Primersequenzen 5'-3'
aktin	CAATTGAACACGGTATTGTGAGC GGTCATCTTCTCTGTTAGC
bass2	AAACGCTGTCTGCGGAATCCG CTGAGAGTGCAACATCCCTTTAG
fax2	TGTCAATTCTGCTGGAATCTCTG AAACAGGTGTTGGTCGAATGC
fax3	TCTGGACTTAGCCTACCGAG GCTAGAGCTTGTTCCTCAAGC
oep7	CTG CAG GAG CAA AAG AAG TCC CCTTAGAGTCGTTACTCTTCTTG
pepc	GCTTTAGGACATTGCAGCGGTATG GCTCCTTACGAACAACAGAGCGGTA
ppdk	CTGAGAGTGCAACATCCCTTTAG GATCTCAGAGCACCCCTGAAACACAAC
ps1(a)	TGGGGTATTGGTCATGGTCT CATGCCATGACGTTGTTAGG
rbcl	ATCTTGGCAGCATTTTCGAGT AAGTCCGTCGGTCCATACAG
tic214	TTCCAATCTCCTGAGTGGGC GAAGTCATAGATTGTGCCAAGG
tic22-IV	ATCAAGTCATCCTCTTTCCAGC GATAAGATTGCTGGCAAGTTTGC
toc159	TTCAATTCTTGCTCGTCAACCC CCACACCCTTTCATCTTTAG
yggf	AAAACCCCTTCATTTCCCTCG GCGAAGATTGCTGCGACTAG

2.4 Kits

Tabelle 3 : Übersicht über die verwendeten Reaktionskits

Verwendung	Name	Hersteller
Plasmidisolation	GeneJet Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific
Plasmidisolation	GeneJet Plasmid Midi Preparation Kit	Thermo Fisher Scientific
DNA-Aufreinigung	MSB Spin PCRapace	StraTech
DNA-Gelextraktion	QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
RNA-Aufreinigung	Rneasy MinElute Cleanup Kit	Qiagen
Dnase Verdau	RNase-free Dnase Set	Qiagen
DNA-Mutagenese	QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
Proteinquantifizierung	RC DC Protein Assay	Bio Rad

2.5 Enzyme

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Enzyme

Enzym	Hersteller
Dream Taq Polymerase	Thermo Fisher Scientific
Pfu Polymerase	Thermo Fisher Scientific
DNaseI	MBI Fermentas
MMLV-Reverse Transkriptase	Promega
Platinum SYBR Green qPCR Super Mix	Thermo Fisher Scientific
SpeI	Thermo Fisher Scientific
XmaI	Thermo Fisher Scientific
PstI	Thermo Fisher Scientific
XbaI	Thermo Fisher Scientific
T4 DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific
Cellulase Onozuka R-10	Duchefa
Macerozyme R-10	Duchefa

2.6 Antikörper

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Antikörper

Primäre Antikörper	Quelle
rabbit-anti-RBCL	Dr. Sascha Offermann (Offermann et al. 2011)
rabbit-anti-PPDK	Dr. Sascha Offermann (Offermann et al. 2011)
rabbit-anti-BASS2	Dr. Sascha Offermann (Offermann et al. 2011)
rabbit-anti-LHCb2	Agrisera Prod. Nr.: AS01003
Sekundäre Antikörper	Quelle
goat-anti-rabbit-Alkalische Phosphatase-Konjugat	Agrisera Prod. Nr.: AS09607

2.7 Pflanzenanzucht

B. sinuspersici Pflanzen wurden aus Samen in einer GroBank-Kammer (CLF Plant Cimatics, Deutschland) propagiert. Die Temperatur betrug 25 °C/20 °C Tag/Nacht. Die Keimung erfolgte für 24 Stunden im Dunkeln. Die weitere Anzucht erfolgte bei einer PAR (*Photosynthetic active radiation*) von 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und einer Photoperiode von 16h/8h Licht/Dunkel. Nach 14 Tagen wurden die Pflanzen in einer Klimakammer (Johnson Controls, USA) platziert. Die Temperatur betrug 30 °C/18 °C Tag/Nacht, die PAR 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, die relative Luftfeuchtigkeit 60 % und die Photoperiode 16h/8h Licht/Dunkel. Die Pflanzen wurden 2x wöchentlich mit 0,03 M NaCl und 0,001 % (v/v) Wuxal® topN Dünger (Manna, Deutschland) gewässert. Nach drei Monaten wurden die Pflanzen für die Experimente verwendet.

2.8 Anzucht von *B. sinuspersici* in Hydrokultur

Zur Entnahme von Wurzelmaterial wurden *B. sinuspersici* Samen auf feuchtem Sand ausgelegt. Die Keimung erfolgte für 24 Stunden im Dunkeln. Die weitere Anzucht erfolgte bei einer PAR von 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$ und einer Photoperiode von 16h/8h Licht/Dunkel. Nach 28 Tagen wurden die jungen Pflanzen hydroponisch in Hoagland-Lösung kultiviert. Die Kultivierung erfolgte im Gewächshaus (Juli). Nach 14 Tagen wurden die Wurzeln geerntet und sofort in flüssigem N₂ eingefroren. Die Ernte erfolgte in der Mittagszeit nach fünf Stunden Belichtung. Die Wurzeln wurden zu einem feinen Pulver zermahlen und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

2.9 Probenentnahme zur Untersuchung der Blattentwicklung

Zur Ermittlung der entwicklungsabhängigen Genexpression, wurden Blätter in drei verschiedenen Entwicklungsstadien (YL = *youngest leaf*; IL = *intermediate leaf*; ML = *mature leaf*) analysiert (Lara et al. 2008). In YL wiesen die Blätter eine Länge von 1-3 mm, eine blassgrüne Färbung und einen gedrungenen Umriss auf. In IL hatten die Blätter eine Länge von 4-6 mm und zeigten beginnende Längsstreckung. In ML waren die Blätter voll entwickelt und mindestens 15 mm lang. Die Blätter wurden in der Mittagszeit (nach fünf Stunden Belichtung) geerntet und sofort in flüssigen N₂ überführt. Anschließend wurde das Blattmaterial zu feinem Pulver zermahlen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.10 Bestimmung der Osmolalität des Blattmaterials

Es wurde ein Dampfdruckosmometer vom Typ Wescor VAPRO 5520 (Kreienbaum, Deutschland) verwendet. Das Blattmaterial wurde mit einem Mörser zerstoßen und anschließend 5 min bei 21.100 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:5 mit Wasser verdünnt und zur Messung der Osmolalität gemäß der Betriebsanleitung verwendet. Die Osmolalität aller isoosmotisch eingestellten Puffer wurden auf dieselbe Weise bestimmt.

2.11 Isolation von Chloroplasten und Zentralkompartimenten

Es wurde eine Routina 420R Zentrifuge mit Ausschwingrotor verwendet. Voll entwickelte Blätter von *B. sinuspersici* wurden geerntet und in einen Mörser überführt. Die Blätter wurden mit Zellpuffer bedeckt und die Chlorenchymzellen durch sanften Druck mit einem Pistill isoliert. Nachdem eine deutliche Grünfärbung des Puffers erreicht war, wurde die Zellsuspension durch ein Teesieb abgossen und die Blätter verworfen. Der Vorgang wurde wiederholt bis insgesamt 200 ml Zellsuspension vorlagen. Die Suspension wurde auf 50 ml Schraubröhren aufgeteilt und 2 min bei 50 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Sediment zunächst im Rücklauf, dann in 20 ml Zellpuffer resuspendiert. Der Waschvorgang wurde anschließend einmal wiederholt. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Sediment in insgesamt 14 ml Verdaupuffer aufgenommen. Die Suspension wurde auf acht 13 ml Rundboden-Röhrchen (Sarstedt) aufgeteilt und 60 min bei 35 °C im Wasserbad inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und die sedimentierten Zellen vorsichtig in 2,5 ml Zellpuffer aufgenommen. Die Suspension wurde 1 min bei 50 xg zentrifugiert, der Überstand dekantiert, und das Sediment vorsichtig in 1 ml Zellpuffer resuspendiert. Die Proben wurden 5 min auf Eis gekühlt. Ab diesem Arbeitsschritt wurde mit gekühlten Puffern und Geräten gearbeitet. Die sedimentierten Zellen wurden erneut resuspendiert und durch 5x auf- und abpipettieren lysiert. Dazu wurde eine 1000 µl Pipettenspitze mit zusätzlich aufgesetzter 200 µl Pipettenspitze verwendet. Die Hälfte der Proben wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert (später: Gesamt-Chloroplasten, TC) die verbliebenen Proben (später: Zentralkompartimente, CC) wurden mit je 2,5 ml Zellpuffer aufgefüllt und 1 min bei 50 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Dieser Waschvorgang wurde anschließend 1x wiederholt. Das Sediment wurde in 1 ml Zellpuffer aufgenommen und erneut wie bereits beschrieben lysiert. Anschließend wurde die Suspension wie bereits zuvor 2x gewaschen. Die Proben von Gesamt-Chloroplasten und Zentralkompartimenten wurden jeweils vereint und anschließend auf je zwei Percoll-Gradienten á 5 ml geschichtet. Die Gradienten wurden 5 min bei 2500 xg zentrifugiert

und der Überstand vollständig abgesaugt. Die Pellets wurden durch pipettieren in je 1 ml Lysispuffer aufgenommen, 10 min auf Eis inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.12 Subfraktionierung von Chloroplasten

Alle Arbeitsschritte wurden mit gekühlten Puffern und Geräten durchgeführt. Die Zentrifugen wurden auf 4 °C vorgekühlt. Die zuvor isolierten Chloroplasten, aus je zwei Isolationsvorgängen, wurden langsam auf Eis aufgetaut, vereint und durch 20 Stöße im Potter homogenisiert. Die Suspension wurde 1 min bei 50 xg zentrifugiert (Routina 420R Zentrifuge mit Ausschwingrotor) und das Sediment verworfen. Der Überstand wurde auf 6 ml mit Lysispuffer aufgefüllt. Es wurden vier Stufengradienten angefertigt (0,93 M; 0,6 M; 0,3 M Saccharose: je 3 ml). Die Gradienten wurden mit je 3 ml Chloroplastenlysat beladen und 60 min bei 24.000 rpm zentrifugiert (Beckmann L7-55 Ultrazentrifuge mit SW 40 Ti Rotor). Die Chloroplastenhüllmembranen fanden sich im Gradienten an der Grenzschicht zwischen 0,93 M und 0,6 M Saccharose und wurden mittels einer Glaspipette entnommen. Die Hüllmembranen wurden in einem Verhältnis von 1:7 mit Lysispuffer verdünnt und 60 min bei 30.000 rpm zentrifugiert (Beckmann L7-55 Ultrazentrifuge mit SW 40 Ti Rotor). Anschließend wurde der Überstand vollständig abgesaugt und das Sediment in 100 µl Lysispuffer resuspendiert. Die Stromafraktion wurde aus dem ehemaligen Ladevolumen des Gradienten, die Thylakoide aus dem Sediment des Gradienten, entnommen. Die Fraktionen wurden bei -80 °C gelagert.

2.13 Proteinfällung

Es wurden 1,5 ml von der Stromafraktion mit 6 ml Methanol und 1,5 ml Chlorform vermischt. Anschließend wurden 4,5 ml Wasser hinzugefügt. Das Gemisch wurde 5 min bei 21.000 xg (Routina 420R Zentrifuge mit Festwinkelrotor) zentrifugiert. Die obere Phase wurde bis etwa 0,5 cm über der Phasengrenze abgesaugt. Die verbliebene Phase wurde mit 4,5 ml Methanol vermischt. Das Gemisch wurde wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Sediment 5 min bei Raumtemperatur getrocknet.

2.14 Proteinextraktion

Die Extraktion der Proteine wurde nach Laemmli et al. (1970) durchgeführt. Die zu extrahierenden Proben wurden mit Laemmli-Puffer versetzt und 5 min bei 100 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Proben 5 min bei 21.100 xg zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen, der Überstand als Proteinprobe weiter verwendet.

2.15 SDS-PAGE und Western Blot

Disc-SDS-PAGE wurde nach dem Prinzip von Laemmli et al. (1970) durchgeführt. Dazu wurde eine Mini-PROTEAN Tetra Zelle (Bio Rad) mit entsprechendem Zubehör verwendet. Die Konzentration von Acrylamid in den Trenngelen betrug 10 bzw. 15 % (v/v).

Je 20 µg extrahiertes Protein wurde auf die Gele aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in Laufpuffer. Die aufgetrennten Proteinbanden wurden in Transferpuffer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurde eine Spannung von 100 V über 60 min angelegt. Die Membran wurde anschließend 30 min mit Block-Lösung, dann 60 min mit primärem Antikörper bedeckt. Nach dreimaligem spülen mit TBST wurde die Membran 60 min mit sekundärem Antikörper bedeckt, anschließend erneut dreimal mit TBST gespült und 1 min in Aktivierungspuffer inkubiert. Die Detektion des gebundenen, sekundären Antikörpers erfolgte durch Inkubation in NBT/BCIP-Lösung.

Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten PAGE-Gele

Komponente	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid 4K Lösung	5 % /v/v)	variabel
Tris-HCl pH 8,8	-	375 mM
Tris-HCl pH 6,8	127 mM	-
TEMED	0,05 % (v/v)	0,01 % (v/v)
APS	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)
SDS	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)

2.16 Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie

Je 50 µg extrahiertes Protein wurde mit Bromphenol-Blau (finale Konzentration 0,05 % w/v) als Lauffrontmarker versetzt. Die Proben wurden auf ein Disc-SDS-PAGE Gel (Trenngel 15 % (v/v) Acrylamid) geladen und an der Grenze von Sammelgel zu Trenngel in einer scharfen Bande fokussiert. Das Gel wurde anschließend 120 min in Fixierlösung inkubiert, zweimal für jeweils 5 min in Wasser gewaschen und die Proteine anschließend über Nacht in Coomassie Brilliant Blau G250 gefärbt (Neuhoff et al. 1985). Die fokussierten Proteinbanden wurden daraufhin ausgeschnitten und in Stücke von etwa 1 mm² Größe zerschnitten. Die Proben wurden 60 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend wurden die Proteine im Gel mittels Trypsin verdaut und die Peptide aus dem Gel extrahiert (Fromm et al. 2016).

2.17 Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen durch Massenspektrometrie

Die Analyse der Proteinproben wurde durch Tandem-Massenspektrometrie nach Fromm et al. (2016) durchgeführt. Dazu wurde ein Q-Exactive Massenspektrometer kombiniert mit einem Ultimate 3000 UHPLC Chromatographen (Thermo Fisher Scientific) verwendet.

Je 2-5 µl Proteinprobe wurden in die Vorsäule (Acclaim PepMap100, 2 cm, 5 µm, C18, 100 Å, Thermo Fisher Scientific) injiziert. Die Flussrate betrug 4 µl/min. Die Peptidtrennung erfolgte anschließend in der Hauptsäule (Acclaim PepMap100, 50 cm, 3 µm, C18, 100 Å, Thermo Fisher Scientific). Die Elution der Peptide erfolgte durch einen nicht-linearen Gradienten aus Acetonitril (5 % - 30 % (v/v)) in 0,1 % Ameisensäure über eine Dauer von 60 min bei 35 °C. Die Flussrate betrug 0,25 µl/min. Die Ionisierung der Peptide erfolgte in einer NSI Ionenquelle (Thermo Fisher Scientific) bei einer Sprühspannung von 2,2 kV und einer Kapillartemperatur von 275 °C. Für MS-Läufe wurden die folgenden Einstellungen verwendet: Auflösung: 70.000; AGC target: 10^6 ; Maximum IT: 400 ms. MS/MS Spektren wurden in einem TOP10 Duty Cycle aufgenommen. Es wurden die folgenden Einstellungen verwendet: Auflösung: 17.500; AGC target: 10^5 ; Maximum IT: 120 ms.

2.18 Separation von Hydrenchym und Chlorenchymprotoplasten

Hundert voll entwickelte Blätter von *B. sinuspersici* wurden geerntet und die Epidermis manuell entfernt. Dazu wurden die Blätter einzeln auf Aluminiumfolie platziert und unter leichtem Druck seitlich mit einem Zentrifugenröhrchen überrollt. Die abgelöste Epidermis wurde verworfen, die verbliebenen Blätter wurden sofort in Zellpuffer überführt. Anschließend wurde der Puffer durch ein Teesieb abgossen und die Blätter in 5 ml Verdaupuffer überführt. Die Blätter wurden daraufhin in einem 50 ml Schraubröhrchen (Sarstedt) 45 min bei 35 °C im Wasserbad inkubiert, 5x vorsichtig invertiert und weitere 15 min wie zuvor inkubiert. Der Überstand (enthält die Chlorenchymprotoplasten) wurde vorsichtig durch ein Teesieb abgossen und 1 min bei 50 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Sediment zunächst im Rücklauf und dann in 2,5 ml Zellpuffer resuspendiert. Die Suspension wurde 1 min bei 50 xg zentrifugiert, der Überstand vorsichtig dekantiert und das Sediment im Rücklauf resuspendiert. Das Hydrenchym wurde direkt im Teesieb mit 3x 10 ml Zellpuffer gespült und anschließend sofort in Zellpuffer überführt. Das Hydrenchym wurde daraufhin manuell inspiziert und auf eventuell verbliebene, mit bloßem Auge sichtbare, Chlorenchymreste untersucht. Falls vorhanden, wurden die betroffenen Blätter entfernt. Der

Puffer wurde durch ein Teesieb abgossen und der restliche Puffer von unterhalb des Siebes aus mit einem Papiertuch aufgesaugt. Hydrenchym und Chlorenchymprotoplasten wurden jeweils in flüssigem N₂ zu einem feinen Pulver gemörsert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.19 RNA Isolation

Die Isolation der RNA für qPCR und RNA-Sequenzierung erfolgte nach der Trizol/Chloroform Methode. Es wurde eine auf 4 °C vorgekühlte Tischzentrifuge verwendet. Es wurden je 100 mg in flüssigem N₂ gemörsertem Pflanzenmaterial verwendet. Für die RNA-Sequenzierung wurden von jeder Probe drei parallele Ansätze isoliert und am Ende vereinigt. Das Pflanzenmaterial wurde in je 1 ml Trizol aufgenommen und 15 min schüttelnd inkubiert (Vortex). Anschließend wurden 200 µl Chloroform zugegeben und 10 min wie zuvor inkubiert. Die Proben wurden 15 min bei 16.100 xg zentrifugiert. 400 µl der oberen Phase wurden abgenommen, mit 400 µl Chloroform versetzt und 10 min schüttelnd inkubiert (Vortex). Anschließend wurde erneut 15 min bei 16.100 xg zentrifugiert. 200 µl der oberen Phase wurden abgenommen und mit 400 µl eiskaltem Ethanol (99 % v/v) versetzt. Die Proben wurden durch invertieren vermischt und 30 min bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben 15 min bei 16.100 xg zentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Das Sediment wurde mit 200 µl eiskaltem Ethanol (70 % v/v) gewaschen und erneut für 10 min bei 16.100 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Sediment 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde die RNA in 20 µl Wasser gelöst. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt und die Integrität durch Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

2.20 RNA Sequenzierung

Es wurden jeweils 60 µl der isolierten RNA verwendet. Diese wurde mit DNase behandelt und anschließend aufgereinigt. Die jeweiligen Kits wurden nach Vorgabe des Herstellers verwendet. Je 2 µg RNA wurden für die Sequenzierung verwendet. Diese wurde von der Firma GATC Biotech mit einem Illumina HiSeq2000 durchgeführt. Zuvor wurden eine Aufreinigung von poly(A)⁺ RNA sowie cDNA-Synthese durchgeführt.

2.21 Reverse Transkription

Isolierte RNA wurde mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden 1-2 µg RNA verwendet. Zunächst wurde ein DNase-Verdau mit 1 U DNaseI für 30 min bei 37 °C durchgeführt. Die DNaseI wurde anschließend 15 min bei 70 °C inaktiviert. Nach Zugabe von 3,25 nM random-nonamer Primer wurde der Ansatz erneut 5 min bei 70 °C inkubiert. Die Synthese des cDNA-Erststranges erfolgte anschließend nach Zugabe von 200 U MMLV-Reverse Transkriptase und 20 nM dNTPs bei 37 °C für 60 min. Die Inaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgte bei 70 °C für 10 min.

2.22 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) diente in dieser Arbeit der Amplifikation von DNA-Sequenzen im Rahmen von Klonierungen. Die erforderlichen Oligonukleotide wurden von den Firmen Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) und Metabion (Martinsried, Deutschland) bezogen. Für die PCR wurde ein Labcycler 48 (SensoQuest) verwendet. Die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente wurde durch Agarose-Gelelektrophorese verifiziert. Die Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt.

Zur relativen Quantifizierung von DNA-Sequenzen wurde des Weiteren eine quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) in Anwesenheit des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green durchgeführt. Die Primer für die Quantifizierung von *rbcl* und *ps1(a)* wurden von Dr. Richard Sharpe zur Verfügung gestellt. Die Primer zur Quantifizierung von *pepc* und *ppdk* wurden aus früheren Studien übernommen (Lara et al. 2008). Die Auswahl der übrigen Primersequenzen erfolgte durch den Autor. Die verwendeten Primer wiesen eine Länge von 20-30 bp, eine Schmelztemperatur von 59-61 °C und einen GC-Gehalt von 45-55 % auf. Es wurde ein qPCR-Cycler vom Typ 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) verwendet. Zur Analyse der Ergebnisse wurde die 7300 System Software (Applied Biosystems) benutzt. Die relative Quantifizierung erfolgte anhand einer seriellen Verdünnungsreihe von *B. sinuspersici* cDNA. Zur Ermittlung der Spezifität wurde nach der Amplifikation die Schmelzkurve der Produkte zwischen 60 und 95 °C aufgenommen. Die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente wurde durch Agarose-Gelelektrophorese verifiziert.

Tabelle 7: PCR-Ansätze und -Programme

Amplifikation				
PCR-Ansatz			PCR-Program	
Pfu Polymerase	1 U		3 min	95 °C
Puffer	1X		30 sek	95 °C 40x
Primer	Je 0,5 µM		30 sek	Annealing
dNTPs	200 µM		1-3 min	72 °C
cDNA (Template)	1 µl		15 min	72 °C
Wasser	auf 50 µl			
qPCR				
PCR-Ansatz			PCR-Program	
Platinum SYBR Green qPCR Mix	10 µl		2 min	50 °C
Primer	Je 0,5 µM		2 min	95 °C
cDNA (Template)	1 µl		15 sek	95 °C 40x
Wasser	auf 20 µl		60 sek	60 °C

2.23 Klonierung von DNA-Fragmenten

Zur Expression von GFP-Fusionsproteinen in Protoplasten wurden die entsprechenden DNA-Sequenzen in einen 35S:pUC18-spGFP6 Expressionsvektor (Rosnow et al. 2014) kloniert. Die Klonierung erfolgte durch Restriktionsschnittstellen. Die Sequenzen wurden entweder mit dem 5'-Ende des GFP über XmaI/SpeI oder mit dem 3'-Ende des GFP mit XbaI/PstI fusioniert. Im Falle der Fusion mit dem 3'-Ende des GFP wurde dessen Stoppcodon durch Mutagenese entfernt. Die klonierten DNA-Sequenzen wurden mittels PCR aus cDNA amplifiziert oder synthetisch hergestellt (Eurofins Genomic GmbH, Deutschland). Alle Fragmente sowie der Vektor, wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten und mit T4-Ligase ligiert. Die Plasmide zur Expression von BASS2-GFP und TIC20-GFP wurden von Dr. Diana Wimmer zur Verfügung gestellt. Die Herstellung der übrigen Plasmide erfolgte durch den Autor.

Die Vermehrung der Plasmide erfolgte in *Escherichia coli* (Stamm: DH5-alpha) nach Hitzeshock-Transformation. Dazu wurde der Ligationsansatz mit chemisch kompetenten *Escherichia coli* vermischt, erst 45 s bei 42 °C, dann 2 min auf Eis inkubiert und mit 1 ml LB-Medium (Duchefa, Niederlande) versetzt. Anschließend wurde der Ansatz 60 min schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Die Selektion der transformierten Bakterien erfolgte auf LB-Medium (Duchefa, Niederlande) versetzt mit Carbenicillin (100 µg/ml). Die Kontrolle der Klonierung erfolgte über PCR und Sequenzierung (Metabion, Deutschland).

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Konstrukte

Insert	Herstellung	EST	Position 5'-3'	Position des GFP
BASS2	Amplifikation	UN000162	211-1503	C-Terminal
TIC20	Amplifikation	UN053561	1109-309	C-Terminal
OEP7	Amplifikation	UN000720	505-209	C-Terminal
FAX2	Synthese	UN045319	187-951	C-Terminal
FAX3	Amplifikation	UN052734	100-1212	C-Terminal
YGGT	Synthese	UN053947	93-782	C-Terminal
TOC159	Synthese	UN054529	2538-2897	N-Terminal
		UN034759	905-284	
TIC22	Synthese	UN018217	7-738	C-Terminal
		UN069423	419-297	
TIC22 (TP)	Amplifikation	UN018217	7-151	C-Terminal

2.24 Isolation und Transformation von Protoplasten

Protoplasten wurden aus jungen Blättern von *B. sinuspersici* isoliert (Wimmer et al. 2017). Für alle Zentrifugationsschritte wurde eine Routina 420R Zentrifuge mit Ausschwingrotor verwendet. Junge Blätter (3-5 mm) wurden durch einen Längsschnitt halbiert und in eine Petrischale (Ø: 35 mm) mit Verdaupuffer überführt. Die Oberfläche wurde mit einem passend zugeschnittenen Stück Klarsichtfolie abgedeckt. Die Blätter wurden daraufhin 180 min langsam schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Blattreste wurden im Anschluss mittels Filtration durch ein Nylonnetz (Maschenweite: 70 µm) entfernt. Das Filtrat wurde 5 min bei 300 xg zentrifugiert und der Überstand bis etwa 5 mm über dem Sediment entfernt. Das Pellet wurde vorsichtig im verbliebenen Puffer und dann in 5 ml ZIP resuspendiert. Anschließend wurde erneut wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde bis etwa 5 mm über dem Sediment entfernt. Das Sediment wurde vorsichtig resuspendiert und das finale Volumen auf 70 µl pro beabsichtigtem Transformationsansatz mit ZIP eingestellt. Für die Transformation wurden 33 µl ZIP vorgelegt, vorsichtig mit 10 µl isoliertem Plasmid (eingestellt auf 2,5 µg/µl) und anschließend mit 67 µl Protoplastensuspension überschichtet. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden, mit Hilfe einer abgeschnittenen 200 µl-Pipettenspitze, 110 µl PEG-Puffer zugegeben und 5x vorsichtig auf- und abpipettiert. Der Ansatz wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde vorsichtig 1 ml W5-Puffer zugegeben und der Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Auswertung erfolgte am nächsten Tag durch Fluoreszenzmikroskopie.

2.25 Fluoreszenzmikroskopie

Es wurde ein Eclipse Ti Fluoreszenzmikroskop (Nikon, Deutschland) mit einem Plan Apo, 40x/0,95 Objektiv (Nikon, Deutschland) verwendet. GFP-Fluoreszenz wurde bei 469/35 nm angeregt und bei 525/39 nm detektiert. Die Autofluoreszenz von Chlorophyll wurde bei 559/34 nm angeregt und bei 636/69 nm detektiert. Zur Verarbeitung der Bilder wurde ein NIS Element AR 4.40.00 (Nikon) verwendet.

2.26 Bioinformatische Methoden

2.26.1 Referenztranskriptom

Zur Auswertung der durch Massenspektrometrie und RNA-Sequenzierung ermittelten Daten wurde ein bereits vorhandenes Referenztranskriptom von *B. sinuspersici* (Offermann et al. 2015) verwendet. Zur Identifizierung von Sequenzhomologen wurde das Transkriptom durch BLASTX (Altschul et al. 1990) analysiert. Als Referenz dienten *A. thaliana* und Viridiplantae. Zur funktionellen Annotation des Referenztranskriptoms wurde das Online-tool Mercator (Lohse et al. 2014) verwendet. Mercator nutzt die Datenbanken SwissProt, InterPro, CDD und KOG um den Daten MapMan BIN-Kategorien (Thimm et al. 2004) zuzuordnen. Dabei wurde *A. thaliana* als Referenzorganismus genutzt. Da Mercator jedoch keine C4-Gene annotiert, wurden die in *B. sinuspersici* bekannten Gene des C4-Zyklus (Offermann et al. 2015) manuell annotiert. Zusätzlich wurden die Kern-C4 Gene *pepc*, *ppdk*, *nad-me*, *asp-at* und *ala-at* (Bräutigam et al. 2011) in einer separaten Kategorie zusammengefasst. (Annotation C4-Gene: PS.C4; Annotation Kern-C4-Gene: PS.C4.Kern-C4). Zusätzlich wurde die Annotation der Daten mit GO-Termini (Ashburner et al. 2000) vorgenommen. Dazu wurde die Software Blast2GO (Conesa et al. 2005) verwendet.

2.26.2 Analyse der RNA-Sequenzdaten

Prozessierung

Die Entfernung der Adaptersequenzen erfolgte mittels der Software RobiNA (Lohse et al. 2012; Bolger et al. 2014). Dazu wurden die folgenden Module verwendet: *adaptor clipper*, *leading trimmer*, *trailing trimmer*, *sliding window trimmer* und *read length filter* (Entfernung von *Reads* < 35 bp). Anschließend wurde die Qualität der Daten durch die Software FASTQC evaluiert (Babraham Bioinformatics). Dabei war das Ergebnis des Moduls „*Per Base Sequence Quality*“ entscheidend. Dieses Modul erstellt und analysiert einen Qualitätswert aller *Reads* eines Datensatzes.

Mapping und Normalisierung

Die Zuordnung der Sequenzdaten zum Referenztranskriptom (*mapping*) wurde durch CLC Genomics Workbench 9.5 (CLC bio, Aarhus, Dänemark) vorgenommen. Für alle Parameter wurden die Voreinstellungen verwendet. Die Anzahl der zugeordneten *Reads* pro EST wurde auf die Summe aller *Reads* der jeweiligen Probe normalisiert (*Reads per Kilobase*). Die auf diese Weise normalisierten Daten werden im Folgenden als NC (*normalized counts*) bezeichnet.

Bestimmung der Gesamtexpression von BIN-Kategorien

Zunächst wurden alle ESTs nach dem e-value der eingangs durchgeführten BLASTX-Analyse (Referenz: *A. thaliana*) gefiltert. ESTs mit einem e-value $> 1 \times 10^{-6}$ (Pearson et al. 2013) wurden von der Analyse ausgeschlossen. Des Weiteren wurden ESTs mit einer Expression von < 10 NC aufgrund des hohen Variationskoeffizienten ausgeschlossen. Zur Bestimmung der relativen Expression primärer BIN-Kategorien (z.B. PS) wurde der prozentuale Anteil der zugeordneten NC am annotierten Transkriptom bestimmt. Zur Bestimmung der relativen Expression untergeordneter BIN-Kategorien (z.B. Calvin Zyklus) wurde der prozentuale Anteil der zugeordneten NC an der jeweiligen primären BIN-Kategorie bestimmt. Auf diese Weise sollte die Charakterisierung der Expression der untergeordneten Kategorien unabhängig von der Expression der primären Kategorie möglich sein. Die Ergebnisse wurden anschließend logarithmiert und das Signifikanzniveau der Expressionsunterschiede durch einen t-Test bestimmt.

Differenzielle Genexpression

Zur Bestimmung der differentiellen Genexpression in Chlorenchym, Hydrenchym und Wurzeln wurde die DGE-Funktion der CLC Genomics Workbench verwendet. Es wurde der *Fold Change* von Chlorenchym zu Hydrenchym (FC C/H) und der *Fold Change* von Chlorenchym zu Wurzeln (FC C/R) ermittelt. Dabei wurden die Rohdaten (*Reads* vor der Normalisierung) verwendet. Für alle Parameter wurden die Voreinstellungen verwendet. Zusätzlich wurde eine FDR-Korrektur durchgeführt. ESTs wurden als differentiell exprimiert klassifiziert, wenn die FDR $< 0,01$ lag.

Identifizierung von SCC4-Genen

Tabelle 9: Filterkriterien zur Identifizierung von SCC4-Genen

Parameter	Grenzwert
E-value (BLASTX)	$< 1 \times 10^{-6}$
NC in Chlorenchym	> 10
FDR der DGE	< 0.01
FC C/H	> 55
FC C/W	> 80

2.26.3 Analyse von MS-Daten

Prozessierung der Rohdaten durch MaxQuant

Die Proteinidentifizierung und -quantifizierung wurde mit Hilfe des MaxQuant Software-Pakets (Version 1.5.5.1; Cox & Mann 2008) vorgenommen. MaxQuant wurde weitestgehend mit Standard-Parametern verwendet. Lediglich unter dem Menüpunkt „*Group specific parameters/label-free quantification*“ wurde die Einstellung „LFQ“ (*label-free quantification*) vorgenommen. Die Identifizierung der Peptide erfolgte durch MS/MS-Spektren anhand eines *B. sinuspersici* Referenztranskriptoms (Offermann et al. 2015). Dazu wurde die integrierte Suchmaschine Andromeda verwendet. Für die relative Quantifizierung von Proteinen wurden LFQ-Intensitäten aus den MS-Daten bestimmt. MaxQuant setzt hierzu die MS-Peaks der detektierten Peptide über die Retentionszeit zu dreidimensionalen Peaks zusammen. Dadurch ist eine exakte Quantifizierung möglich. Zusätzlich können niedrig abundante Peptide, auch ohne Identifikation durch MS/MS, durch Abgleich der Retentionszeiten zwischen verschiedenen Läufen identifiziert und für die Quantifizierung berücksichtigt werden.

