

Plastidäre Vorläuferproteine im Cytosol: Import vs. Degradation

DISSERTATION

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

der

NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT I – BIEWISSENSCHAFTEN

MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG

vorgelegt von

Julia Grimmer

geb. am 26.06.1985 in Halle (Saale)

Gutachter: 1. Prof. Dr. Sacha Baginsky
2. Prof. Dr. Ingo Heilmann
3. Prof. Dr. Felix Kessler

Tag der Verteidigung: 26.02.2019

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die Photosynthese in Plastiden höherer Pflanzen	1
1.2 Assemblierung, Aufrechterhaltung und Regulation des plastidären Proteoms.....	3
1.2.1 Expression von Plastidenprotein-kodierenden Genen.....	3
1.2.2 Import kernkodierter Proteine in den Plastiden	4
1.2.3 Vorläuferproteine im Cytosol.....	8
1.3 Co-translationale Modifikation von Proteinen im Cytosol	11
1.4 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS).....	12
1.4.1 Die Polyubiquitinierung in Eukaryoten.....	12
1.4.2 Struktur und Funktion des Proteasoms.....	13
1.4.3 Regulation des Proteasoms.....	18
1.5 Die Rolle des Ubiquitin-Proteasom-Systems in plastidären Prozessen.....	20
1.6 Zielstellung.....	22
2 MATERIAL UND METHODEN.....	23
2.1 Material	23
2.1.1 Pflanzenmaterial	23
2.1.2 Enzyme und Antikörper.....	24
2.1.3 Plasmide und Oligonukleotide	25
2.1.4 Programme und Datenbanken.....	28
2.2 Methoden.....	29
2.2.1 Pflanzenanzucht	29
2.2.2 Generierung der Doppelmutanten.....	29
2.2.3 Physiologische Analysen.....	30
2.2.4 Molekularbiologische Standardmethoden.....	31
2.2.5 Transkriptanalysen mit quantitativer <i>real time</i> -RCR (qRT-PCR).....	34
2.2.6 Proteinbiochemische Standardmethoden	35
2.2.7 Proteasom-Inhibierung mit MG132	37
2.2.8 Massenspektrometrische Analysen	37
2.2.9 Importanalysen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
2.2.10 Mikroskopie.....	40
3 ERGEBNISSE	42
3.1 Plastidäre Vorläuferproteine sind typische NatA-Substrate	42

3.2	Anreicherung von plastidären Vorläuferproteinen in transient transformierten Protoplasten	44
3.2.1	Expression chimärer eGFP-Substrate in <i>ppi2</i> -Protoplasten	45
3.2.2	Nachweis des Toc159-abhängigen Imports von Rnp29	49
3.3	Einfluss des N-Terminus auf die Akkumulation von Vorläuferproteinen	51
3.3.1	Ein Austausch der zweiten Aminosäure verändert die N-terminale Modifikation von Vorläuferproteinen	52
3.3.2	Prolin an zweiter Position erhöht die Akkumulation von Vorläufern	53
3.3.3	Die Inhibierung der Proteasom-Aktivität mit MG132 stabilisiert Vorläuferproteine in transient transformierten Protoplasten.....	55
3.4	Analysen zur Veränderung plastidärer Eigenschaften und des Proteasoms nach Mutation von <i>Rpn8A</i>	58
3.4.1	Die T-DNA-Linie <i>rpn8a-2</i> zeigt wenige Abweichungen im Phänotyp	59
3.4.2	Der Vergleich von WT, <i>sp1</i> und <i>rpn8a</i> auf Proteinebene zeigt Unterschiede der T-DNA-Linien zueinander und zum WT auf.....	63
3.4.3	Die Mutation von <i>Rpn8A</i> in <i>ppi2</i> verbessert die Plastiden strukturell und funktionell	70
3.4.4	<i>sp1 ppi2</i> und <i>rpn8a ppi2</i> sind auf Proteinebene divergent gegenüber <i>ppi2</i> verändert.....	73
3.5	Untersuchungen zur Aufklärung funktioneller Mechanismen in <i>rpn8a</i> -Mutanten	81
3.5.1	Quantitative Transkriptanalysen zu plastidären und UPS-zugehörigen Proteinen weisen auf differenzielle Regulationsmechanismen hin	82
3.5.2	Untersuchung zur Import-Fähigkeit von <i>rpn8a</i> -Mutanten	85
3.5.3	Vergleich der MG132- und mutationsbasierten Inhibierung des Proteasoms auf Proteinebene.....	87
3.5.4	Anzucht unter Schwachlichtbedingungen ändert physiologische und photosynthetische Eigenschaften	93
4	DISKUSSION	96
4.1	Akkumulation und Import von Vorläuferproteinen bei Überexpression in Toc159-defizienten Protoplasten	96
4.1.1	Der Import von eGFP-Fusionsproteinen erfolgt auch ohne Toc159	96
4.1.2	Rnp29 als spezielles Toc159-abhängiges Importsubstrat	98
4.2	Bedeutung N-terminaler Aminosäuren und N-Acetylierung von Vorläuferproteinen.....	99
4.3	Ein Defekt der Proteasom-Untereinheit Rpn8A erzeugt proteolytischen Stress und beeinflusst die Proteasom-Aktivität	102
4.3.1	Steigerung der Abundanz und Aktivität des 20S-Proteasoms in <i>rpn8a</i> -Mutanten.....	102
4.3.2	Regulation der Abundanz von RP-Untereinheiten in <i>rpn8a</i>	103
4.3.3	<i>rpn8a</i> zeigt im Vergleich zu anderen RP-Mutanten einen eher schwach ausgeprägten Phänotyp	104

4.3.4	Rpn8B könnte den Verlust von Rpn8A in <i>rpn8a</i> -Mutanten kompensieren	107
4.4	Einfluss der <i>Rpn8A</i> -Mutation auf plastidäre Prozesse	108
4.4.1	Rpn8A und SP1 beeinflussen Plastiden auf funktionell unterschiedlichen Wegen	108
4.4.2	Änderungen in Pigment- und Proteinkonzentrationen gehen nicht auf Transkriptregulationen zurück	109
4.4.3	Proteasom-abhängige Regulation von Vorläuferproteinen	111
4.4.4	Photoprotektive Mechanismen und oxidativer Stress in <i>ppi2</i> und <i>rpn8a ppi2</i>	112
ZUSAMMENFASSUNG.....		116
LITERATURVERZEICHNIS.....		118
ANHANG		129
LEBENS LAUF		145
EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG.....		146
DANKSAGUNG		147

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildungen

Abb. 1:	Schematische Darstellung der Wege von plastidären Vorläuferproteinen im Cytosol.....	10
Abb. 2:	Das 26S-Proteasom in Eukaryoten.....	15
Abb. 3:	<i>In silico</i> Analyse der N-Termini kernkodierter Proteine.....	43
Abb. 4:	Die <i>plastid protein import mutant 2 (ppi2)</i>	45
Abb. 5:	Schematische Darstellung der verwendeten eGFP-Fusionsproteine.....	46
Abb. 6:	<i>Confocal laser scanning microscopy (CLSM)</i> mit transient transformierten Protoplasten.....	47
Abb. 7:	Nachweis von eGFP-Fusionsproteinen mittels Western-Blot-Analyse.....	48
Abb. 8:	Nachweis der Toc159-Abhängigkeit des Imports von Rnp29.....	50
Abb. 9:	Import verschiedener Rnp29:eGFP-Varianten in transient transformierten Protoplasten.....	54
Abb. 10	Analyse von Fd2 ₁₋₁₀₀ :eGFP und Fd2 ₁₋₁₀₀ A2P:eGFP in Protoplasten.....	55
Abb. 11:	Stabilisierung von Vorläuferproteinen in transient transformierten Protoplasten mit MG132.....	56
Abb. 12:	Die T-DNA-Insertionslinie <i>rpn8a</i>	59
Abb. 13:	Physiologische Eigenschaften von <i>rpn8a</i>	61
Abb. 14:	Die Proteasom-Aktivität von <i>rpn8a</i>	63
Abb. 15:	Gesamtproteom der Linien <i>sp1</i> und <i>rpn8a</i> im Vergleich zum WT.....	65
Abb. 16:	Immunologischer Nachweis plastidärer Proteine in <i>sp1</i> , <i>rpn8a</i> und WT.....	67
Abb. 17:	Plastidenproteine der Linien <i>sp1</i> und <i>rpn8a</i> im Vergleich zum WT.....	69
Abb. 18:	Eigenschaften der Doppelmutanten im Vergleich zu <i>ppi2</i>	70
Abb. 19:	Verbesserung der Plastidenstruktur in der <i>rpn8a ppi2</i> gegenüber <i>ppi2</i>	71
Abb. 20:	Funktionelle Veränderung des PSII in <i>rpn8a ppi2</i> und <i>ppi2</i>	73
Abb. 21:	Gesamtproteom der Linien <i>sp1 ppi2</i> und <i>rpn8a ppi2</i> im Vergleich zu <i>ppi2</i>	74
Abb. 22:	Funktionelle Gruppierung signifikant veränderter Proteine in <i>rpn8a ppi2</i>	76
Abb. 23:	Plastidenproteine der Linien <i>sp1 ppi2</i> und <i>rpn8a ppi2</i> im Vergleich zu <i>ppi2</i>	78
Abb. 24:	Immunologischer Nachweis plastidärer Proteine in <i>ppi2</i> , <i>sp1 ppi2</i> und <i>rpn8a ppi2</i>	80
Abb. 25:	Quantitative Transkriptanalysen zu plastidären und UPS-zugehörigen Proteinen.....	83

Abb. 26:	Verhältnis der Transkript- zur Proteinregulation in <i>rpn8a ppi2</i>	85
Abb. 27:	Importfähigkeit von <i>rpn8a</i> -Mutanten	86
Abb. 28:	Auswirkung der MG132-Behandlung auf das Proteom von WT- bzw. <i>ppi2</i> -Keimlingen.....	89
Abb. 29:	Vergleich der Proteinmengen von Glutathion-S-Transferasen und Proteasom-Untereinheiten in MG132-behandelten und unbehandelten Keimlingen.....	90
Abb. 30:	Regulation von Proteasomuntereinheiten und weiterer Proteine des PSR.....	92
Abb. 31:	Einfluss der Lichtbedingungen auf Eigenschaften von WT und Mutanten	94

Tabellen

Tab. 1:	Zahl der putativ am Ubiquitin-System beteiligten Gene in Eukaryoten	13
Tab. 2:	Übersicht zu den verwendeten Enzymen.....	24
Tab. 3:	Übersicht zu den verwendeten primären Antikörpern.....	24
Tab. 4:	Übersicht zu den verwendeten Konstrukten	25
Tab. 5:	Oligonukleotide zur cDNA-Amplifikation und Klonierung.....	26
Tab. 6:	Oligonukleotide zur Genotypisierung von T-DNA-Linien	26
Tab. 7:	Oligonukleotide zur Transkriptanalyse mittels <i>real time</i> -PCR.....	27
Tab. 8:	Übersicht zu den verwendeten Programmen und Datenbanken/Portalen.....	28
Tab. 9:	Reaktionsbedingungen der qRT-PCR.....	34
Tab. 10:	MS-basierte Identifizierung N-terminaler Modifikationen verschiedener Rnp29- und Fd2-Varianten.....	52
Tab. 11:	Signifikant veränderte Proteine von <i>sp1</i> bzw. <i>rpn8a</i> mit Funktion in der Proteindegradation	66
Tab. 12:	Signifikant 1,5-Fach verändert sowie ausschließlich in <i>rpn8 ppi2</i> identifizierte Proteine der Lichtreaktion (<i>BIN 1.1</i>) und RuBisCO.....	79

Anhang

Anhang 1:	Sequenzen zu den verwendeten eGFP-Konstrukten im Plasmid pRT100mod	129
Anhang 2:	<i>Confocal laser scanning microscopy</i> (CLSM) mit transient transformierten Protoplasten.....	134
Anhang 3:	<i>inclusion lists</i> (m/z-Werte) für zielgerichtete MS-Messungen zur Identifizierung N-terminaler Peptide verschiedener Rnp29- und Fd2-Varianten.....	135
Anhang 4:	Extrahierte Spektren N-terminaler Peptide von Rnp29-Varianten.....	136

Anhang 5:	Extrahierte Spektren N-terminaler Peptide von Fd2-Varianten	137
Anhang 6:	<i>in vitro</i> Import in isolierte WT-Chloroplasten	137
Anhang 7:	Stabilisierung von Vorläuferproteinen in transient transformierten Protoplasten mit MG132.....	138
Anhang 8:	Abundanz photosynthetischer Proteine in <i>sp1</i> und <i>rpn8a</i>	139
Anhang 9:	Analog im Vergleich zu <i>ppi2</i> regulierte Proteine in <i>sp1 ppi2</i> und <i>rpn8a ppi2</i>	139
Anhang 10:	In <i>rpn8a ppi2</i> gegenüber <i>ppi2</i> \geq 1,5-fach, signifikant höher veränderte Proteine	140
Anhang 11:	In <i>rpn8a ppi2</i> gegenüber <i>ppi2</i> \geq 1,5-fach, signifikant geringer veränderte Proteine	142
Anhang 12:	Das Rpn8A-Homologe Rpn8B.....	144

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

% (v/v)	<i>volume per volume</i> , Gewichtsprozent
% (w/v)	<i>weight per volume</i> , Volumenprozent
½ MS	½ Murashige & Skoog Medium
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AGI	<i>Arabidopsis genome initiative</i>
Cdc48	<i>cell division controll 48</i>
Chip	<i>carboxy terminus of Hsc70-interacting protein</i>
CHS	Chalkonsynthase
CLSM	<i>confocal laser scanning microscopy</i>
CP, 20S CP	<i>20S catalytic particle</i> , katalytische Einheit des Proteasoms
CSN	<i>constitutive photomorphogenesis 9 (Cop9)</i> -Signalosom
C _t	<i>crossing threshold</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DUB	Deubiquitinierendes Enzym
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> aus <i>Aequorea victoria</i>
eIF3	eukaryotischen Initiationsfaktor 3
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fd2	Ferredoxin 2
FNR	Ferredoxin-NADP-Reduktase
GA	<i>Gibberellic acid</i> , Gibberellinsäure
Glk1/2	Transkriptionsfaktor <i>Golden 2-like 1/2</i>
GST/Gst	Glutathion-S-Transferase
GUN/Gun	<i>Genomes uncoupled</i>
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
Hsc70-4	<i>heat shock protein cognate 70-4</i>
HSP/Hsp	<i>heat shock protein</i> , Hitzeschockprotein
JAMM	JAB1-MPN-Mov34 [Sequenzmotiv]
LHC/Lhc	<i>light harvesting complex</i> , Lichtsammelkomplex
MAP	Methionin-Aminopeptidase
MG132	Proteasominhibitor, N-Benzylloxycarbonyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal
MPN	Mpr1/Pad1 N-terminal [Sequenzmotiv]
MS	Massenspektrometrie
N-Ac	N-terminale Acetylierung
Nac78/53	NAM/ATAF1/CUC2 (No Apical Meristem/Arabidopsis Transcription Activation Factor 1/Cup-Shaped Cotyledons 2) 78/53
NAT/Nat	N-Acetyltransferase
NL-Pflanzen	unter Normallicht (150 µmol m ⁻² s ⁻¹) angezogene Pflanzen
NME	<i>N-terminal methionine excision</i> , Abspaltung des initialen Methionins
NPQ	<i>non-photochemical quenching</i> , nicht-photochemische Auslöschung

OEC33	<i>oxygen evolving complex 33</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAM	<i>pulse amplitude modulation</i>
PAR	<i>photosynthetically active radiation</i> , photosynthetisch aktive Strahlung
PCI	Proteasom-CSN-eIF3 [Sequenzmotif]
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PLGS	<i>ProteinLynx Global Server</i> [Software]
<i>ppi1</i>	<i>plastid protein import mutant 1; toc33</i> -Mutante
<i>ppi2</i>	<i>plastid protein import mutant 2; toc159</i> -Mutante
ppm	<i>parts per million</i> [Konzentrationseinheit]
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
PSM	<i>peptide spectrum match</i>
PSR	Proteasom-Stress-Regulon
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative <i>real time-PCR</i>
Rbcl	<i>large subunit of RuBisCo</i> , große RuBisCo-Untereinheit
RbcS	<i>small subunit of RuBisCo</i> , kleine RuBisCo-Untereinheit
Rnp29	Ribonukleoprotein 29
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
RP, 19S RP	<i>19S regulatory particle</i> , regulatorische Einheit des 26S-Proteasoms
RP-Mutanten	Sammelbegriff für <i>Arabidopsis</i> -Linien mit Mutation in 19S RP-Untereinheiten kodierenden Genen
Rpn	<i>regulatory particle non-ATPase subunit</i>
Rpt	<i>regulatory Triple-A-ATPase subunit</i>
RT	Raumtemperatur
RuBisCO	Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SALK	Salk Institute Genomic Analysis Laboratory
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwerts
SL-Pflanzen	unter Schwachlicht ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) angezogene Pflanzen
SP1	<i>suppressor of ppi1</i>
TAIR	<i>The Arabidopsis information resource</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TIC/Tic	<i>Translocon of the Inner envelope of the Chloroplast</i> , Translokationskomplex der inneren Chloroplastenhüllmembran
TOC/Toc	<i>Translocon of the Outer envelope of the Chloroplast</i> , Translokationskomplex der äußeren Chloroplastenhüllmembran
TPR	<i>tetratrico-peptide repeat</i> [Sequenzmotif]
UbQ/Ubq	Ubiquitin
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
WT	Wildtyp

1 EINLEITUNG

1.1 Die Photosynthese in Plastiden höherer Pflanzen

Die Photosynthese ist einer der bedeutendsten Prozesse der Erde, bei dem in einem biologischen System Licht in chemische Energie umgewandelt wird. Grüne Pflanzen, Algen, Phytoplankton und einige photosynthetische Bakterien sind fähig Photosynthese zu betreiben und Licht als Energiequelle für Stoffwechselprozesse und die Produktion von Biomasse zu nutzen. Bei der oxygenen Photosynthese werden die energiearmen anorganischen Stoffe Wasser und CO_2 mit Hilfe von Lichtenergie in energiereiche, organische Kohlenwasserstoffverbindungen umgewandelt. Molekularer Sauerstoff wird als Nebenprodukt gebildet, der wiederum essentiell für den Erhalt aeroben Lebens ist und der Photosynthese eine enorme globale Bedeutung einräumt.

Biochemisch betrachtet sind die Hauptelemente der Photosynthese die Reaktionszentren Photosystem I (PSI) und Photosystem II (PSII), Lichtsammelkomplexe (*light harvesting complexes*, LHCs), die lichtinduzierte elektronische Anregung an die Reaktionszentren leiten können, Elektronentransfer-Elemente, die Elektronen zwischen den Reaktionszentren vermitteln, und ein Mechanismus zur Fixierung von Kohlenstoff zur Synthese organischer Verbindungen (Olson und Blankenship, 2004). Zudem sind Adenosintriphosphat (ATP)-Synthase-Komplexe zur Umwandlung des, während des Elektronentransports erzeugten, chemischen Potentials in ATP involviert. Diese Elemente agieren streng koordiniert, um einen effizienten Ablauf des Photosynthese-Prozesses zu gewährleisten. In eukaryotischen Zellen findet die Photosynthese in den Chloroplasten statt.

Chloroplasten sind chlorophyllhaltige, spezialisierte Plastiden in photosynthetisch aktivem Gewebe grüner Pflanzen. Sie entwickeln sich aus undifferenzierten Proplastiden oder aus bereits differenzierten Plastidentypen, wie den stärkespeichernden Amyloplasten, Pigmentakkumulierenden Chromoplasten oder den in Dunkelheit gebildeten Etioplasten. Abhängig von der pflanzlichen Entwicklung, dem Gewebe und äußeren Bedingungen kann auch eine Umwandlung von Chloroplasten stattfinden. Beispielsweise werden Chloroplasten bei Seneszenz zu Gerontoplasten oder bei der Reifung von Früchten zu Chromoplasten (Jarvis und López-Juez, 2013).

Chloroplasten sind von einer äußeren und einer inneren Hüllmembran umgeben, die durch einen Intermembranraum getrennt sind. Die innere Membran umschließt die plasmatische Plastidenmatrix, das Stroma. In Chloroplasten höherer Pflanzen bilden Thylakoid-Membranen ein internes, in sich verbundenes, lamellenartiges Membransystem, wodurch das Thylakoidlumen vom Stroma abgegrenzt wird. Elektronenmikroskopisch kann man deutlich zwei morphologisch unterschiedliche Thylakoid-Strukturen unterscheiden: Stapel aus mehreren übereinander gelagerten Thylakoid-

EINLEITUNG

Schichten, genannt Grana-Thylakoide und ungestapelte Bereiche, genannt Stroma-Thylakoide (Nevo *et al.*, 2012). In den Thylakoidmembranen sind die photosynthetischen Komplexe integriert. Das PSII ist als Dimer assoziiert mit LHCII Protein-Pigment-Aggregaten in den Grana-Thylakoiden lokalisiert, während das PSI und die assoziierten LHCI-Komplexe in nicht-gestapelten Membranen, den Stroma-Thylakoiden oder Grana-Enden, lokalisiert sind (Andersson und Anderson, 1980). Die LHC-Proteine binden große Mengen an photosynthetischen Pigmenten Chlorophyll a, Chlorophyll b und Carotinoiden.