Statistische Evaluierung und Auswertung der MS-Daten

Die weitere Analyse der durch MaxQuant generierten LFQ-Daten wurde mit Hilfe der Software Perseus (Version 1.5.5.3; Tyanova et al. 2016) vorgenommen. Zunächst wurden Proteine aus den Datensätzen entfernt, deren Identifikation nur anhand von post-translationaler Modifikation („*Only identified by site*“) oder in reverser Orientierung („*Reverse*“) erfolgte. Zusätzlich wurden typische Kontaminationen erkannt und entfernt („*Potential contaminant*“). Des Weiteren wurden Proteine entfernt, die in weniger als drei Replikaten eines Probenotyps identifiziert wurden. Die LFQ-Intensitäten der verbliebenen Proteine wurden logarithmisch transformiert. Differenziell abundante Proteine wurden durch statistische Tests ermittelt.

Zur Ermittlung differenziell in Thylakoiden (THY), Stroma (STR) und Hüllmembranen (HÜL) abundanter Proteine wurde ein Zweistichproben t-Test mit FDR-Korrektur angewendet. Es wurden folgende Kombinationen getestet: THY/STR; HÜL/THY; HÜL/STR. Proteine, die eine FDR von $< 0,1$ aufwiesen oder nur in einem der jeweils getesteten Probentypen identifiziert worden sind, wurden als differenziell abundant klassifiziert. Basierend auf diesen Daten wurden die identifizierten Proteine vier Gruppen zugeordnet:

- 1) <HÜL: Angereichert in HÜL gegenüber THY und STR
- 2) <STR: Angereichert in STR gegenüber THY und HÜL
- 3) <THY: Angereichert in THY gegenüber STR und HÜL
- 4) Unspez.: keine signifikante Anreicherung zwischen mindestens zwei Probentypen.

Zusätzlich wurden die Daten durch eine Varianzanalyse (ANOVA) untersucht. Proteine, die dabei eine FDR von $> 0,1$ aufwiesen wurden aus der Gruppierung entfernt. Die Identifizierung von Hüllmembranproteinen erfolgte nach den folgenden Kriterien: Anreicherung in HÜL gegenüber THY und STR; Annotation mit entsprechenden GO-Termini (*chloroplast envelope*; *chloroplast inner Membrane*; *chloroplast outer membrane*). Zusätzlich wurden die Daten manuell nach bekannten Chloroplastenhüllmembranproteinen durchsucht.

Zur Ermittlung differenziell in TC- und CC-Hüllmembranen abundanter Proteine wurde ein Zweistichproben t-Test mit FDR-Korrektur angewendet. Proteine, die eine FDR von $< 0,1$ aufwiesen oder nur in einem der Probentypen identifiziert worden sind, wurden als differenziell abundant klassifiziert. Die Ermittlung der subzellulären Lokalisation, der differenziell abundanten Proteine, erfolgte manuell durch Datenbankensuche, mittels NCBI sowie manueller Literaturrecherche.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden Faktoren identifiziert, die potenziell an der SCC4-Photosynthese von *B. sinuspersici* beteiligt sind. Dazu wurde die Transkriptome von SCC4- und potenziellen C3-Geweben durch RNA-Sequenzierung verglichen. Des Weiteren wurde die Proteinzusammensetzung der Chloroplastenhüllmembranen von C- und P-Chloroplasten durch Massenspektrometrie untersucht. Im Anschluss erfolgte die Analyse der Expression der Kandidaten, während der Blattentwicklung. Abschließend wurde der subzelluläre Transport einiger Kandidaten anhand von GFP-Fusionsproteinen untersucht.

3.1 Vergleichende Transkriptomik von Chlorenchym, Hydrenchym und Wurzeln

Die Chlorenchymzellen von *B. sinuspersici* betreiben SCC4-Photosynthese durch die Ausbildung zweier intrazellulärer Kompartimente, die jeweils einen physiologisch spezialisierten Chloroplastentyp enthalten. Derzeit ist jedoch wenig darüber bekannt, welche Gene bzw. Proteine daran beteiligt sind.

Bisherige Studien an *B. cycloptera* und *S. aralocaspica* haben gezeigt, dass die Chlorenchymzellen aller Pflanzenteile SCC4-Photosynthese betreiben (Boyd et al. 2007). Die Zellen des Hydrenchyms von SCC4-Spezies enthalten ebenfalls Chloroplasten (Voznesenskaya et al. 2002; Voznesenskaya et al. 2003). Jedoch wurden hier weder die typische SCC4-Kompartimentierung, noch das Vorkommen spezialisierter Chloroplastentypen beobachtet. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die Hydrenchymzellen SCC4-Photosynthese betreiben. Dies zeigt, dass neben dem SCC4-photosynthetischem Chlorenchym auch potenzielle C3-photosynthetische Gewebe in SCC4-Spezies vorkommen. Ein Vergleich der Transkriptome dieser Gewebstypen ermöglicht es theoretisch, SCC4-spezifische Faktoren zu identifizieren.

3.1.1 Isolation von Chlorenchym und Hydrenchym

Da zu Beginn dieser Arbeit nicht auf ein bestehendes Protokoll zurückgegriffen werden konnte, wurde ein Verfahren zur Trennung der Blattgewebe von *B. sinuspersici* entwickelt (siehe 2.18). Die wesentlichen Schritte dieses Verfahrens sind in Abbildung 4 dargestellt. Von *B. sinuspersici* Blättern (A) wurde die Epidermis manuell entfernt. Die daraufhin freiliegenden Chlorenchymzellen (B) wurden im Anschluss durch enzymatischen Verdau entfernt und als Protoplasten aus dem Verdaupuffer aufgereinigt (D). Die Entfernung der Chlorenchymzellen ermöglichte die Analyse der darunter liegenden Hydrenchymzellen sowie des Vaskulärsystems durch Licht- und Fluoreszenzmikroskopie (C, E, F). Die Hydrenchymzellen (E) weisen einen

Durchmesser von etwa 50 μm auf. Sie enthalten grüne Organellen, bei denen es sich wahrscheinlich um Chloroplasten handelt. Die Hydrenchymzellen zeigen jedoch nicht die typische SCC4-Morphologie der Chlorenchymzellen (vgl. D und E). Es besteht keine intrazelluläre Aufteilung in CC und PC. Stattdessen sind die Chloroplasten der Hydrenchymzellen einzeln entlang der Zellwände angeordnet. Des Weiteren zeigen die Chloroplasten des Hydrenchyms nach Anregung durch grünes Licht Autofluoreszenz (F). Die Zellen des Vaskulärsystems enthalten ebenfalls Chloroplasten und zeigen starke Autofluoreszenz. Auch hier besteht jedoch keine intrazelluläre Aufteilung in CC und PC.

In dieser Arbeit wurde ein Verfahren zur Trennung der Blattgewebe von *B. sinuspersici* entwickelt. Dadurch konnte bestätigt werden, dass die Zellen des Hydrenchyms Chloroplasten enthalten. Die Autofluoreszenz der Chloroplasten deutet auf das Vorkommen von Chlorophyll und damit auf die Fähigkeit zur Photosynthese hin. Die fehlende intrazelluläre Aufteilung in CC und PC weist allerdings darauf hin, dass die Hydrenchymzellen keine SCC4- sondern möglicherweise C3-Photosynthese betreiben. Zudem wurde gezeigt, dass auch die Zellen des Vaskulärsystems Chloroplasten enthalten. Wie im Hydrenchym, besteht auch hier keine intrazelluläre Kompartimentierung in CC und PC. Auch die Zellen des Vaskulärsystems betreiben daher wahrscheinlich keine SCC4-Photosynthese.

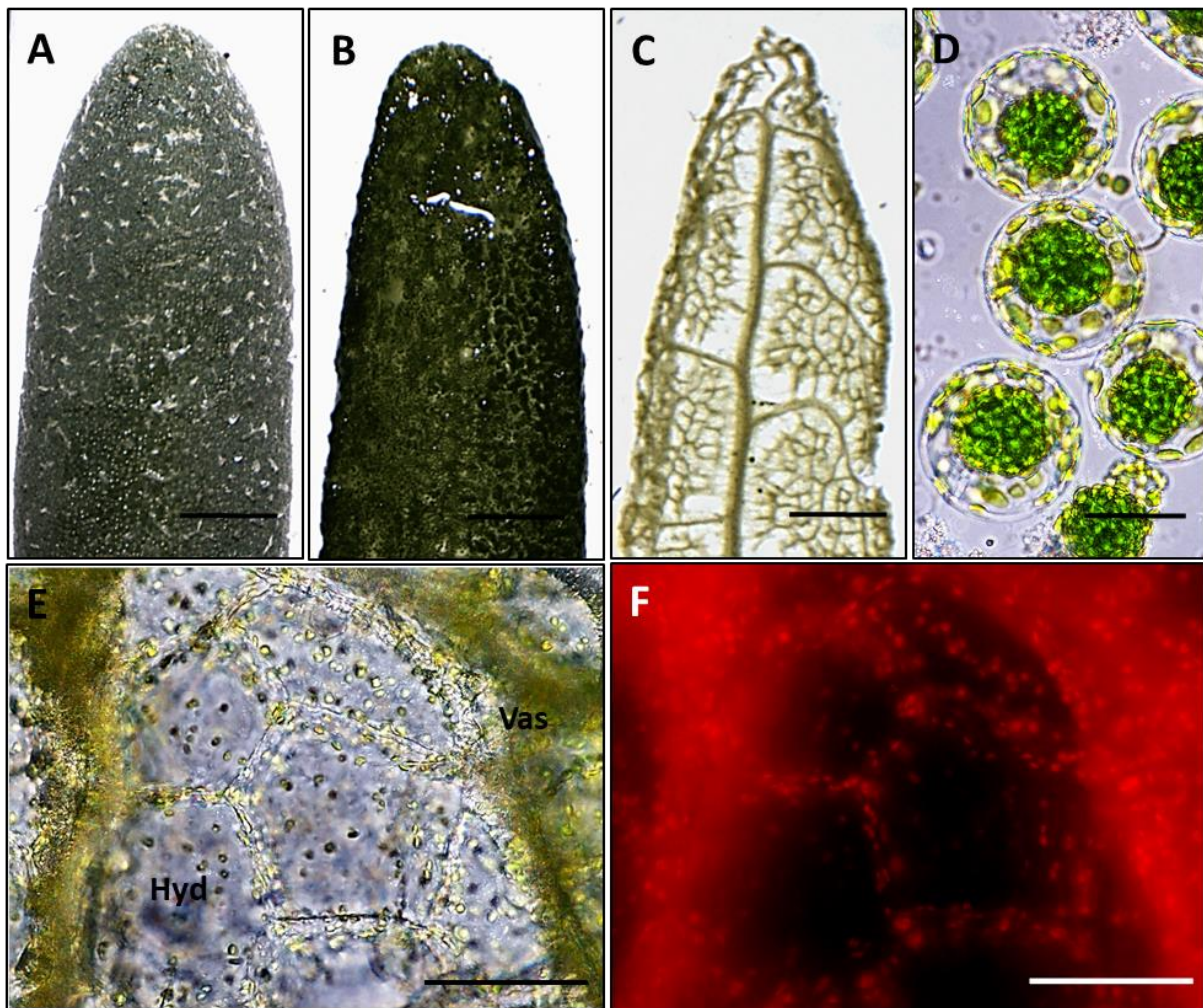


Abbildung 4: Isolation von Chlorenchym und Hydrenchym

(A) Blatt zum Zeitpunkt der Ernte (B) Blatt nach Entfernung der Epidermis (C) Hydrenchym und Vaskulärsystem (D) Isolierte Chlorenchymprotoplasten (E) Lichtmikroskopische Aufnahme von Hydrenchym (Hyd) und dem Vaskulärsystem (Vas) (F) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Hydrenchym und Vaskulärsystem (Anregung: 559 nm; Detektion 639 nm). Maßstäbe: A-C: 1 mm; D-F: 50 μ m.

3.1.2 Sequenzierung der Transkriptome von Chlorenchym, Hydrenchym und Wurzeln

Zur Identifizierung potenzieller SCC4-Faktoren wurden Chlorenchym und Hydrenchym durch RNA-Sequenzierung analysiert (siehe 2.20). Anders als das SCC4-photosynthetische Chlorenchym, betreiben die Hydrenchymzellen wahrscheinlich C3-Photosynthese (siehe 3.1.1). Das dies wahrscheinlich auch auf das Vaskulärsystem zutrifft, wurde das Hydrenchym gemeinsam mit diesem analysiert. Zur Vereinfachung wird die Mischung der beiden Gewebe im Folgenden als Hydrenchym bezeichnet. Zusätzlich wurde RNA aus *B. sinuspersici* Wurzeln sequenziert. Da Wurzeln als heterotrophes Gewebe keine Photosynthese betreiben, dienten sie als Negativkontrolle. So sollte ermöglicht werden, nicht-photosynthetische Gene von der Kandidatenliste auszuschließen.

Die Transkriptome von Chlorenchym, Hydrenchym und Wurzeln wurden mittels RNA-Sequenzierung untersucht. Die Sequenzierung ergab 47.202.754 Reads (Chlorenchym), 54.418.672 Reads (Hydrenchym) und 58.869.159 Reads (Wurzeln) (jeweils Mittelwerte aus $n = 4$). Die Reads wurden mittels CLC Genomic Workbench einem *B. sinuspersici* Referenztranskriptom (Offermann et al. 2015) zugeordnet (*Mapping*). Durchschnittlich konnten 92,9 % (Chlorenchym), 59,1 % (Hydrenchym) und 74,6 % (Wurzeln) der Reads zugeordnet werden. Insgesamt wurden die Reads 70.652 ESTs des Referenztranskriptoms zugeordnet. Die ermittelten Reads pro EST wurden anschließend auf die Summe der Reads pro analysierter Probe normalisiert (Normalized Counts; NC).

Im Anschluss wurde der Datensatz durch eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) analysiert. Durch eine PCA werden die Daten in sogenannte Hauptkomponenten zerlegt. Damit wird die Verteilung der Varianz des Datensatzes ersichtlich. Hauptkomponente 1 repräsentiert dabei den höchsten Anteil und Hauptkomponente 2 den zweithöchsten Anteil der Varianz des Datensatzes. Abbildung 5 zeigt, dass die Probenotypen Chlorenchym, Hydrenchym und Wurzeln nach der Hauptkomponente 1 aufgetrennt wurden. Diese repräsentiert in diesem Fall 57 % der Varianz. Die Replikate der drei Probenotypen wurden nach der Hauptkomponente 2 aufgetrennt. Diese repräsentiert 21 % der Varianz des Datensatzes. Die Replikate liegen auf dem gezeigten Diagramm jeweils dicht beieinander. Lediglich ein Replikat der Wurzeln zeigt leicht erhöhte Varianz zu den übrigen Replikaten. Dies zeigt, dass keines der Replikate als „Ausreißer“ zu werten ist. Somit können alle Proben in der folgenden Analyse berücksichtigt werden.

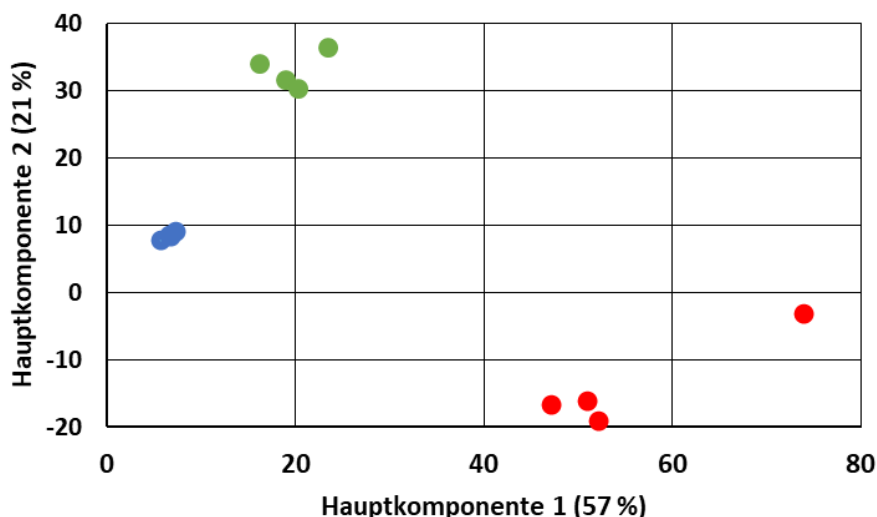


Abbildung 5: Hauptkomponentenanalyse von Transkriptomdaten aus Chlorenchym, Hydrenchym und Wurzeln

Durch RNA-Sequenzierung ermittelte Expressionsdaten wurden mittels CLC Genomic Workbench analysiert ($n = 4$). Der gezeigte Score-Plot umfasst die Probenotypen: Chlorenchym (grün); Hydrenchym (blau) und Wurzeln (rot).

3.1.3 Ausschluss von ESTs bei niedriger Expression

Im Folgenden wurde untersucht, ob die niedrige Expression von ESTs zu einer erhöhten Standardabweichung führt. Dadurch sollte ein Grenzwert ermittelt werden, der den Ausschluss von ESTs mit hoher Standardabweichung ermöglicht. Dazu wurde der Variationskoeffizient (CV) bestimmt. Der CV zeigt die Standardabweichung relativ zur Expressionsstärke (NC) an. Auf diese Weise kann die Standardabweichung auch bei stark unterschiedlicher Expressionsstärke verglichen werden. Da bei SCC4-relevanten Genen tendenziell von einer niedrigen Expression in Hydrenchym und Wurzeln auszugehen ist, wurde der CV anhand der Transkriptomdaten des Chlorenchyms bestimmt.

Abbildung 6 zeigt einen abnehmenden CV mit steigender Expressionsstärke (NC). Ab einer Expressionsstärke von 10 NC wurde ein gleichbleibend niedriger CV von weniger als 30 % ermittelt. Bei einer Expression unter 10 NC hingegen war ein höherer CV von bis zu 120 % zu verzeichnen. Der Grenzwert der Expressionsstärke wurde daher auf 10 NC festgelegt. ESTs mit einer niedrigeren Expression wurden von den nachfolgenden Analysen ausgeschlossen.

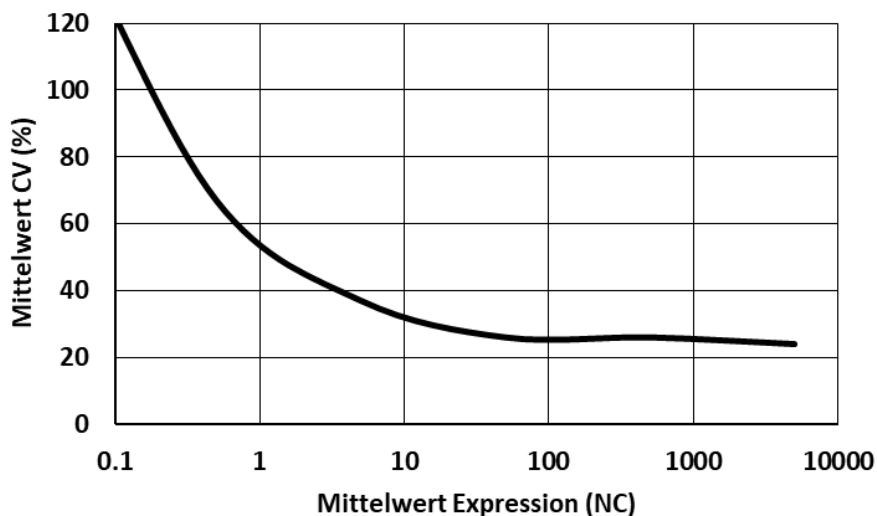


Abbildung 6: Relation von Variationskoeffizient und Expressionsstärke im Chlorenchymtranskriptom

Auf der x-Achse sind die Mittelwerte der Expression im Chlorenchymtranskriptom als normalisierte Counts (NC) dargestellt. Auf der y-Achse ist der Variationskoeffizient (CV) dargestellt. Der CV zeigt die Standardabweichung relativ zu NC an ($n = 4$).

3.1.4 Charakterisierung der photosynthetischen Genexpression im Hydrenchym

Anhand der Transkriptomdaten wurde die Expression photosynthetischer Gene im Hydrenchym untersucht. Um photosynthetische Gene zu identifizieren, wurden die Daten zuvor annotiert. Dazu wurden die identifizierten ESTs, unter Verwendung der Software Mercator, funktionellen BIN-Kategorien zugeordnet (siehe 2.26.1). Anschließend wurde untersucht, ob es sich beim Hydrenchym um ein photosynthetisches Gewebe handelt. Dazu wurde die Expression der BIN-Kategorien Photosynthese, Glykolyse, Atmungskette und Citratzyklus in Hydrenchym und Wurzeln verglichen. Die Expression der BIN-Kategorie Photosynthese war im Hydrenchym etwa 4-fach höher als in den Wurzeln. Die BIN-Kategorien Glykolyse, Atmungskette und Citratzyklus hingegen, waren in den Wurzeln signifikant höher exprimiert, als im Hydrenchym. Hier betrug der Unterschied 1,3-fach bis 1,5-fach.

Da es sich bei den Wurzeln um ein heterotrophes Organ handelt, deutet die höhere Expression der BIN-Kategorie Photosynthese im Hydrenchym darauf hin, dass dieses ein photosynthetisch aktives Gewebe ist. Des Weiteren weisen die Ergebnisse darauf hin, dass respiratorische Stoffwechselwege wie Glykolyse, Atmungskette und Citratzyklus in den Wurzeln aktiver sind als im Hydrenchym.

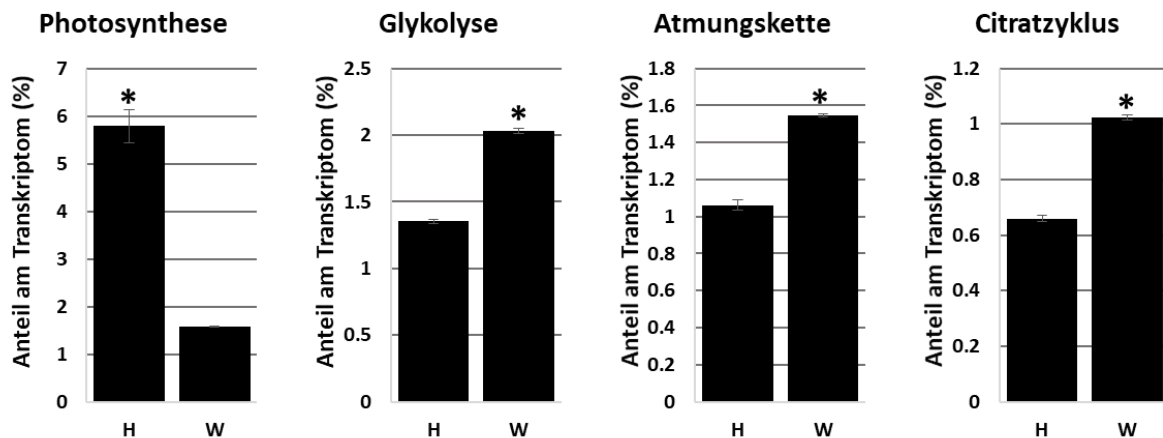


Abbildung 7: Expression photosynthetischer und respiratorischer Gene in Hydrenchym und Wurzel

Aus *B. sinuspersici* Hydrenchym (H) und Wurzeln (W) isolierte RNA wurde durch RNA-Sequenzierung analysiert (n = 4). Die Daten wurden funktionell annotiert. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der Kategorien Photosynthese, Atmungskette und Citratzyklus, am gesamten Transkriptom. (*) Symbolisiert signifikante Unterschiede (t-Test, p < 0,05).

C4-Pflanzen zeichnen sich durch die höhere Expression von C4-Genen und niedrigerer Expression von photorespiratorischen Genen, gegenüber C3-Pflanzen aus. Besonders die Kern-C4 Gene *pepC*, *ppdk*, *nad-me*, *asp-at* und *ala-at* weisen dabei starke Expressionsunterschiede auf (Bräutigam et al. 2011). Es wurde untersucht, ob ein derartiges Expressionsmuster auch in Chlorenchym und Hydrenchym von *B. sinuspersici* auftritt. Daher wurde die Expression der primären BIN-Kategorie Photosynthese, sowie der untergeordneten sekundären Kategorien in Chlorenchym und Hydrenchym analysiert (Abbildung 8).

Die Expression der BIN-Kategorie Photosynthese lag im Chlorenchym bei 40 % und war somit signifikant höher, als im Hydrenchym (5,8 %). Aufgrund dieses hohen Unterschieds war es nötig, die Expression der sekundären Kategorien auf die Expression der primären BIN-Kategorie Photosynthese zu normalisieren. Auf diese Weise konnte der individuelle Anteil der sekundären BIN-Kategorien, unabhängig von der absoluten Expression, verglichen werden. Die normalisierte Expression in den Kategorien C4 und Kern-C4 war im Chlorenchym signifikant höher als im Hydrenchym. C4-Gene waren im Chlorenchym 1,8-fach höher und Kern-C4 Gene 5-fach höher, als im Hydrenchym, exprimiert. Die Kategorie Photorespiration war hingegen im Hydrenchym 2-fach höher exprimiert, als im Chlorenchym. Des Weiteren wurde eine höhere Expression der Kategorien PSI (PhotosystemI) im Chlorenchym und PSII (PhotosystemII) im Hydrenchym festgestellt. In den Kategorien Lichtreaktion und CBB-Zyklus konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen Hydrenchym und Chlorenchym festgestellt werden.

Es wurde gezeigt, dass sich die Expression photosynthetischer Gene in Chlorenchym und Hydrenchym z.T. unterscheidet. Besonders die höhere Expression der BIN-Kategorie Photorespiration sowie die niedrigere Expression von C4-Genen, deuten auf C3-Photosynthese im Hydrenchym hin.

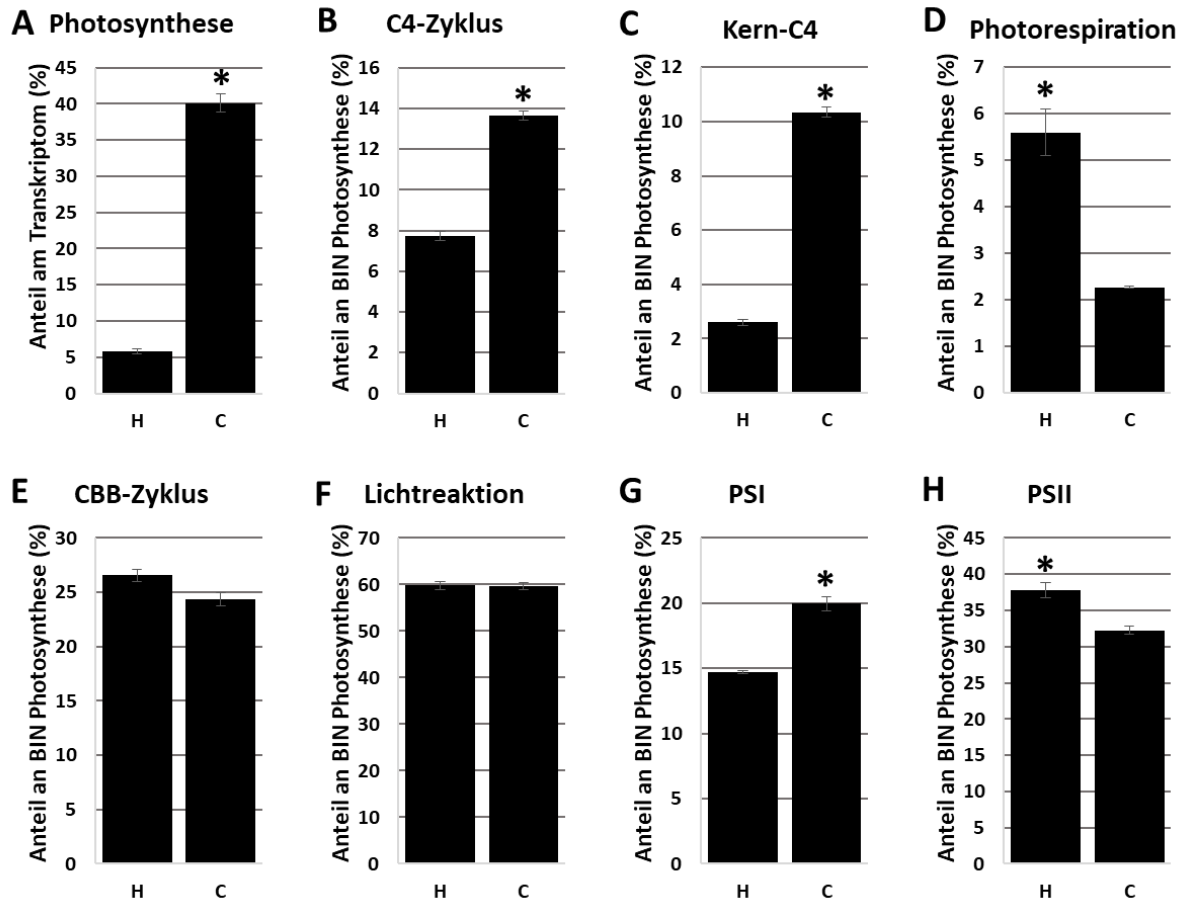


Abbildung 8: Expression photosynthetischer Gene in Hydrenchym und Chlorenchym

Aus *B. sinuspersici* Hydrenchym (H) und Chlorenchym (C) isolierte RNA wurde durch RNA-Sequenzierung analysiert (n = 4). Die Daten wurden funktionell annotiert. Gezeigt ist der prozentuale Anteil von BIN-Kategorien im Mittelwert mit Standardfehler. (*) Symbolisiert signifikante Unterschiede (t-Test, $p < 0,05$). **A:** Anteil der Kategorie Photosynthese am gesamten Transkriptom. **B-H:** Anteile der den Unterkategorien C4-Zyklus, Kern-C4, Photorespiration, CBB-Zyklus, Lichtreaktion, PSI und PSII zugeordneten Gene, an der primären Kategorie Photosynthese.

3.2 Identifizierung von SCC4-Genen durch vergleichende Transkriptomik

Die wahrscheinlich am SCC4-Zyklus beteiligten Proteine in *B. sinuspersici* wurden durch proteomische Studien identifiziert (Offermann et al. 2015). Bisher ist allerdings wenig darüber bekannt, welche Gene bzw. Proteine darüber hinaus an der SCC4-Photosynthese beteiligt sind. Die Transkriptome von Chlorenchym, Hydrenchym und Wurzeln wurden im Folgenden genutzt, um derartige Gene zu identifizieren. Zuvor wurde ermittelt, welche Filterkriterien sich zur Identifizierung von SCC4-Genen eignen.

3.2.1 Ermittlung der Filterkriterien zu Identifizierung von SCC4-Genen

Die Expression der identifizierten ESTs in Chlorenchym, Hydrenchym und Wurzeln wurde durch den *Fold Change* (FC) verglichen. Dazu wurde der FC von Chlorenchym zu Hydrenchym (FC C/H) bzw. Chlorenchym zu Wurzeln (FC C/W) bestimmt (siehe 2.26.2). In Spezies der Gattung *Cleome*, zeigen die Kern-C4 Gene (*pepc*, *ppdk*, *nad-me*, *asp-at* und *ala-at*) einen höheren FC zwischen C4- und C3-Spezies, als es z.B. bei Genen des CBB-Zyklus der Fall ist (Bräutigam et al. 2011). Dies ermöglicht theoretisch die Identifizierung unbekannter C4-Gene durch den Vergleich ihres FC zwischen C4- und C3-Spezies oder Geweben.

Im Folgenden wurde der Grenzwert zur Identifizierung von SCC4-Genen, anhand des FC C/H bestimmt. Tabelle 10 zeigt den FC C/H der bisher in *B. sinuspersici* identifizierten SCC4-Gene sowie der Gene des CBB-Zyklus. Diese Gene wurden bereits in früheren Studien identifiziert (Offermann et al. 2015). Die Kern-C4 Gene *pepc*, *ppdk*, *ala-at* und *nad-me* wiesen mit 55-376 den höchsten FC C/H auf. Der FC C/H der übrigen C4-Gene lag allerdings mit 2-45 niedriger. Besonders einige Gene, die für mitochondriale C4-Proteine codieren (*MDH*, *DTC1* und *DTC2*), zeigten kaum Expressionsunterscheide zwischen Chlorenchym und Hydrenchym. Der FC C/H der Gene des CBB-Zyklus war allgemein niedriger, als bei den Kern-C4 Genen. Er lag mit 2-44 im selben Bereich wie der FC C/H der übrigen C4-Gene. Somit ist es auf der Basis dieser Daten nicht möglich, zwischen allen C4-Genen und am CBB-Zyklus beteiligten Genen zu differenzieren. Dies ist nur bei den Kern-C4 Genen möglich. Daher wurde der FC C/H der Kern-C4 Gene als Referenz für die Expression unbekannter SCC4-Faktoren gewählt. Der im Folgenden verwendete Grenzwert für FC C/H lag demnach bei 55.

Tabelle 10: Expression von Genen des C4- und CBB-Zyklus in Chlorenchym und Hydrenchym

Aus *B. sinuspersici* Chlorenchym und Hydrenchym isolierte RNA wurde durch RNA-Sequenzierung analysiert (n = 4). Der *Fold Change* (FC C/H) und die FDR (*False Discovery Rate*) wurden mittels CLC Genomic Workbench bestimmt. Gezeigt sind die in Offermann et al. (2015) identifizierten Kandidaten für den C4-Zyklus sowie den CBB-Zyklus.

EST Nr.	Gen	FC C/H	FDR
C4-Zyklus			
UN000469	Phosphoenolpyruvate Carboxylase	376.10	0.00
UN054841	Pyruvat Phosphate di-Kinase	145.67	0.00
UN054462	NAD Malic Enzyme	64.13	0.00
UN045745	Alanine Aminotransferase	55.46	0.00
UN000162	Pyruvate/Sodium Symporter	45.65	0.00
UN049970	Adenylate mono-Kinase	44.66	0.00
UN043600	Carbonic Anhydrase1	21.21	0.00
UN054486	Carbonic Anhydrase2	24.14	0.00
UN051674	Cytoplasmic Aspartate Aminotransferase	20.10	0.00
UN047053	PPDK-Regulatory Protein	19.45	0.00
UN052298	Mitochondrial Aspartate Aminotransferase	17.02	0.00
UN055167	Pyrophosphatase	13.20	0.00
UN028577	Phosphoenolpyruvate Transporter	13.09	0.00
UN045771	Mitochondrial Di/Tricarboxylate Carrier2	2.98	0.00
UN055057	Mitochondrial Di/Tricarboxylate Carrier1	2.88	0.00
UN050102	Mitochondrial Malate Dehydrogenase	2.65	0.00
CBB-Zyklus			
UN054971	Fructose-Bisphosphate Aldolase	44.33	0.00
UN052093	RuBisCO small subunit	34.87	0.00
UN000045	Sedoheptulose-1,7-Bisphosphatase	31.84	0.00
UN054144	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	28.79	0.00
UN055677	Phosphoribonuklease	21.62	0.00
UN054553	Ribose-5-Phosphate-Isomerase	19.55	0.00
UN036009	Transketolase	15.37	0.00
UN000227	Phosphoglycerate Kinase	15.05	0.00
UN050396	Phosphoglycolate Phosphatase	8.82	0.00
UN028367	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	7.59	0.00
UN000100	Starch Synthase	6.98	0.00
UN043569	Triosephosphate Translocator	5.09	0.00
UN000395	Triosephosphate Isomerase	2.48	0.00
UN046377	Ribulose-Phosphate-3-Epimerase	2.30	0.02

Zusätzlich wurde der FC C/W genutzt, um nicht-photosynthetische Gene von der Kandidatenliste ausschließen zu können. Dazu musste jedoch zunächst ein geeigneter unterer Grenzwert von FC C/W ermittelt werden. Es wurden verschiedene Grenzwerte getestet (Abbildung 9). Dabei wurden die ESTs unter dem Grenzwert jeweils ausgeschlossen. Für jeden getesteten Grenzwert wurde dann ermittelt, wie hoch der Anteil von ESTs der BIN-Kategorie Photosynthese an den verbliebenen ESTs ist.

Insgesamt war eine Anreicherung von ESTs der BIN-Kategorie Photosynthese mit steigendem Grenzwert von FC C/W zu beobachten. Der maximale Anteil betrug 45 % und wurde bei einem Grenzwert von 500 erreicht. Allerdings war der steilste Anstieg bis zu einem Grenzwert von 80 zu beobachten. Hier lag der Anteil von ESTs der Kategorie Photosynthese bei etwa 30 %. Bei Grenzwerten über 80 war nur noch ein leicht ansteigender Anteil photosynthetischer ESTs zu beobachten. Um Kandidaten auszuschließen, die nicht an der Photosynthese beteiligt sind, wurde folglich für FC C/W ein Grenzwert von 80 verwendet.

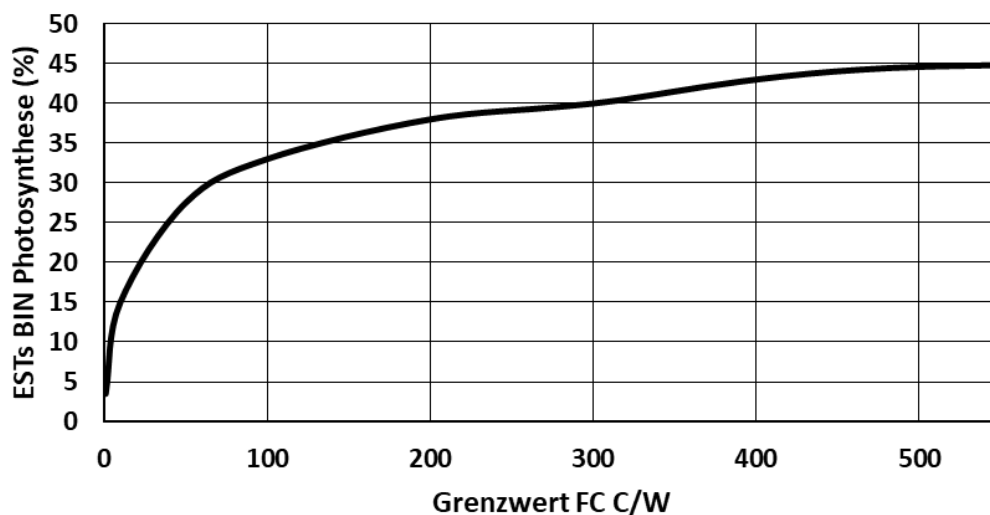


Abbildung 9: Anteil photosynthetischer ESTs abhängig vom Grenzwert FC C/W

Aus *B. sinuspersici* Chlorenchym und Wurzeln isolierte RNA wurde durch RNA Sequenzierung analysiert (n = 4). Die Daten wurden funktionell annotiert. Der *Fold Change* (FC C/W) wurde mittels CLC Genomic Workbench bestimmt. Gezeigt ist der relative Anteil von ESTs der BIN-Kategorie Photosynthese in Abhängigkeit des verwendeten unteren Grenzwertes für FC C/W.

3.2.2 Identifizierung potenzieller SCC4-Gene

Die Transkriptomdaten wurden nach den in 3.2.1 ermittelten Kriterien gefiltert. 119 ESTs entsprachen den Filterkriterien. Diese ESTs konnten 77 Gen-Loci von *A. thaliana* zugeordnet werden. Eine vollständige Auflistung aller identifizierten ESTs sowie der Gen-Loci befindet sich im Anhang (siehe Tabelle 18). In *A. thaliana* sind 41 der Kandidaten in den Chloroplasten, 4 in den Mitochondrien, 3 im Zytoplasma und ein Kandidat in den Peroxisomen lokalisiert. Weitere Kandidaten sind im Zellkern (5), in der Plasmamembran (3) und in der Zellwand (2) lokalisiert. Ein Kandidat ist ein extrazellulär lokalisiertes Protein. 14 der Kandidaten sind potenziell in mehreren Kompartimenten lokalisiert und für drei der Kandidaten ist derzeit keine Lokalisation bekannt (Tabelle 11).

Unter den ermittelten Kandidaten befanden sich die Kern-C4 Gene *pepc*, *ppdk*, *ala-at* und *nad-me*. *Pepc* war mit drei Isoformen (*pepc* 1-3) in der Liste vertreten. Weitere Kandidatengene codieren für Proteine der Lichtreaktion. Darunter Untereinheiten von Photosystem I (*psa-e2* und *psa-d1*), Photosystem II (*psb-p* und *psb-q*) sowie LHC-Untereinheiten A5, A6 und B1 und Untereinheiten der NADPH-Dehydrogenase (*NDH18*, *NDF1*, *NDF2*, *NDF4* und *NDF6*). Neben photosynthetischen Genen, umfasst die Kandidatenliste Gene, die in anderen Pflanzenarten regulative Funktionen erfüllen. Beispiele hierfür sind Transkriptionsfaktoren. Diese können u.a. die zell- bzw. gewebsspezifische Genexpression regulieren (Wang et al. 2017). Die Kandidatenliste umfasst die Transkriptionsfaktoren *gnc*, *constans* und *glk1*. Weitere Kandidaten, mit wahrscheinlich regulativer Funktion, sind die Vertreter der FKBP-Familie *rof1* und *rof2*. Es handelt sich dabei um Co-Chaperone, die in anderen Pflanzenarten an Faltung und Transport von Proteinen beteiligt sind (Prasad et al. 2010). Bei fünf identifizierten Kandidaten handelt es sich um Gene mit bislang unbekannter Funktion.

Diese Ergebnisse zeigen neue Kandidaten auf, die potenziell eine Rolle in der SCC4-Photosynthese spielen. Darunter befinden sich Gene, die für Untereinheiten von PSI, PSII, LHCA/B sowie der NADPH-Dehydrogenase codieren. Dies deutet darauf hin, dass die Proteinkomplexe der Lichtreaktion in Chlorenchym und Hydrenchym möglicherweise unterschiedlich aufgebaut sind. Die identifizierten Transkriptionsfaktoren regulieren möglicherweise die Expression anderer SCC4-Gene in den Chlorenchymzellen. Des Weiteren könnten die identifizierten Co-Chaperone am Proteintransport in C- und P-Chloroplasten beteiligt sein.

Tabelle 11: Kandidatenliste potenzieller SCC4-Gene

Aus *B. sinuspersici* Chlorenchym, Hydrenchym und Wurzeln isolierte RNA wurde durch RNA-Sequenzierung analysiert (n = 4). Die Expression der ESTs wurde auf die gesamt-Reads je Probe normalisiert (*Normalized Counts*, NC). Expression Chlorenchym = NC CHL; Expression Hydrenchym = NC HYD; Expression Wurzel = NC WUZ. Der *Fold Change* der identifizierten ESTs wurde mittels CLC Genomic Workbench bestimmt (Chlorenchym zu Hydrenchym = FC C/H; Chlorenchym zu Wurzeln = FC C/W). Die Daten wurden nach den folgenden Kriterien gefiltert: FC C/H > 55; FC C/W > 80. Die Lokalisation der Genprodukte wurde durch Suche in der Datenbank TAIR ermittelt. C = Chloroplast; ZYT= Zytoplasma; ZK = Zellkern; PL = Plasmamembran; Ex = Extrazellulär; ZW = Zellwand; PE = Peroxisomen; U = Unbekannt.

Gen	Lok	FC C/H	FC C/W	NC CHL	NC HYD	NC WUZ
ABC transporter family protein	Pl	155	441	18.63	0.26	0.09
ALAAT1 Alanine aminotransferase 1	C, M	55	81	3554.37	141.24	96.17
ALAAT2 Alanine aminotransferase 2	M	226	339	84.40	0.78	0.54
Aldolase	C, Cy	205	97	377.67	4.04	8.01
Aldolase	C, Cy	206	105	377.67	4.04	8.01
APL1 ADP glucose pyrophosphorylase large subunit 1	C	676	9268	242.89	0.83	0.03
ATAPR2_5'adenylylphosphosulfate reductase 2	C	72	173	19.84	0.58	0.26
CBL-interacting protein kinase 21	Cy, N	76	1039	30.16	0.90	0.07
Chaperone DnaJ-domain superfamily protein	C	131	19396	405.58	6.89	0.05
Chaperonin family protein	C, Cy	293	128	44.81	0.33	0.79
CRR6 chlororespiratory reduction 6	C	62	199	61.08	2.21	0.72
CRR7 chlororespiratory reduction 7	C	88	2306	83.80	2.09	0.09
Fatty Acid desaturase	C	90	85	25.16	0.63	0.68
FKBP13 FK506-binding protein 13	C	9097	9097	15.59	0.00	0.00
FKBP16-2 FK506-binding protein 42782	C	287	5143	457.51	2.53	0.26
FKBP-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	C	79	911	264.26	7.43	0.65
Fructose-bisphosphate aldolase 1	C	64	171	19.52	0.73	0.27
GER3 germin 3	Ce	818	320	796.41	2.13	5.14
HCEF1 high cyclic electron flow 1	C	100	854	864.91	18.99	1.94
Hydrolase family protein	M	260	114	79.86	0.67	0.66
Hydrolase family protein	M	266	6882	79.86	0.67	0.66
Iron Sulfur cluster protein	C, M	77	138	20.75	0.62	0.35
Jasmonic Acid Carboxyl Methyltransferase	Cy, N	147	90	133.69	1.99	3.30
LHCA5 photosystem I light harvesting complex gene 5	C	92	12799	104.31	3.08	0.03
LHCA6 photosystem I light harvesting complex gene 6	C	999	7777	701.98	1.56	0.18
LHCB1 photosystem II light harvesting complex gene 3	C	66	1059	4852.35	157.33	9.76
MDH malate dehydrogenase	C, M	105	500	138.20	2.89	1.15
MES11 Methyl esterase 11	C	208	3179	152.65	1.71	0.14
MLO1 Seven transmembrane MLO family protein	Pl	204	253	89.78	0.98	0.80
NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	U	905	4427	224.27	3.48	1.98
NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein	C	61	167	27.85	1.03	0.37
NAD-dependent epimerase/dehydratase	U	163	133	18.68	0.23	0.29
NAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase	C	75	294	75.92	2.24	0.58
NAD-dependent malic enzyme 2	C, M	68	138	193.25	6.12	2.71
NCED9 nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 9	C	400	1075	90.93	0.52	0.18
NDF1 NDH-dependent cyclic electron flow 1	C	4638	16000	777.09	9.55	1.66
NDF2 NDH-dependent cyclic electron flow 2	C	121	2930	625.01	12.72	0.58
NDF4 NDH-dependent cyclic electron flow 4	C	199	28974	346.43	3.81	0.05

Gen	Lok	FC C/H	FC C/W	NC CHL	NC HYD	NC WUZ
NDF6 NDH-dependent cyclic electron flow 6	C	60	2275	1289.90	47.69	1.24
NDH18 NAD(P)H dehydrogenase 18	C	91	478	732.12	17.79	3.32
OPR3 oxophytodienoate-reductase 3	Pe	73	2394	29.34	0.88	0.02
Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase	C	100	271	265.94	5.93	2.17
Oxidoreductases, acting on NAD(P)H or quinone	C	82	24027	113.35	3.61	0.04
Pectin lyase-like superfamily protein	Ce	755	484	69.33	0.19	0.31
PGLP1 2-phosphoglycolate phosphatase 1	C	564	8026	14.17	0.05	0.00
Phosphoenolpyruvate carboxylase 1	Cy	2602	4058	15007.93	88.22	27.29
Phosphoenolpyruvate carboxylase 2	Cy	1890	107785	15286.98	80.31	17.92
Phosphoenolpyruvate carboxylase 3	Cy	803	34961	435.01	1.22	0.03
Phosphoglucomutase, putative	C	406	203	70.90	0.37	0.78
Phytoene Synthase	C	80	83	23.32	0.65	0.64
PORA protochlorophyllide oxidoreductase A	C	125	5714	305.31	5.19	0.10
PPDK pyruvate orthophosphate dikinase	C	126	2945	16581.44	282.50	13.37
PSAD-1 photosystem I subunit D-1	C	115	2906	897.58	17.57	0.70
PSAE-2 Photosystem I subunit E-2	C	131	579	1001.29	13.81	3.11
PSBP-2 Photosystem II subunit P-2-like	C	121	25363	560.48	11.08	0.12
PSBQ-1 Photosystem II subunit Q-1-like	C	130	597	153.24	2.62	0.59
PSBQ-2 Photosystem II subunit Q-2-like	C	233	12128	370.67	3.57	0.08
ROF1 FKBP62 rotamase	Cy, N	1066	24897	110.89	0.22	0.01
ROF2 FKBP65 isomerase	N	2556	27800	49.36	0.04	0.00
SGAT alanine:glyoxylate aminotransferase	C	176	19171	955.38	12.24	0.17
SGNH hydrolase-type esterase superfamily protein	Ex	149	1671	64.20	0.95	0.10
Structural constituent of ribosome	C	89	424	72.39	1.77	0.37
SWEET14 Nodulin MtN3 family protein	PI	94	817	38.14	0.93	0.10
Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	Cy, N	67	103	15.78	0.51	0.35
Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	M	364	626	46.00	0.27	0.17
Transcription factor Constans zinc finger type	N	144	66245	118.66	1.82	0.00
Transcription factor GATA zinc finger type (GNC)	N	805	11650	23.40	0.08	0.01
Transcription factor GLK1	N	508	889	50.17	0.21	0.12
UDP-glucosyl transferase	N	149	149	170.70	1.45	0.95
UGT85A2 UDP-glucosyl transferase 85A2	N, C, M	373	1357	170.70	1.45	0.95
Undecaprenyl pyrophosphate synthetase	C, Cy	203	3267	48.79	0.53	0.03
Unknown protein	C	60	108	85.21	2.20	0.47
Unknown protein	C	68	424	46.55	1.54	0.27
Unknown protein	C	186	620	73.81	0.89	0.27
Unknown protein	C, M	100	1019	410.34	8.92	0.80
Unknown protein	C	97	2080	85.21	2.20	0.47
Unknown protein	U	1304	7084	318.51	2.23	0.90

3.3 Proteomik der Chloroplastenhüllmembranen von C- und P-Chloroplasten

In der vorliegenden Arbeit wurde die Proteinzusammensetzung der Hüllmembranen von C- und P-Chloroplasten durch Massenspektrometrie untersucht. Das Ziel lag darin, in den beiden Chloroplastentypen differenziell abundante Proteine zu identifizieren, die potenziell in den Proteintransport und die Chloroplastenbewegung involviert sind. Da zu Beginn dieser Arbeit nicht auf ein bestehendes Protokoll zurückgegriffen werden konnte, wurde ein Verfahren zur Isolation von Chloroplastenhüllmembranen aus *B. sinuspersici*, durch Subfraktionierung der Chloroplasten, entwickelt. Mit Hilfe dieses Verfahrens wurden die Hüllmembranen von getrennten C- und P-Chloroplasten isoliert. Die Proteinzusammensetzung der isolierten Hüllmembranen wurde durch Massenspektrometrie untersucht.

3.3.1 Subfraktionierung von Chloroplasten

B. sinuspersici Chloroplasten (Gemisch aus C- und P-Chloroplasten) wurden osmotisch lysiert und durch Ultrazentrifugation, in einem dreistufigen diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten, subfraktioniert (siehe 2.12). Das Ziel lag darin, eine möglichst hohe Anreicherung der chloroplastidären Subfraktionen (Thylakoide, Stroma und Hüllmembran) zu erzielen.

Nach der Zentrifugation war das ehemalige Ladevolumen im oberen Bereich des Gradienten klar. Am Boden des Röhrchens befand sich ein dunkelgrünes Sediment und an der Grenzschicht 0,6 M zu 0,93 M Saccharose wurde eine hellgrüne Bande sichtbar (Abbildung 10A). In bisherigen Studien zur Subfraktionierung von Chloroplasten konnte gezeigt werden, dass im Ladevolumen die Bestandteile des Stromas, im Sediment die Thylakoide und an der Grenzschicht 0,6 M zu 0,93 M Saccharose die Hüllmembranen enthalten sind (Douce et al. 1973; Joyard et al. 1982). Diese Auftrennung wurde folglich auch in dieser Arbeit erwartet. Die Fraktionen wurden aus dem Gradienten entnommen, die darin enthaltenen Proteine isoliert und jeweils, mittels SDS-PAGE sowie Western-Blot, untersucht (siehe 2.15). Als Kontrolle wurden die Proteine unfraktionierter Chloroplasten verwendet (Abbildung 10B). Zunächst wurden die aufgetrennten Proteine durch Ponceau S gefärbt. Anschließend wurden Markerproteine für Thylakoide, Stroma und Hüllmembran durch Antikörper detektiert und somit ihre relative Abundanz in den Fraktionen ermittelt. Es wurden das im Stroma lokalisierte Protein RBCL (*ribulose-1,5-bisphosphat carboxylase/oxygenase large subunit*), das Hüllmembranprotein BASS2 (*pyruvate/sodium symporter2*) sowie das in den Thylakoiden lokalisierte Protein LHCb2 (*light harvesting complex B2 subunit*) detektiert. Das, nach der Färbung durch Ponceau S, erkennbare Bandenmuster zeigte z.T. drastische Unterschiede zwischen den drei Fraktionen. Besonders das Muster der Stromafraktion unterschied sich deutlich von der

Thylakoid- und Hüllmembranfraktion. Auch die Detektion der Markerproteine zeigte z.T. deutliche Unterschiede zwischen den drei Fraktionen. RBCL zeigte in der Stromafraktion ein deutlich stärkeres Signal als in unfraktionierten Chloroplasten. In der Thylakoid- und Hüllmembranfraktion war RBCL jedoch kaum detektierbar. BASS2 wurde ausschließlich in der Hüllmembranfraktion detektiert. LHCB2 zeigte in der Thylakoidfraktion ein stärkeres Signal als in unfraktionierten Chloroplasten. Es wurde jedoch auch in der Hüllmembranfraktion detektiert. Hier war das Signal jedoch schwächer als in der Thylakoidfraktion.

Die starke Abreicherung von RBCL in der Thylakoid- und Hüllmembranfraktion deutet auf eine effiziente Trennung des Stromas von den beiden Membranfraktionen hin. Die Detektion von BASS2 in der Hüllmembranfraktion deutet auf eine Anreicherung der Hüllmembranen hin. Wohingegen die Präsenz von LHCB2 zeigt, dass die Hüllmembranfraktion auch Thylakoidproteine enthält. Dies deutet darauf hin, dass die Thylakoiden möglicherweise nicht vollständig von den Hüllmembranen getrennt werden konnten.

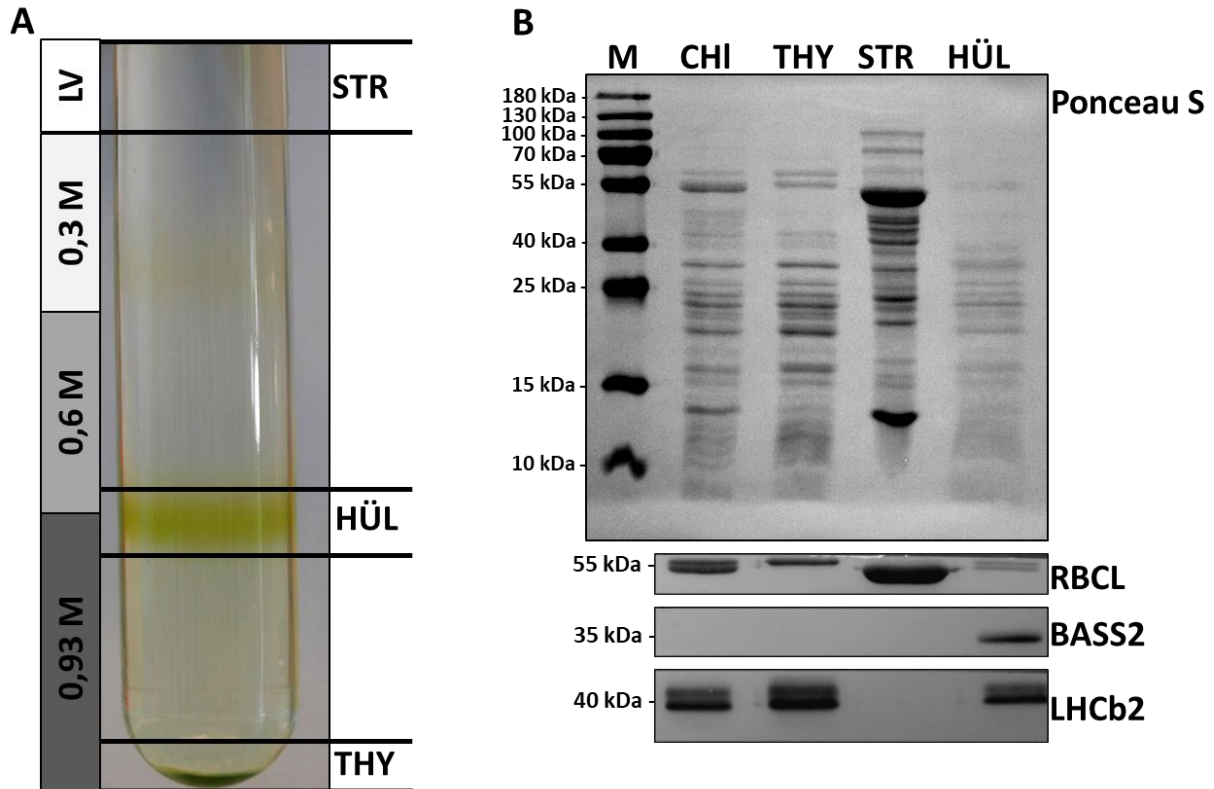


Abbildung 10: Subfraktionierung von Chloroplasten

(A) Lysierte Chloroplasten wurden, in einem dreistufigen diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten, durch Ultrazentrifugation subfraktioniert. Thylakoide (THY) wurden vom Boden des Gradienten, Stroma (STR) aus dem Ladevolumen (LV) und Hüllmembranen (HÜL) von der Grenzschicht zwischen 0,6 M und 0,93 M Saccharose entnommen. (B) Solubilisierte Proteine aus den Fraktionen: Thylakoide (THY), Stroma (STR), Hüllmembranen (HÜL) sowie unfraktionierten Chloroplasten (CHI), wurden durch Western-Blot analysiert. Zur Ermittlung der molekularen Massen wurde ein Größenstandard (M) verwendet. Der Blot wurde mit Ponceau S gefärbt. Die Proteine RBCL, BASS2 und LHCb2 wurden durch Antikörper detektiert (siehe 2.15). Die angegebenen molekularen Massen korrelieren mit den immunoreaktiven Banden der Detektion. Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ aus $n = 4$.

3.3.2 Untersuchung von Chloroplastensubfraktionen durch Massenspektrometrie

Chloroplastidäre Subfraktionen (Hüllmembran, Thylakoide und Stroma) wurden durch Massenspektrometrie analysiert ($n = 4$) (siehe 2.16; 2.17; 2.26.3). Dadurch sollte die Effizienz der Subfraktionierung bestimmt und potenzielle Chloroplastenhüllmembranproteine identifiziert werden. Die MS-Daten wurden einem funktionell annotierten *B. sinuspersici* Referenztranskriptom zugeordnet (siehe 2.26). Es konnten 1060 ESTs in der Stromafraktion, 1108 ESTs in der Thylakoidfraktion und 1326 ESTs in der Fraktion der Hüllmembran identifiziert werden.

Der Datensatz wurde mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA; *principal component analysis*) ausgewertet. Abbildung 11 zeigt, dass die Probenotypen Thylakoide, Stroma und Hüllmembran

nach der Hauptkomponente 1 aufgetrennt wurden. Diese repräsentiert in diesem Fall 84 % der Varianz des Datensatzes. Die Replikate der drei Probenotypen wurden nach der Hauptkomponente 2 aufgetrennt. Diese repräsentiert 10 % der Varianz des Datensatzes. Die Replikate liegen auf dem gezeigten Diagramm jeweils dicht beieinander.

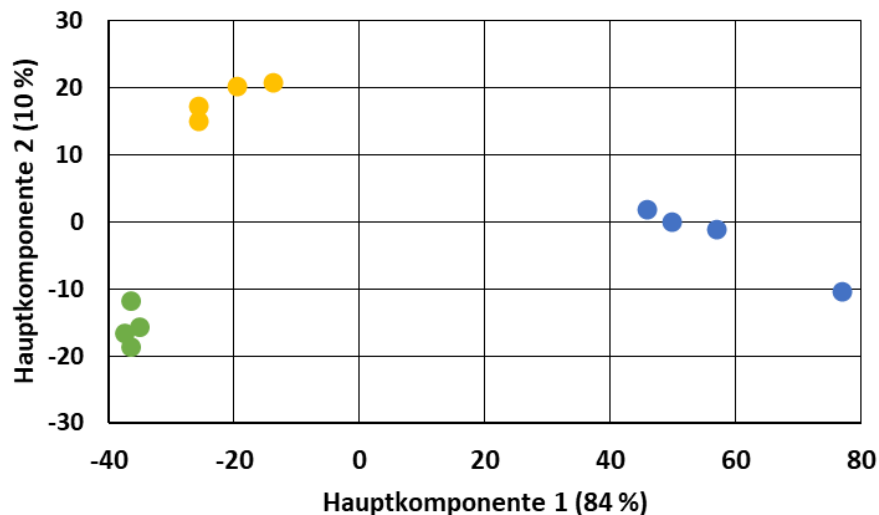


Abbildung 11 : Hauptkomponentenanalyse von MS-Daten aus Thylakoiden, Stroma und Chloroplastenhüllmembranen

Durch Massenspektrometrie ermittelte LFQ-Daten wurden mittels Perseus analysiert (n = 4). Der gezeigte Score-Plot umfasst die Probenotypen: Thylakoide (grün); Stroma (blau) und Hüllmembran (gelb).

Die Abundanz der identifizierten ESTs wurde mittels ANOVA und t-Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Subfraktionen untersucht (siehe 2.26.3). Basierend auf den Ergebnissen wurden die ESTs in vier Gruppen unterteilt:

< HÜL: Signifikant in Hüllmembran gegenüber Thylakoiden und Stroma erhöht

< THY: Signifikant in Thylakoiden gegenüber Hüllmembran und Stroma erhöht

< STR: Signifikant im Stroma gegenüber Hüllmembran und Thylakoiden erhöht

Unspez. (unspezifisch abundant): Kein signifikanter Unterschied zwischen mindestens zwei Fraktionen

Um die Effizienz der Subfraktionierung zu untersuchen, wurde beispielhaft die Anreicherung plastidär lokalisierter BIN-Kategorien in den Subfraktionen untersucht (Tabelle 12). Auf diese Weise wurden ESTs untersucht, die als Komponenten des CBB-Zyklus (BIN: *PS.Calvin-Cycle*), der Lichtreaktion (BIN: *PS.Lightreaction*) sowie des chloroplastidären Proteintransportes (BIN: *Protein.Targeting.Chloroplast*) annotiert sind. Es wurde der

prozentuale Anteil der entsprechend annotierten ESTs in den Gruppen (< HÜL, < THY, < STR, Unspez.) bestimmt.

In der Kategorie CBB-Zyklus waren 70 % der ESTs in der Stromafraktion angereichert. 30 % der ESTs zeigten unspezifische Abundanz. Die ESTs der Kategorie Lichtreaktion waren zu 58 % in der Thylakoidfraktion angereichert. Lediglich 13 % waren in der Stromafraktion angereichert. 29 % der ESTs der Kategorie Lichtreaktion zeigten unspezifische Abundanz. Die ESTs, die als Komponenten des chloroplastidären Proteintransportes annotiert sind, waren zu 68 % in der Hüllmembranfraktion angereichert. Lediglich 5 % zeigten eine Anreicherung in der Thylakoidfraktion und 27 % waren unspezifisch abundant.

Die Ergebnisse zeigen, dass die identifizierten Proteine des CBB-Zyklus überwiegend in der Stromafraktion angereichert sind. Des Weiteren sind Proteine der Lichtreaktion in der Thylakoidfraktion und Proteine des chloroplastidären Proteintransportes vorwiegend in der Hüllmembranfraktion angereichert. Die Anreicherung in den zwei verbleibenden Fraktionen ist jeweils sehr gering. Jedoch ist ein Anteil von bis zu 30 % der ESTs unspezifisch angereichert.

Tabelle 12: Anreicherung ausgewählter chloroplastidärer BIN-Kategorien in chloroplastidären Subfraktionen

Chloroplastidäre Subfraktionen wurden durch Massenspektrometrie analysiert (n = 4). Die Abundanz der identifizierten ESTs wurde durch ANOVA und t-Test (jeweils FDR-korrigiert) auf signifikante Unterschiede geprüft (Signifikant = FDR < 0,1 oder Detektion nur in einer der jeweils getesteten Fraktionen). ESTs waren entweder signifikant in einer Fraktion gegenüber den zwei verbleibenden erhöht (< HÜL, < THY, < STR) oder in mindestens zwei Fraktionen gleich abundant (Unspez.). Gezeigt ist der prozentuale Anteil, der den aufgeführten BIN-Kategorien zugeordneten ESTs, in den drei Fraktionen bzw. der Anteil unspezifischer ESTs.

BIN-Kategorie	< HÜL%	< THY%	< STR%	Unspez.%
PS.Calvin Cycle	0	0	70	30
PS.Lightreaction	0	58	13	29
Protein.Targeting.Chloroplast	68	5	0	27

Die MS-Daten wurden genutzt, um potenzielle Chloroplastenhüllmembranproteine zu identifizieren. Dazu wurden die Daten nach folgenden Kriterien gefiltert: Anreicherung in der Hüllmembran- gegenüber der Thylakoid- und Stromafraktion (< HÜL) und Annotation als Hüllmembranprotein mit entsprechenden GO-Termini (siehe 2.26.3). Zusätzlich wurden die Daten manuell auf bekannte Hüllmembranproteine inspiziert.

Insgesamt konnten auf diese Weise 86 ESTs identifiziert werden, die für 77 verschiedene Chloroplastenhüllmembranproteine codieren (Tabelle 13). In den übrigen Fällen handelte es sich um Fragmente des Selben Proteins, welches im Referenztranskriptom auf mehreren ESTs codiert ist. Die Proteine wurden gemäß ihrer annotierten Funktion kategorisiert. Es konnten 19

Transportproteine, 21 Untereinheiten der Proteinimportkomplexe, 2 Chaperone sowie 8 Proteine des Lipidstoffwechsels identifiziert werden. Zwei der identifizierten Proteine sind in die Teilung von Chloroplasten involviert. Letztlich wurden 10 Chloroplasten-Hüllmembranproteine identifiziert, deren Funktion derzeit noch unbekannt ist.

Sowohl die Detektion ausgewählter Markerproteine durch Western-Blot (siehe 3.3.1), als auch die Analyse der Subfraktionen durch Massenspektrometrie, deuten auf eine erfolgreiche Anreicherung der Chloroplastenhüllmembran hin. Es konnten Homologe von 77 Hüllmembranproteinen identifiziert werden. Das Verfahren wurde im Folgenden angewendet, um die Proteinzusammensetzung der Hüllmembranen von C- und P-Chloroplasten zu vergleichen.