Durch Lichtabsorption wird Chlorophyll a angeregt, indem ein Elektron auf ein höheres Energie-Niveau angehoben wird. In Pflanzen wird nur ein geringer Teil der vom Chlorophyll absorbierten Energie in Form von Fluoreszenz emittiert. Stattdessen wird die Energie bevorzugt auf ein benachbartes Chlorophyll transferiert. Die weitergeleitete Energie führt letztendlich zur Übertragung eines Elektrons von den Reaktionszentren der Photosysteme an einen Elektronenakzeptor. Diese Art der Aufhebung des angeregten S_1 -Zustands des Chlorophylls, die direkt im Zusammenhang mit der Photosynthese-Reaktion steht, wird als photochemische Auslöschung (*photochemical quenching*) bezeichnet. Ist die Kapazität aller Elektronenakzeptoren ausgeschöpft, besteht allerdings die Gefahr, dass Chlorophyll vom angeregten Singulett in den energetisch niedrigeren Triplett-Zustand übergeht. Im Triplett-Zustand kann Chlorophyll beim Rückfall in den S_0 -Grundzustand Energie auf Sauerstoff übertragen, wodurch es zur Bildung von Singulett-Sauerstoff kommt, einer sehr reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), die zur Schädigung von Pigmenten, Proteinen und Membranlipiden führen kann (Barber und Andersson, 1992; Pospíšil, 2016). Chlorophyll kann durch Konvertierung der Anregungsenergie in Wärme regeneriert werden, um die Möglichkeit der ROS-Produktion zu minimieren. Dieser schnell induzierbare und reversible Prozess der nicht-photochemischen Auslöschung (*non-photochemical quenching*, NPQ) ermöglicht die kurzfristige Adaption des PSII an wechselnde Lichtbedingungen. Der Mechanismus wird durch die Verringerung des pH im Thylakoidlumen stimuliert. Die pH-Änderung kann direkt zur Protonierung von LHCII führen oder indirekt durch die Protonierung des Proteins PsbS wirken (Ruban *et al.*, 2012). Die daraus resultierenden Konformationsänderungen der LHC-Proteine verändern intermolekulare Wechselwirkungen, die eine Ableitung von Lichtenergie in Form von Wärme begünstigen. Zusätzlich wird durch Sinken des pH-Werts im Thylakoidlumen das Enzym Violaxanthin-Deepoxidase aktiviert. Es katalysiert die schrittweise Interkonvertierung spezifischer LHC-gebundener Xanthophyll-Pigmente zu Antheraxanthin und Zeaxanthin, das überschüssige Energie effektiver als Violaxanthin in Wärme ableitet.

1.2 Assemblierung, Aufrechterhaltung und Regulation des plastidären Proteoms

Cyanobakterien stellen den Ursprung oxygene Photosynthese-betreibender Organismen dar (Björn und Govindjee, 2009). Evolutionär sind Plastiden durch die Aufnahme eines Vorfahren der heutigen Cyanobakterien in eine eukaryotische Zelle entstanden. Im Zuge der Integration des Endosymbionten als Zellorganell ging ein Großteil der ursprünglich in dem Bakterium enthaltenen Erbinformation in den Kern des eukaryotischen Wirts über (Martin und Herrmann, 1998). In höheren Pflanzen sind, basierend auf Genom-Vorhersagen, geschätzt 95% von etwa 3000 Plastidenproteinen kernkodiert und müssen posttranskriptional in den Plastiden importiert werden (Woodson *et al.*, 2013; Chotewutmontri *et al.*, 2017). Der beträchtliche Anteil kernkodierter Plastidenproteine zeigt deutlich die Abhängigkeit des Organells von extraplastidären Prozessen und die Notwendigkeit einer Kommunikation, um die Assemblierung, Aufrechterhaltung und Regulation des plastidären Proteoms zu gewährleisten. Dies erfordert die Koordination zweier Genome und ein spezifisches Protein-Translokationssystem.

1.2.1 Expression von Plastidenprotein-kodierenden Genen

Die Größe der Plastiden-DNA, auch Plastom genannt, beträgt in höheren Pflanzen etwa 120-160 kb (Jarvis und López-Juez, 2013). Jeder Plastid besitzt mehrere Kopien der DNA. In *A. thaliana* enthält das 154 kb große Plastom 45 RNA-kodierende Gene und 87 Protein-kodierende Gene (Sakamoto *et al.*, 2008). Im Plastom nahezu aller Pflanzen sind die Kernuntereinheiten einer Eubakterien-ähnlichen RNA-Polymerase (*plastid-encoded RNA polymerase*, PEP) kodiert. Zusätzlich existiert eine kernkodierte RNA-Polymerase (*nuclear-encoded RNA polymerase*, NEP), die essentiell für die korrekte Transkription plastidärer Gene in höheren Pflanzen ist (Liere und Börner, 2007). Zur spezifischen Initiation der Transkription plastidärer Gene durch PEP ist die Interaktion des katalytischen Kerns der Polymerase mit Sigma-Faktoren nötig. Diese Sigma-Faktoren sind wiederum kernkodiert und müssen in Plastiden importiert werden. In *A. thaliana* existieren sechs Sigma-Faktoren SIG1-SIG6, die maßgeblich an der Regulation der plastidären Transkription beteiligt sind. Untersuchungen von Sigma-Faktor-Mutanten und Antisense-Linien zeigten, dass die verschiedenen Sigma-Faktoren spezifische aber auch zum Teil überlappende Funktionen hinsichtlich der Erkennung von Promotern aufweisen (Chi *et al.*, 2015). Für einige Plastidengene besteht jedoch eine spezifische, wenn auch nicht absolute Abhängigkeit der Transkriptregulation von einem entsprechenden Sigma-Faktor (Liere und Börner, 2007).

Der Großteil Plastiden-kodierter Gene ist im Zellkern lokalisiert und unterliegt dort Regulationen durch Transkriptionsfaktoren und Promotern. In Anpassung an Veränderungen im Stoffwechsel- und

Entwicklungsstatus der Plastiden wird eine Regulation der nuklearen Expression plastidärer Proteine auch durch Signale der Plastiden realisiert. Die Kommunikation vom Organell zum Kern wird als retrograde Signaltransduktion bezeichnet und reguliert die Expression von kernkodierten, plastidären Proteinen (Leister, 2012; Jarvis und López-Juez, 2013; Börner, 2017). Bislang gibt es nur wenige experimentelle Belege zum Ursprung retrograder Signale (Leister, 2012; Börner, 2017). Die Suche nach *Arabidopsis*-Mutanten mit einer reduzierten Repression von Reportergenen nach Aktivierung der retrograden Signaltransduktion mit Norflurazon, einem Hemmstoff der Carotinoid-Biosynthese, führten zur Identifizierung von sechs *Genomes uncoupled (GUN)*-Genen (Börner, 2017). Weitere Komponenten, die *downstream* der GUNs in die retrograde Signaltransduktion involviert sind, sind die Transkriptionsfaktoren *abscisic acid-insensitive 4 (ABI4)* (Koussevitzky *et al.*, 2007) und *Golden 2-like 1 (Glk1)* (Kakizaki *et al.*, 2009). Eine Repression von Genen für photosynthetische Proteine durch eine Gun1-abhängige Reduzierung der Glk1-Expression konnte auch bei Störung der Plastiden durch Defekte in Komponenten des Plastidenimport-Apparats gezeigt werden (Kakizaki *et al.*, 2009).

1.2.2 Import kernkodierter Proteine in den Plastiden

Plastidäre Proteine, die im Kern kodiert sind, müssen zur Ausübung ihrer spezifischen Funktion nach ihrer Synthese im Cytosol an ihren Zielort transportiert werden. Die meisten Proteine werden als Vorläuferproteine synthetisiert. Sie tragen eine N-terminale Erkennungssequenz, das Transitpeptid, das den Import über die Translokationskomplexe der äußeren (*Translocon of the Outer envelope of the Chloroplast*, TOC) und inneren Chloroplastenhüllmembran (*Translocon of the Inner envelope of the Chloroplast*, TIC) ins Stroma vermittelt und anschließend von der stromalen Prozessierungspeptidase (SPP) abgespalten wird (Paila *et al.*, 2015; Chotewutmontri *et al.*, 2017). Das N-terminale Transitpeptid ist essentiell und ausreichend für die Translokation des Proteins ins Stroma (Smeekens *et al.*, 1987; Keegstra *et al.*, 1989; Bruce, 2000). N-terminal weisen Transitpeptide häufig eine hydrophobe Domäne auf, die etwa 10 Aminosäuren umfasst, mit einem Alanin, auf das initiale Methionin folgend, beginnt und durch Glycin und Prolin terminiert wird (Karlin-Neumann und Tobin, 1986; Heijne *et al.*, 1989; Bruce, 2001). Die zentrale Domäne ist reich an hydroxylierten Aminosäuren und arm an sauren Aminosäuren. Die C-terminale Domäne ist durch die Anreicherung von Arginin charakterisiert (Karlin-Neumann und Tobin, 1986; Heijne *et al.*, 1989; Bruce, 2001).

Der Transitpeptid-vermittelte Import über die TOC/TIC-Maschinerie stellt den bedeutendsten Importweg dar, doch nicht alle kernkodierten plastidären Proteine haben eine spaltbare Signalsequenz. Für Proteine der inneren Chloroplastenhüllmembran, ist beispielsweise ein Import unabhängig von einem Transitpeptid und TOC-Kernkomponenten nachgewiesen (Nada und Soll,

2004; Miras *et al.*, 2007). Plastidenproteine, die ein Signalpeptid besitzen, das einen co-translationalen Import ins Endoplasmatische Retikulum (ER) vermittelt, können über den sekretorischen Weg importiert werden (Villarejo *et al.*, 2005; Nanjo *et al.*, 2006). Membranproteine der äußeren Hüllmembran weisen selten spaltbare N-terminale Transitpeptide auf. Bei einigen Membranproteinen können strukturelle Besonderheiten, wie die hydrophoben Eigenschaften der Transmembrandomänen und ein C-terminal angrenzender, positiv geladener Bereich als Signal für eine korrekte Integration in die äußere Chloroplastenhüllmembran fungieren (Hofmann und Theg, 2005; Lee *et al.*, 2014). Andere Membranproteine besitzen keine konkrete Signalsequenz, sowohl die C-terminale Transmembrandomäne, als auch der N-terminale Bereich dieser Proteine sind essentiell bei der korrekten Translokation. Am Import von Proteinen der äußeren Hüllmembran von Chloroplasten können cytosolische Proteine, wie das *Ankyrin-repeat protein 2* (AKR2) und das kleine Hitzeschockprotein sHsp17.8, sowie Proteine der äußeren Hüllmembran, wie Toc75, beteiligt sein, die eine Erkennung, Navigation und Integration erleichtern (Lee *et al.*, 2014; Richardson *et al.*, 2014).

Der TOC/TIC-Importkomplex

Versuche mit isolierten Chloroplasten aus Erbse zeigten, dass der Importprozess durch die TOC/TIC-Importkomplex in drei energetisch unterschiedlichen Phasen abläuft (Schnell und Blobel, 1993): Vorläuferproteine können ATP-unabhängig, reversibel an die äußere Chloroplastenhüllmembran binden. Durch geringe ATP-Konzentrationen ($\leq 100 \mu\text{M}$) kann die Bildung eines stabilen Import-Intermediates in einer frühen Phase des Imports generiert werden, der die Translokation initiiert. Der Transport ins Stroma durch die äußere und innere Membran wird jedoch erst durch Steigerung der ATP-Konzentration auf $> 1 \text{ mM}$ ATP induziert, was die Beteiligung von ATP-hydrolysierenden Proteinen am Translokationsprozess impliziert. Die gezielte Untersuchung stabiler Import-Intermediate nach Arretierung des *in vitro* Imports durch Limitierung des ATP-Gehalts führten zur Identifizierung der am frühen Importprozess beteiligten Proteine Hsp70, Toc75, Toc159 und Toc34 (Perry und Keegstra, 1994; Schnell *et al.*, 1994). Heterolog exprimiert sind die Proteine Toc75, Toc159 und Toc34 fähig, stabile Membrankomplexe zu formen und einen Transport von Vorläufern durch Lipid-Vesikel zu vermitteln (Ma *et al.*, 1996; Schleiff *et al.*, 2003). Sie werden als TOC-Kernuntereinheiten bezeichnet.

Das β -barrel-Protein Toc75 fungiert als Translokationskanal in der äußeren Hüllmembran des Chloroplasten (Schnell *et al.*, 1994; Tranel *et al.*, 1995; Hinnah *et al.*, 2002). Elektrophysikalische und strukturelle Analysen von rekombinanten Toc75 zeigten, dass das Protein einen ionendurchlässigen Kanal mit einer Porengröße formt, die den Transfer komplett oder partiell entfalteter Proteine ermöglichen kann (Hinnah *et al.*, 2002). Der *knockout* von Toc75 III (AT3G46740) in *A. thaliana* ist

EINLEITUNG

letal (Baldwin *et al.*, 2005; Hust und Gutensohn, 2006), was Ausdruck der Bedeutung von Toc75 III als Kernkomponente des TOC-Komplexes in *A. thaliana* ist.

Im TOC-Kernkomplex assembliert Toc75 mit den TOC-Rezeptorproteinen Toc34 und Toc159, die direkt mit Vorläuferproteinen interagieren können (Hirsch *et al.*, 1994; Kessler *et al.*, 1994; Perry und Keegstra, 1994; Seedorf *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1996; Kouranov und Schnell, 1997). Sie besitzen eine GTPase-Domäne, die dem Cytosol exponiert ist und eine Rolle bei der Initiation des Importprozesses hat (Kessler *et al.*, 1994; Paila *et al.*, 2015).

In *A. thaliana* gibt es zwei Vertreter der Toc34-Familie, Toc33 und Toc34, die eine Sequenzübereinstimmung von 61% aufweisen (Jarvis *et al.*, 1998). Ein Verlust von Toc33 (*plastid protein import mutant 1, ppi1*) wirkt sich vor allem in jungen Entwicklungsstadien auf die Biogenese der Chloroplasten aus, was den Mutanten ein hellgrünes Erscheinungsbild verleiht (Jarvis *et al.*, 1998; Gutensohn *et al.*, 2000), während die Toc34-Mutante *ppi3* dem Wildtyp (WT) ähnelt (Gutensohn *et al.*, 2000; Constan *et al.*, 2004). Die Fähigkeit von Toc34, den Phänotyp von *ppi1* zu komplementieren (Jarvis *et al.*, 1998) und die Beobachtung, dass ein Verlust beider Toc34-Homologe letal ist (Constan *et al.*, 2004), argumentieren für eine überlappende Funktion beider Homologe. *In vitro* Analysen zeigen allerdings, dass Toc33 und Toc34 Unterschiede in ihrer Affinität zu Vorläuferproteinen (Jelic *et al.*, 2003) und differenzielle Expressionsmuster besitzen (Gutensohn *et al.*, 2000; Kubis *et al.*, 2003), die für eine divergente Funktionalität beider Homologe von Bedeutung sein könnte.

Das größere GTPase-Protein des TOC-Komplexes, Toc159, ist strukturell in drei Bereiche gegliedert: die N-terminale A-Domäne ist durch die hohe Abundanz von sauren Aminosäuren geprägt, die zentrale G-Domäne enthält die konservierten GTP-Bindestellen und die M-Domäne ist ein C-terminaler Protease-geschützter Bereich, der in der äußeren Membran verankert ist (Hirsch *et al.*, 1994; Kessler *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2000). Die vier in *A. thaliana* exprimierten Proteine der Toc159-Familie Toc159, Toc132, Toc120 und Toc90 zeigen Sequenzähnlichkeiten in der G- und der M-Domäne, variieren jedoch stark im Bereich der N-terminalen A-Domäne, die in Toc90 enorm reduziert ist (Bauer *et al.*, 2000; Jackson-Constan, 2001; Kubis *et al.*, 2004). Im Vergleich zu den anderen Einzelmutationen der *Toc159*-Homologe weist die *toc159*-Mutante *plastid protein import mutant 2 (ppi2)* einen ausgeprägten Albinophänotyp, die verringerte Abundanz plastidärer Proteine und eine degenerierte Plastidenstruktur auf und kann auf Erde nicht über das Kotyledonen-Stadium hinauswachsen (Bauer *et al.*, 2000; Kubis *et al.*, 2004; Hiltbrunner *et al.*, 2004). Eine Überexpression von Toc132 oder Toc120 kann den Phänotyp von *ppi2* nicht regenerieren (Ivanova *et al.*, 2004; Kubis *et al.*, 2004), was auf eine differenzielle Funktionalität von Toc159 und Toc132 bzw. Toc120 hinweist. Die massive Überexpression von Toc90, das keine A-Domäne besitzt und nur 30,5%

EINLEITUNG

Sequenzübereinstimmung zu Toc159 aufweist (Kubis *et al.*, 2004), ist in Studien von Infanger *et al.* (2011) fähig den *ppi2*-Phänotyp zumindest teilweise zu verbessern. In der Doppelmutante im Ökotyp Wassilewskija *ppi2 ppi4*, die weder Toc159 noch Toc90 exprimiert, ist der Albinophänotyp im Vergleich zur Einzelmutante *ppi2* stärker ausgeprägt (Hiltbrunner *et al.*, 2004), was zusätzlich eine zum Teil redundante Funktion von Toc90 und Toc159 stärkt.

Die Expression von Toc159 unterliegt sowohl während der Entwicklung als auch in unterschiedlichen Geweben einer Regulation. Die Toc159-Expression dominiert besonders in jungen Pflanzen und grünem Gewebe gegenüber der Expression von Toc120, Toc132 und Toc90, während in älteren Pflanzen sowie in nicht-photosynthetischem Gewebe ein geringerer Unterschied besteht (Bauer *et al.*, 2000; Yu und Li, 2001; Ivanova *et al.*, 2004; Kubis *et al.*, 2004). Das charakteristische Expressionsmuster, dass Toc159 *in vitro* eine Präferenz für photosynthetische Vorläufer hat (Ivanova *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2004; Inoue *et al.*, 2010) und eher mit Toc33 als mit Toc34 assembliert (Ivanova *et al.*, 2004), führten zu der Hypothese, dass Toc159 im Komplex mit Toc33 auch *in planta* eine besondere Bedeutung beim Import photosynthetischer Proteine zukommt. *Housekeeping* Proteine werden demnach eher über einen TOC-Komplex mit Toc120/Toc132 und Toc34 transportiert. Diese Hypothese wurde bestärkt durch die Beobachtung, dass in *ppi2* nicht-photosynthetische Proteine wie die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) Untereinheit E1 α und die Chalkonsynthase (CHS) in gleichem Maße oder verstärkt nachgewiesen werden können und an der Photosynthese beteiligte Proteine wie LHCs, Ferredoxin und kernkodierte Untereinheiten der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RuBisCO) weniger abundant sind (Bauer *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2004). Eine Massenspektrometrie (MS)-basierte, quantitative Analyse des gesamten Proteoms zeigte jedoch, dass 74% der kernkodierten plastidären Proteine, inklusive einiger photosynthetische Proteine, in Toc159-defizienten Pflanzen im Vergleich zum WT unverändert sind (Bischof *et al.*, 2011). Plastidäre Proteine, die im WT gegenüber Toc159-defizienten Pflanzen höher abundant sind und somit eine potentielle Toc159-Abhängigkeit aufweisen, sind funktionell verschiedenen zellulären Prozessen, aber tatsächlich überwiegend der Photosynthese zugeordnet (Bischof *et al.*, 2011). Gleichzeitig werden viele dieser photosynthetischen Proteine in Toc159-defizienten Pflanzen im Vergleich zum WT in geringerem Maße exprimiert (Kakizaki *et al.*, 2009; Bischof *et al.*, 2011), sodass die veränderte Abundanz der Photosynthese-Proteine in *ppi2* nicht allein auf den Importdefekt, sondern auch auf eine transkriptionale Regulation zurückgeht. Darüber hinaus konnte in *yeast-two-hybrid*-Experimenten die Interaktion von Toc132 mit vielen photosynthetischen und nicht-photosynthetischen Vorläuferproteinen gezeigt werden (Dutta *et al.*, 2014), sodass anzunehmen ist, dass die Spezifität der TOC-Rezeptoren nicht allein auf der funktionellen Gruppierung von Vorläufern beruhen kann.

Als periphere Untereinheit des TOC-Komplexes wurde Toc64 bei Isolierung des TOC-Komplexes nach chemischem *cross-linking* identifiziert (Sohrt und Soll, 2000). Toc64 besitzt eine *tetratrico-peptide repeat* (TPR)-Domäne, die eine Affinität zu den Chaperonen Hsp90 und Hsp70 vermittelt (Panigrahi *et al.*, 2013). Es gibt Hinweise darauf, dass Toc64 als Rezeptor für Hsp90-gebundene Vorläufer fungiert und deren Transfer zu Toc34/Toc33 vermittelt (Qbadou *et al.*, 2006; Sommer *et al.*, 2013). Eine Beteiligung von Toc64 zusammen mit Toc12, Hsp70 und Tic22 beim Transfer von Vorläufern im Intermembranraum ist allerdings umstritten (Qbadou *et al.*, 2007; Flores-Pérez und Jarvis, 2013).

Für einen erfolgreichen Import von Vorläuferproteinen ins Stroma ist wahrscheinlich die direkte Interaktion von TOC- und TIC-Komponenten zu einem TOC/TIC-Superkomplex notwendig (Chen und Li, 2017). Es konnte gezeigt werden, dass in *A. thaliana* Komponenten der inneren Chloroplastenhüllmembran, wie Tic20 und Tic56, mit Kernkomponenten des TOC-Komplexes coreinigt werden können (Kikuchi *et al.*, 2013; Köhler *et al.*, 2015). Tic56 und Tic20 sind zusammen mit Tic214 und Tic100 in einem 1 MDa-TIC-Komplex assoziiert (Kikuchi *et al.*, 2013). Der Verlust von Tic100, Tic56 oder Tic20 resultierte in drastischen Phänotypen mit stark reduzierter Abundanz photosynthetischer Pigmente und Proteine, die vermutlich auf geringere Mengen des 1 MDa-Komplexes zurückgehen (Kikuchi *et al.*, 2013). Interaktionen des 1 MDa-Komplexes mit Tic110 oder Tic40, die möglicherweise auch eine Funktion in der Translokation über die innere Chloroplastenhüllmembran haben, konnten bislang nicht nachgewiesen werden (Kikuchi *et al.*, 2013), eine Beteiligung dieser Komponenten im plastidären Import bleibt offen (Nakai, 2015).

1.2.3 Vorläuferproteine im Cytosol

Proteine, die für die Chloroplasten bestimmt sind, werden als ungefaltete Vorläuferproteine vom Cytosol in den Plastiden transportiert (Ruprecht *et al.*, 2010). Strukturanalysen zeigen, dass in wässriger Umgebung Transitpeptide weitestgehend unstrukturiert sind (Pilon *et al.*, 1992; Wienk *et al.*, 1999), in Anwesenheit von 2,2,2-Trifluoroethanol, Methanol oder Detergenz-Micellen bilden sie alpha-helikale Strukturen aus (Wienk *et al.*, 1999; Wienk *et al.*, 2000). Ob die flexible Struktur der Transitpeptide *in vivo* vorkommt, ist nicht bekannt, eine Membran-induzierte Konformationsänderung könnte aber eine sekundäre Interaktion zu Komponenten des TOC-Komplexes erleichtern (Bruce, 2001).

An der korrekten Sortierung von plastidären Vorläuferproteinen sind neben den Rezeptoren der äußeren Hüllmembran auch cytosolische Faktoren beteiligt, deren Bedeutung *in vivo* meist noch nicht vollständig aufgeklärt ist (Flores-Pérez und Jarvis, 2013; Lee *et al.*, 2013). Bei den bislang identifizierten cytosolischen Komponenten, die eine Funktion bei der Translokation haben könnten, handelt es sich oft um Proteine, die eine Chaperon-Aktivität besitzen und neben der Sortierung auch

EINLEITUNG

an der Vermeidung von Aggregationen und dem Erhalt einer importfähigen Konformation der Vorläufer beteiligt sein könnten (Flores-Pérez und Jarvis, 2013; Lee *et al.*, 2013). Etwa 75% der Vorläuferproteine besitzen eine vorhergesagte Hsp70-Bindestelle (Ivey *et al.*, 2000; Rial *et al.*, 2000) und eine direkte Interaktion einiger Vorläufer mit Proteinen der Hsp70-Familie konnte *in vitro* nachgewiesen werden (Kourtz und Ko, 1997; Ivey *et al.*, 2000; Rial *et al.*, 2000; Fellerer *et al.*, 2011). Die Assoziation von cytosolischem Hsp70 und einem 14-3-3-Dimer zu einem sogenannten *guidance* Komplex, kann *in vitro* die Translokation von phosphorylierten Vorläuferproteinen begünstigen (May und Soll, 2000). *In vivo* scheint der Prozess entbehrlich, denn die Mutation der Phosphorylierungsstellen des Transitpeptids hat keine Auswirkung auf die Lokalisierung von chimären GFP-Fusionsproteinen *in vivo* (Nakrieko *et al.*, 2004), könnte aber unter bestimmten Entwicklungs- und Umwelt-Bedingungen an Bedeutung gewinnen. Hsp90 ist mit dem Co-Chaperon *Hsp70 and Hsp90 organizing protein* (Hop) und dem Immunophilin *FK506 binding protein 73* (FKBP73) an der Bildung eines zweiten *guidance* Komplexes beteiligt (Fellerer *et al.*, 2011). Während der Transfer der Vorläufer im 14-3-3-Komplex direkt an Toc34 stattfindet (Qbadou *et al.*, 2006), ist beim Hsp90-Komplex die Interaktion von Hsp90 mit Toc64 erforderlich (Qbadou *et al.*, 2006).

Im Cytosol akkumulierende potentiell ungefaltete Proteine neigen dazu cytotoxische Aggregate zu bilden, die Auswirkungen auf die Zellhomöostase haben können (Haass und Selkoe, 2007). Die Degradation von Vorläufern ist neben dem Import ein zweiter Prozess, der zur Reduzierung von Vorläuferproteinen im Cytosol beitragen kann (Abb. 1). Es gibt Hinweise darauf, dass Vorläuferproteine Ubiquitin-abhängig über das 26S-Proteasom abgebaut werden: eine direkte Interaktion von Vorläufern mit Untereinheiten der regulatorischen 19S Einheit des 26S Proteasoms konnte nachgewiesen werden (Sako *et al.*, 2014), bei Inhibierung des plastidären Imports akkumulierte verstärkt ubiquitiniertes RbcS(TP):eGFP in stabil transformierten *A. thaliana*-Linien (Shanmugabalaji *et al.*, 2018) und nach Inhibierung der Proteasom-Aktivität akkumulierte der Vorläufer von endogenem Lhcb4 in *ppi2* (Lee *et al.*, 2009). Die bislang einzige bekannte, am Vorläufer-Abbau beteiligte E3-Ligase ist das *carboxy terminus of Hsc70-interacting protein* (Chip), die spezifisch an *heat shock protein cognate 70-4* (Hsc70-4)/Vorläufer-Aggregate bindet und eine Ubiquitinierung und Polyubiquitinierung als Signal für die Degradation über das 26S-Proteasom des Vorläufers vermittelt (Lee *et al.*, 2009). Zusätzlich zur Degradation wird eine Akkumulation von Proteinen als Vorläufer bei verminderter Importfähigkeit durch Regulation der Transkription vermieden (Kakizaki *et al.*, 2009; Bischof *et al.*, 2011), sodass auch bei eingeschränkter Importeffizienz in *ppi2* nur wenige potentielle Vorläuferproteine nachgewiesen werden können (Bischof *et al.*, 2011). Die Mehrheit der identifizierten absolut N-terminalsten Peptide potentieller Vorläufer trug eine N-terminale Acetylierung an einem Alanin, dass nach Abspaltung des initialen

Methionins N-terminal exponiert wird (Bischof *et al.*, 2011). Die Bedeutung dieser Modifikation im Zusammenhang mit Vorläufern ist bislang unbekannt.

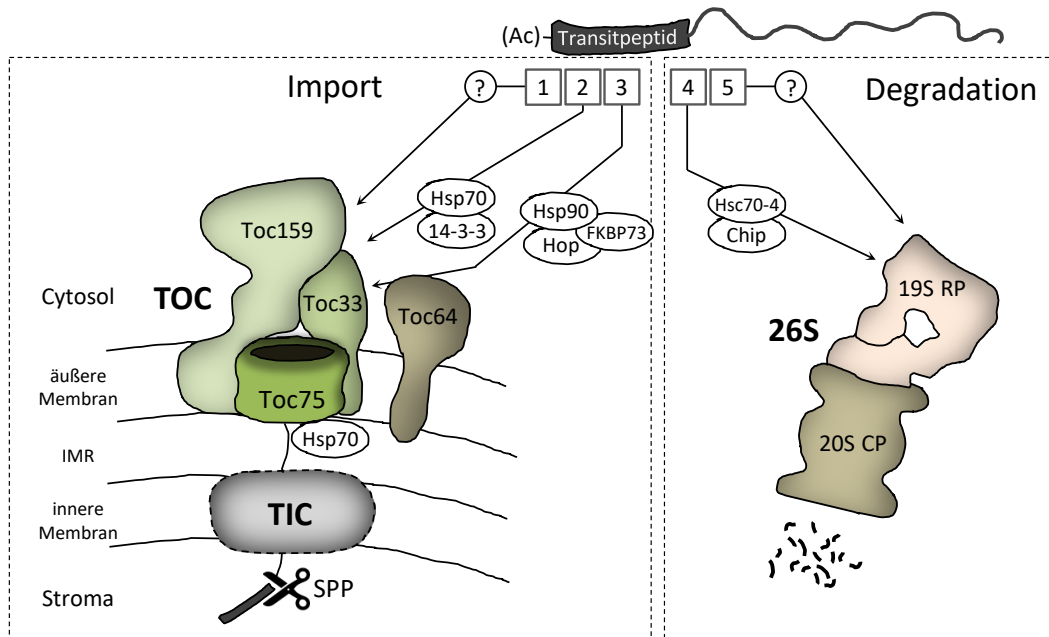


Abb. 1: Schematische Darstellung der Wege von plastidären Vorläuferproteinen im Cytosol

Nach Beobachtungen von Bischof *et al.* (2011) liegt die Mehrheit von potentiellen Vorläuferproteinen mit N-terminalem Transitpeptid im Cytosol N-terminal, irreversibel acetyliert (Ac) vor. Sie können einerseits über die Translokationskomplexe der äußeren und inneren Chloroplastenhüllmembran (TOC und TIC) in das Zielorganell transportiert werden (Darstellung inspiriert von Agne und Kessler (2009)) oder andererseits der Degradation durch das 26S Proteasom zugeführt werden (Darstellung inspiriert von Goldberg (2012)). In dieser vereinfachten Darstellung sind stöchiometrische Verhältnisse einzelner Komponenten nicht berücksichtigt.

[1] Plastidäre Vorläuferproteine können direkt, möglicherweise unter Beteiligung bislang unbekannter cytosolischer Faktoren, an die TOC-Kernkomponenten (GTPase-Rezeptoren der Toc159-Familie und der Toc34-Familie, sowie Toc75) binden und durch den von Toc75 gebildeten Kanal die äußere Chloroplastenhüllmembran passieren. Unter Beteiligung eines Hsp70 im Intermembranraum (IMR) erfolgt ein Transfer zum Multiproteinkomplex TIC, der eine Translokation durch die innere Chloroplastenhüllmembran erlaubt. Im Stroma wird das N-terminale Transitpeptid von einer stromalen Prozessierungspeptidase (SPP) abgeschnitten. An der korrekten Vermittlung plastidärer Vorläufer aus dem Cytosol zum TOC-Komplex könnten [2] die Assoziation von phosphorylierten Vorläuferproteinen mit Hsp70 und 14-3-3 oder [3] die Assoziation von Vorläuferproteinen mit Hsp90 und den Co-Chaperonen Hop und FKBP73 zu sogenannten *guidance* Komplexen involviert sein. Die transient gebundene TOC-Untereinheit Toc64 besitzt eine *tetratricopeptide repeat* (TPR)-Domäne, die Hsp90 bindet und den Hsp90-Komplex an Toc34 vermittelt. [4] Hsc70-4-gebundene Vorläufer können von der E3-Ligase Chip ubiquitiniert und so von Ubiquitin-Bindeproteinen der regulatorischen Untereinheit (19S RP), die mit der katalytischen Untereinheit (20S CP) zum 26S-Proteasom assoziiert, erkannt werden. [5] Eine direkte Interaktion von Vorläufern zu Untereinheiten des Proteasoms ist *in vitro* und *in vivo* beobachtet wurden (Sako *et al.*, 2014), schließt allerdings nicht aus, dass weitere noch unbekannte cytosolische Faktoren an der Proteasom-abhängigen Degradation von Vorläufern beteiligt sind.

1.3 Co-translationale Modifikation von Proteinen im Cytosol

An jedem Ort der Proteinsynthese, dem Cytosol, den Mitochondrien und den Chloroplasten, finden co-translationale Ereignisse an den entstehenden Proteinen unmittelbar am Ribosom statt. Dazu gehören Faltung, Prozesse zur Protein-Lokalisierung sowie co-translationale Protein-Degradation im Zuge der Protein-Qualitätskontrolle und co-translationale Modifikationen, wie die Deformylierung, die Abspaltung des initialen Methionins (*N-terminal methionine excision*, NME), die N-terminale Acetylierung (N-Ac) und die N-Myristoylierung (Breiman *et al.*, 2016).

Die NME und die N-Ac sind im Cytosol eukaryotischer Zellen die am häufigsten vorkommenden co-translationalen Modifikationen am N-Terminus. Beide Modifikationen sind irreversibel und finden zu einem frühen Zeitpunkt der Translation statt (Breiman *et al.*, 2016). Die verantwortlichen Enzymgruppen Methionin-Aminopeptidasen (MAPs) und N-Acetyltransferasen (NATs) weisen eine strikte Substratspezifität auf, die durch die ersten N-terminalen Aminosäuren der Zielproteinsequenz vermittelt wird (Arfin und Bradshaw, 1988; Polevoda und Sherman, 2003). NME findet statt, wenn der Radius der auf das initiale Methionin folgenden Aminosäure kleiner als 1,29 Å ist (Sherman *et al.*, 1985). Wenn in der Proteinsequenz ein Alanin, Valin, Serin, Threonin, Cystein, Prolin oder Glycin auf das initiale Methionin folgt, so wird es durch eine MAP prozessiert und ein neuer N-Terminus freigegeben, der im Folgenden weiter modifiziert werden kann. In *A. thaliana* existieren drei im Cytosol lokalisierte MAPs: zwei MAPs des Typs MAP2, die nur in eukaryotischen Systemen vorkommen, und MAP1A (Giglione *et al.*, 2004). Eine Reduzierung der NME durch Mutation oder Inhibierung der entsprechenden Enzyme beeinträchtigt das Wachstum und die Entwicklung von *A. thaliana* (Ross *et al.*, 2005), was möglicherweise im Zusammenhang mit einer veränderten Proteininstabilität bei Erhalt des initialen Methionins steht (Frottin *et al.*, 2009).

Die Enzymgruppe der NATs konjugiert einen Acetylrest von Acetyl-Coenzym A auf die freie α -Aminogruppe eines naszierenden Proteins. NATs bestehen aus mindestens einer katalytischen Untereinheit, die mit einer oder zwei zusätzlichen Untereinheiten assoziiert sein kann. Die Spezifität der NATs sind in Hefe bereits gut untersucht und in eukaryotischen Organismen hoch konserviert (Martinez *et al.*, 2008; Arnesen *et al.*, 2009; Bienvenut *et al.*, 2012). Der Großteil cytosolischer N-Ac wird von NATs des Typs NatA, NatB und NatC vorgenommen, wobei NatA eine Spezifität für die Acetylierung von N-Termini nach NME aufweist und NatB bzw. NatC NME-unabhängig agieren (Polevoda und Sherman, 2003; Polevoda *et al.*, 2009). Eine auf Homologie-basierte *in silico*-Analyse führte zur Identifizierung 18 putativer NATs im Genom von *A. thaliana*, die eine cytosolische Lokalisierung besitzen (Dinh *et al.*, 2015; Breiman *et al.*, 2016). Aus Untersuchungen zu cytosolischen NATs in *A. thaliana* ließen sich allerdings nur wenige Informationen über die Aktivität, Spezifität oder den Mechanismus der N-Ac ableiten. Für Naa10 als Untereinheit des NatA-Komplexes konnte eine

katalytische NAT-Aktivität *in vitro* bestätigt werden (Magin *et al.*, 2016). In Linien mit verringerter NatA-Expression ist der Anteil N-acetylierter Proteine nach NME, bevorzugt an Alanin und Serin, reduziert (Linster *et al.*, 2015), was auf eine ähnliche Substratspezifität von NatA in Pflanzen und NatA in Hefe und Säugern hinweist (Linster *et al.*, 2015; Breiman *et al.*, 2016). Eine Bedeutung der NatA-Aktivität konnte *in vivo* für die Entwicklung und die Stressantwort unter Trockenstress im Zusammenhang mit Abscisinsäure nachgewiesen werden (Linster *et al.*, 2015). Ein vollständiger Verlust der NatA-Untereinheiten Naa10 oder Naa15 ist in *A. thaliana* letal (Linster *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2016). Hingegen sind T-DNA-Insertionslinien, die in Genen für die NatB-Untereinheit Naa25 oder die katalytische NatC-Untereinheit Naa30 betroffen sind, lebensfähig. NatB-Mutanten zeigen allerdings pleiotrope Entwicklungsdefekte (Ferrández-Ayela *et al.*, 2013) und NatC-Mutanten sind in ihren PSII-Eigenschaften verändert (Pesaresi, 2003).

Trotz der biologischen Relevanz der N-Ac ist über konkrete Funktionen nur wenig bekannt (Arnesen, 2011; Dörfel und Lyon, 2015; Gibbs, 2015). Lange wurde angenommen, dass eine Blockierung des N-Terminus durch N-Ac Proteine stabilisiert (Hershko *et al.*, 1984). Im Gegensatz dazu kann in Hefe eine N-Ac als destabilisierendes Degron die Erkennung durch N-Ac-spezifische E3-Ligasen und somit einen Ubiquitin-abhängigen Abbau über das 26S-Proteasom induzieren (Hwang *et al.*, 2010; Shemorry *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014). Neben der Regulation der Proteinstabilität konnte eine Beteiligung der N-Ac an Protein-Interaktionen (Arnesen *et al.*, 2010; Scott *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2016; Oh *et al.*, 2017) und der -Translokation (Forte *et al.*, 2011; Stael *et al.*, 2011) gezeigt werden.

1.4 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Die spezifische intrazelluläre Degradation von Proteinen ist Teil der zellulären Regulation, die nicht nur der Beseitigung beschädigter Proteine, sondern auch dem Erhalt der Zellhomöostase sowie der Anpassung an Umweltveränderungen und Entwicklungsprozesse dient. Nahezu alle zellulären Prozesse in Eukaryoten werden direkt oder indirekt durch das Protein-Degradationssystem beeinflusst, nicht zuletzt dadurch, dass der spezifische Abbau von Zielproteinen die Lebensdauer dieser determiniert. Eine enzymatische Kaskade führt zur kovalenten Bindung von Ubiquitin an Proteine. Für die Degradation polyubiquitinerter Substrate im Kern und im Cytosol ist das 26S-Proteasom verantwortlich, das ATP-abhängig Proteine in Peptide zerlegt (Hershko *et al.*, 2000; Finley *et al.*, 2004; Varshavsky, 2006).

1.4.1 Die Polyubiquitinierung in Eukaryoten

Das nur 8,5 kDa-große Protein Ubiquitin existiert hoch konserviert in allen eukaryotischen Organismen und wird in seinem C-terminalen Glycin durch eine kovalente Bindung an ein Ubiquitin-

aktivierendes Enzym E1 ATP-abhängig aktiviert. Das so aktivierte Ubiquitin wird an ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym E2 übertragen und dann wiederum an das Substrat transferiert. Diese Reaktion wird katalysiert durch eine E3-Ligase, die sehr spezifisch das Substrat und den E2-Ubiquitin-Thioester erkennt und in unmittelbare Nähe zueinander bringt. Ubiquitin wird über eine Isopeptid-Bindung kovalent an eine primäre Aminogruppe, meist einer Seitenkette eines internen Lysins des Zielproteins, gebunden. Nach Monoubiquitinierung kann die Konjugation eines weiteren Ubiquitinrestes an ein Lysin oder den N-Terminus des bereits gebundenen Ubiquitins erfolgen. Jedes der sieben Lysine des Ubiquitins kann als Verknüpfungsstelle dienen (Sharma *et al.*, 2016), wobei eine Polyubiquitinierung mit einer Verknüpfung über Lys48 als dominierendes Degradationssignal identifiziert wurde (Hershko *et al.*, 1980; Chau *et al.*, 1989),

Die Polyubiquitinierung stellt eine Markierung von Proteinen für die anstehende Degradation dar, die gleichermaßen konsequent, somit generell funktionell für eine große Bandbreite an Substraten ist, und differenziert, somit regulatorisch wirksam ist. Dies wird realisiert durch die Vielfältigkeit der an der Ubiquitinierung beteiligten Proteine. So gibt es nur wenige diverse E1, mehrere E2 und eine große Zahl spezifischer E3-Ligasen in Eukaryoten (Tab. 1). E3-Ligasen stellen mit Abstand die größte und vielseitigste Enzymgruppe in der Ubiquitinierungskaskade dar.

Tab. 1: Zahl der putativ am Ubiquitin-System beteiligten Gene in Eukaryoten

Protein	<i>S. cerevisiae</i> ^{a,b}	<i>H. sapiens</i> ^a	<i>A. thaliana</i> ^b
E1	1	2	2
E2	13	~40	~45
E3	~80	~600	~1200

^a Li *et al.*, 2008; ^b Vierstra, 2003

1.4.2 Struktur und Funktion des Proteasoms

Für die differenzielle Degradation der polyubiquitinierten Proteine im Cytosol und Nukleus von Eukaryoten ist ein multikatalytischer Enzymkomplex, das 26S-Proteasom, verantwortlich. Es ist aus zwei Hauptkomponenten aufgebaut: einer 700 kDa-Einheit, die nach ihrer Sedimentationskonstante 20S-Proteasom oder 20S *catalytic particle* (CP) benannt ist und ein oder zwei Einheiten des regulatorischen PA700 auch 19S *regulatory particle* (RP) genannt, der an einem oder beiden Enden des 20S CP assoziiert sein kann (Hough *et al.*, 1987).

Das 20S CP - Die katalytische Einheit des Proteasoms

Das 26S-Proteasom ist in seiner Komplexität einzigartig in Eukaryoten und während die regulatorischen Einheiten sehr variabel sein können, ist die Quartärstruktur des 20S CP in Archaeobakterien und Eukaryoten erstaunlich konserviert (Dahlmann *et al.*, 1989; Grziwa *et al.*, 1991;

Baumeister *et al.*, 1998). In Archae und Eukaryoten wird das tonnenförmig aufgebaute 20S-Proteasom von zwei heptameren Ringen aus Beta-Untereinheiten gebildet, die an beiden Seiten von heptameren Ringen aus Alpha-Untereinheiten flankiert werden. In Eukaryoten einschließlich Hefen und Säugern bestehen die Heptamere aus sieben verschiedenen Alpha- und Beta-Untereinheiten $\alpha 1$ - $\alpha 7$ und $\beta 1$ - $\beta 7$ (Groll *et al.*, 1997; Unno *et al.*, 2002; Jung *et al.*, 2009). Die zwei Ringe aus Beta-Untereinheiten bilden die katalytische Kammer. Die reaktiven Ketten der Untereinheiten ragen in das Lumen des zylindrischen Hohlraums hinein, wo sie abgeschirmt vom Cytosol, nur spezifisch in die katalytische Kammer geleitete Proteine degradieren (Baumeister *et al.*, 1998). In Eukaryoten weisen drei der sieben Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ nukleophile N-terminale-Hydrolyse-Aktivität auf (Heinemeyer *et al.*, 1997).

Assoziiert an die Beta-Untereinheiten formen die Alpha-Ringe zwei Vorkammern, in denen die Proteine zunächst im ungefalteten Zustand gehalten werden, ehe die Weiterleitung in die proteolytische Kammer stattfindet (Ruschak *et al.*, 2010). Strukturanalysen des 20S-Proteasoms von Archae-Bakterien zeigten eine im Durchmesser 13 Å große Öffnung, die den Einlass ungefalteter Aminosäureketten zulassen könnte (Löwe *et al.*, 1995). In Hefen und Säugern wird dieser Zugang ins Innere des 20S-Proteasoms im „ruhenden“ Zustand durch N-terminale Enden der Alpha-Untereinheiten auf nur 9 Å verengt (Groll *et al.*, 1997; Unno *et al.*, 2002; Jung *et al.*, 2009). Eine Konformationsänderung der Alpha-Untereinheiten führt zur Erweiterung des Zugangs und damit zum Übergang des „ruhenden“ Proteasoms in ein „aktives“ Proteasom (Groll *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2003; Jung *et al.*, 2009). *In vitro*-Experimente unterstützen dieses Modell, da in Anwesenheit eines Substrates geringe Konzentrationen des Detergenz SDS und Wärme, die Auswirkungen auf die Konformation von Proteinen haben, die proteolytische Aktivität des 20S CP gesteigert werden konnte (Coux *et al.*, 1996). Die Assoziation des 20S CP mit regulatorischen Einheiten stimuliert ebenfalls die Öffnung des Zugangs zur katalytischen Kammer und beeinflusst die Aktivität und Spezifität des Komplexes (Jung *et al.*, 2009; Finley *et al.*, 2016). Es gibt Hinweise darauf, dass oxidierte und ungefaltete Proteine sowie Proteine, die einen hohen Anteil *intrinsically disordered regions* (IDRs) aufweisen, auch unabhängig von regulatorischen Elementen vom 20S CP hydrolysiert werden (Grune *et al.*, 2003; Baugh *et al.*, 2009; Ben-Nissan und Sharon, 2014).