Tabelle 13: Identifizierung von Chloroplastenhüllmembranproteinen

Chloroplastidäre Subfraktionen wurden durch Massenspektrometrie analysiert (n = 4). Chloroplasten-hüllmembranproteine wurden durch GO-Annotation und Anreicherung in der Hüllmembranfraktion identifiziert. Gezeigt sind die Nummerierung der ESTs im Referenztranskriptom und deren relative Abundanz zwischen Hüllmembran- und Thylakoidfraktion (H/T), sowie zwischen Hüllmembran- und Stromafraktion (H/S). Signifikante Unterschiede wurden durch t-Test ermittelt (FDR korrigiert). H = nur in Hüllmembranfraktion identifiziert; T= nur in Thylakoidfraktion identifiziert.

EST Nr.	Protein/Funktion	H/T	FDR	H/S	FDR
Transport					
UN049807	Adenosylmethionine Carrier	3.51	0.08	H	0.00
UN028994	2-Oxoglutarat/Malate Carrier	6.55	0.02	H	0.00
UN056395	ABC Transporter	H	0.00	H	0.00
UN013083	Aquaporin TIP2-1	4.36	0.04	H	0.00
UN028723	Early Response to Dehydration 4	4.89	0.04	H	0.00
UN050577	D-Xylose/Proton Symporter-like	2.15	0.04	H	0.00
UN031209	Glucose Transporter 4	H	0.00	H	0.00
UN050310	Magnesium Transporter MRS2	1.94	0.02	H	0.00
UN047850	Mitoferrin-like	H	0.00	H	0.00
UN000245	Na ⁺ /H ⁺ Antiporter	1.71	1.00	H	0.00
UN035142	Outer Envelope Protein 24	3.96	0.02	H	0.00
UN048051	Outer Envelope Protein 37	4.97	0.01	H	0.00
UN028577	Pep Transporter PPT	3.85	0.10	H	0.00
UN053785	PREDICTED ABC Transporter	17.13	0.01	49.36	0.01
UN030339	PREDICTED Chloroplast Anion Transporter	5.70	0.01	H	0.00
UN033737	PROBABLE Adenine Nucleotide Transporter BTL3	H	0.00	H	0.00
UN025455	PROBABLE Sodium/Metabolite-Cotransporter	H	0.00	H	0.00
UN000162	Pyruvate/Sodium Symporter	3.34	0.07	H	0.00
UN043569	Triosephosphate Transporter TPT	6.84	0.02	H	0.00
Proteinimport					
UN055441	Preprotein Translocase SecA	H	0.00	H	0.00
UN049583	Translocon of the Inner Chl. Membrane 100	11.49	0.04	H	0.00
UN032125	Translocon of the Inner Chl. Membrane 110	H	0.00	H	0.00

EST Nr.	Protein/Funktion	H/T	FDR	H/S	FDR
UN026521	Translocon of the Inner Chl. Membrane 110	7.89	0.00	170.74	0.00
UN053561	Translocon of the Inner Chl. Membrane 20 I	H	0.00	H	0.00
UN038093	Translocon of the Inner Chl. Membrane 20 II	4.18	0.00	H	0.00
UN054012	Translocon of the Inner Chl. Membrane 21	T	0.00	-	-
UN003204	Translocon of the Inner Chl. Membrane 214 (Ycf1)	H	0.00	H	0.00
UN027651	Translocon of the Inner Chl. Membrane 214 (Ycf1)	19.25	0.01	H	0.00
UN023778	Translocon of the Inner Chl. Membrane 214 (Ycf1)	9.63	0.02	H	0.00
UN054441	Translocon of the Inner Chl. Membrane 214 (Ycf1)	5.76	0.01	H	0.00
UN054539	Translocon of the Inner Chl. Membrane 214 (Ycf1)	15.28	0.04	H	0.00
UN000511	Translocon of the Inner Chl. Membrane 214 (Ycf2)	5.07	1.00	H	0.00
UN024135	Translocon of the Inner Chl. Membrane 22 III	5.56	0.02	4.05	0.00
UN018217	Translocon of the Inner Chl. Membrane 22 IV	3.19	0.02	62.42	0.00
UN069423	Translocon of the Inner Chl. Membrane 22 IV	3.19	0.02	H	0.00
UN051486	Translocon of the Inner Chl. Membrane 32 I	4.86	0.01	73.46	0.01
UN047389	Translocon of the Inner Chl. Membrane 32 I	1.89	0.55	H	0.00
UN040788	Translocon of the Inner Chl. Membrane 32 II	H	0.00	H	0.00
UN055540	Translocon of the Inner Chl. Membrane 55	9.33	0.01	358.84	0.00
UN054712	Translocon of the Inner Chl. Membrane 56	5.45	0.01	H	0.00
UN051168	Translocon of the Inner Chl. Membrane 62	1.17	1.00	1.73	1.00
UN000505	Translocon of the Outer Chl. Membrane 132	13.08	0.01	H	0.00
UN054529	Translocon of the Outer Chl. Membrane 159	2.68	1.00	H	0.00
UN034759	Translocon of the Outer Chl. Membrane 159	H	0.00	H	0.00
UN053567	Translocon of the Outer Chl. Membrane 159	4.22	0.02	208.26	0.00
UN055335	Translocon of the Outer Chl. Membrane 34	2.98	0.03	H	0.00
UN055651	Translocon of the Outer Chl. Membrane 64	9.92	0.01	104.89	1.00
UN055385	Translocon of the Outer Chl. Membrane 75	6.78	0.02	343.17	0.00
Chaperone					
UN045422	Chaperone-like Protein	3.11	0.09	H	0.00
UN052530	DnaJ Chaperone Homolog	2.11	0.07	17.37	0.02
Lipidstoffwechsel					
UN028779	Acyl-CoA Synthetase 9	5.65	0.01	H	0.00
UN000222	AMP-Dep. Synthetase/Ligase Family Protein	8.90	0.02	H	0.00
UN045319	Fatty Acid Export 2	2.04	0.21	H	0.00
UN052734	Fatty Acid Export 3	2.93	0.03	H	0.00
UN001736	J-like Domain1 Protein	3.16	0.01	H	0.00
UN041096	PREDICTED Fatty-Acid-Binding Protein 1	2.87	0.05	2.83	0.02
UN054405	PREDICTED TGD2	8.29	0.00	H	0.00
UN054787	Protochlorophyllide-Dep. Translocon Comp. 52	14.68	0.01	H	0.00
Plastidenteilung					
UN049254	Plastid Division 2	H	0.00	H	0.00
UN048258	Accumulation and Replication of Chloroplasts 11	1.47	0.48	H	0.00
Sonstige Funktionen					
UN044496	ATP-Dependent Zinc Metalloprotease FTSH	14.95	0.02	H	0.00
UN055154	ATP-Dependent Zinc Metalloprotease FTSH	4.72	0.02	H	0.00
UN054382	ATP-Dependent Zinc Metalloprotease FTSH	12.70	0.02	H	0.00
UN049584	ATP-Dependent Zinc Metalloprotease FTSH 9	2.86	0.06	H	0.00
UN008456	Chromophore Lyase	H	0.00	H	0.00
UN054392	Hexokinase	4.19	0.02	H	0.00

EST Nr.	Protein/Funktion	H/T	FDR	H/S	FDR
UN050268	Ornithine Carbamoyltransferase	H	0.00	0.06	1.00
UN047621	PREDICTED E3 Ubiquitin-Ligase KEG	33.06	0.02	H	0.00
UN031348	PREDICTED FTSH	9.50	0.02	H	0.00
UN055528	PREDICTED Inner Envelope Protein	4.88	0.00	217.43	0.00
UN043406	PREDICTED NLRC 3	2.84	0.03	3.05	0.09
UN025443	Protoporphyrinogen Oxidase 2	4.56	0.01	H	0.00
UN048684	Quinone Oxireductase	5.68	0.00	111.38	0.00
UN028858	Zeta-Carotene Desaturase	0.84	1.00	0.48	0.45
Unbekannte Funktion					
UN000430	Mesophyll Envelope Protein2	4.28	0.03	77.57	0.03
UN001056	Outer Envelope Protein 21	3.03	0.02	H	0.00
UN000720	Outer Envelope Protein 7	7.73	0.64	80.34	0.56
UN006329	Uncharacterized Protein	3.38	0.06	H	0.00
UN050650	Uncharacterized Protein	3.89	0.00	H	0.00
UN053185	Uncharacterized Protein	6.55	0.06	H	0.00
UN039814	Uncharacterized Protein	4.70	0.01	179.00	0.01
UN045729	Uncharacterized Protein	4.30	0.01	H	0.00
UN001252	Uncharacterized Protein	H	0.00	H	0.00
UN014458	Uncharacterized Protein	H	0.00	H	0.00
UN053947	YGGT-Family Protein	5.10	0.05	H	0.00

3.3.3 Isolation von C- und P-Chloroplasten

Ein Vergleich der Hüllmembranen von C- und P-Chloroplasten erforderte die Separation der beiden Chloroplastentypen. Ein entsprechendes Verfahren wurde bereits in früheren Studien verwendet (Offermann et al. 2011; Lung et al. 2012a; Offermann et al. 2015;). In diesen Studien wurden isolierte C- und P-Chloroplasten untersucht. Diese Strategie hat sich jedoch für diese Arbeit als unzulänglich erwiesen. Die Menge isolierter P-Chloroplasten war für die Subfraktionierung zu gering und auch die Isolation freier C-Chloroplasten führte zu großem Materialverlust (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde eine alternative Strategie entwickelt. Einerseits wurden Zentralkompartimente isoliert (CC). Andererseits wurde eine Mischung aller Chloroplasten, also Zentralkompartimente und P-Chloroplasten isoliert (TC). Die Isolation von TC und CC wurde durch SDS-PAGE und Western-Blot kontrolliert. Als Vergleich dienten die Proteine intakter Protoplasten (P). Durch Antikörper wurden PPK (Pyruvat Phosphat Dikinase) als Marker für die P-Chloroplasten und RBCL als Marker für die C-Chloroplasten detektiert (Abbildung 12). PPK zeigte in TC ein stärkeres Signal als in CC und P. Das Signal von RBCL war in TC und CC gleich stark, allerdings in beiden Fällen stärker als in P.

Die Anreicherung der Markerproteine PPK und RBCL deutet darauf hin, dass in TC sowohl C-Chloroplasten als auch P-Chloroplasten enthalten waren. In CC war die Abundanz der P-

Chloroplasten hingegen deutlich reduziert. Dies zeigt, dass die Isolation von TC und CC erfolgreich war.

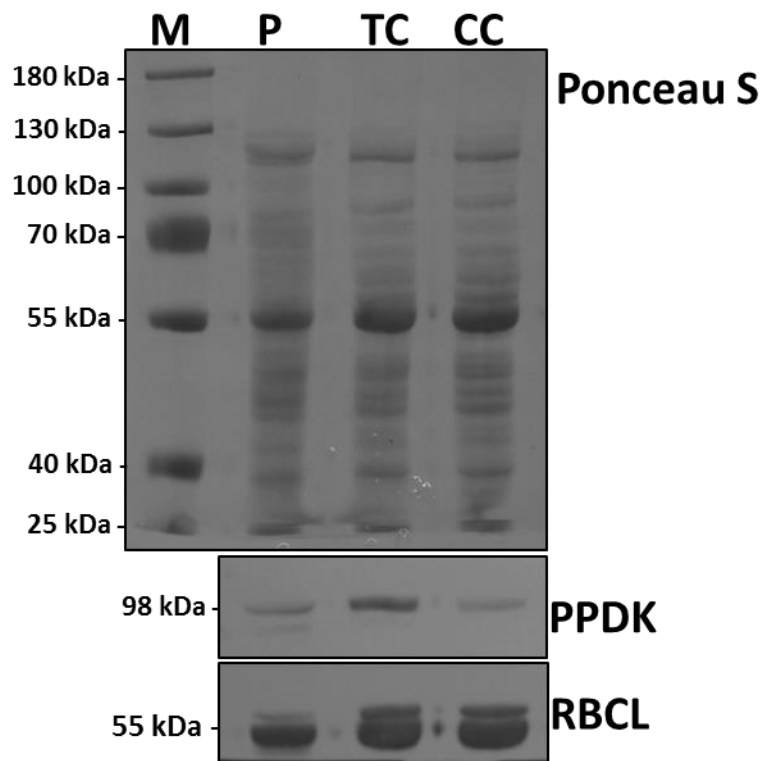


Abbildung 12: Western-Blot Analyse isolierter Chloroplasten

Solubilisierte Proteine aus Chlorenchymprotoplasten (P), einem Gemisch aus CC und P-Chloroplasten (TC) sowie isolierten Zentralkompartimenten (CC) wurden durch Western-Blot analysiert. Zur Ermittlung der molekularen Massen wurde ein Größenstandard (M) verwendet. Der Blot wurde mit Ponceau S gefärbt. Die Proteine PPDK und RBCL wurden durch Antikörper detektiert. Die angegebenen molekularen Massen korrespondieren mit den immunoreaktiven Banden der Detektion. Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ aus $n = 6$.

3.3.4 Identifizierung differenziell abundanter Hüllmembranproteine

Die zuvor etablierten Verfahren zur Isolation von TC und CC (siehe 3.3.3) sowie zur Subfraktionierung von Chloroplasten (siehe 3.3.1) wurden im Folgenden kombiniert um die Hüllmembranen von C- und P-Chloroplasten miteinander zu vergleichen. Das Ziel lag darin, Hüllmembranproteine zu identifizieren, die in den beiden Chloroplastentypen unterschiedlich häufig vorkommen. TC und CC wurden jeweils subfraktioniert und die Hüllmembranfraktionen (TC-HÜL; CC-HÜL) durch Massenspektrometrie analysiert. Die Daten wurden einem *B. sinuspersici* Referenztranskriptom (Offermann et al. 2015) zugeordnet (siehe 2.26.1). Es konnten 1105 ESTs in TC-HÜL und 1106 ESTs in den CC-HÜL identifiziert werden.

Der Datensatz wurde durch eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) analysiert. Abbildung 13 zeigt, dass die Probenotypen TC-HÜL und CC-HÜL nach der Hauptkomponente 2 aufgetrennt wurden. Diese repräsentiert in diesem Fall 27 % der Varianz des Datensatzes. Die Replikate der beiden Probenotypen wurden nach der Hauptkomponente 1 aufgetrennt. Diese repräsentiert 51 % der Varianz des Datensatzes.

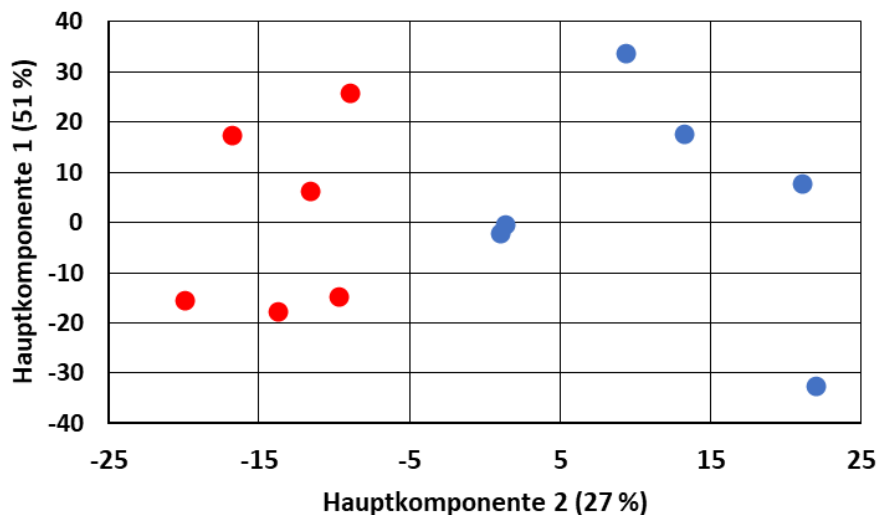


Abbildung 13: Hauptkomponentenanalyse von MS-Daten aus TC- und CC-Hüllmembranen

Durch Massenspektrometrie ermittelte LFQ-Daten wurden mittels Perseus analysiert ($n = 6$). Der gezeigte Score-Plot umfasst die Probenotypen: TC-HÜL (blau) und CC-HÜL (rot).

Die ESTs wurden, mittels t-Test, auf signifikante Abundanzunterschiede zwischen TC-HÜL und CC-HÜL untersucht. Es konnten 171 differenziell abundante ESTs ermittelt werden. Davon kamen 104 häufiger in CC-HÜL und 67 häufiger in TC-HÜL vor. Die ESTs wurden anschließend manuell analysiert. Es wurde die wahrscheinliche subzelluläre Lokalisation, der auf den ESTs codierten Proteine ermittelt (Tabelle 14). Dazu wurden eine BLASTX-Analyse durchgeführt, sowie Literaturdaten verwendet (siehe 2.26.3). Eine Auslistung aller identifizierten differenziell abundanten ESTs befindet sich im Anhang (siehe Tabelle 19).

Die vorhandenen Literaturdaten deuten darauf hin, dass 30 der differenziell abundanten ESTs für chloroplastidäre Proteine, die verbleibenden 141 ESTs hingegen für Proteine anderer zellulärer Kompartimente codieren. Darunter befinden sich 65 ESTs mitochondrialer Proteine und 3 ESTs peroxisomaler Proteine, die alle häufiger in CC-HÜL vorkamen. Die identifizierten ESTs von Proteinen der Plasmamembran, des Tonoplasten und des Zellkerns kamen hingegen ausnahmslos häufiger in TC-HÜL vor. Die ESTs zytoplasmatischer und ribosomaler Proteine waren z.T. in beiden Probenotypen höher abundant. Dies gilt ebenso für die ESTs von Proteinen

unbekannter Lokalisation. Diese Ergebnisse zeigen, dass TC-HÜL und CC-HÜL jeweils mit Proteinen unterschiedlicher Kompartimente kontaminiert waren.

Tabelle 14: Subzelluläre Lokalisation differenziell abundanter Proteine

Hüllmembranen aus TC und CC wurden durch Massenspektrometrie analysiert (n = 6). Die ermittelten ESTs wurden durch t-Test und FDR-Korrektur auf signifikant unterschiedliche Abundanz getestet (FDR < 0,1 bzw. Detektion in nur einer der verglichenen Fraktionen). Die wahrscheinliche Lokalisation der durch die ESTs codierten Proteine wurde durch BLASTX und Literaturrecherche ermittelt. Gezeigt sind die Anzahl der signifikant unterschiedlich abundanten ESTs sowie die subzelluläre Lokalisation der codierten Proteine.

Lokalisation	<TC-HÜL	<CC-HÜL
Chloroplast	18	12
Zytoplasma	2	3
Ribosom	2	1
Zellkern	3	0
Tonoplast	6	0
Plasmamembran	4	0
Peroxisom	0	3
Mitochondrium	0	65
Unbekannte Lokalisation	32	20

Die identifizierten differenziell abundanten ESTs codieren für 13 Hüllmembranproteine (Tabelle 15). Aus der relativen Abundanz zwischen TC-HÜL und CC-HÜL wurde abgeleitet, in welchem der beiden Chloroplastentypen die Proteine häufiger vorkommen (TC-HÜL/CC-HÜL < 1 = C-Chloroplast; TC-HÜL/CC-HÜL > 1 = P-Chloroplast).

BASS2 und NHD1 kamen häufiger in den P-Chloroplasten vor. Beide Proteine sind am SCC4-Zyklus beteiligt (Offermann et al. 2015). Es wird vermutet, dass BASS2 Pyruvat im Co-Transport mit Na⁺ in die P-Chloroplasten transportiert, während NDH1 Na⁺ zurück ins Zytoplasma transportiert. Es konnten drei differenziell abundante Untereinheiten der Proteinimportkomplexe TIC und TOC identifiziert werden. TIC22-IV und TIC214 kamen häufiger in den P-Chloroplasten vor. TIC22-IV ist im Intermembranraum zwischen der inneren und der äußeren Hüllmembran lokalisiert und unterstützt dort wahrscheinlich die Passage der importierten Proteine (Glaser et al. 2012; Kasmati et al. 2013). Die Funktion von TIC214 wird zurzeit noch diskutiert. TOC159 kam hingegen häufiger in den C-Chloroplasten vor. TOC159 ist ein primärer TOC-Rezeptor und in anderen Pflanzenarten am Proteinimport in Chloroplasten beteiligt (Hirsch et al. 1994; Bauer et al. 2000). Weitere differenziell abundante Hüllmembranproteine waren FAX2 (*fatty acid export2*) und FAX3 (*fatty acid export3*). In anderen Pflanzenarten wurde gezeigt, dass diese Proteine Fettsäuren aus den Chloroplasten ins Zytoplasma transportieren (Li et al. 2015). FAX2 war höher abundant in den P-Chloroplasten, während FAX3 in den C-Chloroplasten häufiger vorkam. Des Weiteren zeigten die

Hüllmembranproteine OEP7 (*outer envelope protein7*), PDV2 (*plastid division2*) und ZDS (zeta-carotene desaturase) höhere Abundanz in den C-Chloroplasten. ARC11 (*accumulation and replication of chloroplasts11*), ERD4 (*early response to dehydration4*) und YGGT (*YGGT-domain protein*) kamen hingegen in den P-Chloroplasten häufiger vor.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Hüllmembranen von C- und P-Chloroplasten eine unterschiedliche Proteinzusammensetzung aufweisen. Dies betrifft u.a. Untereinheiten der Proteinimportkomplexe, Metabolit-Transporter sowie Proteine, die an der Fettsäuresynthese beteiligt sind.

Tabelle 15: Differenziell abundante Chloroplastenhüllmembranproteine

Hüllmembranen aus TC und CC wurden durch Massenspektrometrie analysiert (n = 6). Die ermittelten ESTs wurden durch t-Test (FDR-korrigiert) auf signifikant unterschiedliche Abundanz getestet (FDR < 0,1 bzw. Detektion in nur einer der Fraktionen). Die wahrscheinliche Lokalisation der durch die ESTs codierten Proteine wurde durch BLASTX und anschließende Literaturrecherche ermittelt. Die Tabelle enthält die identifizierten Hüllmembranproteine. Gezeigt sind die EST-Nummer der Proteine im Referenztranskriptom, die relative Abundanz TC/CC sowie das Signifikanzniveau nach t-Test und FDR-Korrektur. CC = Nur in CC-HÜL identifiziert.

EST Nr.	Protein	TC/CC	FDR
UN045319	Fatty Acid Export 2	2.80	0.03
UN000162	Pyruvate/Sodium Symporter	2.02	0.02
UN053947	YGGT-Family Protein	1.87	0.04
UN028723	Early Response to Dehydration 4	1.86	0.07
UN000245	Na ⁺ / H ⁺ -Antiporter	1.82	0.06
UN069423	Translocon of the Inner Chl. Membrane 22 IV	1.72	0.05
UN048258	Accumulation and Replication of Chloroplasts 11	1.70	0.01
UN023778	Translocon of the Inner Chl. Membrane 214 (Ycf1)	1.59	0.08
UN049254	Plastid Division 2	0.59	0.05
UN052734	Fatty Acid Export 3	0.54	0.06
UN054529	Translocon of the Outer Chl. Membrane 159	0.48	0.09
UN000720	Outer Envelope Protein 7	0.44	0.06
UN028858	Zeta-Carotene Desaturase	CC	-

Wie bereits dargelegt, waren die isolierten Chloroplastenhüllmembranen von TC und CC u.a. mit zytoplasmatischen Proteinen kontaminiert. In früheren Studien wurde gezeigt, dass bestimmte zytoplasmatische Proteine mit der Chloroplastenhüllmembran oder mit Hüllmembranproteinen interagieren können (Deng et al. 2014). Es ist also möglich, dass die Kontamination der Hüllmembranen mit zytoplasmatischen Proteinen auf Interaktionen *in-vivo* zurück zu führen ist. Einige der identifizierten zytoplasmatischen Proteine kamen in TC-HÜL und CC-HÜL unterschiedlich häufig vor (Tabelle 16). WEB1 (*weak chloroplast movement under blue light1*), PMI2 (*plastid movement impaired2*) sowie Myosin, wiesen eine höhere

Abundanz in CC-HÜL auf. In *A. thaliana* sind diese Proteine wahrscheinlich an der Bewegung von Chloroplasten beteiligt (Luesse et al. 2006; Paves et al. 2007; Kodama et al. 2010). Die zytoplasmatischen Isoformen von TPI (*triosephosphate isomerase*) sowie Fructose-Bisphosphat Aldolase wurden nur in TC-HÜL identifiziert.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass WEB1, PMI2, Myosin sowie TPI und Fructose-Bisphosphat Aldolase *in-vivo* bevorzugt in räumlicher Nähe eines Chloroplastentypen lokalisiert sind.

Tabelle 16: Differenziell in TC- und CC-Hüllmembranen abundante Zytoplasmaproteine
Hüllmembranen aus TC und CC wurden durch Massenspektrometrie analysiert (n = 6). Die ermittelten ESTs wurden durch t-Test (FDR-korrigiert) auf signifikant unterschiedliche Abundanz getestet (FDR < 0,1 bzw. Detektion in nur einer der Fraktionen). Die wahrscheinliche Lokalisation der durch die ESTs codierten Proteine wurde durch BLASTX und Literaturrecherche ermittelt. Die Tabelle enthält die identifizierten Zytoplasmaproteine. Gezeigt sind die EST-Nummer der Proteine im Referenztranskriptom, die relative Abundanz TC/CC sowie das Signifikanzniveau nach t-Test und FDR-Korrektur. TC = Nur in TC-HÜL identifiziert.

EST Nr.	Protein	TC/CC	FDR
UN049469	Fructose-Bisphosphate Aldolase	TC	-
UN048278	Cytoplasmic Triosephosphate Isomerase	1.85	0.03
UN000137	Plastid Movement Impaired 2	0.47	0.06
UN055429	Weak Chloroplast Movement Under Blue Light 1	0.36	0.06
UN030015	Myosin-11 Isoform x2	0.29	0.09

3.4 Expressionsmuster von Hüllmembranproteinen während der Blattentwicklung

In *B. sinuspersici* findet eine graduelle Entwicklung von jungen Chlorenchymzellen mit nur einem Chloroplastentyp, zu voll entwickelten Chlorenchymzellen mit SCC4-Morphologie statt (Lara et al. 2008; Park et al. 2009; Offermann et al. 2015). In bisherigen Studien wurde dies anhand von drei Stadien der Blattentwicklung untersucht (YL = *youngest leaf*; IL = *intermediate leaf*; ML = *mature leaf*) (Lara et al. 2008). Die Chlorenchymzellen der YL enthalten nur einen Chloroplastentyp, während in IL bereits die räumliche Trennung von CC und PC erkennbar ist. In ML ist die Entwicklung der SCC4-Morphologie vollständig abgeschlossen. Es wurde gezeigt, dass die Expression vieler C4-Gene nach der Ausbildung von CC und PC ansteigt. Andere photosynthetisch relevante Gene, z.B. des CBB-Zyklus, zeigen hingegen schon in der früheren Entwicklung eine hohe Expression (Lara et al. 2008).

Im Folgenden wurde untersucht, ob die durch Massenspektrometrie identifizierten, differenziell in C- und P-Chloroplasten abundanten Hüllmembranproteine, in die SCC4-Photosynthese involviert sein könnten. Dazu wurde ihre Expression in YL, IL sowie ML ermittelt und mit der

Expression von bekannten C4-Genen sowie nicht-C4 photosynthetischen Genen verglichen. Für die Untersuchung wurden exemplarisch einige der identifizierten Hüllmembranproteine ausgewählt, die Untereinheiten der Proteinimportkomplexe tic22-IV, tic214 und toc159 sowie die Fettsäuretransporter fax2 und fax3. Des Weiteren oep7, ygg7 sowie bass2. Als Kontrolle für C4-Gene dienten pepc und ppdk. Als Kontrolle für nicht-C4 photosynthetische Gene dienten rbcl und ps1a (Photosystem I A-Untereinheit). Abbildung 14 zeigt die Genexpression der Kontrollen und der Kandidaten in YL, IL und ML relativ zur Expression von Aktin.

Pepc und ppdk zeigten beide niedrige Expression in YL und IL und einen starken Anstieg in ML. Während der gesamten Blattentwicklung (YL zu ML) zeigte pepc einen 5,5-fachen und ppdk einen 10-fachen, jeweils signifikanten, Expressionsanstieg. Rbcl zeigte einen leichten, jedoch nicht signifikanten Expressionsanstieg während der Blattentwicklung. Ps1a wurde in YL und ML zunächst niedrig exprimiert und zeigte einen signifikanten Anstieg der Expression in ML. Toc159, tic214 und bass2 waren niedrig in YL und IL und signifikant höher in ML exprimiert. Während der gesamten Blattentwicklung (YL zu ML) zeigte toc159 einen 4-fachen, tic214 einen 3,3-fachen und bass2 einen 2,5-fachen, jeweils signifikanten, Expressionsanstieg. Tic22-IV, oep7, fax2, fax3 und ygg7 zeigten keine signifikanten Expressionsveränderungen während der Blattentwicklung. Oep7 zeigte eine tendenziell, aber nicht signifikante, rückläufige Expression.

Es wurde gezeigt, dass die Expression von toc159, tic214 und bass2 während der Blattentwicklung signifikant ansteigt. Damit ähnelt ihr Expressionsmuster dem der C4-Gene pepc und ppdk. Letztere zeigten jedoch einen höheren Gesamtanstieg. Auch ps1a zeigte, ähnlich wie pepc und ppdk eine ansteigende Expression während der Blattentwicklung. Die Expression der übrigen Kandidaten zeigte keine, oder nur geringe Änderungen während der Blattentwicklung und glich damit dem Expressionsmuster von rbcl.

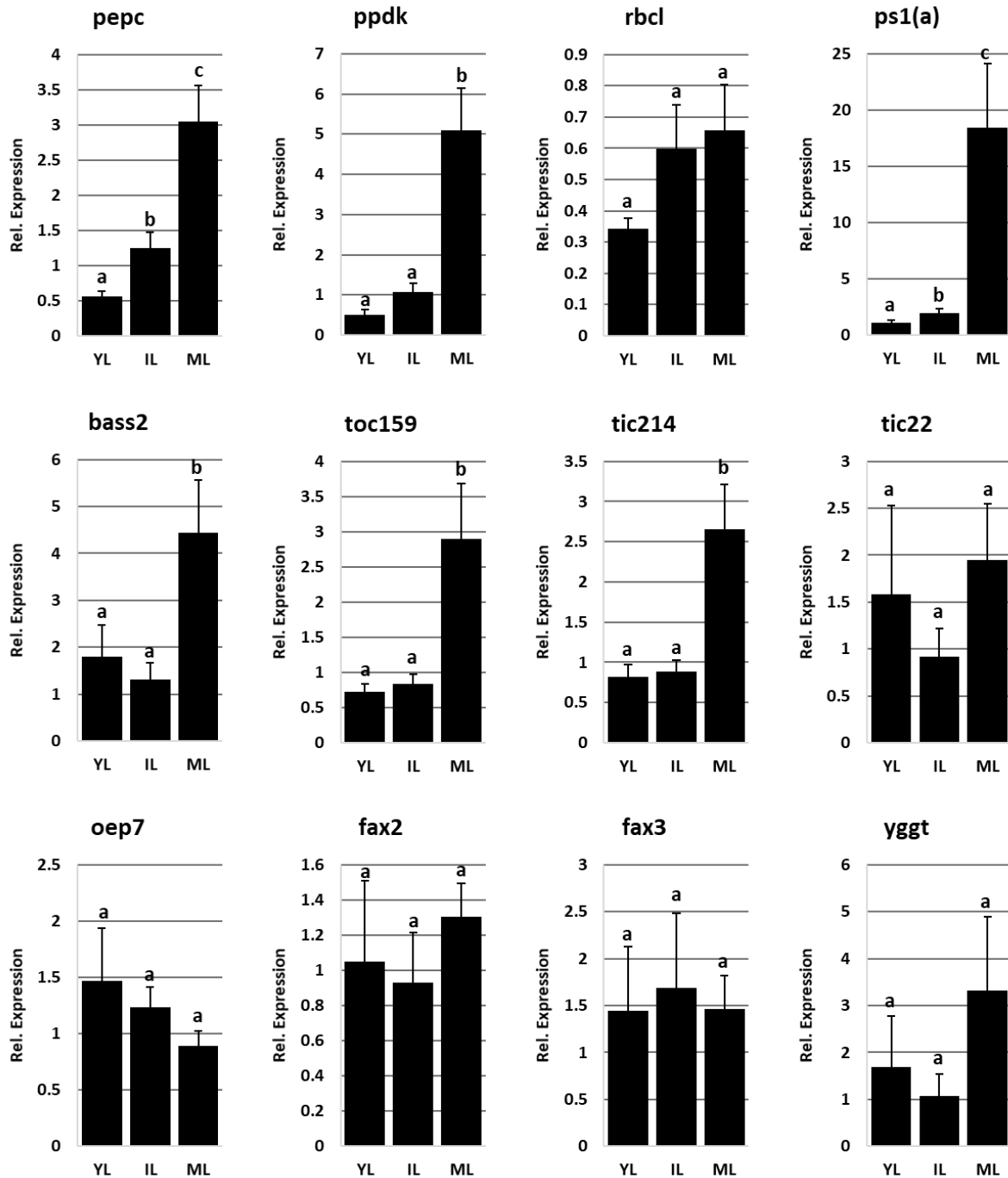


Abbildung 14: Genexpression von Hüllmembranproteinen während der Blattentwicklung
 RNA der Entwicklungsstadien YL, IL und ML wurde isoliert und zur Synthese von cDNA verwendet. Die relative Expression wurde mittels qPCR bestimmt. Die Ergebnisse wurden durch die Expression von Aktin standardisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte aus n = 4 mit Standardfehler. Signifikante Unterschiede wurden durch t-Test ermittelt ($p < 0,05$) und sind durch unterschiedliche Gruppierungen (a,b,c) angezeigt.