Das 19S RP - Die regulatorische Einheit des 26S-Proteasoms

Im 26S-Proteasom assoziieren ein oder zwei 19S regulatorische Einheiten an die Enden eines „ruhenden“ 20S CP, wodurch ein enzymatisch aktiver Holokomplex entsteht, der ATP-abhängig und spezifisch für ubiquitinierte Substrate agiert (Tanaka, 2009; Finley *et al.*, 2016). Die Funktionen des regulatorischen Komplexes bestehen in der Substraterkennung, Deubiquitinierung, Entfaltung und Translokation des ungefalteten Substrates durch den geöffneten Zugang des 20S CP (Abb. 2A).

EINLEITUNG

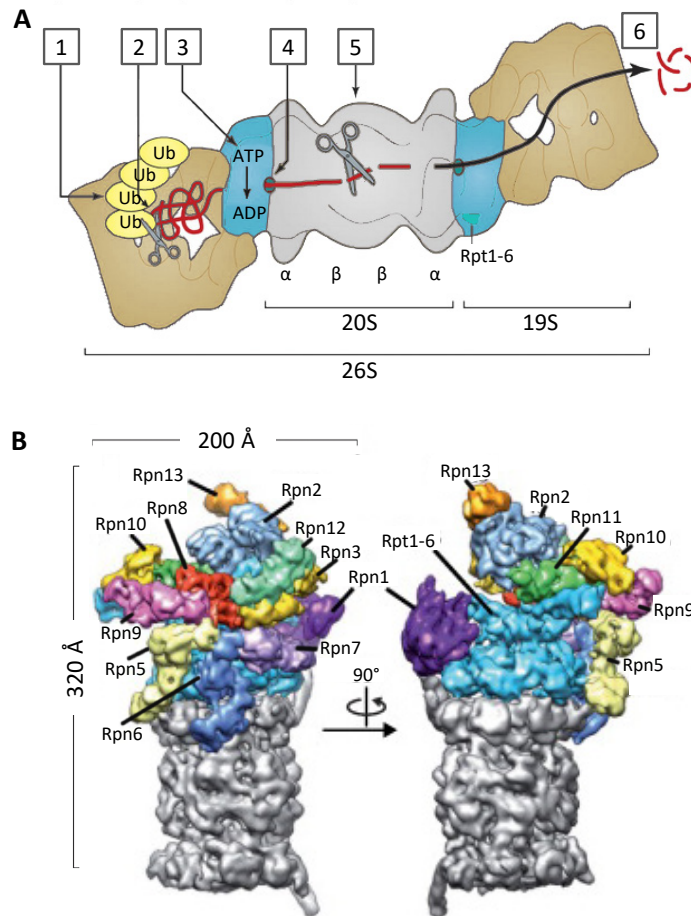


Abb. 2: Das 26S-Proteasom in Eukaryoten

(A) Schematische Darstellung der Struktur und Funktion des 26S-Proteasoms [1] Bindung eines Substrates nach Erkennung einer Polyubiquitin-Kette [2] Deubiquitinierung [3] Entfaltung und Translokation über den ATPase-Ring (Rpt1-6) [4] Öffnung des Zugangs zum 20S CP [5] Hydrolyse des Substrates in der katalytischen Kammer [6] Entlassung von Peptiden aus dem Proteasom. Modifizierte Abbildung nach Goldberg (2012) (B) Kryoelektronenmikroskopische Rekonstruktion des 26S-Proteasoms aus Hefe von Lander *et al.* (2012); RPN-Untereinheiten des 19S RP sind farblich und beschriftet, der ATPase-Ring (Rpt1-6) ist hellblau, das 20S CP grau dargestellt.

Sechs AAA-Typ ATPasen Rpt1-Rpt6 formen einen hexameren Ring, der unmittelbaren Kontakt zum Alpha-Ring des 20S CP hat (Tomko *et al.*, 2010). Die RPTs sind für die Entfaltung der Substrate verantwortlich und erleichtern den Eintritt der ungefalteten Substrate in die katalytische Kammer (Finley, 2009; Smith *et al.*, 2007). Die sechs ATPasen und die vier Nicht-ATPase-Einheiten Rpn1, Rpn2, Rpn10 und Rpn13 bilden gemeinsam die Basis des 19S RP (Tanaka, 2009). Rpn1 und Rpn2 sind die größten Proteasom-Untereinheiten und haben wahrscheinlich eine Funktion bei der Rekrutierung Proteasom-assoziiierter Proteine sowie bei der Bindung der Proteasom-Untereinheiten (Saeki *et al.*, 2002; Tanaka, 2009; Finley, 2009). Außerdem fungiert Rpn1, wie auch Rpn10 und Rpn13 als integrales Ubiquitin-Rezeptorprotein des 26S-Proteasoms (Elsasser *et al.*, 2004; Husnjak *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2016). Ubiquitin und Polyubiquitin-Ketten können direkt von Rpn1, Rpn10 und Rpn13 oder

indirekt über reversibel an das Proteasom gebundene Proteine wie Rad23, Ddi1 oder Dsk2 erkannt werden (Saeki *et al.*, 2002; Fatimababy *et al.*, 2010; Fu *et al.*, 2010). In Abwesenheit von Rpn10 dissoziiert der Deckel leicht vom 26S-Proteasom, was Rpn10 zusätzlich zur Substraterkennung eine Rolle bei der Verbindung von Basis und Deckel des 19S RP zuschreibt (Glickman *et al.*, 1998). Elektronenmikroskopische Aufnahmen lieferten Erkenntnisse zur Struktur des 26S-Proteasoms und des 19S-Komplexes aus Hefe und Säugern (Lander *et al.*, 2012; Luan *et al.*, 2016; Schweitzer *et al.*, 2016) (Abb. 2B). Demnach besteht möglicherweise kein direkter Kontakt von Rpn10 mit anderen Basis-Untereinheiten, sondern Rpn10 beeinflusst die Basis-Deckel-Assoziation indirekt über die Stabilisierung der Interaktion von Rpn8/11 mit Rpn9.

Der Deckel wird von neun Untereinheiten gebildet, Rpn3, Rpn5-Rpn9, Rpn11, Rpn12 und Rpn15 (Tanaka, 2009; Lander *et al.*, 2012; Luan *et al.*, 2016; Schweitzer *et al.*, 2016) (Abb. 2B). Die Zn²⁺-abhängige Metalloisopeptidase Rpn11 ist ein essentielles, deubiquitinierendes Enzym (DUB) des 26S-Proteasoms (Verma *et al.*, 2002) und ist neben extrinsisch rekrutierten DUBs wie der Ubiquitin-abhängigen Protease Ubp6 und der Ubiquitin C-terminalen Hydrolase Uch37 am Ubiquitin-Recycling beteiligt (Tanaka, 2009). Rpn11 besitzt eine MPN (Mpr1/Pad1 N-terminal)-Domäne mit einem JAMM (JAB1-MPN-Mov34)-Motiv, das essentiell für die spezifische Hydrolyse einer Ubiquitinbindung zu einem Substrat ist (Verma *et al.*, 2002; Birol und Echaliier, 2014). Auch Rpn8 besitzt eine MPN-Domäne, allerdings ohne katalytische Aktivität, was die Hypothese unterstützt, dass die MPN-Domäne in Rpn8 primär eine strukturelle Funktion erfüllt (Sanchez *et al.*, 2007; Birol und Echaliier, 2014).

Die Untereinheiten Rpn3, Rpn5-Rpn7, Rpn9 und Rpn12 enthalten C-terminal eine PCI (Proteasom-CSN-eIF3)-Domäne, die ebenfalls keine katalytische Aktivität besitzt, aber intermolekulare Wechselwirkungen unterstützt (Budenholzer *et al.*, 2017). PCI-PCI-Proteininteraktionen sind neben dem Proteasom auch im *constitutive photomorphogenesis 9* (Cop9)-Signalosom (CSN), das analog zum Deckel des 19S RP eine Isopeptidase-Aktivität aufweist, und dem eukaryotischen Initiationsfaktor 3 (eIF3) zu finden, die namensgebend für die Domäne sind (Pick *et al.*, 2009). Die sechs PCI-Proteine des Deckels interagieren über die PCI-Domänen miteinander, was die strukturgebende Funktion der Untereinheiten unterstreicht (Budenholzer *et al.*, 2017).

Das 26S-Proteasom in Arabidopsis thaliana

Viele Erkenntnisse über Struktur und Funktion des 26S-Proteasoms stammen von Untersuchungen des Komplexes aus Archae, Hefen und Säugern. Dabei wird deutlich, wie konserviert die Architektur und die Funktionsweise des Degradationskomplexes über die verschiedenen Reiche hinweg ist. Molekulargenetische Analysen zeigen, dass das UPS auch in Pflanzen einen direkten oder indirekten

Einfluss auf vielseitige Prozesse wie den Zellzyklus, die Embryogenese, die Photomorphogenese, die circadiane Rhythmik, die Hormon-Signaltransduktion, die Reaktion auf biotischen und abiotischen Stress und die Seneszenz hat (Vierstra, 2003; Smalle und Vierstra, 2004; Sharma *et al.*, 2016). In *A. thaliana* stehen mehr als 1600 Gene, etwa 6% des gesamten Genoms, im Zusammenhang mit dem UPS (Sharma *et al.*, 2016), was die Relevanz des Degradationssystems bekräftigt.

Die Untereinheiten des 26S-Proteasoms wurden in *A. thaliana* zunächst basierend auf Sequenzähnlichkeiten zu Hefen identifiziert (Fu *et al.*, 1998; Fu *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2004). Während in Hefen nur je ein Gen für die entsprechende Untereinheit kodiert, konnten in *A. thaliana* mit wenigen Ausnahmen für jede Untereinheit mindestens zwei kodierende Gene identifiziert werden, die möglicherweise durch Genduplikation hervorgegangen sind (Fu *et al.*, 1998; Fu *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2004). Die Existenz mehrerer paraloger Gene, die für eine Proteasom-Untereinheit kodieren, eröffnet die Möglichkeit der Assemblierung verschiedener Proteasom-Subspezies. Massenspektrometrie-basierte Untersuchungen gereinigten 26S-Proteasoms bestätigten die parallele Existenz verschiedener Proteasom-Subspezies in *A. thaliana*, die hier auf die aktive Expression der diversen Paraloge zurückgeht (Yang *et al.*, 2004; Book *et al.*, 2010). Anders als in tierischen Systemen werden in Pflanzen viele Untereinheiten sowohl des 20S CP als auch des regulatorischen 19S RP in zwei Varianten genetisch kodiert und synthetisiert (Fu *et al.*, 1999; Shibahara *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2004). In *A. thaliana* konnten mit Ausnahme von vier 20S CP-Untereinheiten (PAG1 (AT2G27020; α 7), PBA1 (AT4G31300; β 1), PBF1 (AT3G60820; β 6) und PBG1 (AT1G56450; β 7)), der RPT-Untereinheit Rpt3 (AT5G58290) und fünf RPN-Untereinheiten (Rpn6 (AT1G29150), Rpn7 (AT4G24820), Rpn10 (AT4G38630), Rpn11 (AT5G23540) und Rpn12A (AT1G64520)) alle 26S-Kernuntereinheiten in zwei Homologen massenspektrometrisch nachgewiesen werden (Book *et al.*, 2010).

Die Ähnlichkeiten in den Aminosäuresequenzen der Homologen sind groß und suggerieren redundante Funktionen. Der Verlust beider Paraloge in den Doppelmutanten *rpt2a rpt2b*, *rpt5a rpt5b*, *rpn5a rpn5b* und *rpn8a rpn8b* ist letal (Huang *et al.*, 2006; Book *et al.*, 2009; Gallois *et al.*, 2009; Ueda *et al.*, 2011), was die Annahme einer überlappenden Funktion der Homologen-Paare bestärkt. Mutationen einzelner Untereinheiten des regulatorischen 19S RP resultieren jedoch in Phänotypen, die unter anderem den Wuchs, die Wurzellänge, die Blattmorphologie, die Zellgröße, die Histon-Akkumulation, die Reaktion auf biotischen und abiotischen Stress, die Abscisinsäure- und Cytokinin-Antwort und die Fertilität betreffen können (Smalle *et al.*, 2003; Kurepa *et al.*, 2008; Book *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Ueda *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012). Dies bestärkt die Bedeutung einzelner Untereinheiten, und dass in den untersuchten Mutanten eine partielle, aber keine absolute Kompensation durch das entsprechende Homologe erreicht wird. Die Paraloge zeigen zum Teil

verschiedene Expressionslevel (Yang *et al.*, 2004), die eine differenzierte Aktivität des Proteasoms bedingen könnten. Auch unter Stressbedingungen können die paralogen Gene unterschiedlich reguliert sein. Beispielsweise wird bei der Minderung der Proteasom-Aktivität durch den Proteasom-Inhibitor MG132, die Expression einiger Proteasom-Gene induziert, während die Transkription des zugehörigen Paralogen unverändert bleibt (Lee *et al.*, 2011; Gladman *et al.*, 2016). Die gesteigerte Variabilität des 26S-Komplexes könnte dem Proteasom in Pflanzen erweiterte Funktionalität, Spezifität und Flexibilität verleihen.

1.4.3 Regulation des Proteasoms

Im Laufe der Entwicklung eines Organismus oder in Anpassung an verschiedene Umweltbedingungen muss das Proteom entsprechend adaptiert werden. In diesem Zusammenhang ändern sich auch die Ansprüche an zelluläre Degradationssysteme. Bei der Protein-Degradation über das UPS sind vor allem E3-Ligasen als regulatorisches Element von Bedeutung, über deren Aktivität und Abundanz die Ubiquitinierung von spezifischen Substraten gesteuert werden kann. Aber auch das 26S-Proteasom unterliegt essentiellen Regulationen und Modifikationen, die Spezifität, Funktionalität und Aktivität des proteolytischen Enzymkomplexes maßgeblich beeinflussen.

Einzelne Untereinheiten des 26S-Proteasoms sind Ziel diverser co- und posttranslationaler Modifikationen, wie beispielsweise Phosphorylierung, N-terminaler Myristoylierung, Acetylierung, N-terminaler Prozessierung oder Ubiquitinierung, die Einfluss auf die Aktivität oder Lokalisierung des Proteasoms haben können (Hirano *et al.*, 2016). Die meisten Beta-Untereinheiten des 20S CP werden zum Beispiel als Vorläufer mit einem N-terminalen Propeptid synthetisiert, dessen autokatalytische Degradation essentiell für die korrekte Assemblierung und Aktivierung des Proteasoms ist (Chen und Hochstrasser, 1996). Eine Ubiquitinierung des Ubiquitin-Rezeptors Rpn13 durch eine 26S-assoziierte Ubiquitin-Ligase verringert die weitere Bindung von Ubiquitin-Konjugaten und beeinflusst so die 26S-Aktivität in Säugerzellen reversibel (Besche *et al.*, 2014). In Pflanzen und Hefe wurde die Ubiquitinierung von 26S-Untereinheiten bei Proteasom-Inhibierung und Stickstoff-Mangel im Zusammenhang mit dem Abbau inaktivierter 26S-Komplexe durch Autophagie beschrieben (Marshall *et al.*, 2015; Marshall *et al.*, 2016).

Eine Beeinträchtigung der Proteasom-Funktion durch Mutation, Inhibitoren oder abiotischen Stress kann als Reaktion auf proteolytischen Stress auch die Steigerung der Abundanz von Proteasom-Untereinheiten durch Regulation der Transkription zur Folge haben (Meiners *et al.*, 2003). In Hefe existiert ein *feedback*-Mechanismus, bei dem der Aktivator Rpn4 die Expression von Proteasom-Genen hochreguliert, selbst aber über das 26S-Proteasom abgebaut wird (Dohmen *et al.*, 2007). In Säugern und auch in *Caenorhabditis elegans* wirkt bei Beeinträchtigung der Proteasom-Funktion eine

Transkriptionsfaktor (*nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 1*, Nrf1)-vermittelte Kompensation (Radhakrishnan *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Radhakrishnan *et al.*, 2014). Nrf1 wird unter normalen Umständen nach Re-Translokation vom Lumen des ER ins Cytosol 26S-Proteasom-abhängig degradiert. Bei proteolytischem Stress wird Nrf1 stattdessen endoproteolytisch prozessiert und die verkürzte Variante ist anschließend im Kern funktionell.

Für *A. thaliana* ist eine Induktion der Expression von Proteasom-Untereinheiten nach Einschränkung der Proteasom-Funktion sowohl in MG132-behandelten Pflanzen, als auch in Mutanten, in denen Gene für 19S RP-Untereinheiten betroffen sind (RP-Mutanten), beobachtet worden (Yang *et al.*, 2004; Kurepa *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2011; Gladman *et al.*, 2016). Auch oxidativer Stress durch die Wirkung von Cadmium und Licht kann in Pflanzen die Aktivitätsänderung und erhöhte Abundanz des 20S-Proteasoms hervorrufen (Polge *et al.*, 2009; Yabuta *et al.*, 2011). Umfangreiche quantitative Transkriptanalysen von Gladman *et al.* (2016) führten zur Identifizierung von 119 Genen, die nach Aktivitätsminderung des 26S-Proteasoms durch MG132-Behandlung sowie durch *Rpn10-* bzw. *Rpn12A*-Mutation eine gesteigerte Expression aufwiesen. Diese Gene wurden als Proteasom-Stress-Regulon (PSR) definiert. Das PSR umfasst neben Genen, die für Proteasom-Untereinheiten kodieren auch Transkripte akzessorischer Faktoren, wie den alternativen *capping*-Faktoren PA200 und *cell division control 48* (Cdc48), der deubiquitinierenden Enzyme Ubp6, Ubp7 und Uch3 und der extraproteasomalen Ubiquitin-Bindeproteine Dsk2a und Ddi1. Auch Gene für Chaperone, Transkriptionsfaktoren, Hitzeschockproteine (HSPs) und andere Komponenten, die eine Funktion bei proteolytischem Stress haben, sind Teil des PSR (Gladman *et al.*, 2016). Es konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren NAM/ATAF1/CUC2* 78 (Nac78) und Nac53 gemeinsam an der Aktivierung des PSR in *A. thaliana* beteiligt sind (Gladman *et al.*, 2016). Wie der genaue Mechanismus der Aktivierung des PSR bei proteolytischem Stress in *A. thaliana* funktioniert, ist bislang jedoch unklar.

In einer vitalen Zelle existiert eine Mischung aus „aktivem“, mit regulatorischen Einheiten assoziiertem, Proteasom und freiem 20S CP. Abhängig von der subzellularen Lokalisierung der Komplexe, dem Zelltyp und Umweltbedingungen existiert die Mehrheit der Proteasom-Komplexe in Säugerzellen als freies 20S CP und nur etwa 25-40% der Gesamtheit an Proteasom-Komplexen liegt als „aktives“ Proteasom vor (Fabre *et al.*, 2013). In Hefe- und Säugerzellen konnte eine Dissoziation des 26S-Holoenzym und somit eine Änderung des Verhältnisses von 26S-Proteasom und freiem 20S CP als Reaktion auf oxidativen Stress beobachtet werden (Wang *et al.*, 2010). Das freie 20S-Proteasom besitzt nicht nur eine höhere Resistenz gegenüber oxidativem Stress (Reinheckel *et al.*, 1998), sondern auch eine höhere Aktivität gegenüber oxidativ modifizierten Proteinen (Davies,

* No Apical Meristem/Arabidopsis Transcription Activation Factor 1/Cup-Shaped Cotyledons 2

2001). Proteine, die stressbedingt oder generell unstrukturierte Bereiche besitzen können Ubiquitin- und ATP-unabhängig vom 20S CP degradiert werden (Grune *et al.*, 2003; Baugh *et al.*, 2009; Aiken *et al.*, 2011; Ben-Nissan und Sharon, 2014), sodass diese Form der Degradation insbesondere unter Stressbedingungen von Bedeutung sein könnte. Der Zugang zur katalytischen Kammer des 20S CP wird durch die N-Termini der Alpha-Untereinheiten behindert. Eine Steigerung der Aktivität des 20S CP in Bezug auf oxidierte und ungefaltete Proteine konnte in Hefe nach Redox-regulierter S-Glutathionylierung von Cystein-Resten der Alpha-Untereinheiten (Silva *et al.*, 2012) und auch durch die Interaktion des 20S CP mit einem Proteasom-aktivierenden Peptid (Pap1) gezeigt werden (Dal Vechio *et al.*, 2014). Die Assoziation mit Regulatoren stimuliert die Öffnung durch Konformationsänderung der Alpha-Untereinheiten und beeinflusst zudem die Substratspezifität des Proteasoms (Jung *et al.*, 2009). Der bereits ausführlich beschriebenen Proteasom-Regulator 19S RP, stellt assembliert mit dem 20S CP zum 26S-Proteasom die effektivste Konfiguration für Ubiquitin-abhängige Degradationsprozesse dar. Daneben sind eine Reihe von alternativen *capping*-Faktoren wie 11S/PA28 oder Blm10/PA200, die im Zusammenhang mit der Vermittlung einer ATP- und Ubiquitin-unabhängigen Proteasom-Aktivität stehen, bekannt (Ben-Nissan und Sharon, 2014; Eralles und Coffino, 2014; Schmidt und Finley, 2014).

1.5 Die Rolle des Ubiquitin-Proteasom-Systems in plastidären Prozessen

Das UPS nimmt direkt oder indirekt Einfluss auf nahezu alle Vorgänge der pflanzlichen Zelle, das Wachstum und die Entwicklung des Organismus. Auch lichtabhängige Prozesse, die indirekt Auswirkungen auf die Plastidenbiogenese haben, stehen im Zusammenhang mit dem UPS (Henriques *et al.*, 2009). Beispielsweise werden die Photorezeptoren Phytochrom A und Cryptochrom 2 UPS-abhängig degradiert. *Downstream* der Rezeptoren wird die Abundanz von Transkriptionsfaktoren, die die Photomorphogenese positiv oder negativ regulieren, ebenfalls über das Proteasom determiniert (Hoecker, 2005; Henriques *et al.*, 2009). Das UPS spielt außerdem eine Rolle bei der Signaltransduktion von Phytohormonen (Santner und Estelle, 2010). Die Gibberellinsäure (*Gibberellic acid*, GA)- Signaltransduktion beinhaltet die Degradation von DELLA-Proteinen, die als Repressorproteine der GA-Antwort fungieren, über das UPS (Wang und Deng, 2011). Aktuelle Forschungen haben gezeigt, dass eine direkte Interaktion von DELLAs mit Toc159 einen Abbau des TOC-Rezeptors über das UPS induziert, ehe eine Assemblierung im Membrankomplex stattfindet (Shanmugabalaji *et al.*, 2018). So wird eine GA-abhängige Regulation der Plastidenbiogenese in einer frühen Phase der Entwicklung vermittelt (Shanmugabalaji *et al.*, 2018). Zudem spielt die GA-abhängige Regulation der DELLA-Proteine eine Rolle in der Expression kernkodierter

Plastidenproteine, die an der Plastidenteilung beteiligt sind (Jiang *et al.*, 2012), und bei der Chlorophyll- und Carotinoid-Biosynthese während der De-Etiolierung (Cheminant *et al.*, 2011).

Der Transkriptionsfaktor Glk1 vermittelt in *A. thaliana* die Expression von Genen, die mit der Photosynthese im Zusammenhang stehen (Fitter *et al.*, 2002). Im Zuge der retrograden Signaltransduktion erfolgt neben der Gun1-abhängigen Transkriptregulation von Glk1 (Kakizaki *et al.*, 2009) eine Gun1-unabhängige, posttranskriptionale Regulation der Abundanz von Glk1 (Tokumaru *et al.*, 2017). Die Stabilisierung von polyubiquitiniertem Glk1 in Anwesenheit des Proteasom-Inhibitors MG132 belegt die Beteiligung des Proteasoms an der von retrograden Signalen induzierten Degradation des Glk1 (Tokumaru *et al.*, 2017). Ein weiterer Mechanismus, in den das UPS involviert ist und der zur Vermeidung der Akkumulation nicht-importierter Vorläufer beiträgt, ist die Degradation der Vorläuferproteine im Cytosol. Eine direkte Interaktion von Transitpeptiden plastidärer Proteine mit den Untereinheiten Rpt2A und Rpt5A des 26S-Proteasoms wurde sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt (Sako *et al.*, 2014). Bei Inhibierung des plastidären Imports akkumulierte konstitutiv exprimiertes RbcS(TP):eGFP verstärkt ubiquitiniert (Shanmugabalaji *et al.*, 2018). Des Weiteren interagiert die E3-Ligase Chip aus *A. thaliana* mit Hsc70-4 und vermittelt die Ubiquitinierung plastidärer Vorläufer (Lee *et al.*, 2009), was ebenfalls für die Rolle des UPS bei der Degradation von plastidären Vorläufern argumentiert.

Die Suche nach einem Repressor für den Phänotyp der *toc33*-Mutante *ppi1* führte zur Identifizierung einer weiteren, mit plastidären Prozessen im Zusammenhang stehenden E3-Ligase, *suppressor of ppi1* (SP1), die assoziiert mit dem TOC-Komplex ist (Ling *et al.*, 2012). Die Doppelmutante *sp1 ppi1* weist im Vergleich zur Einzelmutante *ppi1* verbesserte Plastiden-Eigenschaften wie einen gesteigerten Chlorophyllgehalt und eine verbesserte Importrate auf (Ling *et al.*, 2012). SP1 vermittelt die Ubiquitinierung von TOC-Komponenten und begünstigt somit deren Abbau über das Proteasom (Ling *et al.*, 2012). In *sp1*-Mutanten akkumulieren im Vergleich zum WT die TOC-Komponenten Toc33 und Toc75, während sie in einer *SP1*-Überexpressionslinie geringer abundant sind (Ling und Jarvis, 2015). Die SP1-abhängige Degradation der TOC-Komponenten hat möglicherweise eine Bedeutung bei der Reorganisation der TOC-Maschinerie zur dynamischen Regulation des Plastiden-Proteoms unter Stressbedingungen oder bei Entwicklungsprozessen, denn *sp1*-Mutanten zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Salz-, osmotischem und oxidativem Stress (Ling und Jarvis, 2015) und Defizite während der De-Etiolierung (Ling *et al.*, 2012).

1.6 Zielstellung

Plastidäre Proteine, die kernkodiert sind, werden im Cytosol meist mit einem N-terminalen Transitpeptid synthetisiert, das den Import über den TOC/TIC-Importweg vermittelt. Auf Grund ihrer geringen Abundanz und der eingeschränkten Nachweisbarkeit gibt es bislang nur wenige Belege für die Existenz nicht-prozessierter Vorläuferproteine *in vivo* (Lee *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2009; Bischof *et al.*, 2011). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass eine Behinderung des Imports in *ppi2* zur Akkumulation von Vorläufern im Vergleich zum WT führt (Lee *et al.*, 2003; Bischof *et al.*, 2011). Diese Beobachtung soll im Rahmen dieser Arbeit mit transient transformierten *ppi2*- und WT-Protoplasten, die unter der Kontrolle eines 35S-Promoters verschiedene Transitpeptid:eGFP-Fusionsproteine konstitutiv exprimieren, überprüft werden, um im Anschluss die akkumulierenden Vorläufer näher zu untersuchen. Vorarbeiten von Bischof *et al.* (2011) wiesen auf eine N-terminale Acetylierung von potentiellen Vorläuferproteinen hin. Eine Funktion dieser Modifikation ist noch unbekannt. Die Generierung von Substraten, die in *ppi2*-Protoplasten akkumulieren und sich in ihrer N-terminalen Modifikation unterscheiden soll zur Aufklärung ihrer Funktion beitragen.

Des Weiteren wurde ein Zusammenhang von Vorläuferproteinen mit dem 26S-Proteasom postuliert (Lee *et al.*, 2009; Sako *et al.*, 2014), sodass wahrscheinlich neben dem Importprozess eine effiziente Degradation von Vorläuferproteinen im Cytosol zur Vermeidung der Akkumulation von Bedeutung ist. Im Laufe der Arbeit soll die Rolle des UPS für plastidäre Prozesse näher beleuchtet werden, indem die Proteasom-Mutante *rpn8a-2* und die Doppelmutante *rpn8a ppi2*, mit Defekten im Proteasom und im plastidären Proteinimport, physiologisch und proteinbiochemisch untersucht werden. Gleichzeitig sollen die E3-Ligase-Mutante *sp1-2* und die Doppelmutante *sp1 ppi2* analysiert werden, um Parallelen und Unterschiede in potentiellen Veränderungen die Plastiden betreffend aufzuzeigen und Ansätze zur Aufklärung möglicher Wirkmechanismen zu erarbeiten.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Pflanzenmaterial

Für die vorliegende Arbeit wurde der Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (*A. thaliana*) verwendet. Die T-DNA-Insertionslinie *plastid protein import mutant 2* (*ppi2*, Introgression von CS11072 in Ökotyp Columbia, Kubis *et al.* (2004)) wurde von Paul Jarvis (*University of Oxford, Department of Plant Sciences*) zur Verfügung gestellt. Sie besitzt eine Mutation im *Toc159*-kodierenden Gen *AT4G02510*. Die T-DNA-Insertionslinie *plastid protein import mutant 1* (*ppi1*, Ökotyp Wassilewskija) besitzt eine Mutation im *Toc33*-kodierenden Gen *AT1G02280*. Die Samen der T-DNA-Insertionslinien *suppressor of ppi1 locus 1* (*sp1-2*, SALK_063571) und *regulatory particle non-ATPase subunit 8a_2* (*rpn8a-2*, *ae3-3*, SALK_151595c) wurden vom *The Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC) bezogen. Die inserierte T-DNA der SALK-Linien geht auf einen pROK2-Vektor mit dem Kanamycinresistenzgen *Neomycin-Phosphotransferase II* (*NptII*) zurück (Alonso, 2003), das im Fall von *rpn8a-2* und *sp1-2* keine Resistenz auf ½ MS-Selektionsmedium mit Kanamycin vermittelte. Die Kontrolle des Genotyps der beiden Linien erfolgte ausschließlich über T-DNA-Amplifikation mittels PCR. In *sp1-2* ist das E3-Ligase kodierende Gen *AT1G63900* von der Mutation betroffen. In *rpn8a-2* ist das Gen *AT5G05780*, das für eine Nicht-ATPase-Untereinheit des Proteasoms kodiert, von der Mutation betroffen. Die Doppelmutanten *sp1 ppi2* und *rpn8a ppi2* gingen aus Kreuzungen der T-DNA-Mutanten *sp1-2* mit *ppi2* bzw. *rpn8a-2* mit *ppi2* hervor (Kapitel 2.2.2 [S. 29]).

2.1.2 Enzyme und Antikörper

Enzyme

Tab. 2: Übersicht zu den verwendeten Enzymen

Enzym	Hersteller	Anwendung
Taq-DNA-Polymerase	New England Biolabs GmbH	DNA-Amplifikation
Pfu-DNA-Polymerase	Promega	cDNA-Amplifikation
T4-DNA-Polymerase	New England Biolabs GmbH	Ligation von DNA-Fragmenten
T4-Polynukleotid-Kinase	New England Biolabs GmbH	Phosphorylierung von DNA-Fragmenten
Alkaline Phosphatase FastAP	Thermo Fisher Scientific Inc.	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten
Restriktionsenzyme	New England Biolabs GmbH	Restriktion von DNA
	Fermentas	
Trypsin Seq Grade Modified	Promega	Proteinverdau
Tryp V5111		
Cellulase Onozuka R-10	SERVA Electrophoresis GmbH	Zellwandverdau
Macerozym R-10	SERVA Electrophoresis GmbH	Zellwandverdau
Thermolysin	Sigma-Aldrich	<i>in vitro</i> Import

Antikörper

Eine Liste der verwendeten primären Antikörper ist in Tab. 3 aufgeführt. Als sekundäre Antikörper wurden die mit Peroxidase konjugierten Antikörper *Goat anti-Rabbit (H&L)* (Agrisera) 1:10000 verdünnt oder *Goat anti-Mouse IgG (H&L)* (Agrisera) 1:20000 verdünnt eingesetzt.

Tab. 3: Übersicht zu den verwendeten primären Antikörpern

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Serum
αAktin	Sigma-Aldrich	1 : 5000	Maus
αD1, psbA	Agrisera	1 : 10000	
αFNR	R.B. Klösigen (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abt. Allgemeine Botanik)	1 : 5000	
αGFP 598	MBL International Corporation	1 : 5000	
αLhcb2	Agrisera	1 : 10000	
αLhcb4	Agrisera	1 : 7000	
αOEC33	R.B. Klösigen (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abt. Allgemeine Botanik)	1 : 5000	Kaninchen
αRnp29	C. Schmitz-Linneweber (Humboldt-Universität zu Berlin, Molekulare Genetik)	1 : 3000	
αToc132	D. J. Schnell (<i>Michigan State University, Department of Plant Biology</i>)	1 : 2000	
αToc75	Hiltbrunner <i>et al.</i> , 2001	1 : 2000	
αUbQ11	Agrisera	1 : 10000	

2.1.3 Plasmide und Oligonukleotide

Plasmide

Als Zwischenvektoren für die Klonierung wurden pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen) und pBSK+ (Stratagene) genutzt. Für die Expression von eGFP-Fusionsproteinen in Protoplasten wurde der Vektor pRT- Ω /Not/Asc (Überlacker und Werr, 1996) mit inserierter eGFP-Sequenz (pRT100mod_eGFP erzeugt in der AG von R. B. Klösigen (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abt. Allgemeine Botanik), Anhang 1 [S. 129]) verwendet. Ausgehend von cDNA aus *A. thaliana* wurden mittels PCR Gensequenzen von Interesse amplifiziert und in den Zielvektor pRT100mod_eGFP *upstream* der eGFP-Sequenz kloniert (Anhang 1 [S. 129]). Eine Übersicht zu den verwendeten Konstrukten ist in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4: Übersicht zu den verwendeten Konstrukten

Konstrukt	Vektor	erzeugt von	Anwendung
eGFP	pRT100mod	R. B. Klösigen	
FNR ₁₋₅₅ :eGFP	pRT100mod	R. B. Klösigen	
E1 α ₁₋₁₀₀ :eGFP	pRT100mod	J. Grimmer, J. Heise, A. Rödiger	
Fd2 ₁₋₁₀₀ :eGFP (22)	pRT100mod	J. Grimmer, J. Heise, A. Rödiger	
Fd2 ₁₋₁₀₀ :eGFP (8)	pRT100mod	J. Grimmer, K. Peter	
Fd2 A2P ₁₋₁₀₀ :eGFP	pRT100mod	J. Grimmer, K. Peter	
Lhcb4 ₁₋₁₀₀ :eGFP	pRT100mod	J. Grimmer, A. Rödiger	Protoplasten-Transformation
RbcS ₁₋₁₀₀ :eGFP	pRT100mod	J. Grimmer, A. Rödiger	
Rnp29 ₁₋₁₀₀ :eGFP	pRT100mod	J. Grimmer, A. Rödiger	
Rnp29 A2E ₁₋₁₀₀ :eGFP	pRT100mod	J. Grimmer, A. Rödiger	
Rnp29 A2N ₁₋₁₀₀ :eGFP	pRT100mod	J. Grimmer, A. Rödiger	
Rnp29 A2P ₁₋₁₀₀ :eGFP	pRT100mod	J. Grimmer	
Toc159 VL	pCHF7	B. Agne, F. Kessler	
Rnp29 ₁₋₁₀₀ :eGFP	pET21.d	J. Grimmer	
Rnp29 A2P ₁₋₁₀₀ :eGFP	pET21.d	J. Grimmer	<i>in vitro</i> Translation
Rnp29 VL	pET21.d	J. Grimmer	
Rnp29 A2P VL	pET21.d	J. Grimmer	

Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von *Metabion International AG* bezogen.

Tab. 5: Oligonukleotide zur cDNA-Amplifikation und Klonierung

AGI-Locus/ Plasmid	Primer -Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	T _m [°C]*
AT1G01090	E1α_for_Nco	CACCATGGCGACGGCTTTCGCTCCC	65,9
	E1α_rev_Nco_TP	CCATGGCCATGTCTTCGAAAGATCTACC	61,4
AT1G60950	Fd2_for_Nco	CACCATGGCTTCCACTGCTCTCTCA	61,0
	Fd2 A2P_for_Nco	CGGCTTCACCATGCCTTCCACTGC	62,5
	Fd2_rev_TP_Nco (22)	CCATGGCAGCACAGCTCGAACAAGA	61,0
	Fd2_rev_TP_BamHI (8)	GGATCCGCCAGCACAGCTCGAACA	62,5
	Rnp29_for_Nco	CACCATGGCTGCTTCAGCTTCGTCT	61,0
AT2G37220	Rnp29 A2E_for_Nco	CACCATGGAGGCTTCAGCTTCGTCT	61,0
	Rnp29 A2N_for_BspHI	CATCATGAACGCTTCAGCTTCGTCT	57,7
	Rnp29 A2P_for_BamHI	CAGGATCCATGCCTGCTTCAGCTTC	61,0
	Rnp29_rev_TP_Nco	CCATGGCGAAAGGAAGGTTACCAAC	59,3
	Rnp29_rev_VL_Nco	CCATGGCATATTGGCGCCTTGGA	58,8
	Rnp29_rev_VL_STOP	TGCTCAATATTGGCGCCTTG	51,8
	AT5G01530	Lhcb4_for_Nco	CACCATGGCCGCAACATCC
Lhcb4_rev_TP_Nco		CCATGGCATTCTGGTCTAGTG	54,4
AT5G05780	Rpn8a_CDS_for [For]	ATGGATGTGATTAAGACGCAACAGATTT	55,5
	Rpn8a_CDS_rev [Rev (II)]	CTAGCTGGTGGCAGGTATGGCC	60,4
	Rpn8a_LP [Rev (I)]	CATGAACGAAAACCTTTCTGGC	50,5
AT5g38430	RbcS_for_Nco	CACCATGGCGTCTCTATGCTCTCC	62,6
	RbcS_rev_TP_Nco	CCATGGCCTCGAATTCAACACAAGGAAT	59,9
pRT100mod	pCL60_eGFP	CTTGTGGCCGTTTACGTCG	53,2
	pCL60_35S	TCTCCACTGACGTAAGGGAT	51,8

* Schmelztemperatur kalkuliert mit *Metabion Biocalculator* (<http://www.metabion.com/support-and-solution/biocalculator/>)

Tab. 6: Oligonukleotide zur Genotypisierung von T-DNA-Linien

Linie	Primer -Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	T _m [°C]*
ppi2	Toc159_for ^{A, B}	GAATAGGGTTTTAATCGGAAG	48,5
	Toc159_rev ^A	TGCCACATCAACATGCACTG	51,8
	LB5 ^B	GATGCAATCGATATCAGCCAATTTAGAC	57,3
sp1-2	sp1-2_RP ^{A, B}	ATTACATGGACACGGCTTGTC	52,4
	sp1-2_LP ^A	AGGATCATTCAATTCCAACCC	50,5
	LBb1.3 ^B	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	46,8
rpn8a-2	rpn8a-2_RP ^{A, B}	GGCCTAAGCCTAACGAACTTG	54,4
	rpn8a-2_LP ^A	TTGCTCAGGGATGTGAAAGAC	52,4
	LBb1.3 ^B	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	46,8

^A zur Amplifikation des genomischen Fragments; ^B zur Amplifikation des T-DNA-spezifischen Fragments

* Schmelztemperatur kalkuliert mit *Metabion Biocalculator* (<http://www.metabion.com/support-and-solution/biocalculator/>)

MATERIAL UND METHODEN

Tab. 7: Oligonukleotide zur Transkriptanalyse mittels *real time*-PCR

AGI-Locus	Primer -Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Effizienz
AT1G67090	RbcS_qRT_for	TGAATTCGAGTTGGAGCACG	1,94
	RbcS_qRT_rev	TGGGGTACTCCTTCTTGAC	
AT2G03430	Nas6_qRT_for	GTGCTTTTGACCAGAGGTGC	1,80
	Nas6_qRT_rev	GTGCAACCAACCTTGTCTGTG	
AT2G05840	PAA2_qRT_for	TGCGTCGTTACGCAGAAGAA	1,97
	PAA2_qRT_rev	AACTCAGCAGCCTCATTCT	
AT3G04870	ZDS_qRT_for	TCTCGTGCTTTGCGGATCTT	2,06
	ZDS_qRT_rev	TCAGTGACCTGCATCGCTAC	
AT3G09840	Cdc48A_qRT_for	ATTTCCACACTGCTCTCGGG	1,92
	Cdc48A_qRT_rev	CTTCTCTGGGTGCTCGACTG	
AT3G11270	Rpn8B_qRT_for	ATGCGGTTGAGGAGGTGAAAG	1,82
	Rpn8B_qRT_rev	GTTGCCAAGGTAATGATGGTTG	
AT4G10340	Lhcb5_qRT_for	AAGCCAGCTCCTGCTAAGTC	1,84
	Lhcb5_qRT_rev	TCTCCAGCAACTTCACCGTT	
AT4G29040	Rpt2A_qRT_for	CGACCTGGACGGATTGATAGG	1,82
	Rpt2A_qRT_rev	CAGCTCCTGAGAACTCGTCTT	
AT4G38630	Rpn10_qRT_for	AAACTCGAGGCGCTCCTTAC	1,88
	Rpn10_qRT_rev	CAGCTGCCGCAGAAACATAG	
AT5G01530	Lhcb4_qRT_for	AGCCGTACAGTGAGGTGTTC	2,14
	Lhcb4_qRT_rev	CTACAAGCTCCACCTTGCCA	
AT5G09810	Act7_for	GGAGCACCCAGTTCTACTCA	1,89
	Act7_qRT_rev	TGTACGACCACTGGCATAGAG	
AT5G09900	Rpn5A_qRT_for	ACGTGGTCAGCTCAAACAGG	1,94
	Rpn5A_qRT_rev	GACGTGCCCTCTCGATTCA	
ATCG00020	psbA_qRT_for	TTCGGCGGCTCCCTTTTAG	1,99
	psbA_rev	CGGCCAAAATAACCGTGAGC	
ATCG00490	RbcL_qRT_for	CTCAAGATTGGGTCTCACTACCT	1,82
	RbcL_rev	CCCAAGGGTGGCCTAAAGTT	
ATCG00630	psaJ_qRT_for	ACATATCTTCCGTAGCACCG	2,20
	psaJ_qRT_rev	GGGAAATGTTAATGCATCTGGAA	
ATCG00700	psbN_qRT_for	AGCAACCCTAGTCGCCATC	1,99
	psbN_qRT_rev	TAGTCCCCGTGTTCTCGAAT	
ATCG01110	ndhF_qRT_for	CTGTTATGGCTCGGCCCTT	1,91
	ndhF_qRT_rev	TCAGCCGCTATTCTCCAATAC	

2.1.4 Programme und Datenbanken

Tab. 8: Übersicht zu den verwendeten Programmen und Datenbanken/Portalen

Programme	Quelle	Anwendung
<i>Alignment</i> - Programm	https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/	Darstellungen zum Protein- <i>Alignment</i>
<i>AxioVision</i> 4.8.2	Carl Zeiss Microscopy	Bearbeitung von TEM-Aufnahmen
BLAST®	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Primer-Design, Sequenzvergleiche
<i>Image J</i>	https://imagej.nih.gov/ij/	Quantifizierung von Western-Signalen
<i>ImageJ Plugins NeuronJ</i>	https://imagescience.org/meijering/software/neuronj/	Ermittlung von Wurzel- und Hypocothyllänge
<i>ImagingWin</i>	http://www.walz.com/products/chl_p700/imaging-pam_ms/imagingwin.html	Software zur <i>Imaging-PAM</i> -Fluorometrie
<i>LSM Image Browser</i>	Carl Zeiss Microscopy	Bearbeitung von CLSM-Aufnahmen (LSM 510 Meta)
<i>Metabion Biocalculator</i>	http://www.metabion.com/support-and-solution/biocalculator/	Kalkulation der Schmelztemperatur von Oligonukleotiden
Protein-Kalkulationsprogramm	http://web.expasy.org/compute_pi/	Kalkulation des Molekulargewichts von Proteinen
<i>ProteinLynx Global Server</i> (PLGS 3.0)	Waters	Auswertung der Synapt G2S-Daten
<i>Proteome Discoverer v.1.4 mass analysis environment</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.	Auswertung der Velos-Orbitrap-Daten
<i>terminator3</i>	https://bioweb.i2bc.paris-saclay.fr/terminator3/	Vorhersagen zu N-terminalen Modifikationen
<i>ZEN blue 2.5 lite</i>	Carl Zeiss Microscopy	Bearbeitung von CLSM-Aufnahmen (LSM 780)
Datenbanken/Portale	Link /Referenz	
TAIR10	ftp://ftp.arabidopsis.org	
Uniprot	http://www.uniprot.org/	
MapMan	Thimm <i>et al.</i> , 2004	
SUBA3 MS*	Hooper <i>et al.</i> , 2014 Tanz <i>et al.</i> , 2013	
häufige Kontaminationen	ftp://ftp.thegpm.org/fasta/cRAP/crap.fasta	

* enthält nur Lokalisierungen, die experimentell mit MS-Daten belegt wurden

2.2 Methoden

2.2.1 Pflanzenanzucht

Samensterilisation und Stratifizierung

Etwa 10 mg Samen wurden in 330 μ l Ethanol (70% v/v) für 5 min unter Rotieren gewaschen. Es folgte eine Inkubation für 5 min in 330 μ l Sterilisationslösung [50% (v/v) Natriumhypochlorit (12%ig); 0,1% (v/v) Triton] und vier Waschschrirte mit 330 μ l sterilem H₂O.