3.5 Expressionsmuster von Hüllmembranproteinen in Chlorenchym, Hydrenchym und Wurzeln

In Kapitel 3.3.2 wurden potenzielle Chloroplastenhüllmembranproteine durch Massenspektrometrie identifiziert. In Kapitel 3.3.4 wurde gezeigt, dass einige zytoplasmatische Proteine wahrscheinlich unterschiedlich häufig in der Nähe von C- bzw. P-Chloroplasten lokalisiert sind. Um zu ermitteln, ob diese Kandidaten möglicherweise in die SCC4-Photosynthese involviert sind, wurde ihre Expression in Chlorenchym, Hydrenchym und Wurzeln untersucht und mit der von Kern-C4 Genen verglichen. Dazu wurden die durch RNA-Sequenzierung ermittelten Daten (Kapitel 3.1.2) verwendet. Tabelle 17 zeigt den FC C/H (*fold change*: Chlorenchym zu Hydrenchym) sowie den FC C/W (*fold change*: Chlorenchym zu Wurzeln) ausgesuchter Hüllmembran- und Zytoplasmaproteine. Eine Auflistung des FC C/H und des FC C/W aller identifizierten Hüllmembranproteine befindet sich im Anhang (siehe Tabelle 20).

Die Kern-C4 Gene zeigten hohe Expressionsunterschiede zwischen Chlorenchym, Hydrenchym und Wurzeln. Der FC C/H lag bei > 55 , der FC C/W bei > 80 (siehe 3.2). *Bass2* und *ppt* (*phosphoenolpyruvate transporter*) codieren für Hüllmembranproteine, die an der SCC4-Photosynthese beteiligt sind (Offermann et al. 2015). Der FC C/H von *bass2* lag bei 45, der FC C/H von *ppt* bei 13. Damit war ihr Expressionsunterschied zwischen Chlorenchym und Hydrenchym niedriger als bei den Kern-C4 Genen. *Bass2* zeigte des Weiteren einen hohen FC C/W. Dieser entsprach dem der Kern-C4 Gene. Unter den Untereinheiten der Proteinimportkomplexe TOC und TIC zeigte *tic62* mit 14,8 den höchsten FC C/H. Des Weiteren zeigte *tic62*, wie die Kern-C4 Gene, einen hohen FC C/W. Die übrigen Untereinheiten von TOC und TIC (z.B. *toc159* und *tic22-IV*) zeigten deutlich geringere Expressionsunterschiede. *Tic214* und *toc132* zeigten hingegen keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen Chlorenchym, Hydrenchym und Wurzeln. Des Weiteren zeigten *oep7*, *pmi2* und TPT (*triosephosphate transporter*) nur einen niedrigen FC C/H, jedoch einen sehr hohen FC C/W. Die ESTs UN006329 und UN014458 codieren für uncharakterisierte Hüllmembranproteine. Beide zeigten hohe FC C/H und FC C/W.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die in dieser Arbeit identifizierten Chloroplastenhüllmembranproteine z.T. gewebsspezifisch exprimiert werden. Allerdings war der Expressionsunterschied zwischen Chlorenchym und Hydrenchym in keinem Fall so hoch, wie bei den Kern-C4 Genen. Weitere Kandidaten zeigten einen hohen Expressionsunterschied zwischen Chlorenchym und Wurzeln. Dies deutet möglicherweise auf eine generelle, nicht C4-spezifische Funktion in photosynthetischen Geweben hin.

Tabelle 17: Expression ausgewählter Hüllmembranproteine in Chlorenchym, Hydrenchym und Wurzeln

RNA aus *B. sinuspersici* Chlorenchym, Hydrenchym und Wurzeln wurde durch RNA Sequenzierung analysiert (n = 4) (siehe 3.1.2). Der *Fold Change* der identifizierten ESTs wurde mittels CLC genomic Workbench bestimmt (Chlorenchym zu Hydrenchym = C/H; Chlorenchym zu Wurzeln = C/W). Gezeigt sind die *Fold Changes* ausgesuchter Chloroplastenhüllmembran- und Zytoplasmaproteine (FDR korrigiert).

EST Nr.	Gen	FC C/H	FDR	FC C/W	FDR
UN000162	Pyruvate/Sodium Symporter	45.65	0.00	88.85	0.00
UN014458	Uncharacterized Protein	37.73	0.00	745.25	0.00
UN006329	Uncharacterized Protein	37.53	0.00	584.89	0.00
UN051168	Translocon of the Inner Chl. Membrane 62	14.76	0.00	794.42	0.00
UN028577	Phosphoenolpyruvat Transporter	13.09	0.00	3.05	0.00
UN055528	PREDICTED Inner Envelope Protein	11.57	0.00	8.96	0.00
UN000720	Outer Envelope Protein 7	8.08	0.00	1001.42	0.00
UN054712	Translocon of the Inner Chl. Membrane 56	7.78	0.00	6.54	0.00
UN030339	PREDICTED Chloroplast Anion Transporter	7.09	0.00	12.22	0.00
UN000137	Plastid Movement Impaired 2	7.03	0.00	628.72	0.00
UN053947	YGGT-Family Protein	6.99	0.00	9.58	0.00
UN054529	Translocon of the Outer Chl. Membrane 159	6.00	0.00	4.50	0.00
UN043569	Triosephosphate Transporter	5.09	0.00	182.63	0.00
UN030015	Myosin-11 isoform x2	3.42	0.00	2.41	0.00
UN069423	Translocon of the Inner Chl. Membrane 22 IV	2.29	0.00	2.67	0.00
UN023778	Translocon of the Inner Chl. Membrane 214 (Ycf1)	1.62	0.21	0.66	0.23
UN055429	Weak Chloroplast Movement Under Blue Light 1	1.21	0.67	0.77	0.39
UN000505	Translocon of the Outer Chl. Membrane 132	1.18	0.63	0.73	0.16

3.6 Subzellulärer Transport von Hüllmembranproteinen

Einige, die durch Massenspektrometrie ermittelten differenziell abundanten Hüllmembranproteine (siehe 3.3.4), wurden mit GFP fusioniert und in *B. sinuspersici* Protoplasten exprimiert (siehe 2.23; 2.24). Es sollte untersucht werden, ob die Fusionsproteine selektiv zu C- oder P-Chloroplasten transportiert werden. Dazu wurden exemplarisch einige der Kandidatenproteine ausgewählt. Die Untereinheiten der Proteinimportkomplexe TOC159 und TIC22-IV, die Fettsäuretransporter FAX2 und FAX3 sowie die funktionell uncharakterisierten Hüllmembranproteine OEP7 und YGGT. Der leere Vektor (pUC18_35S_GFP) wurde als Kontrolle für die Lokalisation von GFP ohne fusioniertes Protein verwendet. BASS2 wurde bereits in bisherigen Studien als P-Chloroplast-spezifisch lokalisiertes Protein beschrieben (Offermann et al. 2011; Offermann et al. 2015) und diente somit als Positivkontrolle. TIC20 ist laut der MS-Daten (siehe 3.3.2) in beiden Chloroplastentypen gleich hoch abundant und diente daher als Negativkontrolle. Die Lokalisation der Fusionsproteine wurde durch Fluoreszenzmikroskopie ermittelt. Der grüne Kanal (GFP) und der rote Kanal (Chlorophyll) wurden jeweils zu einem Bild vereint (Abbildung 15).

Nach der Transformation mit dem leeren Vektor zeigten die Protoplasten ein wabenförmiges GFP-Signal am CC und ein starkes Signal in der Peripherie (A). Zudem war ein großer, stark fluoreszierender Bereich neben dem CC zu erkennen. Insgesamt zeigte das Signal keine Assoziation mit der Autofluoreszenz der Chloroplasten. Das GFP-Signal von BASS2 (B), TIC20 (C), OEP7 (D), FAX2 (E), FAX3 (F), YGGT (G) und TOC159 (H) war hingegen deutlich mit C- und P-Chloroplasten assoziiert. Bei BASS2 und OEP7 bildete das Signal einen scharfen Ring um die Chloroplasten. Bei TIC20 war das Signal hingegen gleichmäßig mit der Oberfläche der Chloroplasten assoziiert. Das GFP-Signal von FAX3 zeigte eine ungleichmäßige Struktur am Rand der Chloroplasten. Bei FAX2, YGGT und TOC159 war zusätzlich ein GFP-Signal in der Peripherie der Protoplasten zu erkennen. FAX2 und YGGT zeigten zudem einen fluoreszierenden Bereich nahe des CC. TIC22 (I) zeigte hingegen keine Assoziation mit den Chloroplasten. Stattdessen deutet das GFP-Signal auf die Aggregation des Proteins in der Zellperipherie hin. Alternativ wurde das Transitpeptid von TIC22 mit GFP fusioniert (TIC22-TP). So sollte, durch Verkürzung des Fusionsproteins, eine Aggregation vermieden werden. Das Transitpeptid wurde durch ChloroP vorhergesagt und umfasste 144 bp am 5'-Ende des TIC22 Leserasters (siehe 2.23). TIC22-TP zeigte ein wabenförmiges Signal am CC und einen stark fluoreszierenden Bereich neben dem CC (J). Das GFP-Signal zeigte keine Assoziation mit den Chloroplasten.

Bei keinem der untersuchten Hüllmembranproteine fand ein spezifischer Transport zu einem der beiden Chloroplastentypen statt. Auch bei der Positivkontrolle (BASS2) zeigte das GFP-Signal nicht die erwartete Lokalisation in den P-Chloroplasten. Stattdessen war das GFP-Signal mit C- und P-Chloroplasten gleichermaßen assoziiert. Des Weiteren zeigte TIC22 keine Assoziation mit den Chloroplasten.

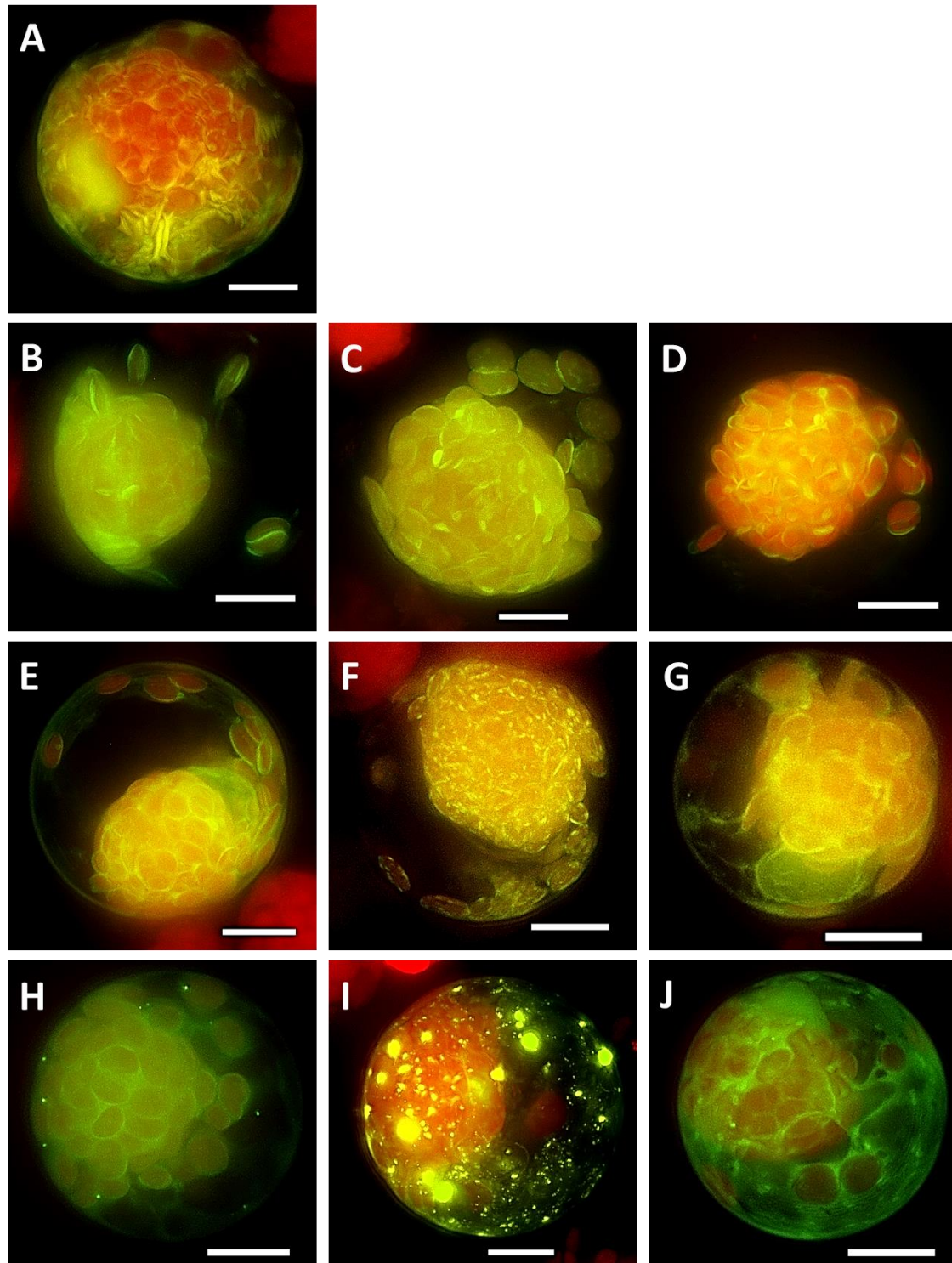


Abbildung 15: Expression von GFP-Fusionsproteinen in Protoplasten

Gezeigt sind fluoreszenzmikroskopische Bilder transient transformierter Protoplasten. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ aus $n = 3$. Die Bilder des grünen Kanals (GFP) und des roten Kanals (Autofluoreszenz des Chlorophylls) wurden jeweils übereinander gelegt. Für die Transformation wurden pUC18_35S_GFP Vektoren mit folgenden Inserts verwendet: A: Vektor ohne Insert; B: BASS2; C: TIC20; D: OEP7; E: FAX2; F: FAX3; G: YGGT; H: TOC159 C-Terminus; I: TIC22; J: TIC22 Transitpeptid. Maßstäbe = 10 μ m.

4. Diskussion

4.1 Evaluation der Methoden zur Identifizierung von SCC4-Faktoren

Derzeit ist unklar, welche Mechanismen zur Ausbildung, Positionierung und Funktion von C- und P-Chloroplasten in *B. sinuspersici* beitragen. In dieser Arbeit wurden potenzielle Komponenten dieser Mechanismen identifiziert. Dazu wurden zwei parallele Versuchsansätze durchgeführt. Einerseits wurden Chlorenchym (SCC4), Hydrenchym (mutmaßlich C3) und Wurzeln (nicht-photosynthetisch) mittels RNA-Sequenzierung analysiert. Es wurde postuliert, dass an der SCC4-Photosynthese beteiligte Gene im Chlorenchym höher exprimiert sind, als in den anderen untersuchten Geweben. Andererseits wurde die Proteinzusammensetzung der Hüllmembranen von C- und P-Chloroplasten durch Massenspektrometrie analysiert und verglichen. In diesem Fall wurde postuliert, dass die Hüllmembranen differenziell abundante Proteine enthalten, die in Proteinimport und Chloroplastenbewegung involviert sind. Bisherige Studien haben gezeigt, dass andere SCC4-Proteine unterschiedlich häufig in den beiden Chloroplastentypen vorkommen (Offermann et al. 2011; Offermann et al. 2015).

Zunächst wurde das Expressionsmuster von bekannten SCC4- und C3-Genen in Chlorenchym, Hydrenchym und Wurzeln untersucht. Diese Gene wurden bereits in einer früheren Studie identifiziert (Offermann et al. 2015). Es wurde gezeigt, dass die Kern-C4 Gene *pepc*, *ppdk*, *nad-me* und *ala-at* zwischen dem Chlorenchym und den übrigen Geweben einen höheren Expressionsunterschied aufweisen, als die C3-Gene (siehe 3.2). Der Expressionsunterschied der übrigen C4-Gene hingegen, liegt im selben Bereich wie bei den C3-Genen. In früheren Studien wurde ermittelt, dass die Kern-C4 Gene starke Expressionsunterschiede zwischen C3- und C4-Spezies aufweisen, während sich die Expression der übrigen C4-Gene häufig nicht unterscheidet (Bräutigam et al. 2011). Dies bedeutet, dass eine Unterscheidung bisher bekannter C4- und C3-Gene anhand der Daten dieser Arbeit nur bei den Kern-C4 Genen möglich ist.

Anhand des Expressionsmusters der Kern-C4 Gene in Chlorenchym, Hydrenchym und Wurzeln wurden Filterkriterien zur Identifizierung von bislang unbekanntem potenziellen SCC4-Genen ermittelt (siehe 3.2.1). Es wurden 77 Gene identifiziert, die potenziell in die SCC4-Photosynthese involviert sind (siehe 3.2.2). Darunter befinden sich u.a. Gene photosynthetischer Proteine sowie Transkriptionsfaktoren und Co-Chaperone. Auch in bisherigen Studien konnten zuvor unbekannte C4-Gene anhand ihrer Co-Expression zu Kern-C4 Genen identifiziert werden (Bräutigam et al. 2011; Gowik et al. 2011).

Durch die Analyse der Hüllmembranproteine von C- und P-Chloroplasten mittels Massenspektrometrie wurden 13 Proteine identifiziert, die in den beiden Chloroplastentypen unterschiedlich häufig vorkommen (siehe 3.3.4). Darunter befinden sich u.a. Untereinheiten

von Proteinimportkomplexen sowie Metabolitransporter. Des Weiteren wurden zytoplasmatische Proteine identifiziert, die möglicherweise bevorzugt in räumlicher Nähe eines Chloroplastentyps lokalisiert sind. Auch durch Studien an Kranz-C4 Spezies, konnten an der C4-Photosynthese beteiligte Hüllmembranproteine anhand unterschiedlicher Abundanzen in BSZ und MZ identifiziert werden (Majeran et al. 2008; Manandhar-Shrestha et al. 2013).

Die beiden in dieser Arbeit durchgeführten Versuchsansätze zur Identifizierung von SCC4-Faktoren, ergaben allerdings jeweils unterschiedliche Kandidaten. Die durch Massenspektrometrie identifizierten Hüllmembranproteine zeigen nicht das Expressionsmuster der Kern-C4 Gene (siehe Anhang: Tabelle 20). Dies könnte bedeuten, dass die vermutete Beteiligung dieser Hüllmembranproteine an der SCC4-Photosynthese zwar eine unterschiedliche Häufigkeit in C- und P-Chloroplasten, jedoch keine Erhöhung der Expression erfordert. Auch in Kranz-C4 Spezies zeigen C4-Gene oft keine höhere Expression zu C3-Spezies (Bräutigam et al. 2011; Gowik et al. 2011). Somit stellen die beiden in dieser Arbeit durchgeführten Versuchsansätze unabhängige Verfahren dar, die nicht zwangsläufig übereinstimmende Ergebnisse liefern müssen.

4.2 C- und P-Chloroplasten enthalten unterschiedlich aufgebaute Proteinimportkomplexe

Chloroplasten sind auf den Import kerncodierter Proteine aus dem Zytoplasma angewiesen. Dabei sind die Komplexe des Proteinimportapparates (TOC und TIC) von entscheidender Bedeutung (Paila et al. 2014; Chotewutmotri et al. 2017). Es wurde gezeigt, dass die beiden Chloroplastentypen von *B. sinuspersici* unterschiedliche kerncodierte Proteine enthalten (Offermann et al. 2011; Offermann et al. 2015). Des Weiteren wurde gezeigt, dass einige Proteine spezifisch in einen Chloroplastentyp importiert werden (Wimmer et al. 2017). In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob bestimmte Untereinheiten der TOC- und TIC-Komplexe unterschiedlich häufig in C- und P-Chloroplasten vorkommen. Dazu wurde die Proteinzusammensetzung isolierter Hüllmembranen durch Massenspektrometrie analysiert. Es wurde ermittelt, dass TOC159, TIC214 und TIC22 unterschiedlich häufig in C- und P-Chloroplasten vorkommen. Des Weiteren wurde die Expression der ermittelten Kandidaten während der Blattentwicklung, sowie vergleichend in Chlorenchym und Wurzeln untersucht. Zusammen mit TOC132, stellt TOC159 den primären Rezeptor für Pre-Proteine am TOC-Komplex dar (Bauer et al. 2000). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass TOC159 in den C-Chloroplasten höher abundant ist als in den P-Chloroplasten, während TOC132 in beiden Chloroplastentypen gleich häufig vorkommt (siehe 3.3.4). Dieses Ergebnis impliziert ein unterschiedliches Verhältnis von TOC159 zu TOC132 in den beiden Chloroplastentypen. Dies

könnte darauf hinweisen, dass diese Rezeptoren am differenziellen Import kerncodierter Proteine in C- und P-Chloroplasten beteiligt sind. Auch in *A. thaliana* wird der selektive Import verschiedener Proteine in unterschiedliche Plastidentypen wahrscheinlich durch das Verhältnis von TOC159 zu TOC132 reguliert (Bauer et al. 2000; Ivanova et al. 2004; Inoue et al. 2010). Ursprünglich wurde angenommen, dass TOC159 einen spezifischen Rezeptor für photosynthetische Proteine darstellt, während TOC132 den Import von nicht-photosynthetischen Proteinen steuert (Bauer et al. 2000; Ivanova et al. 2004; Smith et al. 2004). Neuere Studien zeigen jedoch, dass die beiden Rezeptoren zwar spezifisch für bestimmte Proteine sind, jedoch beide sowohl den Import photosynthetischer als auch nicht-photosynthetischer Proteine regulieren (Bishof et al. 2011; Dutta et al. 2014). Des Weiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Expression von *toc159* während der Blattentwicklung signifikant ansteigt (siehe 3.4). Dies deutet ebenfalls auf eine Beteiligung an der SCC4-Photosynthese hin. Bisherigen Studien haben ergeben, dass die Entwicklung der SCC4-Morphologie graduell verläuft und das SCC4-Gene dabei eine ansteigende Expression aufweisen (Lara et al. 2008; Park et al. 2009). Die Ergebnisse anderer Studien sprechen jedoch gegen eine Beteiligung von TOC159 an der SCC4-Photosynthese. Western-Blot Analysen verschiedener Stadien der Blattentwicklung von *B. sinuspersici* haben ergeben, dass TOC159 bereits vor Ausbildung der SCC4-Morphologie seine maximale Abundanz erreicht hat (Lung & Chuong 2012). Aufgrund dieser uneinheitlichen Ergebnisse sind weitere Untersuchungen zum Expressionsmuster von *toc159* nötig. Es wurde zudem ermittelt, dass *toc159* im Chlorenchym höher als in den Wurzeln exprimiert ist. *Toc132* zeigt hingegen keinen signifikanten Expressionsunterschied zwischen den beiden Geweben (siehe 3.5). Auch in *A. thaliana* wird *toc159* überwiegend in photosynthetischen Geweben, *toc132* hingegen auch in heterotrophen Geweben exprimiert. (Kubis et al. 2004; Yu et al. 2001). Es wird vermutet, dass die Expression der beiden Rezeptoren mit der Differenzierung von Plastiden in photosynthetischen und heterotrophen Geweben in Verbindung steht. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen somit, dass die gewebsspezifische Expression von TOC-Rezeptoren in *B. sinuspersici* der in anderen Pflanzenarten entspricht. Zusammenfassend, spricht das unterschiedliche Verhältnis von TOC159 und TOC132 in C- und P-Chloroplasten dafür, dass die primären TOC-Rezeptoren am differenziellen Import von Proteinen in C- und P-Chloroplasten beteiligt sind. Die ansteigende Expression von TOC159 während der Blattentwicklung ist ein zusätzliches Indiz für dessen Beteiligung an der SCC4-Photosynthese.

TIC214 ist die einzige derzeit bekannte plastidär codierte Untereinheit des Proteinimportapparates. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass TIC214 höher abundant in den P-Chloroplasten ist (siehe 3.3.4). Dies deutet darauf hin, dass TIC214 eine Funktion im Rahmen der SCC4-Photosynthese erfüllt. Auch in anderen Pflanzenarten ist die Funktion von TIC214 bislang nicht aufgeklärt. Durch Stammbaumanalysen wurde gezeigt, dass das Protein nur in den Chlorophyta vorkommt. In primitiven Taxa wie Cyanobakterien und Archaeplastida fehlt es hingegen. Dies deutet darauf hin, dass TIC214 nicht-plastidären Ursprungs ist und erst nach der Endosymbiose in das Plastom integriert wurde (De Vries et al. 2015). Es konnte bisher nicht gezeigt werden, dass TIC214 direkt am Import kerncodierter Proteine in Chloroplasten beteiligt ist. Zudem konnte bislang keine Interaktion mit Transitpeptiden festgestellt werden. Die Ergebnisse neuester Studien zeigen allerdings, dass TIC214 die Expression plastidär codierter Gene induziert und so die Biogenese von NDH, PS1 und CytB6f-Komplex steuert (Yang et al. 2016). Dabei wird die Expression von *tic214* durch das kernkodierte Protein PBR1 induziert. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression von *tic214* während der Blattentwicklung ansteigt und somit eine Co-Expression zu plastidär codierten Genen der Lichtreaktion zeigt (siehe 3.4). Dies könnte bedeuten, dass TIC214 auch in *B. sinuspersici* an der Biogenese von Komplexen der Thylakoidmembran beteiligt ist. Es wurde gezeigt, dass sich C- und P-Chloroplasten im Hinblick auf die Komponenten der Lichtreaktion unterscheiden (Offermann et al. 2015). Komponenten des NDH-Komplexes sind häufiger in den P-Chloroplasten, während Untereinheiten von PSII in den C-Chloroplasten häufiger vorkommen. Die unterschiedliche Abundanz von TIC214 in den beiden Chloroplastentypen von *B. sinuspersici* könnte folglich bedeuten, dass es die Expression plastidär codierter Untereinheiten der Lichtreaktion reguliert. TIC214 könnte somit eine Rolle bei der Differenzierung von C- und P-Chloroplasten spielen.

Die Analyse der Hüllmembranen von *B. sinuspersici* hat außerdem gezeigt, dass TIC22-IV häufiger in den P-Chloroplasten vorkommt (siehe 3.3.4). Dies könnte bedeuten, dass TIC22-IV an der SCC4-Photosynthese beteiligt ist. Bisherige Studien zur Funktion von TIC22-IV haben ergeben, dass es im Intermembranraum lokalisiert ist und wahrscheinlich als molekulares Chaperon beim Proteinimport fungiert (Glaser et al. 2012; Kasmati et al. 2013). Es ist derzeit nicht geklärt, ob TIC22-IV einen regulativen Einfluss auf den Proteinimport in Chloroplasten hat. Es interagiert allerdings mit den Transitpeptiden von Pre-Proteinen (Kouranov & Schnell 1997). Es wird vermutet, dass TIC22-IV während des Proteinimports an einer Verbindung zwischen TOC- und TIC-Komplex beteiligt ist (Qbadou et al. 2007). Ob diese Funktionen im Zusammenhang mit der Regulation des Proteinimports stehen, ist allerdings nicht bekannt.

Zudem konnte gezeigt werden, dass *tic22-IV* während der Blattentwicklung von *B. sinuspersici* stabil exprimiert wird (siehe 3.4) was darauf hindeutet, dass es bereits vor der Etablierung der SCC4-Morphologie von Bedeutung ist. Dieser Befund spricht gegen eine Beteiligung an der SCC4-Photosynthese. Letztlich ist die differenzielle Abundanz von TIC22-IV in C- und P-Chloroplasten von *B. sinuspersici* ein Hinweis darauf, dass das Protein in die SCC4-Photosynthese involviert ist. Die hohe Expression vor der Etablierung der SCC4-Morphologie spricht jedoch dagegen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der Proteinimportapparat der beiden Chloroplastentypen von *B. sinuspersici* unterschiedlich zusammengesetzt ist. Die Resultate deuten darauf hin, dass die TOC-Komplexe ein unterschiedliches Verhältnis von TOC159 zu TOC132 aufweisen. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis auf unterschiedliche Substratspezifität der TOC-Komplexe in den beiden Chloroplastentypen. Des Weiteren wurden mit TIC214 und TIC22-IV zwei weitere Komponenten des Proteinimportapparates identifiziert, die unterschiedlich abundant in C- und P-Chloroplasten und damit möglicherweise an der SCC4-Photosynthese beteiligt sind. Auch in Kranz-C4 Spezies ist der Proteinimportapparat in den Chloroplasten der Mesophyll- und Bündelscheidenzellen unterschiedlich zusammengesetzt. In Mais zeigen TIC110, TIC40 und TIC21 höhere Abundanz in den Bündelscheidenchloroplasten (Majeran et al. 2008). Die Autoren begründen dies mit einer höheren Importaktivität in den Chloroplasten der Bündelscheidenzellen. Allerdings haben die Studien des Importapparates in Kranz-C4 Spezies bisher keine unterschiedliche Abundanz von TOC-Rezeptoren in MZ und BSZ gezeigt. In Kranz-C4 Spezies findet die C4-Photosynthese in zwei verschiedenen Zelltypen statt. Dies ermöglicht die Zelltyp-spezifische Expression von C4-Genen und macht den selektiven Proteinimport, und damit verschiedene TOC-Rezeptoren, unnötig.

4.3 CC-spezifisch lokalisierte Proteine sind möglicherweise an der selektiven Chloroplastenbewegung beteiligt

Pflanzenzellen haben die Fähigkeit, die Position ihrer Chloroplasten abhängig von den vorherrschenden Lichtbedingungen zu verändern (Zurzycki et al. 1955). Die Chlorenchymzellen von *B. sinuspersici* reagieren auf Schwachlicht mit der Bewegung des Zentralkompartiments in Richtung der Lichtquelle, während die P-Chloroplasten ihre Position beibehalten (Lara et al. 2008; Park et al. 2009). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass Chlorenchymzellen von *B. sinuspersici* über einen Mechanismus verfügen, der die Bewegung des CC unabhängig von den P-Chloroplasten ermöglicht.

In dieser Arbeit wurde nach Proteinen gesucht, die in die Chloroplastenbewegung in *B. sinuspersici* involviert sein könnten. In *A. thaliana* sind daran u.a. die zytoplasmatischen Proteine PMI2, WEB1 und Myosin beteiligt (Paves et al. 2006; Luesse et al. 2006; Kodama et al. 2010). Es wurde gezeigt, dass die in dieser Arbeit isolierten Chloroplastenhüllmembranen, unterschiedlich stark mit zytoplasmatischen Proteinen verunreinigt sind (siehe 3.3.4). PMI2, WEB1 und Myosin sind in CC- gegenüber TC-Hüllmembranen angereichert. Des Weiteren zeigt *pmi2* nur sehr geringe Expression in den Wurzeln. Myosin und *web1* zeigen hingegen keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen Wurzeln und Chlorenchym (siehe 3.5). Die Anreicherung in den CC-Hüllmembranen könnte darauf hindeuten, dass PMI2, WEB1 und Myosin *in-vivo* vermehrt in räumlicher Nähe des CC lokalisiert sind und deshalb zusammen mit den Membranen isoliert wurden. Des Weiteren könnte die Anreicherung auf eine Interaktion mit der Hüllmembran der C-Chloroplasten hinweisen. In *A. thaliana* wurden Interaktionen zwischen WEB1 und der Chloroplastenhüllmembran nachgewiesen (Deng et al. 2014). Das in dieser Arbeit ermittelte Expressionsmuster in Chlorenchym und Wurzeln deutet darauf hin, dass PMI2 vorwiegend in photosynthetischen Geweben von Bedeutung ist. Dies konnte auch in *A. thaliana* nachgewiesen werden (Schmid et al. 2005). Das Expressionsmuster von *web1* und *myosin* in *B. sinuspersici* hingegen, lässt auf eine Funktion in photosynthetischen und heterotrophen Geweben schließen. Auch in anderen Pflanzenspezies erfüllen Myosine eine Vielzahl von Funktionen in photosynthetischen und heterotrophen Geweben. Dazu gehört neben der Bewegung von verschiedenen Organellen auch der Transport von Vesikeln. Darüber hinaus sind Myosine an Zellteilung und Wachstum beteiligt (Reddy et al. 2001). Die Funktion von WEB1, außerhalb von photosynthetischen Geweben, wurde allerdings bislang nicht untersucht. Es wird vermutet, dass WEB1 und PMI2 in *A. thaliana* Interaktionen zwischen den Chloroplasten und dem Zytoskelett vermitteln und so in die lichtabhängige Bewegung von Chloroplasten involviert sind. *Knock-out* Mutanten von *pmi2* und *web1* zeigen verlangsamte Chloroplastenbewegung und verminderte Interaktion zwischen Chloroplasten und dem Zytoskelett (Luesse et al. 2006; Kodama et al. 2010). Es wurde zudem gezeigt, dass die Inhibition von Myosin zu einer Verlangsamung der Chloroplastenbewegung führt (Paves et al. 2006). Auch die Chloroplasten von *B. sinuspersici* sind mit dem Zytoskelett assoziiert (Choung et al. 2006; Park et al. 2009). Daher ist das Zytoskelett wahrscheinlich auch hier an der Chloroplastenbewegung beteiligt. Möglicherweise sind PMI2, WEB1 und Myosin in *B. sinuspersici* an der Bewegung des CC beteiligt. Dabei könnten WEB1 und PMI2 die Interaktion zwischen dem CC und dem Zytoskelett regulieren und Myosin als Motorprotein fungieren.