Die Samen wurden für mindestens zwei Tage bei 4 °C im Dunkeln feucht stratifiziert.

Wachstumsbedingungen

Die Anzucht von *A. thaliana* erfolgte auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium [$\frac{1}{2}$ Murashige & Skoog Medium (Duchefa Biochemie B.V); 1 mM MES; pH 5,6] inklusive 0,8% (w/v) *Plant Agar* (Duchefa Biochemie B.V) mit 3% (w/v) oder 0,8% (w/v) Saccharose in Phytoschränken (CU-36L3, CLF Plant Climatics GmbH) bei etwa 65% Luftfeuchte unter Kurztagbedingungen mit 8 h Licht (normale Lichtstärke: 150 μ mol Photonen m⁻² s⁻¹ bzw. Schwachlicht: 20 μ mol Photonen m⁻² s⁻¹, 21 °C) und 16 h Dunkelheit (18 °C). Die Pflanzen wuchsen auf dem Medium bis zur Ernte oder wurden nach 7 d in $\frac{1}{2}$ MS Flüssigmedium mit 0,8% (w/v) Saccharose ohne Zusatz von Agar umgesetzt und bis zur Ernte kultiviert.

Für Anzuchten auf Erde wurde ein feuchtes Erde/Vermikulit-Gemisch (Einheitserde, Typ GS90) genutzt. Die Pflanzen wurden in Phytoschränken (AR-41L3 oder AR-66/L3, CLF Plant Climatics GmbH) unter Kurztagbedingungen bzw. Langtagbedingungen mit 16 h Licht (150 μ mol Photonen m⁻² s⁻¹, 21 °C) und 8 h Dunkelheit (18 °C) oder im Gewächshaus bis zur Samenreife kultiviert.

2.2.2 Generierung der Doppelmutanten

Die Doppelmutanten *sp1-2 ppi2* und *rpn8a ppi2* wurden mittels klassischer Kreuzung erstellt. Heterozygote *ppi2*-Elternpflanzen wurden mit homozygoten *sp1-2*- bzw. *rpn8a-2*-Pflanzen gekreuzt, wobei die Kreuzungen jeweils reziprok erfolgten und die hervorgehende F1 Generation mittels PCR und Selektion auf Kanamycinresistenz (Anzucht 14 d auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium mit 0,8% (w/v) Saccharose und 50 mg/l Kanamycin unter Kurztagbedingungen) auf einen heterozygot/heterozygoten Genotyp getestet wurde. In der F2-Generation wurden Nachkommen, die homozygot für das *sp1*- bzw. *rpn8a*-Allel und heterozygot für das mutierte *Toc159*-Allel waren, zur Samenreife gebracht. Eine Überprüfung des Genotyps der F2-Pflanzen erfolgte über eine T-DNA-Amplifikation. Die Samen von

jeweils vier positiven F2-Pflanzen wurden im gleichen Maße gemischt und für weitere Analysen herangezogen.

2.2.3 Physiologische Analysen

Wurzellängenmessung

Zur Bestimmung des Wurzelwachstums wurden sterilisierte Samen auf ½ MS-Medium mit 3% Zucker in Reihe ausgelegt und stratifiziert. Die Länge der Wurzeln auf senkrecht unter Kurztagbedingungen gelagerten Platten wurde nach 7 d und weiteren 10 d Anzucht dokumentiert und unter Verwendung des *ImageJ Plugins NeuronJ* (<https://imagescience.org/meijering/software/neuronj/>) ermittelt.

Frischgewichtsbestimmung, Isolierung und Quantifizierung von Chlorophyll und Carotinoiden

Für die Ermittlung der Frischgewichte und Pigmentkonzentrationen wurden *Arabidopsis*-Keimlinge in Flüssigkultur unter Kurztagbedingungen 28 d angezogen (eine Pflanze pro well). Die Frischgewichte der einzelnen Keimlinge wurden mit einer Feinwaage (Sartorius™ BP211D) ermittelt.

Die Pigmentkonzentrationen wurden in grünen Linien für einzelne Keimlinge bestimmt, während in Albinolinien jeweils fünf Keimlinge für eine Messung vereinigt wurden. Das Material wurde bei 4 °C fein gemörsert und mit 1 ml 80% (v/v) Aceton versetzt. Es folgte eine Inkubation der Proben bei Dunkelheit unter Rotieren für 45 min. Nach einer Zentrifugation bei 4 °C und 5000 x g für 1 min wurde die Absorption des Überstandes bei 663 nm, 647 nm und 470 nm bestimmt. Nach einer Formel von Lichtenthaler und Buschmann (2001) wurde die Konzentration von Chlorophyll a, Chlorophyll b und Carotinoiden berechnet (siehe Formeln) und ins Verhältnis zum zuvor bestimmten Frischgewicht gesetzt.

$$c_{\text{Chl a}} [\mu\text{g/ml}] = 12,25 A_{663} - 2,79 A_{647}$$

$$c_{\text{Chl b}} [\mu\text{g/ml}] = 21,50 A_{647} - 5,10 A_{663}$$

$$c_{\text{Carot}} [\mu\text{g/ml}] = (1000 A_{470} - 1,82 c_{\text{Chl a}} - 85,02 c_{\text{Chl b}}) / 198$$

Ermittlung der Photosyntheseleistung mittels imaging-PAM (Pulse amplitude measurement)

Keimlinge wurden zunächst auf ½ MS-Medium mit 3% (w/v) Saccharose unter Kurztagbedingungen angezogen und nach 7 d auf Platten (Ø 8 cm) mit ½ MS-Medium mit 3% (w/v) Saccharose umgesetzt. Nach weiteren 21 Tagen unter Kurztagbedingungen erfolgte die Bestimmung der Photosyntheseleistung von Keimlingen der grünen Linien mittels *imaging-PAM*. Für die Messung wurde das 7. oder 8. Blatt von unter normalen Lichtbedingungen gewachsenen Pflanzen ausgewählt, das i.R. das zweit-jüngste Blatt war. Von unter Schwachlicht angezogenen Keimlingen wurde ebenfalls das zweit-jüngste Blatt für die Messung ausgewählt, was dem 2. oder 3. Blatt entsprach.

Albinolinien zeigten bei Anzucht unter normalen Lichtbedingungen erst nach 48 d ausreichende Fluoreszenz um Untersuchungen mittels *imaging-PAM* durchzuführen. Bei den Keimlingen der Albinolinien wurde der gesamte Teil der Pflanze mit einer messbaren Grundfluoreszenz in die Messung der PSII-Parameter einbezogen.

Für die Fluoreszenz-Messung wurde ein *imaging-PAM* Chlorophyll-Fluorometer (Walz) verwendet. Die Parameter *PSII Quantum Yield* und NPQ gingen aus Berechnungen des Programms *ImagingWin* (http://www.walz.com/products/chl_p700/imaging-pam_ms/imagingwin.html) hervor. Nach Ermittlung der maximalen *PSII Quantum Yield* durch Anregung von mindestens 20 min dunkeladaptierten Keimlingen mit einem sättigenden Messlichtimpuls, erfolgte die Messung der *PSII Quantum Yield* nach 20 s Adaption der Keimlinge an etappenweise steigende Lichtbedingungen zur Ermittlung einer operativen *PSII Quantum Yield* und des NPQ in einer Lichtkurve.

Keimungsanalysen unter Salzstress

Zur Erzeugung von Salzstress wurde $\frac{1}{2}$ MS-Medium mit 3% (w/v) Saccharose inklusive 150 mM NaCl eingesetzt. Als Kontrollmedien wurden $\frac{1}{2}$ MS-Medium mit 3% (w/v) Saccharose und osmotischen Stress erzeugendes $\frac{1}{2}$ MS-Medium mit 3% (w/v) Saccharose inklusive 250 mM Mannitol verwendet. Nach 14 d Anzucht unter Kurztagbedingungen wurde der Anteil nichtgekeimter Samen, gekeimter Samen, die keine grünen Kotyledonen ausbildeten und gekeimter Samen, die grüne Kotyledonen ausbildeten, auf Salzmedium und Kontrollmedien ermittelt.

Untersuchungen zur MG132-Sensitivität

Zur Analyse der MG132-Sensitivität wurden in einer 24-well-Platte 10-15 Samen in einem well zunächst in 0,5 ml $\frac{1}{2}$ MS-Medium mit 0,8% (w/v) Saccharose ohne Zusatz von *Plant Agar* stratifiziert. Anschließend erfolgte die Zugabe von verschiedenen Konzentrationen MG132 (SERVA Electrophoresis GmbH) in 10 μ l DMSO. Die Samen wurden für 7 d im Dunkeln gehalten. Im Anschluss wurden die etiolierten Keimlinge fotografiert und die Hypokotyllänge unter Verwendung des *ImageJ-Plugins NeuronJ* ermittelt.

2.2.4 Molekularbiologische Standardmethoden

DNA-Extraktion aus Pflanzen

Etwa 0,5 cm² Blattscheiben wurden gemörsert und mit 300 μ l DNA-Extraktionspuffer [*Shorty buffer*, 0,2 M Tris/HCl pH 9,0; 0,4 M LiCl; 25 mM EDTA, 1% (w/v) SDS] versetzt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 16000 x g und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und mit 1 Volumen Isopropanol gemischt. Die gefällte DNA wurde bei 16000 x g und Raumtemperatur (RT) für 45 min pelletiert. Im

MATERIAL UND METHODEN

Anschluss wurde das DNA-Pellet mit 200 µl Ethanol (70% (v/v)) gewaschen und bei RT getrocknet. Die DNA wurde in 20-30 µl TE [10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA] gelöst und bei -20 °C gelagert.

RNA-Extraktion aus Pflanzen

Aus ca. 100 mg gemörsertem Pflanzenmaterial wurde mit Hilfe des RNA-Isolationskits *NucleoSpin® RNA Plant* (Macherey & Nagel GmbH & Co. KG) RNA isoliert. Die RNA wurde in sterilem H₂O eluiert und bei -80 °C aufbewahrt.

Synthese von cDNA

Für die cDNA-Synthese wurden 4 µg Gesamt-RNA eingesetzt. In einem 20 µl-Ansatz wurde aus der RNA mit dem *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc.) unter der Verwendung von Oligo-(dT)₁₈ Oligonukleotiden für Klonierungen und *random hexamer* Oligonukleotiden für quantitative Transkriptanalysen cDNA synthetisiert. Die cDNA wurde bei -80 °C gelagert.

Amplifikation von DNA-Fragmenten

Ausgehend von genomischer DNA, Plasmid-DNA oder cDNA wurden DNA-Fragmente mit *Taq*-DNA-Polymerase (New England Biolabs GmbH) in einem PCR-Ansatz [1 x ThermoPol® *buffer* (10 x); 100 µM dNTPs; 0,4 µM Oligonukleotide; 1,25 U/50 µl PCR-Ansatz *Taq*-DNA-Polymerase; < 1 µg DNA] amplifiziert. Alternativ wurde für die cDNA-Amplifikation die *Pfu*-DNA-Polymerase (Promega) mit 3'→5' -Exonuklease-Aktivität eingesetzt [1 x *Pfu*-DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (10 x); 200 µM dNTPs; 0,5 µM Oligonukleotide; 1,25 U/50 µl PCR-Ansatz *Pfu*-DNA-Polymerase; < 0,5 µg/50 µl PCR-Ansatz DNA]. Die Reaktionen wurden wie in Tab. 9 [S. 34] beschrieben in *Thermocyclern* (peqSTAR Thermocycler, Peqlab/VWR International GmbH) durchgeführt, allerdings wurde für jedes Oligonukleotid-Paar die *Annealing*-Temperatur und die Elongationszeit angepasst. Außerdem entfiel die Erstellung einer Schmelzkurve und die Reaktion wurde nach 32 Zyklen beendet.

Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Proben wurden mit 6 x Ladepuffer [10 mM Tris/HCl pH 7,6; 0,15% (w/v) Orange G, 0,03% (w/v) Xylencyanol FF; 60% (v/v) Glycerol; 60 mM EDTA] versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Agarose-Gelen [0,8% (w/v) Agarose in 1 x TAE], die den DNA-Farbstoff *SYBR® Safe* (Thermo Fisher Scientific Inc.) enthielten. Als Laufmittel wurde TAE [40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA] verwendet. Die Detektion der Signale erfolgte mit einer Fluoreszenz-Dokumentationsanlage (Quantum-ST4-3026/26MX, Peqlab/VWR International GmbH). Als DNA-Größenstandard wurde der *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific Inc.) verwendet.

Klonierung von Plasmiden

Die Klonierung von Plasmiden wurden nach Protokollen von Sambrook und Russell (op. 2001) durchgeführt.

Ausgehend von *A. thaliana* cDNA wurden PCR-Fragmente mit Restriktionsschnittstellen amplifiziert und in einen Zwischenvektor pCR[®]2.1-TOPO[®] (*TA Cloning™ Kit*, Invitrogen) ligiert. Nach Restriktion der Insertionsfragmente und Reinigung aus einem Agarose-Gel mit einem *NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up Kit* (Macherey & Nagel GmbH & Co. KG) erfolgte die Ligation von DNA-Fragmente mit kompatiblen Überhängen (*sticky ends*) unter Verwendung einer T4-DNA-Polymerase (New England Biolabs GmbH) in einen mit Restriktionsenzymen linearisierten Zielvektor pRT100mod_eGFP oder einen weiteren Zwischenvektor pBSK+ (Stratagene). Eine Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten erfolgte mit einer T4-Polynukleotid-Kinase (New England Biolabs GmbH). Für eine Dephosphorylierung wurde die *Thermosensitive Alkaline Phosphatase FastAP* (Thermo Fisher Scientific Inc.) nach Herstellerempfehlungen eingesetzt. Bei der Restriktion entstehende Überhänge wurden für Ligationen, die auf glatte Enden (*blunt ends*) angewiesen waren, aufgefüllt. Zum Auffüllen von 5'-Überhängen wurde eine T4-DNA-Polymerase (New England Biolabs GmbH) nach Vorgaben des Herstellers verwendet.

Sequenzierungen zur Kontrolle der erfolgreichen Klonierung wurden von *Eurofins Genomics* durchgeführt.

Transformation von E. coli

Chemisch kompetente *DH5 α* -Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 100 μ l der Zellen wurden mit 3 -5 μ l Ligationsansatz oder < 10 μ g Plasmid-DNA gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 50 s bei 42 °C. Anschließend wurden die Zellen sofort für 5 min auf Eis abgekühlt und mit 500 μ l LB-Medium (Luria/Miller) (Carl Roth GmbH + Co. KG) versetzt. Nach 60 min bei 37 °C wurden die Zellen auf LB-Agar (Luria/Miller) (Carl Roth GmbH + Co. KG) mit entsprechendem Selektionsmarker ausplattiert.

Plasmidpräparation

Plasmidpräparationen wurden mit dem *NucleoBond[®] Xtra Midi Kit* (Macherey & Nagel GmbH & Co. KG) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde in 100 μ l TE [10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA] aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

in vitro Translation

Die *in vitro* Translation wurde mit dem *TNT[®] Quick Coupled Transcription/Translation System* (Promega) in einem 25 μ l-Ansatz mit 0,5 μ g Plasmid-DNA (Tab. 4 [S. 25]) nach Herstellerangaben

durchgeführt. Das *in vitro*-Translat wurde mit S^{35} -Met radioaktiv markiert und bis zur Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

2.2.5 Transkriptanalysen mit quantitativer *real time*-PCR (qRT-PCR)

Oligonukleotid-Design

Für die qRT-PCR wurden zur Zielsequenz passende Oligonukleotide mit der Anwendung *Primer-Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) erstellt. Die PCR-Produkte sollten möglichst eine Länge von 150-200 bp aufweisen und die Schmelztemperatur der Oligonukleotide sollte $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ betragen. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass ihr GC-Gehalt bei einer Länge von etwa 20 bp zwischen 50% und 60% lag. Es wurde darauf geachtet, dass die Oligonukleotide möglichst wenige Sekundärstrukturen und Fehlbindungen eingehen. Die Spezifität wurde nach jeder qRT-PCR mit der Erstellung einer Schmelzkurve kontrolliert. Für jedes Oligonukleotidpaar wurde die PCR-Effizienz aus fünf cDNA-Verdünnungsstufen ermittelt (Tab. 7 [S. 27]).

qRT-PCR mit SYBR® Green

Für einen $20\text{ }\mu\text{l}$ Ansatz wurde $1\text{ }\mu\text{l}$ cDNA (1:5) mit $10\text{ }\mu\text{l}$ *iQ™ SYBR® Green Supermix* (Bio-Rad Laboratories GmbH) und Oligonukleotiden in einer finalen Konzentration von 200 nM versetzt. Die Reaktion erfolgte in einem *iCycler* (Bio-Rad Laboratories GmbH) bei den in Tab. 9 angegebenen Bedingungen. Für jede Probe wurde in drei technischen Replikaten *crossing threshold* (C_t)-Werte, die im Anschluss gemittelt wurden, vermessen. Als Kontrollen wurden stets Reaktionen ohne cDNA mitgeführt. Die relative Expressionsrate entspricht nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001) dem C_t -Wert des Zielgens normiert auf das Referenzgen *Aktin7* (*At5G09810*) in Relation zur Kontrolle aus drei unabhängigen Versuchen. Ein zweiseitiger t-Test wurde auf die ΔC_t -Werte angewendet, um eine statistische Verlässlichkeit zu prüfen.

Tab. 9: Reaktionsbedingungen der qRT-PCR

Reaktionsschritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung und Enzymaktivierung	1x	95°C	3 min
Amplifikation und Quantifizierung	35x	95°C 60°C 72°C	20 s 20 s 20 s
Reaktion beenden		95°C	1 min
Schmelzkurve erstellen	80x	$55\text{-}95^{\circ}\text{C}$ (steigt 0.5°C pro Zyklus)	
Abkühlen		4°C	∞

2.2.6 Proteinbiochemische Standardmethoden

Proteinextraktion

Für die Extraktion von Gesamtprotein wurde 100 mg gemörsertes Pflanzenmaterial mit 800 µl Rensink-Extraktionspuffer [100 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 0,5% (v/v) TritonX-100, 2 mM DTT] und 4 µl *Protease Inhibitor Cocktail* (P9599, Sigma-Aldrich) versetzt. Die Extraktion erfolgte unter Rotieren bei 4 °C für 20 min. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 14000 x g und 4 °C wurde die Proteinkonzentration des Überstandes nach Bradford (1976) mit Roti®-Quant (Carl Roth GmbH + Co. KG) bestimmt.

Proteine aus Protoplasten- und Chloroplastenpellets wurden direkt mit SDS-Probenpuffer [50 mM Tris/HCl pH 6,8; 2% (w/v) SDS; 10% (v/v) Glycerol; 0,1 M DTT; 0,04% (w/v) Bromphenolblau] extrahiert und im Anschluss für 5 min bei 95 °C aufgeköcht.

Proteinfällung

Die Reinigung und Konzentrierung der Proteinproben erfolgte mit einer Chloroform/Methanol-Präzipitation nach Wessel und Flügge (1984). 200 µl Probe wurden mit 480 µl Methanol und 160 µl Chloroform versetzt. Nach gründlichem Mischen wurden 640 µl H₂O zugegeben, erneut gemischt und die Lösung für 1 min bei 14000 x g und RT zentrifugiert. Nach Abnahme der wässrigen Phase wurde die organische Phase mit 480 µl Methanol gemischt und für 5 min bei 10000 x g und RT zentrifugiert. Das sedimentierte Protein wurde getrocknet, für eine anschließende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in SDS-Probenpuffer [50 mM Tris/HCl pH 6,8; 2% (w/v) SDS; 10% (v/v) Glycerol; 0,1 M DTT; 0,04% (w/v) Bromphenolblau] aufgenommen und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Proteine, die einen *in solution* Verdau unterzogen werden sollten, wurden als getrocknetes Pellet bei -20 °C gelagert.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte mittels denaturierender SDS-PAGE nach Laemmli (1970). Wenn nicht anders in der Abbildungsunterschrift aufgeführt, wurden 10 x 10 cm Gele mit 5%igem Sammelgel [625 µl Acrylamid/Bis-Lösung (40%, 37,5:1) (SERVA Electrophoresis GmbH); 1,25 ml Tris/HCl (0,5 M; pH 6,8); 50 µl SDS (10% (w/v)) 3,1 ml H₂O; 25 µl APS (10% (w/v)); 20 µl TEMED] und 12%igem Trenngel [6 ml Acrylamid/Bis-Lösung (40%, 37,5:1) (SERVA Electrophoresis GmbH); 5 ml Tris/HCl (1,5 M; pH 8,8); 200 µl SDS (10% (w/v)) 8,8 ml H₂O; 60 µl APS (10% (w/v)); 15 µl TEMED] verwendet. Die Auftrennung der Proteine, gelöst in SDS-Probenpuffer [50 mM Tris/HCl pH 6,8; 2% (w/v) SDS; 10% (v/v) Glycerol; 0,1 M DTT; 0,04% (w/v) Bromphenolblau], erfolgte bei etwa 20 mA pro Gel in Laemmli-Laufpuffer [25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS;

pH 8,3]. Als Größenstandard wurden 5 µl des Proteinmarkers *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific Inc.) mitaufgetrennt.

Western-Blot-Analyse

Der Transfer von Proteinen aus einer Gelmatrix auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon®-P, Merck KGaA) erfolgte in einem *PerfectBlue™ Semi-Dry Blotter* (PeqLab/VWR International GmbH) unter Verwendung eines Drei-Puffer-Systems [Anodenpuffer I: 0,3 M Tris; 10% (v/v) Methanol; pH 10,4, Anodenpuffer II: 25 mM Tris; 10% (v/v) Methanol; pH 10,4, Kathodenpuffer: 25 mM Tris; 40 mM ε-Aminocaprinsäure; 10% (v/v) Methanol; 0,1% (w/v) SDS; pH 9,4]. Nach Equilibrierung des SDS-Gels für mindestens 5 min in Kathodenpuffer erfolgte der Transfer der Proteine auf die mit Methanol aktivierte und in Anodenpuffer II equilibrierte PVDF-Membran mit 1,2 mA/cm² Membran für 50 min. Im Anschluss wurde die Membran über Nacht getrocknet.