Auch das Hüllmembranprotein OEP7 ist möglicherweise in die Chloroplastenbewegung involviert (Wang et al. 2012). In dieser Arbeit wurde ermittelt, dass OEP7 in *B. sinuspersici* häufiger in den Hüllmembranen der C- als in denen der P-Chloroplasten vorkommt (siehe 3.3.4). Darüber hinaus wurde ermittelt, dass *oep7* während der Blattentwicklung stabil exprimiert ist (siehe 3.4) und nur sehr niedrige Expression in den Wurzeln zeigt (siehe 3.5). Die differenzielle Abundanz in C- und P-Chloroplasten könnte darauf hinweisen, dass OEP7 an der SCC4-Photosynthese beteiligt ist. Das Expressionsmuster von *oep7* während der Blattentwicklung, weist allerdings nicht auf ein SCC4-Gen hin. Die stabile Expression in der Blattentwicklung sowie die niedrige Expression in den Wurzeln von *B. sinuspersici*, gleicht dem Expressionsmuster von *oep7* in *A. thaliana* (Lee et al. 2001; Schmid et al. 2005). Die Funktion von OEP7 ist noch nicht vollständig aufgeklärt. In früheren Studien wurde allerdings gezeigt, dass die Überexpression in *A. thaliana* zu einer veränderten Anordnung des Zytoskeletts und zur Aggregation der Chloroplasten führt. Außerdem zeigten einige Gene, die in die Bewegung von Chloroplasten involviert sind, veränderte Expression (Wang et al. 2012). Dies deutet darauf hin, dass OEP7 an der Organisation des Zytoskeletts und möglicherweise an Chloroplastenbewegung und -interaktion beteiligt ist. Auch in der Kranz-C4 Spezies *Zea mays* wurde die Lokalisation von OEP7 untersucht. Dabei wurde ermittelt, dass das Protein häufiger in den Hüllmembranen von Mesophyllchloroplasten als in Bündelscheidenchloroplasten vorkommt (Majeran et al. 2008). Möglicherweise ist OEP7 an der Bewegung von Mesophyllchloroplasten von *Z. mays* beteiligt. Die erhöhte Abundanz von OEP7 in den C-Chloroplasten von *B. sinuspersici*, könnte auf die Funktion des Proteins bei der Stabilisierung des CC durch Aggregation der Chloroplasten hindeuten. Außerdem könnte OEP7 mit dem Zytoskelett interagieren und so an der Bewegung des CC beteiligt sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die zytoplasmatischen Proteine WEB1, PMI2 und Myosin an der selektiven Bewegung des CC beteiligt sind. Auch das Hüllmembranprotein OEP7 spielt dabei potenziell eine Rolle. Der genaue Mechanismus zur Bewegung des CC und die Funktion der hier identifizierten Proteine bei diesem Prozess müssen in künftigen Studien ermittelt werden.

4.4 Photosynthesegene zeigen im Hydrenchym ein C3-artiges Expressionsmuster

SCC4-Photosynthese wurde bislang ausschließlich in sukkulenten Vertretern der Familie Amaranthaceae (früher: Chenopodiaceae) beobachtet. Zur Speicherung von Wasser sind die Blätter dieser Pflanzenarten mit einem Hydrenchym ausgestattet. Das Hydrenchym enthält Chloroplasten und stellt damit ein potenziell photosynthetisches Gewebe dar

(Voznesenskaya et al. 2005). Bislang gibt es keine Untersuchungen die zeigen, ob das Hydrenchym von SCC4-Spezies tatsächlich photosynthetisch aktiv ist und ob es C3- oder C4-Photosynthese betreibt.

In dieser Arbeit wurde ein Verfahren zur Isolation von Chlorenchym und Hydrenchym aus *B. sinuspersici* entwickelt. Es wurde untersucht, ob das Hydrenchym ein photosynthetisch aktives Gewebe ist. Die Chloroplasten des Hydrenchyms zeigen Autofluoreszenz, was auf das Vorhandensein von Chlorophyll und damit auf photosynthetische Aktivität hindeutet (siehe 3.1.1). Des Weiteren wurde durch RNA-Sequenzierung ermittelt, dass die Expression photosynthetischer Gene im Hydrenchym signifikant höher ist als in den Wurzeln (siehe 3.1.4). Im Vergleich zum Chlorenchym zeigt das Hydrenchym jedoch eine siebenfach niedrigere Gesamtexpression photosynthetischer Gene (siehe 3.1.4). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Hydrenchymzellen von *B. sinuspersici* zwar Photosynthese betreiben, diese jedoch wahrscheinlich schwächer ist als im Chlorenchym. Bereits in früheren Studien wurde untersucht, ob die Hydrenchymzellen anderer sukkulenter Spezies der Familie Amaranthaceae Photosynthese betreiben. In sukkulenten Suaeda-Spezies wurde die Aktivität von RuBisCO im Hydrenchym nachgewiesen (Pyankov et al. 1992). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Hydrenchymchloroplasten von *Salsola laricina* Stärke akkumulieren (Voznesenskaya et al. 1999; Voznesenskaya et al. 2006). Dies zeigt, dass die Hydrenchymzellen sukkulenter Spezies der Familie Amaranthaceae photosynthetisch aktiv sind.

Die mikroskopische Analyse der Hydrenchymzellen von *B. sinuspersici* zeigt, dass diese keine SCC4-Morphologie aufweisen. Stattdessen enthalten sie nur einen optisch unterscheidbaren Chloroplastentyp (siehe 3.1.1). Es wurde daher untersucht, ob die photosynthetische Genexpression im Hydrenchym auf C4- oder C3-Photosynthese hindeutet. In Relation zur photosynthetischen Gesamtexpression, zeigt das Hydrenchym eine niedrigere Expression von C4-Genen, im Besonderen von Kern-C4 Genen, sowie eine niedrigere Expression von Photosystem I und eine höhere Expression photorespiratorischer Gene als das Chlorenchym. Gene der Lichtreaktion und des CBB-Zyklus sind hingegen in beiden Geweben gleich stark exprimiert (siehe 3.1.4). Bisherige Studien zur SCC4-Photosynthese deuten darauf hin, dass die Ausbildung von zwei intrazellulären Kompartimenten und die damit verbundene SCC4-Morphologie, essenzielle Merkmale der SCC4-Photosynthese sind (Offermann et al. 2011; Offermann et al. 2015). Aufgrund der fehlenden SCC4-Morphologie in den Hydrenchymzellen ist es daher unwahrscheinlich, dass diese SCC4-Photosynthese betreiben. Auch Studien an sukkulenten Kranz-C4 Spezies deuten auf C3-Photosynthese in deren Hydrenchymzellen hin. Es wurde ermittelt, dass diese zwar RuBisCO, jedoch kein PEPC enthalten (Shomer-

Ilan et al. 1979; Voznesenskaya et al. 1999; Voznesenskaya et al. 2006). Insgesamt wurden bisher nur wenige Studien durchgeführt, die Rückschlüsse auf die Photosyntheseform von Hydrenchymzellen zulassen. Jedoch wurden durch vergleichende Transkriptomstudien an C3- und C4-Spezies typische Expressionsmuster der beiden Photosyntheseformen ermittelt. In diesen Studien wurde gezeigt, dass die höhere Expression photorespiratorischer Gene charakteristisch für C3-Photosynthese ist. Hohe Expression von C4-Genen und Untereinheiten von Photosystem I hingegen sind typisch für C4-Photosynthese (Bräutigam et al. 2011; Külahoglu et al. 2014). Die geringere Expression von Photosystem I in den Hydrenchymzellen weist auf weniger zyklischen Elektronentransport in der Lichtreaktion hin. Aufgrund des gesteigerten Bedarfs an ATP, ist der zyklische Elektronentransport in der C4-Photosynthese von besonderer Bedeutung (Hatch et al. 1987). Photorespiration wird in C3-Pflanzen benötigt, um durch Fixierung von Sauerstoff entstandenes Phosphoglycolat abzubauen. C4-Pflanzen zeigen hingegen weniger Photorespiration (Dai et al. 1993). Zusammen mit der fehlenden SCC4-Morphologie, deutet das ermittelte Expressionsmuster von C4-Genen sowie Genen der Photorespiration und Photosystem I, auf C3-Photosynthese im Hydrenchym von *B. sinuspersici* hin.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass Hydrenchymzellen wahrscheinlich Photosynthese betreiben. Darüber hinaus deutet die relative Expression verschiedener Gruppen photosynthetischer Gene auf C3-Photosynthese im Hydrenchym hin.

4.5 Die mögliche Funktion potenzieller SCC4-Faktoren

Die Ausbildung zweier intrazellulärer Kompartimente mit unterschiedlichen Chloroplastentypen, ist ein charakteristisches Merkmal der SCC4-Photosynthese. Bislang ist jedoch ungeklärt, welche genetischen Faktoren zur Ausbildung, Funktion und Erhalt der SCC4-Photosynthese führen. In dieser Arbeit wurde die Genexpression in Chlorenchym (SCC4), Hydrenchym (mutmaßlich C3) und Wurzeln (nicht-photosynthetisch) verglichen.

Zunächst wurde gezeigt, dass die meisten in einer früheren Studie identifizierten SCC4-Gene (Offermann et al. 2015) im Chlorenchym höher als im Hydrenchym exprimiert sind (siehe 3.2.1). Die Kern-C4 Gene zeigen dabei einen besonders hohen Expressionsunterschied zwischen den beiden Zelltypen. Bei den übrigen C4-Genen liegt dieser Unterschied niedriger und ist z.T. mit den Genen des CBB-Zyklus vergleichbar. Die Gene mitochondrial lokalisierter C4-Proteine, weisen einen besonders niedrigen Expressionsunterschied zwischen Chlorenchym und Hydrenchym auf. Auch frühere Studien haben gezeigt, dass die Kern-C4 Gene zwischen C3- und C4-Spezies besonders stark unterschiedlich exprimiert sind (Bräutigam et al. 2011;

Gowik et al. 2011). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Gene mitochondrial lokalisierter C4-Proteine kaum Expressionsunterschiede zwischen C3- und C4-Spezies aufweisen (Bräutigam et al. 2011). Dies deutet darauf hin, dass die Expression der Kern-C4 Gene während der Evolution der C4-Photosynthese stark an die veränderten Anforderungen angepasst wurde. Die Expression der Gene mitochondrial lokalisierter C4-Proteine war möglicherweise bereits in C3-Pflanzen ausreichend hoch. Um bislang unbekannte SCC4-Faktoren zu identifizieren, wurde anschließend untersucht, welche Gene einen ähnlich hohen Expressionsunterschied zwischen Chlorenchym und Hydrenchym wie die Kern-C4 Gene aufweisen. Durch Ermittlung des Expressionsunterschiedes zwischen Chlorenchym und Wurzeln wurden zusätzlich nicht-photosynthetische Gene ausgeschlossen. Auf diese Weise wurden Gene identifiziert, die potenzielle SCC4-Faktoren darstellen. Im Folgenden wird die mögliche Funktion einiger dieser Gene diskutiert.

Transkriptionsfaktoren sind u.a. Regulatoren der photosynthetischen Genexpression (Wang et al. 2017). Sie aktivieren regulative Kaskaden und Netzwerke, die letztendlich zur Ausbildung funktionell differenzierter, photosynthetischer Zellen führen. Auch für die Differenzierung der Chlorenchymzellen spielen Transkriptionsfaktoren wahrscheinlich eine wichtige Rolle. Im Chlorenchym exprimierte Transkriptionsfaktoren könnten daher für das Verständnis der genetischen Regulation der SCC4-Photosynthese hilfreich sein. In dieser Arbeit wurden die Transkriptionsfaktoren GNC (*GATA nitrate- inducible carbon metabolism-involved*) und GLK1 (*golden-like1*) in *B. sinuspersici* identifiziert (siehe 3.2.2). Diese Transkriptionsfaktoren zeigen hohe Expression im Chlorenchym, jedoch nur schwache Expression in Hydrenchym und Wurzeln. GNC zählt zur Familie der GATA-Transkriptionsfaktoren, die in *A. thaliana* 29 derzeit bekannte Gene in vier Subfamilien umfasst (Reyes et al. 2004). Die Expression von gnc wird durch Licht aktiviert (Naito et al. 2007). In photosynthetischen Geweben von *A. thaliana* ist gnc hoch exprimiert, wohingegen, es in den Wurzeln nur schwache Expression zeigt (Schmid et al. 2005). Damit gleicht das gewebspezifische Expressionsmuster in *A. thaliana* dem in *B. sinuspersici*. In bisherigen Studien wurde die Funktion von GNC durch Überexpression in *A. thaliana* ermittelt (Chiang et al. 2012; An et al. 2014). Diese führte zur Ausbildung von Chloroplasten in heterotrophen Geweben wie Wurzeln und Hypokotyl. In photosynthetischen Zelltypen war hingegen eine erhöhte Anzahl von Chloroplasten pro Zelle zu beobachten. Des Weiteren waren die Chloroplasten im Vergleich zum Wildtyp größer und enthielten mehr Chlorophyll sowie Grana. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass GNC eine entscheidende Schlüsselrolle bei der Regulation der Chloroplastenentwicklung zukommt. GNC ist möglicherweise ein wichtiger

Regulator bei der Chloroplastengenese in den Chlorenchymzellen von *B. sinuspersici*. Die niedrige Expression im Hydrenchym führt möglicherweise zu verminderter Expression von photosynthetischen Genen oder zur fehlenden SCC4-Morphologie. Ob GNC speziell in der SCC4-Photosynthese eine Rolle spielt, muss allerdings in künftigen Studien aufgeklärt werden. Dies könnte u.a. durch eine stabile Überexpression im Hydrenchym oder durch einen *knock-out* im Chlorenchym untersucht werden. Auch *glk1* zeigt in *B. sinuspersici* hohe Expression im Chlorenchym, jedoch sehr schwache in Hydrenchym und Wurzeln (siehe 3.2.2). Auch in *A. thaliana* ist *glk1* vorwiegend in photosynthetischen Geweben exprimiert (Schmid et al. 2005). Ähnlich wie GNC, reguliert GLK1 in *A. thaliana* die photosynthetische Genexpression. Es wurde gezeigt, dass GLK1 die Expression von Genen der Chlorophyllsynthese und der Lichtreaktion induziert (Waters et al. 2009). Die Expression von *glk1* in den Wurzeln führte zur Ausbildung von Chloroplasten (Kobayashi et al. 2013). Dies zeigt, dass GLK1, ähnlich wie GNC, eine Schlüsselrolle bei der Chloroplastengenese spielt. In *B. sinuspersici* könnte GLK1 somit ein Faktor bei der Differenzierung von Chlorenchym und Hydrenchym sein. In Kranz-C4 Spezies ist GLK1 an der Differenzierung von Mesophyll- und Bündelscheidenzellen beteiligt und reguliert die Expression bündelscheidenspezifischer photosynthetischer Gene (Langdale et al. 1994). Dementsprechend ist *glk1* in C4-Pflanzen höher exprimiert als in vergleichbaren C3-Spezies (Bräutigam et al. 2011). Die höhere Expression im Chlorenchym von *B. sinuspersici* könnte darauf hinweisen, dass GLK1 die für die SCC4-Photosynthese notwendige Genexpression reguliert. Anders als in Kranz-C4 Spezies, basiert die SCC4-Photosynthese jedoch auf intrazellulärer Kompartimentierung und kann somit nicht allein durch gewebsspezifische Genexpression erklärt werden. Es ist somit fraglich, ob GLK1 in *B. sinuspersici* dieselbe Funktion hat wie in Kranz-C4 Spezies. Die hohe Expression im Chlorenchym könnte auch bedeuten, dass SCC4-Spezies diesen Mechanismus der Expressionsregulation von evolutionären Vorläufern übernommen haben. Dies könnte darauf hindeuten, dass die SCC4-Photosynthese phylogenetisch aus der Kranz-C4 Photosynthese hervorgegangen ist. Studien zur Phylogenie der Amarantaceae lassen allerdings darauf schließen, dass sich die SCC4-Photosynthese innerhalb der Gattung *Bienertia* direkt aus C3-Vorläufern entwickelt hat (Christin et al. 2011; Kadereit et al. 2012).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass einige Untereinheiten von Thylakoidkomplexen im Chlorenchym hoch, im Hydrenchym jedoch nur schwach exprimiert sind (siehe 3.2.2). Es handelt sich dabei um Untereinheiten von Photosystem I, Photosystem II, der Lichtsammelkomplexe sowie des NADH-Dehydrogenase Komplexes. Generell deutet dies auf eine unterschiedliche Architektur der Thylakoidkomplexe und auf abweichende physiologische

Prozesse bei der Lichtreaktion in den beiden Geweben hin. Auch bisherige Studien haben gezeigt, dass sich die Chloroplasten verschiedener photosynthetischer Gewebe in Bezug auf die Zusammensetzung der Thylakoidkomplexe unterscheiden können (Majeran et al. 2008). Die in dieser Arbeit ermittelten Unterschiede zwischen Chlorenchym und Hydrenchym, könnten mit dem unterschiedlichen Energiebedürfnis von C3- und C4-Photosynthese zusammenhängen. Es wurde ermittelt, dass C4-Pflanzen zusätzliches ATP zur Regeneration von Phosphoenolpyruvat benötigen und daher mehr zyklischen Elektronentransport betreiben als C3-Pflanzen (Hatch et al. 1987). Dementsprechend wurde in C4-Pflanzen eine veränderte Zusammensetzung von Thylakoidkomplexen festgestellt. Besonders betroffen sind Untereinheiten von Photosystem I und des NADH-Dehydrogenase Komplexes (Bräutigam et al. 2011). Möglicherweise sind die unterschiedlichen Thylakoidkomplexe in Chlorenchym und Hydrenchym auf veränderte Spektraleigenschaften des Lichts im Inneren der Blätter von *B. sinuspersici* zurückzuführen. Es wurde gezeigt, dass Licht, welches die inneren Blattgewebe erreicht, einen höheren Anteil an grünem und Infrarotlicht enthält, als an der Blattoberfläche (Terashima et al. 1983). Dementsprechend weisen z.B. die Thylakoidkomplexe im Schwammparenchym von Spinat, andere Zusammensetzungen und physiologische Eigenschaften auf, als es im darüber liegenden Palisadenparenchym der Fall ist (Terashima et al. 1985). Ähnliche Anpassungen wurden in Licht- und Schattenblättern von *Fagus sylvatica* festgestellt (Lichtenthaler et al. 1981). Im Rahmen dieser Arbeit kann allerdings nicht abschließend beurteilt werden, ob die unterschiedlichen Thylakoidkomplexe in Chlorenchym und Hydrenchym durch die unterschiedliche Photosyntheseform oder die Lichteigenschaften in den beiden Geweben begründet sind.

Die Chaperone HSP70 und HSP90 sind wichtige Komponenten des subzellulären Proteintransportes in Pflanzenzellen. Sie bilden Proteinkomplexe durch Interaktion mit verschiedenen Co-Chaperonen (Meiri et al. 2009; Paila et al. 2014). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Co-Chaperone rof1 und rof2 im Chlorenchym höher als in Hydrenchym und Wurzeln exprimiert sind (siehe 3.2.2). In *A. thaliana* sind rof1 und rof2 hingegen auch in den Wurzeln exprimiert (Schmid et al. 2005; Aviezer-Hagai et al. 2007). ROF1 und ROF2 verfügen über eine TPR-Domäne, welche Protein-Protein-Interaktion vermittelt (Prasad et al. 2010). In früheren Studien wurde gezeigt, dass beide Proteine in *A. thaliana* mit HSP90 im Zytoplasma interagieren (Meiri et al. 2009; Meiri et al. 2010). Die hohe Expression von rof1 und rof2 im Chlorenchym von *B. sinuspersici*, deutet möglicherweise auf das Vorkommen von Chlorenchym-spezifischen Mechanismen zum subzellulären Proteintransport hin.

Chloroplastenhüllmembranproteine erfüllen wichtige Funktionen wie z.B. den Austausch von Metaboliten zwischen dem Stroma und dem Zytoplasma. Des Weiteren sind sie am Transport kerncodierter Proteine in die Chloroplasten beteiligt. In dieser Arbeit wurden durch Massenspektrometrie 77 Hüllmembranproteine identifiziert (siehe 3.3.2). Durch vergleichende Transkriptomanalyse in Chlorenchym, Hydrenchym und Wurzeln wurde untersucht, ob diese Hüllmembranproteine in die SCC4-Photosynthese involviert sein könnten. Es ist jedoch keines der identifizierten Hüllmembranproteine in der Kandidatenliste potenzieller SCC4-Gene vertreten (siehe 3.2.2). Stattdessen zeigen die Ergebnisse, dass sich die Expression der meisten Hüllmembranproteine in Chlorenchym, Hydrenchym und Wurzeln kaum unterscheidet (siehe Anhang: Tabelle 20). Einige zeigen allerdings einen höheren Expressionsunterschied zwischen Chlorenchym, Hydrenchym und Wurzeln als die übrigen Hüllmembranproteine. Beispiele hierfür sind die Transportproteine BASS2 und PPT sowie TIC62. Nach dem derzeitigen Modell zur Biochemie der SCC4-Photosynthese importiert BASS2 Pyruvat in die P-Chloroplasten, während PPT Phosphoenolpyruvat exportiert (Offermann et al. 2011; Offermann et al. 2015). TIC62 ist in der inneren Chloroplastenhüllmembran lokalisiert und wahrscheinlich am Import kerncodierter Proteine beteiligt. Es wird vermutet, dass es den Proteinimport in Abhängigkeit vom Redoxzustand der Chloroplasten reguliert. Dies wurde durch Studien an *A. thaliana* ermittelt (Küchler et al. 2002; Stengel et al. 2008). Die erhöhte Expression im Chlorenchym deutet möglicherweise auf mehr redoxabhängigen Proteinimport im Vergleich zum Hydrenchym hin. Bisher wurde TIC62 nicht mit der C4-Photosynthese in Verbindung gebracht. Proteomische Untersuchungen zeigten sogar eine höhere Abundanz von TIC62 in C3- als in C4-Pflanzen (Bräutigam et al. 2008). In *B. sinuspersici* wurde allerdings ermittelt, dass C- und P-Chloroplasten unterschiedliche Redoxzustände aufweisen (Rosnow et al. 2014). Möglicherweise spielt der redoxabhängige Proteinimport durch TIC62 eine Rolle beim selektiven Proteintransport in C- und P-Chloroplasten. Bisher wurde allerdings nicht gezeigt, dass TIC62 in den beiden Chloroplastentypen unterschiedlich häufig vorkommt. Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass sich die Chloroplastenhüllmembranen von Chlorenchym und Hydrenchym, im Hinblick auf Metabolittransport und Proteinimport unterscheiden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, welche Gene in *B. sinuspersici* gewebsspezifische Co-Expression mit Kern-C4 Genen aufweisen. Diese Gene sind möglicherweise in die SCC4-Photosynthese involviert. Die weitere Charakterisierung dieser Kandidaten könnte künftig dazu beitragen die physiologischen und regulativen Prozesse der SCC4-Photosynthese besser zu verstehen.

4.6 Der subzelluläre Transport von Chloroplastenhüllmembranproteinen

Chloroplasten sind wahrscheinlich durch die Endosymbiose ehemals freilebender photosynthetischer Bakterien mit Wirtszellen entstanden (Mereschkowsky et al. 1905). Im Zuge dieser Symbiose wurde ein Großteil des Genoms der Chloroplasten in den Zellkern verlagert (Bruce 2000). Die Translation der entsprechenden Proteine erfolgt im Zytoplasma, gefolgt vom Transport in die Chloroplasten. In *B. sinuspersici* ist darüber hinaus der selektive Transport in zwei verschiedene Chloroplastentypen erforderlich. In dieser Arbeit wurde der subzelluläre Transport von Hüllmembranproteinen durch Expression von GFP-Fusionsproteinen in Protoplasten untersucht. Es wurden die zuvor durch Massenspektrometrie identifizierten differenziell in C- und P-Chloroplasten abundanten Kandidaten verwendet (siehe 3.3.4).

Es wurde untersucht, ob die Fusionsproteine in die Chloroplastenhüllmembran von *B. sinuspersici* transportiert werden und ob dieser Transport selektiv in C- oder P-Chloroplasten erfolgt. Bei BASS2, FAX2, FAX3, OEP7 und YGGT waren die Fusionsproteine in der Chloroplastenhüllmembran lokalisiert (siehe 3.6). Das GFP wurde bei den genannten Kandidaten mit dem C-Terminus des Proteins fusioniert. Daher wiesen die Fusionsproteine einen freien N-Terminus auf. Es ist somit wahrscheinlich, dass der Transport von BASS2, FAX2, FAX3, OEP7 und YGGT in die Chloroplastenhüllmembran durch den N-Terminus vermittelt wird. Der subzelluläre Transport der in dieser Arbeit untersuchten Proteine wurde bereits in früheren Studien analysiert. Es wurde gezeigt, dass die Insertion von BASS2 in die Hüllmembran von *A. thaliana*, wahrscheinlich durch ein N-terminales Transitpeptid vermittelt wird (Furomoto et al. 2011). Auch der Transport von FAX2 und FAX3 erfolgt in *A. thaliana* über ein N-terminales Transitpeptid (Li et al. 2014). Es wird zudem vermutet, dass die Insertion von OEP7 durch die Interaktion einer N-terminalen Erkennungssequenz mit dem Chaperon AKR2 Co-translational erfolgt (Kim et al. 2015). OEP7 ist damit eines der wenigen Proteine der äußeren Hüllmembran, deren Insertion durch den N-Terminus vermittelt wird. In dieser Arbeit wurde darüber hinaus der subzelluläre Transport von TOC159 untersucht. Im Gegensatz zu den übrigen untersuchten Kandidaten wurde das GFP bei TOC159 mit dem N-Terminus des Proteins fusioniert. Somit wies das Fusionsprotein einen freien C-Terminus auf. Auch bei TOC159 war die Lokalisation des Fusionsproteins in der Chloroplastenhüllmembran zu beobachten (siehe 3.6). Dies deutet darauf hin, dass der C-Terminus von TOC159 die Insertion in die Membran vermittelt. Bereits in früheren Studien an *B. sinuspersici* wurde der subzelluläre Transport von TOC159 untersucht (Lung et al. 2012; Lung et al. 2014). Übereinstimmend mit der vorliegenden Arbeit deuten diese Studien darauf hin, dass der Transport von TOC159 durch

den C-Terminus vermittelt wird. Im Gegensatz zu den übrigen untersuchten Kandidaten, war bei TIC22 keine Lokalisation in der Chloroplastenhüllmembran, sondern die Akkumulation des Fusionsproteins im Zytoplasma, zu beobachten (siehe 3.6). Auch in früheren Studien mit TIC22-Fusionsproteinen wurde kein Transport in die Hüllmembran beobachtet. Es wird vermutet, dass der Grund dafür die Maskierung regulativer Sequenzen oder die sterische Hinderung durch das Reporterprotein ist (Kasmati et al. 2013). *In-vitro* Lokalisationsstudien ohne Reporterprotein zeigten hingegen den Transport des Proteins in den Intermembranraum (Kouranov et al. 1999; Vojta et al. 2007). Dies deutet darauf hin, dass bei TIC22 ein freier N-Terminus nicht hinreichend für den subzellulären Transport ist.

Ein selektiver Transport zu C- oder P-Chloroplasten konnte jedoch bei keinem der untersuchten Hüllmembranproteine beobachtet werden. Stattdessen war das GFP-Signal bei allen untersuchten Kandidaten in beiden Chloroplastentypen lokalisiert (siehe 3.6). Auch die verwendete Positivkontrolle (BASS2) wurde in beide Chloroplastentypen transportiert. In früheren Studien wurde jedoch ermittelt, dass BASS2 häufiger in den P- als in den C-Chloroplasten vorkommt (Offermann et al. 2011; Offermann et al. 2015). Dies zeigt, dass die Ergebnisse von Massenspektrometrie und GFP-Lokalisation nicht zwangsläufig übereinstimmen. Ein systematischer Vergleich der beiden Verfahren hat gezeigt, dass sie lediglich für 20 % der untersuchten Proteine übereinstimmende Ergebnisse liefern (Heazlewood et al. 2017). Die Ursache liegt u.a. in der Behinderung des Proteintransportes durch das fusionierte Reporterprotein. Ein weiterer Grund für die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Massenspektrometrie und der GFP-Lokalisation in dieser Arbeit, könnte das Entwicklungsstadium der verwendeten Protoplasten sein. Es wurde gezeigt, dass der selektive Transport in C- und P-Chloroplasten generell nur innerhalb begrenzter Zeiträume der Chlorenchymzellentwicklung stattfindet (Wimmer et al. 2017). Letztlich könnten die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Verfahren auch bedeuten, dass es sich bei den in dieser Arbeit identifizierten differenziell abundanten Hüllmembranproteinen, um falsch-positive Kandidaten handelt. Dagegen spricht allerdings, dass die Daten Übereinstimmungen mit den Ergebnissen vorheriger Studien zeigen. Zwei Beispiele dafür sind BASS2 und NDH1. Beide Proteine zeigen sowohl in dieser Arbeit, als auch in bisherigen Studien (Offermann et al. 2011; Offermann et al. 2015) höhere Abundanz in den P-Chloroplasten. Bisher sind keine C-Chloroplast-spezifischen Hüllmembranproteine bekannt, die hier als Kontrolle angeführt werden können. Die in dieser Arbeit isolierten Hüllmembranen von C-Chloroplasten zeigen allerdings ein hohes Maß an Kontamination mit mitochondrialen Membranproteinen (siehe 3.3.4). Es wurde bereits gezeigt, dass sich ein Großteil der Mitochondrien im CC befindet

(Chuong et al. 2006; Lung et al. 2010; Offermann et al. 2011). Die Kontamination mit mitochondrialen Membranproteinen deutet damit indirekt auf die Anreicherung von C-Chloroplasten hin. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die Untersuchung des subzellulären Transportes von Hüllmembranproteinen durch GFP-Fusion möglich ist. Um zu ermitteln, ob und wie diese Proteine selektiv in C- oder P-Chloroplasten transportiert werden, sind weiterführende Studien essentiell.

4.7 Fazit

Die vorliegende Arbeit bietet neue Einblicke in die zellbiologischen Mechanismen der SCC4-Photosynthese von *B. sinuspersici*. Es wurde ein Protokoll etabliert, welches die proteomische Untersuchung der Chloroplastenhüllmembran einer SCC4-Spezies ermöglicht. Die Ergebnisse zeigen, dass einige Untereinheiten von TOC- und TIC-Komplexen unterschiedlich häufig in C- und P-Chloroplasten vorkommen. Diese Untereinheiten sind möglicherweise am differenziellen Import photosynthetischer Proteine in den beiden Chloroplastentypen beteiligt. Des Weiteren deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die selektive, lichtabhängige Bewegung des CC durch zytoplasmatische Proteine ermöglicht wird, die in dessen räumlicher Nähe lokalisiert sind. In künftigen Studien kann die Funktion dieser Kandidaten, z.B. durch die Analyse von Mutanten weiter spezifiziert werden.

Es wurde gezeigt, dass die Hydrenchymzellen ein C3-artiges Expressionsmuster photosynthetischer Gene aufweisen. Durch den Vergleich der Transkriptome von Chlorenchym und Hydrenchym konnten spezifische SCC4-Gene identifiziert werden. Es handelt sich dabei u.a. um physiologisch relevante Gene, z.B. der Lichtreaktion und Gene mit regulativer Funktion, wie z.B. Transkriptionsfaktoren. Diese Kandidaten sind vielversprechende Objekte künftiger Studien. Die Ergebnisse dieser Arbeit bieten damit die Basis für die weitere Erforschung der SCC4-Photosynthese von *B. sinuspersici*.

Literaturverzeichnis

Akhani H; Barroca J; Koteyeva N; Voznesenskaya E; Franceschi V; Edwards G; Ghaffari S; Ziegler H (2005): *Bienertia sinuspersici* (Chenopodiaceae): A new species from southwest asia and discovery of a third terrestrial C4 plant without kranz anatomy. In: *Systematic Botany* 30, S. 290–301.

Akhani H; Chatrevoor T; Dehghani M; Khoshravesh R; Mahdavi P; Matinzadeh Z (2012): A new species of *Bienertia* (Chenopodiaceae) from iranian salt deserts. A third species of the genus and discovery of a fourth terrestrial C4 plant without kranz anatomy. In: *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* 4, S. 1–10.

Altschul S; Gish W; Miller W; Myers E; Lipman D (1990): Basic local alignment search tool. In: *Journal of Molecular Biology* 215, S. 403–410.

Amos G; Tewari K; Kumar D; Weiliang C; Mukherjee S (1999): Isolation and characterisation of the cDNA encoding a glycosylated accessory protein of pea chloroplast DNA polymerase. In: *Nucleic Acids Research* 27, S. 3120–3129.

An Y; Han X; Tang S; Xia X; Yin W (2014): Poplar GATA transcription factor PdGNC is capable of regulating chloroplast ultrastructure, photosynthesis, and vegetative growth in *Arabidopsis* under varying nitrogen levels. In: *Plant Cell Tiss Organ Cult* 119, S. 313–327.

Anderson L (1971): Chloroplast and cytoplasmic enzymes. In: *Biochim. Biophys. Acta* 235, S. 237–244.

Ashburner M; Ball C; Blake J; Botstein D; Butler H; Cherry J; Davis A; Dolinski K; Dwight S; Eppig J; Harris M; Hill D; Issel-Tarver L; Kasarskis A; Lewis S; Matese J; Richardson J; Ringwald M; Rubin G; Sherlock G (2000): Gene ontology. Tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. In: *Nature genetics* 25, S. 25–29.

Aviezer-Hagai K; Skovorodnikova J; Galigniana M; Farchi-Pisanty O; Maayan E; Bocovza S; Efrat Y; Koskull-Döring P von; Ohad N; Breiman A (2007): *Arabidopsis* immunophilins ROF1 (AtFKBP62) and ROF2 (AtFKBP65) exhibit tissue specificity, are heat-stress induced, and bind HSP90. In: *Plant molecular biology* 63, S. 237–255.

Bauer J; Chen K; Hiltbunner A; Wehrli E; Eugster M; Schnell D; Kessler F (2000): The major protein import receptor of plastids is essential for chloroplast biogenesis. In: *Nature* 403, S. 203–207.

Bischof S; Baerenfaller K; Wildhaber T; Troesch R; Vidi P-A; Roschitzki B; Hirsch-Hoffmann M; Hennig L; Kessler F; Gruissem W; Baginsky S (2011): Plastid proteome assembly without Toc159. Photosynthetic protein import and accumulation of N-acetylated plastid precursor proteins. In: *The Plant cell* 23, S. 3911–3928.

Bolger A; Lohse M; Usadel B (2014): Trimmomatic. A flexible trimmer for Illumina sequence data. In: *Bioinformatics* 30, S. 2114–2120.

Bräutigam A; Hoffmann-Benning S; Hofmann-Benning S; Weber A (2008): Comparative proteomics of chloroplast envelopes from C3 and C4 plants reveals specific adaptations of the plastid envelope to C4 photosynthesis and candidate proteins required for maintaining C4 metabolite fluxes. In: *Plant physiology* 148, S. 568–579.

Bräutigam A; Kajala K; Wullenweber J; Sommer M; Gagneul D; Weber K; Carr K; Gowik U; Mass J; Lercher M; Westhoff P; Hibberd J; Weber A (2011): An mRNA blueprint for C4 photosynthesis derived from comparative transcriptomics of closely related C3 and C4 species. In: *Plant physiology* 155, S. 142–156.

- Briggs W; Christie j** (2002): Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. In: *Trends in Plant Science* 7.
- Brink S; Fischer K; klösgen R; Flügge U** (1995): Sorting of nuclear-encoded chloroplast membrane proteins to the envelope and the thylakoid Membrane. In: *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology* 35, S. 20808–20815.
- Bruce B**: Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution. In: *trends in cell biology* 2000, S. 440–448.
- Chen K; Chen X; Schnell D** (2000): Initial binding of preproteins involving the Toc159 receptor can be bypassed during protein import into chloroplasts. In: *Plant Physiol.* 122, S. 813–822.
- Chiang Y-H; Zubo Y; Tapken W; Kim H; Lavanway A; Howard L; Pilon M; Kieber J; Schaller G** (2012): Functional characterization of the GATA transcription factors GNC and CGA1 reveals their key role in chloroplast development, growth, and division in Arabidopsis. In: *Plant physiology* 160, S. 332–348.
- Chotewutmontri P; Holbrook K; Bruce B** (2017): Plastid protein targeting. Preprotein recognition and translocation. In: *International review of cell and molecular biology* 330, S. 227–294.
- Christin P-A; Osborne C; Sage R; Arakaki M; Edwards E** (2011): C4 eudicots are not younger than C4 monocots. In: *Journal of experimental botany* 62, S. 3171–3181.
- Chuong S; Franceschi V; Edwards G** (2006): The cytoskeleton maintains organelle partitioning required for single-cell C4 photosynthesis in Chenopodiaceae species. In: *The Plant cell* 18, S. 2207–2223.
- Conesa A; Götz S; García-Gómez J; Terol J; Talón M; Robles M** (2005): Blast2GO. A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 21, S. 3674–3676.
- Cox J; Mann M** (2008): MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. In: *Nature biotechnology* 26, S. 1367–1372.
- Dai Z; Ku M; Edwards G** (1993): C4 photosynthesis. In: *Plant Physiol.* 103, S. 83–90.
- Ellis J** (1979): The most abundant protein in the world. In: *Trends in Biochemical Sciences* 4, S. 241–244.
- Deng Z; Oses-Prieto J; Kutschera U; Tseng T-S; Hao L; Burlingame A; Wang Z-Y; Briggs W** (2014): Blue light-induced proteomic changes in etiolated *Arabidopsis* seedlings. In: *Journal of proteome research* 13, S. 2524–2533.
- Dengler N; Nelson T** (1999): Leaf structure and development in C4 plants. In: Sage R; Monson R (1999): C4 plant biology. Academic Press, S. 133-172.
- Douce R; Holtz R; Benson A** (1973): Isolation and properties of the envelope of spinach chloroplasts. In: *J. Biol. Chem.* 20, S. 7215–7222.
- Dutta S; Teresinski H; Smith M** (2014): A split-ubiquitin yeast two-hybrid screen to examine the substrate specificity of atToc159 and atToc132, two Arabidopsis chloroplast preprotein import receptors. In: *PLoS one* 9, e95026.
- Edwards G; Walker D** (1983): *C3, C4: mechanisms, and cellular and environmental regulation, of photosynthesis*. Univ of California Press.

- Fellerer C; Schweiger R; Schöngruber K; Soll J; Schwenkert S** (2011): Cytosolic HSP90 cochaperones HOP and FKBP interact with freshly synthesized chloroplast preproteins of *Arabidopsis*. In: *Molecular plant* 4, S. 1133–1145.
- Ferro M; Salvi D; Riviere-Rolland H; Vermat T; Seigneurin-Berny D; Grunwald D; Garin J; Joyard J; Rolland N** (2002): Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: Identification and subcellular localization of new transporters. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, S. 11487–11492.
- Ferro M; Salvi D; Brugière S; Miras S; Kowalski S; Louwagie M; Garin J; Joyard J; Rolland N** (2003): Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2, S. 325–345.
- Freitag H; Stichler W** (2000): A remarkable new leaf type with unusual photosynthetic tissue in a central asiatic genus of Chenopodiaceae. In: *Plant biol* 2, S. 154–160.
- Freitag H; Stichler W** (2002): *Bienertia cycloptera* Bunge ex Boiss., Chenopodiaceae, another C4 plant without kranz tissues 286. In: *Plant Biology* 4, S. 121–132.
- Fromm S; Senkler J; Eubel H; Peterhänsel C; Braun H-P** (2016): Life without complex I. Proteome analyses of an *Arabidopsis* mutant lacking the mitochondrial NADH dehydrogenase complex. In: *Journal of experimental botany* 67, S. 3079–3093.
- Furumoto T; Yamaguchi T; Ohshima-Ichie Y; Nakamura M; Tsuchida-Iwata Y; Shimamura M; Ohnishi J; Hata S; Gowik U; Westhoff P; Bräutigam A; Weber A; Izui K** (2011): A plastidial sodium-dependent pyruvate transporter. In: *Nature* 476, S. 472–475.
- Glaser S; van Dooren G; Agrawal S; Brooks C; McFadden G; Striepen B; Higgins M** (2012): Tic22 is an essential chaperone required for protein import into the apicoplast. In: *The Journal of biological chemistry* 287, S. 39505–39512.
- Gowik U; Bräutigam A; Weber K; Weber A; Westhoff P** (2011): Evolution of C4 photosynthesis in the genus *Flaveria*. How many and which genes does it take to make C4? In: *The Plant cell* 23, S. 2087–2105.
- Haberlandt G** (1904): Physiologische Pflanzenanatomie. W. Engelmann, Leipzig.
- Hagenau L** (2017): Identification of regulators and effectors of single-cell C4 morphology by comparative transcriptomics of dark-grown cotyledons of the single-cell C4 plant *Bienertia sinuspersici* and the related C3 plant *Suaeda heterophylla*. Dissertation, Leibniz Universität Hannover.
- Hatch M** (1987): C4 photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. In: *Biochimica et Biophysica Acta*, S. 81–106.
- Heazlewood J; Tonti-Filippini J; Verboom R; Millar A** (2005): Combining experimental and predicted datasets for determination of the subcellular location of proteins in *Arabidopsis*. In: *Plant physiology* 139, S. 598–609.
- Hiltbrunner A; Bauer J; Vidi P-A; Infanger S; Weibel P; Hohwy M; Kessler F** (2001): Targeting of an abundant cytosolic form of the protein import receptor at Toc159 to the outer chloroplast membrane. In: *J Cell Biol* 154, S. 309–316.
- Hinnah S; Wagner R; Sveshnikova N; Harrer R; Soll J** (2002): The chloroplast protein import channel Toc75: Pore properties and interaction with transit peptides. In: *Biophysical Journal* 83, S. 899–911.
- Hirsch S; Muckel E; Heemeyer F; Heijne G von; Soll J** (1994): A receptor component of the chloroplast protein translocation machinery. In: *Science* 266, S. 1989–1993.

- Inaba T; Li M; Alvarez-Huerta M; Kessler F; Schnell D** (2003): atTic110 functions as a scaffold for coordinating the stromal events of protein import into chloroplasts. In: *The Journal of biological chemistry* 278, S. 38617–38627.
- 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. In: *The Plant Journal* 34, S. 661–669.
- Inoue H; Rounds C; Schnell D** (2010): The molecular basis for distinct pathways for protein import into *Arabidopsis* chloroplasts. In: *The Plant cell* 22, S. 1947–1960.
- Ivanova Y; Smith M; Chen K; Schnell D** (2004): Members of the Toc159 import receptor family represent distinct pathways for protein targeting to plastids. In: *Molecular biology of the cell* 15, S. 3379–3392.
- Jackson D; Froehlich J; Keegstra K** (1998): The hydrophilic domain of Tic110, an inner envelope membrane component of the chloroplastic protein translocation apparatus, faces the stromal compartment. In: *J. Biol. Chem.* 273, S. 16583–16588.
- Jarvis P** (2004): Organellar proteomics. Chloroplasts in the spotlight. In: *Current biology : CB* 14, R317-9.
- Joyard J; Grossmann A; Bartlett S; Douce R; Chua N** (1982): Characterization of envelope membrane polypeptides from spinach chloroplasts. In: *J. Biol. Chem.*, S. 1095–1101.
- Kadereit G; Ackerly D; Pirie M** (2012): A broader model for C4 photosynthesis evolution in plants inferred from the goosefoot family (Chenopodiaceae). In: *Proceedings. Biological sciences* 279, S. 3304–3311.
- Kadota A; Yamada N; Suetsugu N; Hirose M; Saito C; Shoda K; Ichikawa S; Kagawa T; Nakano A; Wada M** (2009): Short actin-based mechanism for light-directed chloroplast movement in *Arabidopsis*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, S. 13106–13111.
- Kasmati A; Töpel M; Khan N; Patel R; Ling Q; Karim S; Aronsson H; Jarvis P** (2013): Evolutionary, molecular and genetic analyses of Tic22 homologues in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. In: *PloS one* 8, e63863.
- Keegstra K** (1999): Protein import and routing systems of chloroplasts. In: *The Plant Cell Online* 11, S. 557–570.
- Kim D; Lee J-E; Xu Z-Y; Geem K; Kwon Y; Park J; Hwang I** (2015): Cytosolic targeting factor AKR2A captures chloroplast outer membrane-localized client proteins at the ribosome during translation. In: *Nature communications* 6, S. 6843.
- Kobayashi H; Yamada M; Taniguchi M; Kawasaki M; Sugiyama T; Miyake H** (2009): Differential positioning of C4 mesophyll and bundle sheath chloroplasts. Recovery of chloroplast positioning requires the actomyosin system. In: *Plant & cell physiology* 50, S. 129–140.
- Kobayashi K; Sasaki D; Noguchi K; Fujinuma D; Komatsu H; Kobayashi M; Sato M; Toyooka K; Sugimoto K; Niyogi K; Wada H; Masuda T** (2013): Photosynthesis of root chloroplasts developed in *Arabidopsis* lines overexpressing GOLDEN2-LIKE transcription factors. In: *Plant & cell physiology* 54, S. 1365–1377.
- Kodama Y; Suetsugu N; Kong S-G; Wada M** (2010): Two interacting coiled-coil proteins, WEB1 and PMI2, maintain the chloroplast photorelocation movement velocity in *Arabidopsis*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, S. 19591–19596.

- Koteyeva N; Voznesenskaya E; Berry J; Cousins A; Edwards G** (2016): The unique structural and biochemical development of single cell C4 photosynthesis along longitudinal leaf gradients in *Bienertia sinuspersici* and *Suaeda aralocaspica* (Chenopodiaceae). In: *Journal of experimental botany* 67, S. 2587–2601.
- Kouranov A; Schnell D** (1997): Analysis of the interactions of preproteins with the import machinery over the course of protein import into chloroplasts. In: *J Cell Biol* 139.
- Kouranov A; Chen X; Fuks B; Schnell D** (1998): Tic20 and Tic22 are new components of the protein import apparatus at the chloroplast inner envelope membrane. In: *The Journal of cell biology* 143.
- Kouranov A; Wang H; Schnell D** (1999): Tic22 is targeted to the intermembrane space of chloroplasts by a novel pathway. In: *J. Biol. Chem.* 274, S. 25181–25186.
- Kubis S; Patel R; Combe J; Bédard J; Kovacheva S; Lilley K; Biehl A; Leister D; Ríos G; Koncz C; Jarvis P** (2004): Functional specialization amongst the *Arabidopsis* Toc159 family of chloroplast protein import receptors. In: *The Plant cell* 16, S. 2059–2077.
- Küchler M; Decker S; Hörmann F; Soll J; Heins L** (2002): Protein import into chloroplasts involves redox-regulated proteins. In: *EMBO J* 21, S. 6136–6145.
- Külahoglu C; Denton A; Sommer M; Maß J; Schliesky S; Wrobel T; Berckmans B; Gongora-Castillo E; Buell C; Simon R; Veylder L de; Bräutigam A; Weber A** (2014): Comparative transcriptome atlases reveal altered gene expression modules between two Cleomaceae C3 and C4 plant species. In: *The Plant cell* 26, S. 3243–3260.
- Laemmli U** (1970): Denaturing (SDS) discontinuous gel electrophoresis. In: *Nature* 227.
- Lara M; Offermann S; Smith M; Okita T; Andreo C; Edwards G** (2008): Leaf development in the single-cell C4 system in *Bienertia sinuspersici*. Expression of genes and peptide levels for C4 metabolism in relation to chlorenchyma structure under different light conditions. In: *Plant physiology* 148, S. 593–610.
- Lee Y** (2001): Identification of a signal that distinguishes between the chloroplast outer envelope membrane and the endomembrane system in vivo. In: *The plant cell online* 13, S. 2175–2190.
- Li H; Chen L** (1997): A novel chloroplastic outer membrane-targeting signal that functions at both termini of passenger polypeptides. In: *J. Biol. Chem.* 272, S. 10968–10974.
- Li N** (2012): Characterization of two chloroplast envelope membrane proteins. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Li N; Gügel I; Giavalisco P; Zeisler V; Schreiber L; Soll J; Philippar K** (2015): FAX1, a novel membrane protein mediating plastid fatty acid export. In: *PLoS biology* 13, e1002053.
- Li Y; Xu J; Haq N; Zhang H; Zhu X-G** (2014): Was low CO₂ a driving force of C4 evolution. *Arabidopsis* responses to long-term low CO₂ stress. In: *Journal of experimental botany* 65, S. 3657–3667.
- Lichtenthaler H; Buschmann C; Döll M; Fietz H; Bach T; Kozel U; Meier D; Rahmsdorf U** (1981): Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. In: *Photosynthesis Research*.
- Loeffelholz O; Kriechbaumer V; Ewan R; Jonczyk R; Lehmann S; Young J; Abell B** (2011): OEP61 is a chaperone receptor at the plastid outer envelope. In: *The Biochemical journal* 438, S. 143–153.

- Lohse M; Bolger A; Nagel A; Fernie A; Lunn J; Stitt M; Usadel B** (2012): RobiNA. A user-friendly, integrated software solution for RNA-Seq-based transcriptomics. In: *Nucleic Acids Research* 40, W622-7.
- Luesse D; DeBlasio S; Hangarter R** (2006): Plastid movement impaired 2, a new gene involved in normal blue-light-induced chloroplast movements in Arabidopsis. In: *Plant physiology* 141, S. 1328–1337.
- Lung S; Chuong S** (2012): A transit peptide-like sorting signal at the C terminus directs the *Bienertia sinuspersici* preprotein receptor Toc159 to the chloroplast outer membrane. In: *The Plant cell* 24, S. 1560–1578.
- Lung S; Yanagisawa M; Chuong S** (2012a): Isolation of dimorphic chloroplasts from the single-cell C4 species *Bienertia sinuspersici*. In: *Plant methods* 8, S. 8.
- Lung S; Smith M; Weston J; Gwynne W; Secord N; Chuong S** (2014): The C-terminus of *Bienertia sinuspersici* Toc159 contains essential elements for its targeting and anchorage to the chloroplast outer membrane. In: *Frontiers in plant science* 5, S. 722.
- Lung S; Yanagisawa M; Chuong S** (2011): Protoplast isolation and transient gene expression in the single-cell C4 species, *Bienertia sinuspersici*. In: *Plant cell reports* 30, S. 473–484.
- Majeran W; Zybilov B; Ytterberg A; Dunsmore J; Sun Q; van Wijk K** (2008): Consequences of C4 differentiation for chloroplast membrane proteomes in maize mesophyll and bundle sheath cells. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 7, S. 1609–1638.
- Manandhar-Shrestha K; Tamot B; Pratt E; Saitie S; Bräutigam A; Weber A; Hoffmann-Benning S** (2013): Comparative proteomics of chloroplasts envelopes from bundle sheath and mesophyll chloroplasts reveals novel membrane proteins with a possible role in c4-related metabolite fluxes and development. In: *Frontiers in plant science* 4, S. 65.
- Matsuoka M** (2001): Molecular Engineering of C4 Photosynthesis. In: *Annu. rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* 52, S. 297–314.
- May T** (2000): 14-3-3 Proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants. In: *THE PLANT CELL ONLINE* 12, S. 53–64.
- Meiri D; Breiman A** (2009): Arabidopsis ROF1 (FKBP62) modulates thermotolerance by interacting with HSP90.1 and affecting the accumulation of HsfA2-regulated sHSPs. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 59, S. 387–399.
- Meiri D; Tazat K; Cohen-Peer R; Farchi-Pisanty O; Aviezer-Hagai K; Avni A; Breiman A** (2010): Involvement of *Arabidopsis* ROF2 (FKBP65) in thermotolerance. In: *Plant molecular biology* 72, S. 191–203.
- Mereschkowsky C** (1905): Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biologisches Zentralblatt* 25, S. 593-604.
- Mendiola-Morgenthaler L; Morgenthaler J** (1974): Proteins of the envelope and thylakoid membranes of spinach chloroplasts. In: *FEBS Letters* 49, S. 152–155.
- Miyao M; Masumoto C; Miyazawa S; Fukayama H** (2011): Lessons from engineering a single-cell C4 photosynthetic pathway into rice. In: *Journal of experimental botany* 62, S. 3021–3029.
- Neuhoff V; Stamm R; Eibl H**: Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. In: *Electrophoresis* 6, S. 427–448.

- Oaks A** (1994): Efficiency of Nitrogen Utilization in C3 and C4 Cereals. In: *Plant Physiol.* 106, S. 407–414.
- Offermann S; Friso G; Doroshenk K; Sun Q; Sharpe R; Okita T; Wimmer D; Edwards G; van Wijk K** (2015): Developmental and subcellular organization of single-cell C4 photosynthesis in *Bienertia sinuspersici* determined by large-Scale proteomics and cDNA assembly from 454 DNA sequencing. In: *Journal of proteome research* 14, S. 2090–2108.
- Offermann S; Okita T; Edwards G** (2011): Resolving the compartmentation and function of C4 photosynthesis in the single-cell C4 species *Bienertia sinuspersici*. In: *Plant physiology* 155, S. 1612–1628.
- Offermann S; Okita T; Edwards G** (2011a): How do single cell C4 species form dimorphic chloroplasts? In: *Plant Signaling & Behavior* 6, S. 762–765.
- Ogren W** (1984): Photorespiration: Pathways, Regulation, and Modification. In: *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35.
- Oikawa K; Yamasato A; Kong S-G; Kasahara M; Nakai M; Takahashi F; Ogura Y; Kagawa T; Wada M** (2008): Chloroplast outer envelope protein CHUP1 is essential for chloroplast anchorage to the plasma membrane and chloroplast movement. In: *Plant physiology* 148, S. 829–842.
- Paila Y; Richardson L; Schnell D** (2015): New insights into the mechanism of chloroplast protein import and its integration with protein quality control, organelle biogenesis and development. In: *Journal of molecular biology* 427, S. 1038–1060.
- Park J; Knoblauch M; Okita T; Edwards G** (2009): Structural changes in the vacuole and cytoskeleton are key to development of the two cytoplasmic domains supporting single-cell C(4) photosynthesis in *Bienertia sinuspersici*. In: *Planta* 229, S. 369–382.
- Paves H; Truve E** (2007): Myosin inhibitors block accumulation movement of chloroplasts in *Arabidopsis thaliana* leaf cells. In: *Protoplasma* 230, S. 165–169.
- Pearson W** (2013): An introduction to sequence similarity ("homology") searching. In: *Current protocols in bioinformatics* Chapter 3, Unit3.1.
- Prasad B; Goel S; Krishna P** (2010): In silico identification of carboxylate clamp type tetratricopeptide repeat proteins in *Arabidopsis* and rice as putative co-chaperones of Hsp90/Hsp70. In: *PloS one* 5, e12761.
- Pyankov I; Kuzmin A; Demidov E; Maslov A.** (1992): Diversity of biochemical pathways of CO₂ fixation in plants of families Poaceae and Chenopodiaceae from the arid zone of central asia. In: *Soviet Plant Physiology* 39, S. 411–420.
- Qbadou S; Becker T; Bionda T; Reger K; Ruprecht M; Soll J; Schleiff E** (2007): Toc64-a preprotein-receptor at the outer membrane with bipartite function. In: *Journal of molecular biology* 367, S. 1330–1346.
- Reyes J; Muro-Pastor M; Florencio F** (2004): The GATA family of transcription factors in *Arabidopsis* and rice. In: *Plant physiology* 134, S. 1718–1732.
- Richter S; Lamppa G** (1998): A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, S. 7463–7468.
- Rosnow J; Yerramsetty P; Berry J; Okita T; Edwards G** (2014): Exploring mechanisms linked to differentiation and function of dimorphic chloroplasts in the single cell C4 species *Bienertia sinuspersici*. In: *BMC plant biology* 14, S. 34.

- Rudolf M; Machettira A; Groß L; Weber K; Bolte K; Bionda T; Sommer M; Maier U; Weber A; Schleiff E; Tripp J** (2013): In vivo function of Tic22, a protein import component of the intermembrane space of chloroplasts. In: *Molecular plant* 6, S. 817–829.
- Sakai T; Kagawa T; Kashara M; Swartz T; Christie j; Briggs W; Wada M; Okada K** (2001): Arabidopsis *nph1* and *npl1*: Blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, S. 6969–6974.
- Schleiff E; klösgen R** (2001): Without a little help from 'my' friends: direct insertion of proteins into chloroplast membranes? In: *Biochim. Biophys. Acta* 1541, S. 22–33.
- Schmid M; Davison T; Henz S; Pape U; Demar M; Vingron M; Schölkopf B; Weigel D; Lohmann J** (2005): A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. In: *Nature genetics* 37, S. 501–506.
- Schulze E; Hall A** (1982): Stomatal responses, water loss and CO₂ assimilation rates of plants in contrasting environments. In: Lange O; Nobel P; Osmond C; Ziegler H (1982): *Physiological plant ecology II*. Encyclopedia of Plant Physiology 12, Springer.
- Seedorf M; Waegemann K; Soll J** (1995): A constituent of the chloroplast import complex represents a new type of GTP-binding protein. In: *Plant J* 7, S. 401–411.
- Sharpe R** (2014): Gene Expression Profiling in single cell and Related photosynthetic species in Suaedoideae. Dissertation. Washington State University.
- Shomer-Ilan A; Neumann-Ganmore R; Waisel Y** (1979): Biochemical Specialization of Photosynthetic Cell Layers and Carbon Flow Paths in *Suaeda monoica*. In: *Plant physiology* 64, S. 963–965.
- Smith M; Rounds C; Wang F; Chen K; Afithile M; Schnell D** (2004): atToc159 is a selective transit peptide receptor for the import of nucleus-encoded chloroplast proteins. In: *The Journal of cell biology* 165, S. 323–334.
- Stengel A; Benz P; Balsera M; Soll J; Bölter B** (2008): TIC62 redox-regulated translocon composition and dynamics. In: *The Journal of biological chemistry* 283, S. 6656–6667.
- Teng Y-S; Su Y-s; Chen L-J; Lee Y; Hwang I; Li H-m** (2006): Tic21 is an essential translocon component for protein translocation across the chloroplast inner envelope membrane. In: *The Plant cell* 18, S. 2247–2257.
- Terashima I; Inoue H** (1985): Palisade tissue chloroplasts and spongy tissue chloroplasts in spinach: Biochemical and ultrastructural differences. In: *Plant & cell physiology* 26.
- Terashima I; Saeki T** (1983): *Plant & Cell Physiol.* 24(8): 1493-1501 (1983) Light environment within a leaf I. Optical properties of paradermal sections of *Camellia* leaves with special reference to differences in the optical properties of palisade and spongy tissues. In: *Plant & cell physiology* 24.
- Thimm O; Bläsing O; Gibon Y; Nagel A; Meyer S; Krüger P; Selbig J; Müller L; Rhee S; Stitt M** (2004): Mapman. A user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. In: *The Plant Journal* 37, S. 914–939.
- Tripp J; Inoue K; Keegstra K; Froehlich J** (2007): A novel serine/proline-rich domain in combination with a transmembrane domain is required for the insertion of AtTic40 into the inner envelope membrane of chloroplasts. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 52, S. 824–838.
- Tu S-L** (2000): Insertion of OEP14 into the Outer Envelope Membrane Is Mediated by Proteinaceous Components of Chloroplasts. In: *The plant cell online* 12, S. 1951–1960.

- Tyanova S; Temu T; Sinitcyn P; Carlson A; Hein M; Geiger T; Mann M; Cox J** (2016): The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. In: *Nature methods* 13, S. 731–740.
- Vojta L; Soll J; Bölter B** (2007): Protein transport in chloroplasts - targeting to the intermembrane space. In: *The FEBS journal* 274, S. 5043–5054.
- Voznesenskaya E** (1999): Anatomy, chloroplast structure and compartmentation of enzymes relative to photosynthetic mechanisms in leaves and cotyledons of species in the tribe Salsoleae (Chenopodiaceae). In: *Journal of experimental botany* 50, S. 1779–1795.
- Voznesenskaya E; Franceschi V; Kiirats O; Artyusheva E; Freitag H; Edwards G** (2002): Proof of C4 photosynthesis without kranz anatomy in *Bienertia cycloptera* (Chenopodiaceae). In: *The Plant Journal* 31, S. 649–662.
- Voznesenskaya E; Chuong S; Koteyeva N; Franceschi V; Freitag H; Edwards G** (2007): Structural, biochemical, and physiological characterization of C4 photosynthesis in species having two vastly different types of kranz anatomy in genus *Suaeda* (Chenopodiaceae). In: *Plant biology (Stuttgart, Germany)* 9, S. 745–757.
- Voznesenskaya E; Edwards G; Kiirats O; Artyusheva E; Franceschi V** (2003): Development of biochemical specialization and organelle partitioning in the single-cell C4 system in leaves of *Borszczowia aralocaspica* (Chenopodiaceae). In: *American journal of botany* 90, S. 1669–1680.
- Voznesenskaya E; Koteyeva N; Chuong S; Akhani H; Edwards G; Franceschi V** (2005): Differentiation of cellular and biochemical features of the single-cell C4 syndrome during leaf development in *Bienertia cycloptera* (Chenopodiaceae). In: *American journal of botany* 92, S. 1784–1795.
- Vries J de; Sousa F; Bölter B; Soll J; Gould S** (2015): YCF1. A Green TIC? In: *The Plant cell* 27, S. 1827–1833.
- Wang F; Yang C-L; Wang L-L; Zhong N-Q; Wu X-M; Han L-B; Xia G-X** (2012): Heterologous expression of a chloroplast outer envelope protein from *Suaeda salsa* confers oxidative stress tolerance and induces chloroplast aggregation in transgenic *Arabidopsis* plants. In: *Plant, cell & environment* 35, S. 588–600.
- Wang P; Hendron R-W; Kelly S** (2017): Transcriptional control of photosynthetic capacity. Conservation and divergence from *Arabidopsis* to rice. In: *The New phytologist* 216, S. 32–45.
- Wang P; Kelly S; Fouracre J; Langdale J** (2013): Genome-wide transcript analysis of early maize leaf development reveals gene cohorts associated with the differentiation of C4 Kranz anatomy. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 75, S. 656–670.
- Waters M; Wang P; Korkaric M; Capper R; Saunders N; Langdale J** (2009): GLK transcription factors coordinate expression of the photosynthetic apparatus in *Arabidopsis*. In: *The Plant cell* 21, S. 1109–1128.
- Weissbach A; Horecker B; Hurwitz J** (1956): The enzymatic formation of phosphoglyceric acid from ribulose diphosphate and carbon dioxide. In: *J. Biol. Chem.* 218, S. 795–810.
- Wimmer D** (2017): Analysis of subcellular protein targeting mechanisms in the single-cell C4 species *Bienertia sinuspersici*. Dissertation, Leibniz Universität Hannover.
- Wimmer D; Bohnhorst P; Shekhar V; Hwang I; Offermann S** (2017): Transit peptide elements mediate selective protein targeting to two different types of chloroplasts in the single-cell C4 species *Bienertia sinuspersici*. In: *Scientific reports* 7, S. 41187.