Nach erneuter Aktivierung folgte die Blockierung der Membran in Blockierer [5% (w/v) Magermilchpulver (TSI GmbH) in TBST [10 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween; pH 7,5] oder PBST [137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄; 0,05% (v/v) Tween; pH 7,4]] bei RT für 1 h. Die Inkubation mit primären Antikörpern (Tab. 3 [S. 24]) in Blockierer erfolgte für 2 h bei RT oder alternativ über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde die Membran 3 x 5 min in TBST oder PBST und 1 x 5min in TBS [10 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; pH 7,5] oder PBS [137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄; pH 7,4] gewaschen ehe die Membran mit sekundären Antikörpern in Blockierer für 1 h bei RT inkubiert wurde. Nach der Wiederholung der Waschschrte folgte die Anwendung des Chemilumineszenz-Substrates AceGlow™ (PeqLab/VWR International GmbH) und die Aufnahme der entwickelten Membran an dem Chemilumineszenz-*Imager Fusion Fx7* (PeqLab/VWR International GmbH). Zur Quantifizierungen der detektierten Signale wurden das Bildbearbeitungsprogramm *ImageJ* (<https://imagej.nih.gov/ij/>) verwendet.

Proteinfärbung

In SDS-Gelen aufgetrennte Proteine wurden für 20 min bei RT mit *Coomassie Brilliant Blue* [0,2% (w/v) *Coomassie Brilliant Blue* R250; 0,05% (w/v) *Coomassie Brilliant Blue* G250; 42% (v/v) Ethanol; 5% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure] fixiert und angefärbt. Im Anschluss wurden die Gele mit einer Entfärbelösung [45% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure] mehrmals gewaschen, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abhoben.

Die Färbung von Proteinen, die auf eine PVDF-Membran transferiert wurden, erfolgte durch Inkubation der Membran für 5 min bei RT in *Amido Black* Färbelösung [0,1% (w/v) *Amido Black* 10B;

25% (v/v) Isopropanol; 10% (v/v) Essigsäure]. Die Membran wurde anschließend mehrmals mit deionisiertem H₂O entfärbt.

2.2.7 Proteasom-Inhibierung mit MG132

Arabidopsis-Keimlinge wurden in Flüssigkultur unter Kurztagbedingungen 28 d angezogen. Eine Inhibierung des Proteasoms wurde durch einen Wechsel des Mediums gegen Medium mit 50 µM MG132 (SERVA Electrophoresis GmbH), in DMSO gelöst, erreicht. Als Kontrolle wurde Medium mit einem adäquaten Volumen DMSO eingesetzt. Die Inkubation dauerte 30 h an.

Transient transformierte Protoplasten in Protoplastenkulturmedium [Murashige & Skoog Medium (Duchefa Biochemie B.V); 350 mM Sorbitol; 50 mM Glukose; 3 mM CaCl₂; pH5,8] mit 0,1 mg/ml Ampicillin wurden 17 h nach der Transformation mit DMSO oder mit 50 µM MG132 in DMSO gelöst für 6 h und 12 h inkubiert.

2.2.8 Massenspektrometrische Analysen

Probenvorbereitung

Für einen *in solution* Verdau wurde 100 µg gereinigtes Gesamtprotein verwendet. Die Solubilisierung erfolgte in 233 µl Ammonium-Hydrogencarbonat (25 mM), versetzt mit 0,05% (w/v) RapiGest™ SF (Waters Corporation), für 10 min bei 80 °C. Zur Reduzierung wurden dem Ansatz 6,2 µl DTT-Lösung (10 mM in 25 mM Ammonium-Hydrogencarbonat) zugegeben und für 10 min bei 60 °C inkubiert. Die Alkylierung von Cysteinresten erfolgte nach Zugabe von 6,2 µl Iodacetamid (30 mM in 25 mM Ammonium-Hydrogencarbonat) für 30 min im Dunkeln. Anschließend wurde dem Ansatz 1 µg Trypsin (*Sequencing Grade Modified* Trypsin V5113, Promega) hinzugefügt. Der Proteinverdau fand über Nacht bei RT statt und wurde durch den Abfall des pH unter 2,0 nach Zusatz von 37%iger HCl gestoppt. Unlösliche Bestandteile wurden bei 13000 x g und 4 °C für 30 min sedimentiert und der Überstand für massenspektrometrische Untersuchungen verwendet.

Für einen *in gel* Verdau wurden aus einem Coomassie-gefärbten SDS-Gel zunächst schmale Gelstücke auf Höhe des Proteins von Interesse ausgeschnitten. Wie von Rödiger *et al.* (2014) beschrieben wurden die Proteine in den Gelstücken einem Trypsinverdau und anschließender Extraktion der entstandenen Peptide aus der Gelmatrix unterzogen. Die getrockneten Peptide wurden bei -20 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

Quantitative Proteomanalysen

Für die Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen eines Gesamtextraktes wurden *in solution* verdaute Peptide mit Quantifizierungslösung [2% (v/v) Acetonitril; 0,1% (v/v) Ameisensäure; 20 fmol

Glycogenphosphorylase B aus Kaninchen] 1:1 gemischt. Je 1 µl der Probe wurde einer Separation mittels *liquid chromatography* (*Acquity UPLC System*, Waters) in Kombination mit einer datenunabhängigen Datenerfassung mittels HD-MS^E in einem Synapt G2-S Massenspektrometer (Waters, Eschborn) unterzogen (Helm *et al.*, 2014). Die Peptide wurden in einem linearen Gradienten (7-35% Laufmittel B [0,1% (v/v) Ameisensäure in Acetonitril (Carl Roth GmbH + Co. KG)] in Laufmittel A [0,1% (v/v) Ameisensäure in H₂O (Carl Roth GmbH + Co. KG)]) innerhalb von 120 min separiert. Für die Datenanalyse wurde *ProteinLynx Global Server* (PLGS 3.0, Waters) verwendet. Dabei erfolgte ein Abgleich mit Proteinsequenzen der *A. thaliana*-Datenbank TAIR10 (<ftp://ftp.arabidopsis.org>), erweitert um typische Laborkontaminationen (<ftp://ftp.thegpm.org/fasta/cRAP/crap.fasta>). Als Modifikationen wurde eine technisch bedingte Carbamido-Methylierung an Cysteinen als statische und Methionin-Oxidation sowie N-terminale Acetylierung als variable Modifikationen einbezogen. Während der Zuordnung wurde eine einmalige *missed cleavage* toleriert. Die Quantifizierung der Proteine wurde basierend auf der Intensität der drei abundantesten proteolytischen Peptide eines Proteins vorgenommen, wobei als interner Standard die Glycogenphosphorylase B mit 10 fmol/Injektion definiert wurde (Silva *et al.*, 2006). Die Konzentration der Proteine wurde in Bezug auf die Gesamtmenge quantifizierter Proteine pro Injektion in *parts per million* (ppm) berechnet.

Drei biologische Replikate wurden in je drei technischen Replikaten analysiert. Für die statistische Auswertung wurden Proteine, die mit einem PLGS-internen Bewertungsmaßstab (*protein.AutoCurate*) als unzuverlässig (*red*) bewertet wurden, ausgeschlossen. Zusätzlich galt als Kriterium für eine sichere Identifizierung, dass ein Protein in mindestens zwei aus den drei biologischen und drei aus den insgesamt neun technischen Replikaten quantifiziert worden sein musste. Der Signifikanzwert (p-Wert) wurde mittels t-Test bestimmt.

Identifizierung N-terminaler Modifikationen

Zur Ermittlung der N-terminalen Modifikationen an Proteinen wurden *in gel* mit Trypsin verdaute Proteine an Wolfgang Höhenwarter (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (IPB), Halle) übergeben und einer Separation mittels *liquid chromatography* (EASY-column SC001 und EASY-column SC200, Thermo Fisher Scientific Inc.) in Kombination mit einer zielgerichteten Datenerfassung, basierend auf einer *inclusion list*, in einem *LTQ-Orbitrap Velos Pro* Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific Inc.) unterzogen (beschrieben in Grimmer *et al.*, 2014). Die *inclusion list* enthielt Masse/Ladungsverhältnisse (m/z) zu dem jeweiligen in der Probe erwarteten N-terminalen Peptid unter Berücksichtigung der Modifikationen: N-terminale Methionin-Exzision, N-terminale Acetylierung und Methionin-Oxidation (Anhang 3 [S. 135]). Die Rohdaten wurden mit dem Programm *Proteome Discoverer v.1.4 mass analysis environment* (Thermo Fisher Scientific Inc.) unter Verwendung von *Mascot Software v2.4.0* ausgewertet. Die Identifizierung der Peptide erfolgte nach

Abgleich gegen die TAIR10-Datenbank (<ftp://ftp.arabidopsis.org>), erweitert um die Proteinsequenzen der in der Probe erwarteten Fusionsproteine (Anhang 1 [S. 129]) unter Berücksichtigung der Carbamido-Methylierung an Cysteinen, als statische Modifikation, und Methionin-Oxidation sowie N-terminaler Acetylierung, als variable Modifikationen.

2.2.9 Importanalysen in *Arabidopsis thaliana*

Importanalysen in Protoplasten

Nach 32 d Anzucht auf ½ MS-Medium mit 3% (w/v) Saccharose unter Kurztagbedingungen wurde der oberirdische Teil der *A. thaliana* Keimlinge bei Beginn der Lichtperiode in eine Petrischale mit etwa 10 ml vorgelegter Enzymlösung-PR ohne Enzym [400 mM Sorbitol; 5 mM MES; 8 mM CaCl₂; pH 5,6] geerntet. Das Material wurde mit einem Skalpell grob zerschnitten und die Enzymlösung-PR ohne Enzym durch Enzymlösung-PR mit 1,5% (w/v) Cellulase Onozuka R-10 (SERVA Electrophoresis GmbH) und 0,375% (w/v) Macerozym R-10 (SERVA Electrophoresis GmbH) ersetzt. Es folgte eine Vakuuminfiltration (2 x 2-5 min). Anschließend wurde das Material für 4 h bei RT in Ruhe im Dunkeln inkubiert.

Die Protoplasten wurden vorsichtig aus dem Gewebe geschüttelt und durch ein Zellsieb (100 µm BD Falcon™) filtriert. Nach vollständiger Gewinnung aller freien Protoplasten durch mehrmaliges Waschen mit Enzymlösung ohne Enzym und Ausschütteln, folgte eine Zentrifugation der Protoplasten bei 100 x g für 5 min mit sanfter Beschleunigung und Bremse. Das Protoplastenpellet wurde in 10-15 ml kalter Waschlösung [230,4 mM NaCl; 187,6 mM CaCl₂; 7,5 mM KCl; 7,5 mM Glukose, 2,3 mM MES; pH 5,6] resuspendiert. Die Konzentration der präparierten Protoplasten wurde mit einer *Neubauer* Zellzählkammer ermittelt. Nach erneuter Zentrifugation der Protoplastenlösung bei 100 x g für 5 min wurde die Protoplastenzahl auf 2 x 10⁶ Protoplasten/ml mit einem entsprechenden Volumen Waschlösung eingestellt. Die Protoplastenlösung wurde für 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Sedimentation der Protoplasten durch Zentrifugation bei 100 x g für 5 min. Das Pellet wurde in Sorbitol/Mg-Lösung [0,4 M Sorbitol; 15 mM MgCl₂, 5 mM MES; pH 5,6] aufgenommen, wobei die Konzentration von 2 x 10⁶ Protoplasten/ml beibehalten wurde.

100 µl der Protoplastenlösung wurde mit 10 µg Plasmid-DNA (Tab. 4 [S. 25]) versetzt. Der Ansatz wurde mit 110 µl PEG-Lösung [60% (w/v) PEG4000 (Fluka® Analytical); 0,3 M Sorbitol; 0,15 M Ca(NO₃)₂] gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Der Transformationsansatz wurde zunächst mit 500 µl Waschlösung und weiter mit 1 ml Waschlösung verdünnt. Es folgte eine Zentrifugation bei 100 x g für 5 min. Das Protoplastenpellet wurde in 1 ml Protoplastenkulturmedium [Murashige &

Skoog Medium (Duchefa Biochemie B.V); 350 mM Sorbitol; 50 mM Glukose; 3 mM CaCl₂; pH 5,8] mit 0,1 mg/ml Ampicillin resuspendiert und erneut bei 100 x g für 5 min sedimentiert. Die transformierten Protoplasten wurden in 500 ml Protoplastenkulturmedium im Dunkeln ruhend belassen. Etwa 24 h nach der Transformation wurden die Proben bei 100 x g für 5 min zentrifugiert, das Protoplastenkulturmedium abgenommen. Protoplastenpellets wurden anschließend in SDS-Probenpuffer [50 mM Tris/HCl pH 6,8; 2% (w/v) SDS; 10% (v/v) Glycerol; 0,1 M DTT; 0,04% (w/v) Bromphenolblau] aufgenommen.

Importanalysen in isolierten Chloroplasten

Die Extraktion von intakten Chloroplasten aus 5 g Frischgewicht von 28 d auf ½ MS-Medium mit 3% (w/v) Saccharose unter Kurztagbedingungen angezogenem WT und der *in vitro* Import wurden wie von Agne *et al.* (2009) beschrieben durchgeführt. Chloroplasten, die einer Chlorophyll-Konzentration von 40 µg entsprechen, wurden in einem 100 µl-Ansatz [HS-Puffer [330 mM Sorbitol; 50 mM HEPES; pH 8,0] mit 1x Importpuffer [40 mM KOAc; 2 mM Mg(OAc)₂; 25 mM DTT, 330 M Sorbitol; 50 mM HEPES (pH 7,5)]; 5 mM ATP; 10 mM L-Methionin] mit 5 µl S³⁵-Met-markiertem *in vitro*-Translat (*TNT[®] Quick Coupled Transcription/Translation System*, Promega) für 15 min bei RT inkubiert. Nach Stoppen des Imports auf Eis und durch Zugabe von 900 µl kaltem HS-Puffer [330 mM Sorbitol; 50 mM HEPES; pH 8,0] wurde ein Teil der Proben mit 50 µg/ml Thermolysin (in HS-Puffer) versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Der Verdau wurde durch Zugabe von 1 ml HS-Puffer mit EDTA (5 mM) beendet. Chloroplastenpellets wurden anschließend in SDS-Probenpuffer [50 mM Tris/HCl pH 6,8; 2% (w/v) SDS; 10% (v/v) Glycerol; 0,1 M DTT; 0,04% (w/v) Bromphenolblau] aufgenommen.

2.2.10 Mikroskopie

Fluoreszenzmikroskopie

Die Qualität der Präparation und der Erfolg der transienten Transformation von *A. thaliana* Protoplasten wurden mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop des Typs Axiovert 200 (Carl Zeiss Microscopy) kontrolliert. Zur Visualisierung der eGFP-Fluoreszenz wurde der Filtersatz 09 (Carl Zeiss Microscopy) verwendet.

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) wurde mit einem konfokalen Mikroskop des Typs LSM 510 Meta (Carl Zeiss Microscopy) mit transient transformierten Protoplasten frühestens 20 h nach der Transformation durchgeführt. Es wurde ein Argon-Laser (458 nm, 488 nm, 514 nm) verwendet und zur Anregung von eGFP und Chlorophyll auf 488 nm eingestellt. Zwei Strahlenteiler wurden eingesetzt: HFT 405/488 und NFT 545. Zur Trennung der eGFP- von der Chlorophyll-Fluoreszenz wurden im *channel mode* ein Bandpassfilter BP 505-530 und ein Langpassfilter LP 615

verwendet. Die Protoplasten wurden mit einem Objektiv des Typs *Plan-Apochromat 63x/1.40oil* aufgenommen. Für die Bearbeitung der Aufnahmen wurde das Programm *LSM Image Browser* (Carl Zeiss Microscopy) genutzt. Alternativ wurde ein konfokales Mikroskop des Typs LSM 780 (Carl Zeiss Microscopy) mit einem *alpha Plan-Apochromat 100x/1.46oil*-Objektiv verwendet. Zur Trennung der eGFP- von der Chlorophyll-Fluoreszenz wurden im *channel mode* die Wellenlängen von 647-721 nm für Chlorophyll und 496-598 nm für eGFP detektiert. Für die Bearbeitung der Aufnahmen wurde das Programm *ZEN blue 2.5 lite* (Carl Zeiss Microscopy) genutzt. Als Immersionsöl wurde Immersol™ 518 F (Carl Zeiss Microscopy) verwendet.

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Vorbereitung der Proben und die Aufnahmen am Elektronenmikroskop wurden von Gerd Hause (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt. Die Folgeblätter von 28 d alten, im Kurztag auf ½ MS-Medium mit 3% Saccharose gewachsenen Keimlingen wurden in Epoxidharz eingebettet und Plastiden der Mesophyllzellen in Ultradünnschnitten (80 nm) mit einem Transmissionselektronenmikroskop LIBRA 120 (Carl Zeiss Microscopy) dokumentiert. Von je 51 Plastiden, in denen mindestens drei Thylakoide nach dem Schnitt in einer fokussierbaren Ebene lagen, wurden die Schichten der drei höchsten Granastapel pro Plastid gezählt. Insgesamt wurde aus drei Querschnitten die Anzahl der Thylakoidschichten von 153 Plastiden bestimmt. Zur Aufarbeitung der Bilder wurde das Programm *AxioVision 4.8.2* (Carl Zeiss Microscopy) verwendet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Plastidäre Vorläuferproteine sind typische NatA-Substrate

Die N-terminale Aminosäuresequenz eines Proteins ist für N-terminale Modifikationen mitbestimmend. Für die co-translationale Abspaltung des initialen Methionins durch Methionin-Amino-peptidasen (MAPs) und die N-terminale Acetylierung (N-Ac) durch N-Acetyltransferasen (NATs) stellt die zweite Aminosäure einer Proteinsequenz eine Schlüsselposition dar (Sherman *et al.*, 1985; Polevoda und Sherman, 2003; Silva und Martinho, 2015). Eine Datenbank-gestützte Analyse der kernkodierten Proteine aus *A. thaliana* (27168 Proteine, TAIR10-Datenbank, <ftp://ftp.arabidopsis.org>) zeigte zunächst, dass jede der 20 proteinogenen Aminosäuren an dieser Position vorkommen kann (Abb. 3A). Die Aminosäure Alanin kommt in 22% der cytosolisch synthetisierten Proteine an zweiter Position vor und wird somit deutlich präferiert. Die zweithäufigste Aminosäure an Position 2 ist Serin, die nur in 11% der Proteine dem initialen Methionin folgt. Gleichzeitig ist Serin nach Leucin die am häufigsten in der Gesamtheit der kernkodierten Proteinsequenzen vertretene Aminosäure (Abb. 3B). Alanin kommt in der Gesamtheit der Proteinsequenzen ähnlich häufig wie Glutamat, Valin, Glycin und Lysin vor, die allerdings weitaus seltener an Position 2 vertreten sind. Somit ist die hohe Abundanz von Alanin als zweite Aminosäure nicht allein mit der Häufigkeit, mit der die Aminosäure in Proteinen vorkommt, zu begründen, sondern sie wird gegenüber anderen Aminosäuren an der zweiten Position in cytosolisch synthetisierten Proteinen eindeutig bevorzugt.

Unter den 27168 in die Analyse einbezogenen Proteinen sind 2103 cytosolisch, 672 mitochondrial und 1959 plastidär lokalisierte Proteine. Die Häufigkeit, mit der einzelne Aminosäuren in Sequenzen der kernkodierten Proteine vorkommen, ist im Vergleich der verschiedenen Kompartimente, für die meisten Aminosäuren recht ähnlich (Abb. 3B). Alanin ist in Proteinsequenzen mitochondrial und plastidär lokalisierter Proteine etwas häufiger als in cytosolische lokalisierten Proteinen vertreten. Das leicht erhöhte Vorkommen von Alanin in Sequenzen mitochondrial oder plastidär lokalisierter Proteine kann allerdings nicht allein begründen, dass Alanin bei 27% der cytosolisch lokalisierten Proteine, jedoch bei 32% der mitochondrialen und sogar bei 45% der plastidären Proteine an Position 2 auftritt (Abb. 3A). Im Vergleich zu cytosolischen Proteinen treten die Aminosäuren Glycin, Serin, Valin, Aspartat und Glutamat hingegen seltener in plastidär lokalisierten Proteinen an zweiter Position auf. Aminosäuren, wie zum Beispiel Phenylalanin, Leucin, Isoleucin und Arginin, die keine N-terminale Methionin-Exzision (NME) zulassen, sind eher in mitochondrialen Proteinen, als in cytosolischen oder plastidären Proteinen an Position 2 zu finden.