- Wildman S; Cheo C; Bonner J** (1949): The proteins of green leaves. In: *J. Biol. Chem.* 180, S. 985–1001.
- Yamada M; Kawasaki M; Sugiyama T; Miyake H; Taniguchi M** (2009): Differential positioning of C₄ mesophyll and bundle sheath chloroplasts. Aggregative movement of C₄ mesophyll chloroplasts in response to environmental stresses. In: *Plant & cell physiology* 50, S. 1736–1749.
- Yang X-F; Wang Y-T; Chen S-T; Li J-K; Shen H-T; Guo F-Q** (2016): PBR1 selectively controls biogenesis of photosynthetic complexes by modulating translation of the large chloroplast gene Ycf1 in *Arabidopsis*. In: *Cell discovery* 2, S. 16003.
- Young M; Keegstra K; Froehlich J** (1999): GTP promotes the formation of early-import intermediates but is not required during the translocation step of protein import into chloroplasts. In: *Plant Physiol.* 121, S. 237–244.
- Yu T; Li H** (2001): Chloroplast protein translocon components atToc159 and atToc33 are not essential for chloroplast biogenesis in guard cells and root cells. In: *Plant physiology*, S. 90–96.
- Zurzycki J** (1955): Chloroplast arrangements as a factor in photosynthesis. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 24: 27-63

Anhang

Tabelle 18: Identifizierte ESTs potenzieller SCC4-Gene

EST Nr.	Lokus	Gen	FC C/H	FC C/W	NC CHL	NC HYD	NC WUR
UN065858	AT5G60790	ABC transporter family protein	155.5	441.3	18.6	0.3	0.1
UN045745	AT1G17290	ALAAT1 Alanine aminotransferase 1	55.5	81.0	3554.4	141.2	96.2
UN026653	AT1G72330	ALAAT2 Alanine aminotransferase 2	226.2	339.0	84.4	0.8	0.5
UN030289	AT4G26530	Aldolase	204.9	97.3	33.9	0.3	0.7
UN052727	AT4G26530	Aldolase	205.8	105.2	343.7	3.7	7.3
UN024052	AT5G19220	APL1 ADP glucose pyrophosphorylase large subunit 1	1205.1	4087.0	19.2	0.0	0.0
UN048650	AT5G19220	APL1 ADP glucose pyrophosphorylase large subunit 1	523.9	5745.6	25.0	0.1	0.0
UN015778	AT5G19220	APL1 ADP glucose pyrophosphorylase large subunit 1	308.1	6984.7	12.0	0.1	0.0
UN053402	AT5G19220	APL1 ADP glucose pyrophosphorylase large subunit 1	650.8	12976.0	157.2	0.5	0.0
UN005426	AT5G19220	APL1 ADP glucose pyrophosphorylase large subunit 1	692.3	16550.0	29.5	0.1	0.0
UN028198	AT1G62180	ATAPR2_5'adenylylphosphosulfate reductase 2	72.1	172.8	19.8	0.6	0.3
UN054031	AT5G57630	CBL-interacting protein kinase 21	75.8	1039.2	30.2	0.9	0.1
UN039930	AT5G21430	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein	130.7	19395.5	405.6	6.9	0.0
UN053717	AT1G26230	Chaperonin family protein	293.1	128.2	44.8	0.3	0.8
UN011561	AT2G47910	CRR6 chlororespiratory reduction 6	61.7	199.0	61.1	2.2	0.7
UN059337	AT5G39210	CRR7 chlororespiratory reduction 7	88.1	2305.7	83.8	2.1	0.1
UN000952	AT4G27030	Fatty Acid desaturase	89.5	85.3	25.2	0.6	0.7
UN029221	AT5G45680	FKBP13 FK506-binding protein 13	9097.2	9097.2	15.6	0.0	0.0
UN025080	AT4G39710	FKBP16-2 FK506-binding protein 42782	129.2	271.3	21.7	0.4	0.2
UN051409	AT4G39710	FKBP16-2 FK506-binding protein 42782	444.9	10015.3	435.8	2.2	0.1
UN047075	AT1G18170	FKBP-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	78.9	911.3	264.3	7.4	0.6
UN023953	AT2G21330	Fructose-bisphosphate aldolase 1	64.2	170.8	19.5	0.7	0.3
UN051259	AT5G20630	GER3 germin 3	818.0	320.4	796.4	2.1	5.1
UN048824	AT3G54050	HCEF1 high cyclic electron flow 1	99.9	726.2	30.1	0.7	0.1
UN055517	AT3G54050	HCEF1 high cyclic electron flow 1	101.2	982.9	834.8	18.3	1.9
UN040196	AT3G45740	Hydrolase family protein	260.5	114.4	32.7	0.3	0.6
UN068705	AT3G45740	Hydrolase family protein	282.4	1375.7	25.1	0.2	0.0
UN018259	AT3G45740	Hydrolase family protein	250.9	12389.3	22.0	0.2	0.0
UN037898	AT5G51720	Iron Sulfur cluster protein	76.9	137.6	20.7	0.6	0.4
UN051103	AT1G19640	Jasmonic Acid Carboxyl Methyltransferase	147.1	89.9	133.7	2.0	3.3
UN001680	AT1G45474	LHCA5 photosystem I light harvesting complex 5	73.1	7850.1	104.3	3.1	0.0
UN036725	AT1G45474	LHCA5 photosystem I light harvesting complex 5	111.1	17748.9	318.7	6.4	0.0
UN046148	AT1G19150	LHCA6 photosystem I light harvesting complex 6	999.1	7776.5	702.0	1.6	0.2
UN050321	AT1G29910	LHCB1 photosystem II light harvesting complex 3	66.2	1059.0	4852.4	157.3	9.8
UN046122	AT3G47520	MDH malate dehydrogenase	104.3	218.8	89.7	1.9	0.9
UN005023	AT3G47520	MDH malate dehydrogenase	119.3	349.8	29.5	0.5	0.2
UN008841	AT3G47520	MDH malate dehydrogenase	91.5	931.6	19.0	0.5	0.1
UN049325	AT3G29770	MES11 Methyl esterase 11	180.2	1914.5	94.0	1.2	0.1
UN034312	AT3G29770	MES11 Methyl esterase 11	236.8	4443.6	58.6	0.6	0.0
UN036606	AT4G02600	MLO1 Seven transmembrane MLO family protein	204.5	253.3	89.8	1.0	0.8
UN011868	AT2G29370	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	77.4	113.1	85.3	2.4	1.6
UN025714	AT2G29370	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	189.5	204.1	25.4	0.3	0.3
UN009325	AT2G29370	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	388.7	795.2	28.3	0.1	0.1
UN051518	AT2G29370	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	2656.8	5406.4	42.6	0.0	0.0

EST Nr.	Lokus	Gen	FC C/H	FC C/W	NC CHL	NC HYD	NC WUR
UN022302	AT2G29370	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	87.8	5469.4	24.8	0.6	0.0
UN069298	AT2G29370	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	1203.0	10263.7	17.8	0.0	0.0
UN041419	AT2G27680	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein	60.7	167.3	27.9	1.0	0.4
UN071070	AT2G29340	NAD-dependent epimerase/dehydratase	162.9	132.5	18.7	0.2	0.3
UN001730	AT2G40690	NAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase	74.9	294.2	75.9	2.2	0.6
UN036712	AT4G00570	NAD-dependent malic enzyme 2	67.6	138.1	41.2	1.4	0.6
UN041471	AT4G00570	NAD-dependent malic enzyme 2	112.3	163.6	10.1	0.2	0.1
UN025501	AT4G00570	NAD-dependent malic enzyme 2	72.1	174.0	141.9	4.6	1.9
UN044962	AT1G78390	NCED9 nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 9	400.1	1075.4	90.9	0.5	0.2
UN028650	AT1G15980	NDF1 NDH-dependent cyclic electron flow 1	168.1	946.7	722.2	9.5	1.7
UN050267	AT1G15980	NDF1 NDH-dependent cyclic electron flow 1	4470.0	31186.0	54.9	0.0	0.0
UN036571	AT1G64770	NDF2 NDH-dependent cyclic electron flow 2	130.2	835.0	20.3	0.3	0.0
UN053745	AT1G64770	NDF2 NDH-dependent cyclic electron flow 2	107.4	2436.0	579.5	11.9	0.5
UN039048	AT1G64770	NDF2 NDH-dependent cyclic electron flow 2	126.0	5520.8	25.2	0.4	0.0
UN045041	AT3G16250	NDF4 NDH-dependent cyclic electron flow 4	184.6	6699.5	118.1	1.4	0.0
UN036474	AT3G16250	NDF4 NDH-dependent cyclic electron flow 4	213.5	51250.1	228.4	2.4	0.0
UN045016	AT1G18730	NDF6 NDH-dependent cyclic electron flow 6	60.3	2274.9	1289.9	47.7	1.2
UN046784	AT5G43750	NDH18 NAD(P)H dehydrogenase 18	91.1	477.7	732.1	17.8	3.3
UN037381	AT2G06050	OPR3 oxophytodienoate-reductase 3	72.9	2393.7	29.3	0.9	0.0
UN055682	AT1G23740	Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase	100.1	270.9	265.9	5.9	2.2
UN001902	AT5G58260	Oxidoreductases, acting on NAD(P)H or quinone	70.1	7337.5	113.3	3.6	0.0
UN044167	AT5G58260	Oxidoreductases, acting on NAD(P)H or quinone	95.6	40716.9	511.7	12.0	0.0
UN053130	AT5G19730	Pectin lyase-like superfamily protein	755.5	484.3	69.3	0.2	0.3
UN035676	AT5G36700	PGLP1 2-phosphoglycolate phosphatase 1	563.5	8026.4	14.2	0.0	0.0
UN051500	AT1G53310	Phosphoenolpyruvate carboxylase 1	202.2	451.5	1610.9	17.9	8.0
UN072941	AT1G53310	Phosphoenolpyruvate carboxylase 1	774.8	852.8	152.5	0.4	0.4
UN000121	AT1G53310	Phosphoenolpyruvate carboxylase 1	424.1	1526.7	11657.0	61.8	17.0
UN055044	AT1G53310	Phosphoenolpyruvate carboxylase 1	435.8	1872.6	1552.6	8.0	1.9
UN005175	AT1G53310	Phosphoenolpyruvate carboxylase 1	317.8	6190.7	11.0	0.1	0.0
UN073956	AT1G53310	Phosphoenolpyruvate carboxylase 1	13458.5	13458.5	23.9	0.0	0.0
UN016930	AT2G42600	Phosphoenolpyruvate carboxylase 2	135.7	628.6	14.0	0.2	0.0
UN000469	AT2G42600	Phosphoenolpyruvate carboxylase 2	376.1	1428.6	10960.8	65.4	17.0
UN025611	AT2G42600	Phosphoenolpyruvate carboxylase 2	299.3	1445.8	459.5	3.4	0.7
UN034483	AT2G42600	Phosphoenolpyruvate carboxylase 2	436.7	2482.6	182.9	0.9	0.1
UN028236	AT2G42600	Phosphoenolpyruvate carboxylase 2	685.8	308548.3	3082.2	10.1	0.0
UN038809	AT2G42600	Phosphoenolpyruvate carboxylase 2	9410.4	332176.1	587.6	0.1	0.0
UN032233	AT3G14940	Phosphoenolpyruvate carboxylase 3	803.4	34961.1	435.0	1.2	0.0
UN028763	AT1G70820	Phosphoglucomutase, putative	406.0	203.5	70.9	0.4	0.8
UN000675	AT5G17230	Phytoene Synthase	80.1	82.7	23.3	0.6	0.6
UN055166	AT5G54190	PORA protochlorophyllide oxidoreductase A	125.3	5714.2	305.3	5.2	0.1
UN053068	AT4G15530	PPDK pyruvate orthophosphate dikinase	105.9	1467.9	3184.2	67.1	5.0
UN054149	AT4G15530	PPDK pyruvate orthophosphate dikinase	128.6	3604.8	5720.1	98.1	3.7
UN054841	AT4G15530	PPDK pyruvate orthophosphate dikinase	145.7	3763.6	7677.1	117.3	4.7
UN047123	AT4G02770	PSAD-1 photosystem I subunit D-1	114.7	2905.6	897.6	17.6	0.7
UN036713	AT2G20260	PSAE-2 Photosystem I subunit E-2	80.8	268.3	23.1	0.6	0.2
UN008861	AT2G20260	PSAE-2 Photosystem I subunit E-2	147.0	714.8	90.9	1.4	0.3
UN035433	AT2G20260	PSAE-2 Photosystem I subunit E-2	166.4	756.0	887.3	11.9	2.7
UN051208	AT2G39470	PSBP-2 Photosystem II subunit P-2-like	109.4	9356.5	485.8	9.9	0.1

EST Nr.	Lokus	Gen	FC C/H	FC C/W	NC CHL	NC HYD	NC WUR
UN003660	AT2G39470	PSBP-2 Photosystem II subunit P-2-like	134.2	41371.0	74.7	1.2	0.0
UN020017	AT3G01440	PSBQ-1 Photosystem II subunit Q-1-like	129.8	597.3	153.2	2.6	0.6
UN025854	AT1G14150	PSBQ-2 Photosystem II subunit Q-2-like	232.6	12127.6	370.7	3.6	0.1
UN053007	AT3G25230	ROF1 FKBP62 rotamase	1065.7	24897.0	110.9	0.2	0.0
UN028216	AT5G48570	ROF2 FKBP65 isomerase	2555.5	27799.6	49.4	0.0	0.0
UN042526	AT2G13360	SGAT alanine:glyoxylate aminotransferase	183.9	3763.7	185.6	2.2	0.1
UN049837	AT2G13360	SGAT alanine:glyoxylate aminotransferase	169.0	34579.3	769.8	10.0	0.1
UN038058	AT2G19060	SGNH hydrolase-type esterase superfamily protein	149.1	1671.4	64.2	0.9	0.1
UN031536	ATCG00800	Structural constituent of ribosome	89.3	424.5	72.4	1.8	0.4
UN046512	AT4G25010	SWEET14 Nodulin MtN3 family protein	93.8	816.6	38.1	0.9	0.1
UN039490	AT1G01320	Tetratricopeptide repeat (TPR) superfamily protein	67.4	102.8	15.8	0.5	0.4
UN050254	AT2G35130	Tetratricopeptide repeat (TPR) superfamily protein	364.4	625.8	46.0	0.3	0.2
UN045757	AT1G49130	Transcription factor Constans zinc finger type	144.2	66244.6	118.7	1.8	0.0
UN041386	AT5G56860	Transcription factor GATA zinc finger type (GNC)	595.3	5359.0	23.4	0.1	0.0
UN048082	AT5G56860	Transcription factor GATA zinc finger type (GNC)	1016.6	17941.5	166.0	0.4	0.0
UN053746	AT2G20570	Transcription factor GLK1	507.6	889.3	50.2	0.2	0.1
UN054605	AT1G22360	UDP-glucosyl transferase	149.0	149.1	52.5	0.8	0.8
UN054347	AT1G22360	UDP-glucosyl transferase	373.4	1356.7	118.2	0.7	0.2
UN023010	AT5G58770	Undecaprenyl pyrophosphate synthetase	203.3	3266.5	48.8	0.5	0.0
UN028089	AT2G04039	Unknown protein	96.7	446.7	66.7	1.5	0.3
UN032589	AT2G04039	Unknown protein	103.6	1592.9	343.7	7.4	0.5
UN054751	AT2G15020	Unknown protein	229.2	553.9	214.9	2.1	0.9
UN054212	AT2G15020	Unknown protein	2380.5	13616.0	103.6	0.1	0.0
UN000305	AT3G48200	Unknown protein	67.6	423.6	46.6	1.5	0.3
UN034998	AT5G20935	Unknown protein	60.4	108.4	18.9	0.7	0.4
UN025747	AT5G20935	Unknown protein	96.7	2080.0	66.3	1.5	0.1
UN069073	AT5G52780	Unknown protein	185.6	620.3	73.8	0.9	0.3

Tabelle 19: Differenziell in TC- und CC-Hüllmembranen abundante ESTs

EST Nr.	Protein/Lokalisation	TC/CC	FDR
Chloroplastenhüllmembran			
UN045319	Fatty Acid Export 2	2.80	0.03
UN000162	Pyruvate/Sodium Symporter	2.02	0.02
UN053947	YGGT-Family Protein	1.87	0.04
UN028723	Early Response to Dehydration 4	1.86	0.07
UN000245	Na ⁺ / H ⁺ -Antiporter	1.82	0.06
UN069423	Translocon of the Inner Chl. Membrane 22 IV	1.72	0.05
UN048258	Accumulation and Replication of Chloroplasts 11	1.70	0.01
UN023778	Translocon of the Inner Chl. Membrane 214 (Ycf1)	1.59	0.08
UN049254	Plastid Division 2	0.59	0.05
UN052734	Fatty Acid Export 3	0.54	0.06
UN054529	Translocon of the Outer Chl. Membrane 159	0.48	0.09
UN000720	Outer Envelope Protein 7	0.44	0.06
UN028858	Zeta-Carotene Desaturase	CC	0.00
Thylakoid/Stroma			
UN028267	Clp Protease	TC	0.00
UN053635	Tyrosine-tRNA-Ligase	TC	0.00
UN054149	PPDK Pyruvate Orthophosphate Dikinase	2.65	0.02
UN055644	Chloroplast ATP Synthase Beta Subunit	2.50	0.03
UN044314	Chloroplast ATP Synthase Alpha Subunit	2.45	0.04
UN043600	Carbonic Anhydrase (CA1)	2.29	0.04
UN000395	Triosephosphate Isomerase	2.18	0.05
UN051266	Chloroplast ATP Synthase Gamma Subunit	2.11	0.04
UN054841	PPDK Pyruvate Orthophosphate Dikinase	1.97	0.05
UN051246	Glutathion Reductase	1.37	0.05
UN032837	FtsY Protein	0.74	0.01
UN047053	PPDK-Regulatory Protein	0.62	0.02
UN051498	Ascorbate Peroxidase Chloroplastic	0.60	0.01
UN016916	Organellar RNA Editing Factor	0.58	0.01
UN044313	Glycine-tRNA-Ligase	CC	0.00
UN000197	Magnesium-Chelatase	CC	0.00
UN057124	NAD(P)H-Quinone Oxidoreductase	CC	0.00
Zytoplasma			
UN049469	Fructose-Bisphosphate Aldolase	TC	0.00
UN048278	Cytoplasmic Triosephosphate Isomerase	1.85	0.03
UN000137	Plastid Movement Impaired 2	0.47	0.06
UN055429	Weak Chloroplast Movement Under Blue Light 1	0.36	0.06
UN030015	Myosin-11 Isoform X2	0.29	0.09
Mitochondrium			
UN027784	rho GTPase 1	0.76	0.09
UN051326	PREDICTED Mitochondrial Outer Membrane Porin 2	0.75	0.06
UN053624	Voltage Dependent Anion Channel	0.74	0.05
UN054115	NADH dehydrogenase	0.73	0.09
UN053587	Dicarboxylate Carrier	0.71	0.07
UN047382	Outer Membrane Porin 4	0.71	0.05
UN054219	Uncoupling Protein	0.70	0.09
UN043618	Serine Hydroxymethyltransferase	0.70	0.08

EST Nr.	Protein/Lokalisation	TC/CC	FDR
UN039571	NADH Dehydrogenase	0.70	0.05
UN040186	Cytochrome C Oxidase Subunit	0.70	0.07
UN054615	PREDICTED TOM40	0.70	0.03
UN000140	Mitochondrial aldehyde Dehydrogenase	0.70	0.05
UN000328	2-Oxoglutarate Mitochondrial-like	0.69	0.08
UN028742	HSP70	0.69	0.02
UN045664	1 Alternative Oxidase	0.69	0.05
UN050311	Glycine Cleavage System H	0.69	0.06
UN045027	Gamma Carbonic Anhydrase	0.68	0.09
UN051910	ATP Synthase subunit	0.68	0.04
UN043493	Alternative NAD(P)H-Ubiquinone Oxidoreductase	0.68	0.05
UN055426	LETM1 and EF-Hand Domain Protein	0.68	0.08
UN000260	Lipoamide Acyltransferase Component	0.68	0.04
UN038180	Isocitrate Dehydrogenase	0.67	0.04
UN002213	ATPase Subunit	0.67	0.06
UN037058	Cytochrome C Oxidase Subunit	0.66	0.05
UN050439	Mitochondrial-like	0.66	0.08
UN054260	Succinyl-Ligase	0.66	0.04
UN055030	NADH dehydrogenase	0.66	0.04
UN048333	ATP synthase 24 kDa Protein	0.66	0.06
UN037385	Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase	0.65	0.05
UN049352	Carnitine/Acylcarnitine Carrier	0.65	0.05
UN028682	ATP Synthase Subunit	0.65	0.05
UN054797	Dihydrolipoyl Mitochondrial	0.64	0.02
UN000253	Mitochondrial NADH-Ubiquinone Oxidoreductase	0.64	0.03
UN000202	Glycine Decarboxylase P	0.63	0.03
UN008012	Pyruvate Carrier 4	0.63	0.05
UN036519	D-2-hydroxyglutarate Mitochondrial	0.63	0.05
UN057870	NADH dehydrogenase	0.63	0.02
UN051698	L-galactono-1,4-lactone Mitochondrial	0.63	0.02
UN035104	Reticulon-4-Interacting	0.63	0.03
UN052455	MICOS Complex Subunit	0.63	0.06
UN046149	Cytochrome B-c1 Complex Subunit	0.63	0.05
UN053959	Voltage Dependent Anion Channel	0.63	0.01
UN046233	Gamma Carbonic Anhydrase-like	0.62	0.06
UN054020	Cytochrome C Oxidase Subunit 3	0.62	0.04
UN046652	Calcium-binding Mitochondrial Carrier S -1-like	0.62	0.08
UN000342	Component of Pyruvate Dehydrogenase	0.62	0.09
UN055424	Methylcrotonoyl-Carboxylase	0.61	0.08
UN049477	HSP60	0.61	0.02
UN051477	Chaperonin CPN60-like	0.60	0.06
UN052549	Pyruvate Dehydrogenase E1	0.60	0.02
UN050696	Succinate-Fumarate Transporter 1	0.59	0.06
UN042798	SCO1 Homolog	0.59	0.03
UN042148	ATP Synthase Subunit	0.59	0.02
UN034440	Cytochrome C Oxidase Subunit	0.58	0.01
UN028593	Pyruvate Dehydrogenase	0.57	0.03
UN020654	ATP Synthase Subunit	0.55	0.02
UN025702	Adrenodoxin Mitochondrial	0.55	0.05

EST Nr.	Protein/Lokalisation	TC/CC	FDR
UN039503	Ubiquinone Biosynthesis COQ9	0.54	0.04
UN054932	HSP70 Mitochondrial	0.53	0.02
UN038859	D-Lactate Dehydrogenase	0.52	0.07
UN044475	Bifunctional L-3-Cyanoalanine Synthase Cysteine Synthase	0.52	0.09
UN048863	ATP synthase Subunit	0.44	0.02
UN054578	Altered Inheritance of Mitochondria 32	0.40	0.01
UN043466	D-Lactate Dehydrogenase	CC	0.00
UN028868	Methylcrotonoyl-Carboxylase Subunit	CC	0.00
Zellkern			
UN054514	TLD-Domain Containing Nucleolar Protein	2.30	0.04
UN035225	Histone H4	2.29	0.08
UN039114	Probable Histone	2.10	0.09
Peroxisom			
UN053494	Catalase 1	0.69	0.03
UN055173	Catalase 1	0.61	0.08
UN044206	Long Chain Acyl-Synthetase	0.61	0.09
Plasmamembran			
UN050756	Probable Aquaporin PIP1-4	2.06	0.06
UN049751	Plasma Membrane ATPase 4	1.77	0.02
UN044740	Synaptotagmin-5-like	1.59	0.01
UN051251	Synaptotagmin-5	1.37	0.07
Ribosom			
UN041864	60S Ribosomal L10a-1	2.55	0.06
UN068976	40S Ribosomal S19-3	1.76	0.05
UN053972	50S Ribosomal	0.65	0.02
Tonoplast			
UN055267	Vacuolar ATPase	1.62	0.02
UN054317	Vacuolar ATPase H Subunit	1.46	0.01
UN000436	Vacuolar ATPase B Subunit	1.43	0.02
UN000508	Vacuolar ATPase A Subunit	1.42	0.01
UN054669	Vacuolar ATPase Subunit d	1.33	0.06
UN053473	Vacuolar ATPase	1.25	0.05
Unbekannte Lokalisation			
UN051196	3-Oxoacyl Reductase 4	TC	0.00
UN008240	9-Divinyl Ether Synthase-like	TC	0.00
UN053772	ATP Sulfurylase 2	TC	0.00
UN046937	Elongation Factor 1-Beta 2	TC	0.00
UN000506	Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 Subunit B-like	TC	0.00
UN051047	Isocitrate Dehydrogenase	TC	0.00
UN027955	Nucleobase-Ascorbate Transporter 6-like	TC	0.00
UN005932	14 kDa Proline-Rich-like	4.79	0.02
UN051259	Auxin-Binding Protein abp19a-like	3.41	0.06
UN041356	Amino Acid Binding	2.13	0.04
UN028724	Guanosine Nucleotide Diphosphate Dissociation Inhibitor 2	2.12	0.04
UN055676	Alpha-L-Arabinofuranosidase 1-like	1.90	0.05
UN039423	GDSL Esterase Lipase At5g45670-like	1.86	0.03
UN023530	Lipoxygenase Homology Domain-containing Protein	1.86	0.02
UN050180	Tetraspanin-8-like	1.83	0.02

EST Nr.	Protein/Lokalisation	TC/CC	FDR
UN045857	Serine Threonine-Kinase HT1-like	1.83	0.05
UN042921	Malate Dehydrogenase	1.82	0.09
UN057305	Lipoxygenase Homology Domain-containing Protein	1.81	0.06
UN035889	Lycopene Beta Epsilon Cyclase	1.80	0.07
UN052295	Monocopper Oxidase SKU5	1.79	0.03
UN000646	Lipoxygenase Homology Domain-containing Protein	1.72	0.09
UN054418	Elongation Factor 1-Gamma 2-like	1.70	0.09
UN028450	Phototropin 2	1.67	0.08
UN050954	Strictosidine Synthase 3-like	1.54	0.08
UN065865	Hypothetical Protein SOVF_090490	1.54	0.08
UN053432	NAD-Dependent Epimerase Dehydratase	1.52	0.03
UN052266	Alene Oxide Synthase	1.51	0.05
UN051006	GTP-Binding YPTM2	1.43	0.01
UN051980	Hypersensitive-Induced Response 2	1.42	0.05
UN049878	Phospholipase D Delta	1.37	0.09
UN042622	Hypothetical Protein SOVF_048700	1.34	0.04
UN028314	s-Adenosyl-l-Methionine-Dependent Methyltransferases	1.31	0.09
UN050542	Probable Thimet Oligopeptidase	0.76	0.05
UN053713	Sorting and Assembly Machinery Component 50	0.72	0.10
UN046461	Haloacid Dehalogenase-like Hydrolase Domain-Containing 3	0.70	0.07
UN070451	Hypothetical protein SOVF_198330	0.64	0.01
UN037583	Hypothetical protein SOVF_020010	0.64	0.06
UN063457	Senescence-Associated Protein	0.62	0.03
UN035364	Fiber Fb15	0.61	0.02
UN038305	Adenylate Kinase 4	0.61	0.05
UN045867	NADH-Cytochrome b5 Reductase	0.59	0.03
UN000125	ATPase Family AAA Domain-Containing 3-B-like	0.57	0.05
UN045386	Uncharacterized Protein	0.57	0.09
UN063355	GRIP and Coiled-Coil Domain-containing Protein	0.54	0.10
UN054597	Hypothetical Protein SOVF_153230	0.54	0.02
UN067845	Copper Ion Binding Protein 1	0.53	0.03
UN003917	Adenylate kinase	0.52	0.06
UN046810	Succinate Dehydrogenase Subunit 3	0.47	0.02
UN053803	Nuclear Control of ATPase 2	0.47	0.02
UN054176	CBS Domain-Containing CBSCBSPB3-like	0.42	0.01
UN047351	AMP Deaminase	CC	0.00
UN048466	Katanin p60 ATPase-Containing Subunit A1	CC	0.00
UN015093	Plasma Membrane Isoform 1	CC	0.00

Tabelle 20: Gewebsspezifische Genexpression von Chloroplastenhüllmembranproteinen

EST Nr.	Protein	FC C/H	FDR	FC C/W	FDR
UN028994	2-Oxoglutarat/Malate Carrier	0.97	1.00	1.72	0.02
UN056395	ABC Transporter	2.79	0.00	3.65	0.00
UN048258	Accumulation and Replication of Chloroplasts 11	3.75	0.00	3.50	0.00
UN028779	Acyl-CoA Synthetase 9	1.91	0.00	1.36	0.19
UN049807	Adenosylmethionine Carrier	5.03	0.00	7.27	0.00
UN000222	AMP-Dep. Synthetase/Ligase Family Protein	0.54	0.01	0.39	0.00
UN013083	Aquaporin TIP2-1	2.08	0.39	0.24	0.03
UN044496	ATP-Dependent Zinc Metalloprotease FTSH	8.10	0.00	7.60	0.00
UN055154	ATP-Dependent Zinc Metalloprotease FTSH	7.38	0.00	9.07	0.00
UN054382	ATP-Dependent Zinc Metalloprotease FTSH	4.95	0.00	9.27	0.00
UN049584	ATP-Dependent Zinc Metalloprotease FTSH 9	4.33	0.00	10.29	0.00
UN045422	Chaperone-like Protein	6.10	0.00	6.52	0.00
UN008456	Chromophore Lyase	2.49	0.00	4.03	0.00
UN052530	DnaJ Chaperone Homolog	6.01	0.00	9.61	0.00
UN050577	D-Xylose/Proton Symporter-like	6.23	0.00	5.77	0.00
UN028723	Early Response to Dehydration 4	4.34	0.00	4.67	0.00
UN045319	Fatty Acid Export 2	3.34	0.00	2.66	0.00
UN052734	Fatty Acid Export 3	5.50	0.00	3.86	0.00
UN031209	Glucose Transporter 4	0.37	0.00	0.41	0.00
UN054392	Hexokinase	0.68	0.12	0.33	0.00
UN001736	J-like Domain1 Protein	4.82	0.00	4.72	0.00
UN050310	Magnesium Transporter MRS2	3.04	0.00	6.40	0.00
UN000430	Mesophyll Envelope Protein2	4.97	0.00	5.19	0.00
UN047850	Mitoferrin-like	2.37	0.00	0.94	0.90
UN000245	Na ⁺ /H ⁺ Antiporter				
UN050268	Ornithine Carbamoyltransferase	2.80	0.00	2.89	0.00
UN001056	Outer Envelope Protein 21	7.74	0.00	3.38	0.00
UN035142	Outer Envelope Protein 24	3.65	0.00	2.50	0.00
UN048051	Outer Envelope Protein 37	0.92	0.89	2.73	0.00
UN000720	Outer Envelope Protein 7	8.08	0.00	1001.42	0.00
UN028577	Pep Transporter PPT	13.09	0.00	3.05	0.00
UN049254	Plastid Division 2	4.54	0.00	3.61	0.00
UN053785	PREDICTED ABC Transporter	2.22	0.00	4.14	0.00
UN030339	PREDICTED Chloroplast Anion Transporter	7.09	0.00	12.22	0.00
UN047621	PREDICTED E3 Ubiquitin-Ligase KEG	2.02	0.00	1.93	0.00
UN041096	PREDICTED Fatty-Acid-Binding Protein 1	4.02	0.00	3.16	0.00
UN031348	PREDICTED FTSH	6.17	0.00	8.20	0.00
UN055528	PREDICTED Inner Envelope Protein	11.57	0.00	8.96	0.00
UN043406	PREDICTED NLRC 3	2.78	0.00	3.85	0.00
UN054405	PREDICTED TGD2	2.02	0.00	2.41	0.00
UN055441	Preprotein Translocase SecA	2.10	0.00	3.08	0.00
UN033737	PROBABLE Adenine Nucleotide Transporter BTL3	1.78	0.08	1.07	0.93
UN025455	PROBABLE Sodium/Metabolite-Cotransporter	3.37	0.00	5.57	0.00
UN054787	Protochlorophyllide-Dep. Translocon Comp. 52	7.15	0.00	24.85	0.00
UN025443	Protoporphyrinogen Oxidase 2	5.84	0.00	4.05	0.00
UN000162	Pyruvate/Sodium Symporter	45.65	0.00	88.85	0.00
UN048684	Quinone Oxidoreductase	1.63	0.11	1.42	0.23

EST Nr.	Protein	FC C/H	FDR	FC C/W	FDR
UN049583	Translocon of the Inner Chl. Membrane 100	5.66	0.00	5.37	0.00
UN032125	Translocon of the Inner Chl. Membrane 110	4.94	0.00	2.73	0.00
UN026521	Translocon of the Inner Chl. Membrane 110	3.33	0.00	2.81	0.00
UN053561	Translocon of the Inner Chl. Membrane 20 I	5.49	0.00	4.79	0.00
UN038093	Translocon of the Inner Chl. Membrane 20 II	5.62	0.00	4.20	0.00
UN054012	Translocon of the Inner Chl. Membrane 21	4.82	0.00	6.02	0.00
UN003204	Translocon of the Inner Chl. Membrane 214 (Ycf1)	1.60	0.59	0.59	0.41
UN027651	Translocon of the Inner Chl. Membrane 214 (Ycf1)	1.99	0.03	0.83	0.62
UN054441	Translocon of the Inner Chl. Membrane 214 (Ycf1)	1.58	0.27	0.56	0.08
UN054539	Translocon of the Inner Chl. Membrane 214 (Ycf1)	1.42	0.40	0.58	0.09
UN023778	Translocon of the Inner Chl. Membrane 214 (Ycf1)	1.62	0.21	0.66	0.23
UN000511	Translocon of the Inner Chl. Membrane 214 (Ycf2)	1.71	0.25	1.61	0.24
UN024135	Translocon of the Inner Chl. Membrane 22 III	5.12	0.00	9.92	0.00
UN018217	Translocon of the Inner Chl. Membrane 22 IV	2.67	0.00	2.96	0.00
UN069423	Translocon of the Inner Chl. Membrane 22 IV	2.29	0.00	2.67	0.00
UN051486	Translocon of the Inner Chl. Membrane 32 I	3.50	0.00	5.41	0.00
UN047389	Translocon of the Inner Chl. Membrane 32 I	0.73	0.34	1.63	0.06
UN040788	Translocon of the Inner Chl. Membrane 32 II	0.84	0.73	1.97	0.01
UN055540	Translocon of the Inner Chl. Membrane 55	5.86	0.00	15.60	0.00
UN054712	Translocon of the Inner Chl. Membrane 56	7.78	0.00	6.54	0.00
UN051168	Translocon of the Inner Chl. Membrane 62	14.76	0.00	794.42	0.00
UN000505	Translocon of the Outer Chl. Membrane 132	1.18	0.63	0.73	0.16
UN054529	Translocon of the Outer Chl. Membrane 159	6.53	0.00	5.34	0.00
UN034759	Translocon of the Outer Chl. Membrane 159	5.90	0.00	5.11	0.00
UN053567	Translocon of the Outer Chl. Membrane 159	5.66	0.05	2.98	0.21
UN055335	Translocon of the Outer Chl. Membrane 34	1.56	0.05	0.65	0.04
UN055651	Translocon of the Outer Chl. Membrane 64	1.60	0.04	0.88	0.65
UN055385	Translocon of the Outer Chl. Membrane 75	6.29	0.00	3.07	0.00
UN043569	Triosephosphate Transporter TPT	5.09	0.00	182.63	0.00
UN006329	Uncharacterized Protein	37.53	0.00	584.89	0.00
UN050650	Uncharacterized Protein	6.39	0.00	3.63	0.00
UN053185	Uncharacterized Protein	6.35	0.00	3.29	0.00
UN039814	Uncharacterized Protein	5.03	0.00	5.23	0.00
UN045729	Uncharacterized Protein	4.54	0.00	3.60	0.00
UN001252	Uncharacterized Protein	3.49	0.00	3.57	0.00
UN014458	Uncharacterized Protein	37.73	0.00	745.25	0.00
UN053947	YGGT-Family Protein	6.99	0.00	9.58	0.00
UN028858	Zeta-Carotene Desaturase	9.07	0.00	14.42	0.00

Lebenslauf

Name: Matthias Erlinghäuser

Geburtsdatum: 12.05.1984

Geburtsort: Hannover

Staatsangehörigkeit: deutsch

Publikationen

Erlinghäuser M, Hagenau L, Wimmer D, Offermann S (2016):
Development, subcellular positioning and selective protein accumulation
in the dimorphic chloroplasts of single-cell C4 species. *Current Opinion
in Plant Biology*. Vol 31.

Akademische Ausbildung

seit Januar 2013: Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Doktorand), Institut für Botanik,
Leibniz Universität Hannover

2010 – 2012: Masterstudium, M. Sc. Biologie der Pflanzen, Leibniz Universität
Hannover

2007 – 2010: Bachelorstudium, B. Sc. Biologie, Leibniz Universität Hannover

Schulische Ausbildung

1994 – 2003: Integrierte Gesamtschule Garbsen, Abitur

1990 – 1994: Grundschule Frielingen