ERGEBNISSE

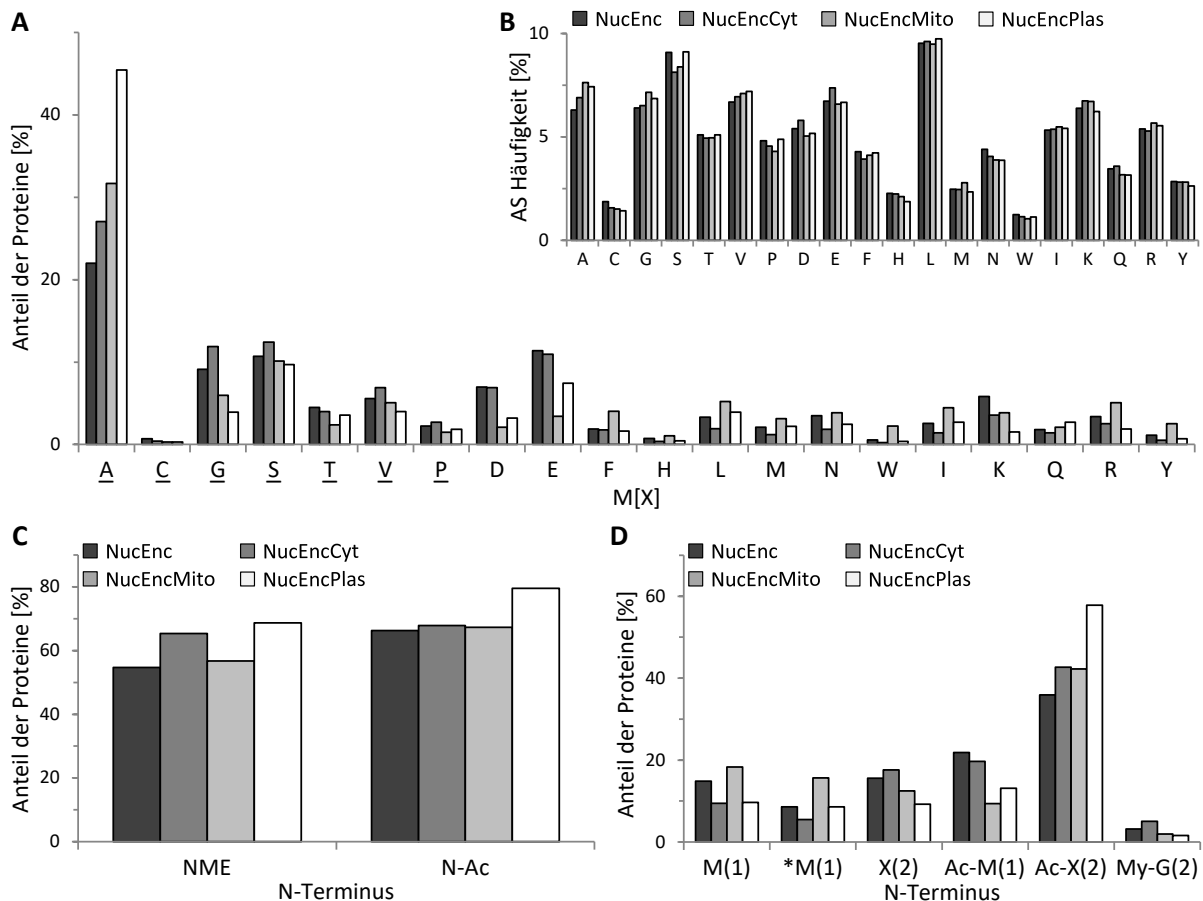


Abb. 3: In silico Analyse der N-Termini kernkodierter Proteine

Die Liste der analysierten Proteinsequenzen umfasst 27168 kernkodierte *A. thaliana* Proteine (NucEnc) aus der TAIR10-Datenbank, die mit Methionin starten. Von diesen Proteinen sind 2103 im Cytosol (NucEncCyt), 672 in Mitochondrien (NucEncMito) und 1959 in Plastiden (NucEncPlas) annotiert (SUBA3 MS). **(A)** Übersicht zum prozentualen Anteil einzelner Aminosäuren an zweiter Position M[X] an der Gesamtheit der analysierten Proteine. Unterstrichene Aminosäuren lassen NME zu. **(B)** Häufigkeit, mit der einzelne Aminosäuren (AS) in Sequenzen kernkodierter Proteine vorkommen. **(C)-(D)** Für Vorhersagen zu Modifikationen von N-Termini wurde das Web-Tool *terminator3* genutzt (Martinez *et al.*, 2008). In **(C)** sind die Anteile der Proteine gezeigt, die N-terminaler Methionin Exzision (NME) oder N-terminaler Acetylierung (N-Ac) unterliegen. In **(D)** ist die prozentuale Verteilung der vorhergesagten N-Termini dargestellt. M(1) – nicht-modifiziertes initiales Methionin; *M(1) – initiales Methionin kann partiell acetyliert sein (NatC-Substrat); X(2) – NME ohne Modifikation der zweiten Aminosäure; Ac-M(1) – N-Ac des initialen Methionins (NatB-Substrat); Ac-X(2) – NME und N-Ac der zweiten Aminosäure (NatA-Substrat); My-G(2) – NME und Myristoylierung am Glycin an Position 2

Zur Vorhersage N-terminaler Modifikationen wurde das Programm *terminator3* (Frottin *et al.*, 2006; Martinez *et al.*, 2008); <https://bioweb.i2bc.paris-saclay.fr/terminator3/>) genutzt. Basierend auf den Enzymspezifitäten (Meinzel *et al.*, 2005) und experimentell generierten MS-Daten von Tieren, Pilzen, Pflanzen und Archae wurde der Algorithmus zu Vorhersagen von NME, N-Ac, N-Myristoylierung und S-Palmitoylierung auf Grundlage der ersten 20 Aminosäuren eines Proteins erstellt (Martinez *et al.*, 2008). Die Analyse der kernkodierten Proteine mit *terminator3* zeigte, dass bei 55% aller betrachteten kernkodierten Proteine eine Abspaltung des Methionins am N-Terminus vorhergesagt

wird (Abb. 3C). Eine NME ist für 57% der mitochondrialen Proteine vorhergesagt. Bei cytosolischen oder plastidären Proteinen ist für 65% bzw. 69% der Proteinsequenzen eine NME vorhergesagt. Demnach bleibt bei mitochondrialen Proteinen das initiale Methionin häufiger erhalten. Ein verbleibendes Methionin kann nicht-acetyliert vorliegen oder durch NME-unabhängige NATs (NatB oder NatC) N-terminal acetyliert werden (Abb. 3D). Nach einer NME kann die frei werdende Aminosäure ebenfalls unmodifiziert vorliegen, durch die NME-abhängige NatA N-terminal acetyliert oder, im Falle eines Glycins an Aminosäureposition 2, myristoyliert werden. Im Vergleich zu cytosolischen und mitochondrial lokalisierten Proteinen ist der hohe Anteil an vorhergesagter NME-abhängiger N-Ac der plastidären Proteine durch NatA sehr auffällig. Die Acetylierung an der zweiten Aminosäure wird für 58% der im Cytosol synthetisierten plastidären Proteine vorhergesagt.

3.2 Anreicherung von plastidären Vorläuferproteinen in transient transformierten Protoplasten

Eine Western-Blot-Analyse mit Gesamtprotein von WT und der *plastid protein import mutant 2 (ppi2)* zeigte die reduzierte Abundanz reifer, plastidärer Proteine, wie OEC33 und Lhcb4 in *ppi2* (Abb. 4). Die geringe Abundanz der Proteine kann auf einen posttranslationalen Effekt, beispielsweise durch die Beeinträchtigung des Imports, oder eine Verminderung der Transkriptionsrate entsprechender Proteine zurückgehen (Bischof *et al.*, 2011). Im Gegenteil dazu konnten die beiden Homologe des Ribonukleoproteins 29 Rnp29A und Rnp29B in WT und *ppi2* gleichermaßen abundant nachgewiesen werden (Abb. 4). Beide Rnp29-Homologe besitzen ein spaltbares Transitpeptid (Wang *et al.*, 2006). Dennoch konnte das acetylierte N-terminale Peptid des Rnp29B-Vorläuferproteins in *ppi2* mittels MS identifiziert werden (Bischof *et al.*, 2011). Die Abundanz solcher Vorläuferproteine ist jedoch selbst bei Beeinträchtigung der Importmaschinerie nur sehr gering und mit der Western-Blot-Analyse ließen sich Vorläuferproteine nicht *in planta* nachweisen (Abb. 4).

Für Analysen der Regulation plastidärer Vorläuferproteine im Cytosol und der Bedeutung N-terminaler Modifikationen sollte die Abundanz von Vorläuferproteinen gesteigert werden. Die transiente Expression von Vorläuferproteinen in *ppi2*-Protoplasten, unter der Kontrolle eines konstitutiven 35S Promoters, eröffnet die Möglichkeit plastidäre Vorläuferproteine zu akkumulieren und sie mittels Western-Blot-Analyse zu identifizieren (Lee *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2008). Die akkumulierenden Vorläuferproteine können mittels MS-Analyse auf Modifikationen untersucht werden. Die Fusion verkürzter plastidärer Proteinsequenzen, die mindestens das Transitpeptid beinhalten, mit dem Reporterprotein *enhanced green fluorescent protein* aus *Aequorea victoria* (eGFP) erlaubt außerdem die Beobachtung von Importprozessen in transient transformierten Protoplasten mittels Fluoreszenz-Mikroskopie.

ERGEBNISSE

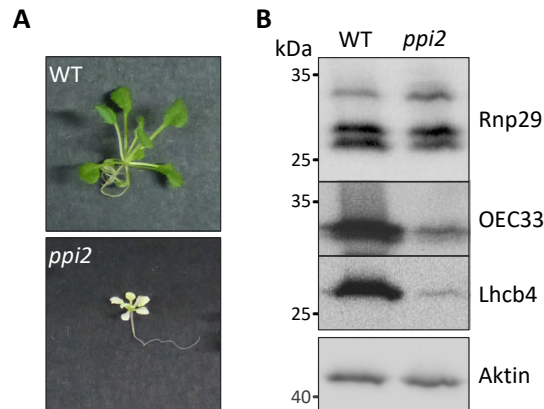


Abb. 4: Die *plastid protein import mutant 2 (ppi2)*

(A) 28 d unter Kurztagbedingungen auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium mit Zusatz von 3% Saccharose angezogene WT- und *ppi2*-Pflanzen. (B) Abundanz von Rnp29A (AT3G53460, ~33 kDa) und Rnp29B (AT2G37220, ~29 kDa), OEC33 (AT5G66570) und Lhcb4.1 (AT5G01530) in 28 d alten WT- und *ppi2*-Keimlingen. 150 μ g Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit dem Western-Blot-Verfahren nachgewiesen. Aktin ist als Ladekontrolle gezeigt.

3.2.1 Expression chimärer eGFP-Substrate in *ppi2*-Protoplasten

Für Analysen des Imports in Protoplasten wurden verschiedene eGFP-Substrate mit einer Größe von etwa 40 kDa verwendet (Abb. 5). Die Aminosäuresequenz der ersten 100 Aminosäuren ausgewählter plastidärer Proteine beinhaltet das Transitpeptid, das den Import des Fusionsproteins in Plastiden vermittelt. Darüber hinaus enthielt sie Teile des reifen Proteins, die Einfluss auf den Import oder die Prozessierung nehmen könnten (Shen *et al.*, 2017). Die Proteinsequenzen der ausgewählten Substrate E1 α ₁₋₁₀₀:eGFP, Fd2₁₋₁₀₀:eGFP, Lhcb4₁₋₁₀₀:eGFP, RbcS₁₋₁₀₀:eGFP und Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP beginnen mit einem initialen Methionin gefolgt von einem Alanin. Die von *terminator3* vorhergesagten N-Termini für die Substrate umfassen eine NME-abhängige Acetylierung des Alanins, was für Rnp29 und Fd2 mit MS-Daten belegt werden konnte (Bischof *et al.*, 2011). Damit unterliegen alle gewählten Substrate wahrscheinlich, wie für die Mehrheit plastidärer Vorläuferproteine vorhergesagt, im Cytosol einer co-translationalen Acetylierung durch eine NatA. Zur Kontrolle des experimentellen Ansatzes wurden eGFP ohne Transitpeptid und das Konstrukt FNR₁₋₅₅:eGFP, bei dem das Transitpeptid des Spinat FNR mit eGFP fusioniert ist, eingesetzt.

ERGEBNISSE

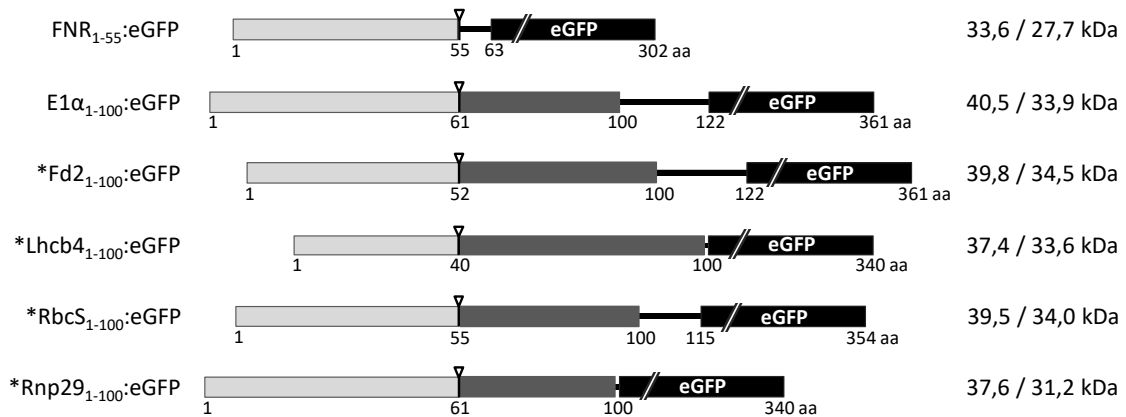


Abb. 5: Schematische Darstellung der verwendeten eGFP-Fusionsproteine

Die N-terminalen 55 Aminosäuren der Ferredoxin-NADP-Reduktase FNR aus Spinat bzw. die N-terminalen 100 Aminosäuren der plastidären Proteine Pyruvat-Dehydrogenase Untereinheit E1 α (AT1G01090), Ferredoxin Fd2 (AT1G60950), Lhcb4.1 (AT5G01530), Ribonukleoprotein Rnp29B (AT2G37220) und der kleinen RuBisCO Untereinheit RbcS1B (AT5G38430) aus *A. thaliana* sind mit eGFP über einen 1-22 Aminosäuren langen *Linker* fusioniert. In UniProt (<http://www.uniprot.org/>) vermerkte Prozessierungsstellen für die Transitpeptide sind mit einem Pfeil markiert und die entsprechende Aminosäureposition angegeben. Die theoretischen Größen (kDa) der Vorläufer-/prozessierten Proteine wurden mit einem Kalkulationsprogramm (http://web.expasy.org/compute_pi/) bestimmt. Mit * versehene Konstrukte sind potentielle Toc159-Substrate.

Mittels *Confocal laser scanning microscopy* (CLSM) konnte beobachtet werden, dass sowohl in transient transformierten WT- als auch *ppi2*-Protoplasten das heterolog exprimierte eGFP ohne Transitpeptid im Cytoplasma und teilweise im Kern lokalisiert ist (Abb. 6). Die Fusion eines Transitpeptids an eGFP vermittelte den Transport der verwendeten Konstrukte in Plastiden von WT-Protoplasten (Abb. 6; Anhang 2 [S. 134]). Die Fluoreszenz von FNR₁₋₅₅:eGFP korrelierte mit der Position der Chloroplasten, wobei die eGFP-Fluoreszenz vorrangig im Stroma auftrat. Die Fluoreszenz von Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP sowie E1 α ₁₋₁₀₀:eGFP und Lhcb4₁₋₁₀₀:eGFP waren, ähnlich wie FNR₁₋₅₅:eGFP, hauptsächlich im plastidären Stroma zu verzeichnen, wo die Fusionsproteine gleichmäßig verteilt vorlagen. In Fd2₁₋₁₀₀:eGFP oder RbcS₁₋₁₀₀:eGFP exprimierenden Protoplasten konnten zusätzlich zur Fluoreszenz im Stroma Aggregate beobachtet werden, die sich in hell fluoreszierenden Flecken in oder an den Plastiden äußerten. eGFP allein aggregierte nach der Prozessierung nicht in Plastiden, wie die CLSM-Bilder von FNR₁₋₅₅:eGFP exprimierenden Protoplasten zeigten, sodass vermutlich die nach der Prozessierung am eGFP verbleibenden C-terminalen Bereiche des nativen Fd2 und RbcS für die Aggregation verantwortlich sind. Ob die Aggregationen außerhalb der Plastiden, an der Hüllmembran, oder nach der Prozessierung in Chloroplasten stattfinden, kann aus den CLSM-Aufnahmen nicht geschlossen werden.

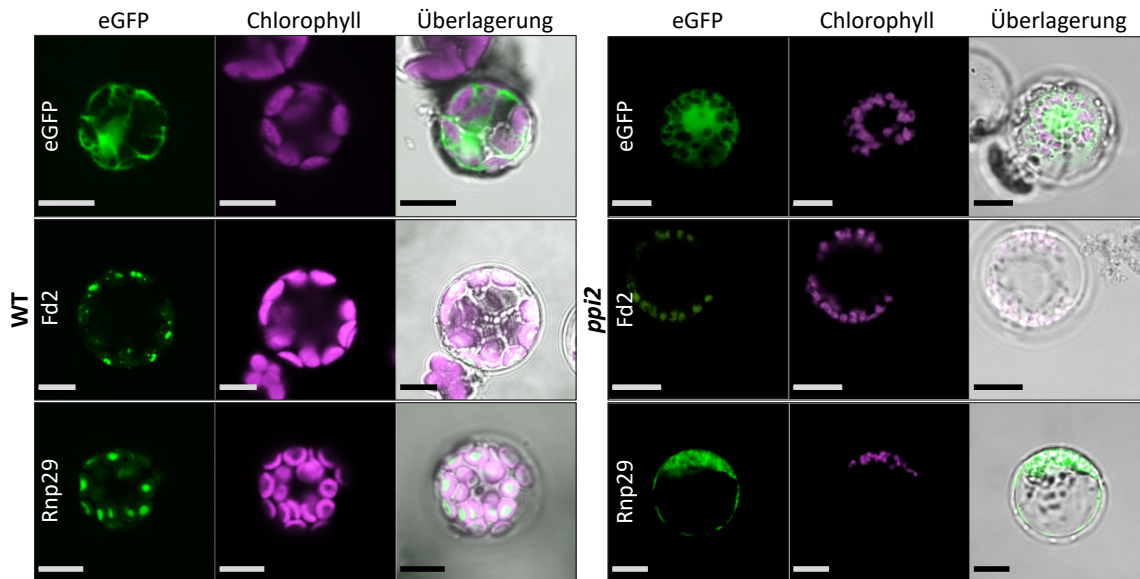


Abb. 6: Confocal laser scanning microscopy (CLSM) mit transient transformierten Protoplasten

CLSM-Aufnahmen (LSM 510 Meta) mit eGFP, Fd₂₁₋₁₀₀:eGFP oder Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP transformierten WT- und *ppi2*-Protoplasten. Gezeigt sind die eGFP-Fluoreszenz, die Chlorophyll-Fluoreszenz und eine Überlagerung beider Fluoreszenz-Signale mit einer Hellfeld-Aufnahme. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 µm.

In einzelnen mit eGFP-Fusionsproteinen transformierten WT-Protoplasten konnte neben der dominierenden in Plastiden lokalisierten eGFP-Fluoreszenz auch eine eGFP-Fluoreszenz außerhalb der Plastiden, im Cytosol, beobachtet werden. Diese Beobachtung weist auf den Verbleib von gefalteten Fusionsproteinen im Cytosol hin. GFP kann ohne die Hilfe von Chaperonen *in vitro* zu funktionellem GFP falten (Reid und Flynn, 1997). Da charakteristischerweise Vorläuferproteine nur wenig Sekundärstrukturen ausbilden und im ungefalteten Zustand transportiert werden (Pilon *et al.*, 1992), verhindert die spontane Faltung des Reporters den Import der Substrate. In diesem Zusammenhang könnten die Fusionsproteine, bedingt durch die konstitutive Expression, in WT-Protoplasten als Vorläufer im Cytosol verbleiben.

Die Plastiden von *ppi2* waren in CLSM-Aufnahmen auf Grund ihrer geringen Größe und ihrer schwachen Chlorophyll-Fluoreszenz nur schwer zu erkennen (Abb. 6). Dementsprechend war eine genaue intrazelluläre Lokalisierung der eGFP-Konstrukte kaum möglich. Allerdings unterschieden sich mit eGFP allein transformierte *ppi2*-Protoplasten deutlich von Protoplasten, die mit Transitpeptid:eGFP-Konstrukten transformiert waren (Abb. 6; Anhang 2 [S. 134]). Die Fluoreszenz der eGFP-Fusionsproteine umfasste nicht das gesamte Cytosol, wie es für eGFP allein beobachtet wurde, sondern schien verdichtet an Stellen, an denen man Plastiden vermuten könnte. Ein erfolgreicher Import der Fusionsproteine in *ppi2*-Protoplasten konnte nur auf Grundlage der CLSM-Aufnahmen jedoch nicht beurteilt werden. Um den Anteil an Vorläuferproteinen und reifen

ERGEBNISSE

Proteinen in WT- und *ppi2*-Protoplasten zu bestimmen, wurde eine Western-Blot-Analyse angewendet. Durch Prozessierung des Vorläufers in Plastiden verändert sich die Größe des Konstruktes, sodass Vorläufer- und reifes Protein anhand ihres Molekulargewichts unterschieden werden können (Abb. 7).

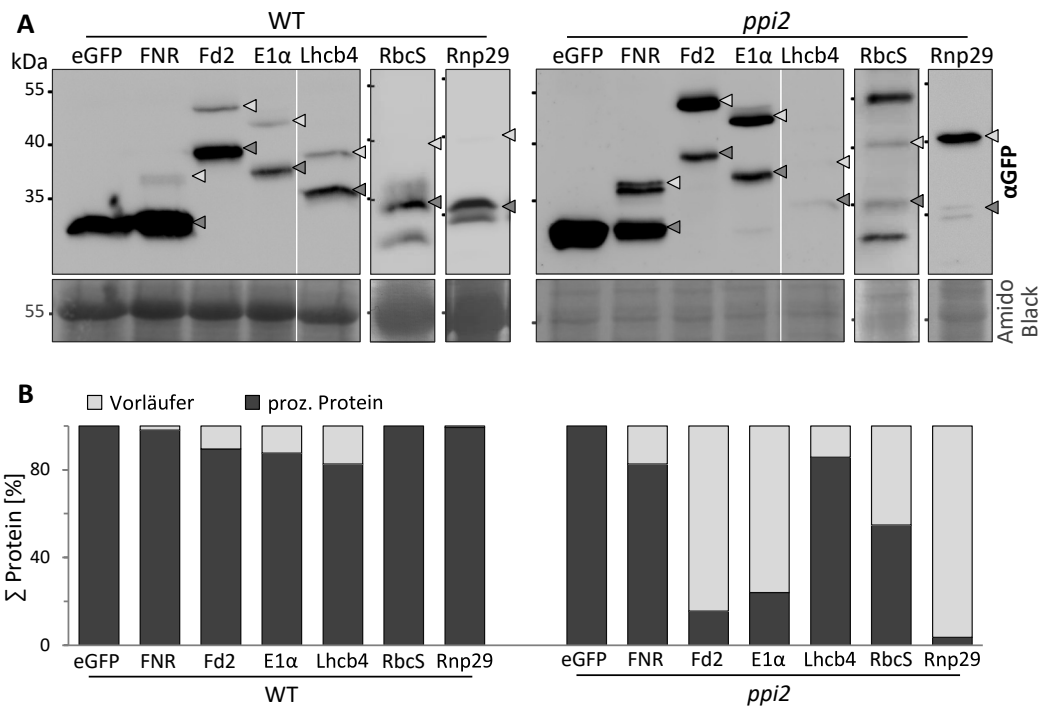


Abb. 7: Nachweis von eGFP-Fusionsproteinen mittels Western-Blot-Analyse

(A) Nachweis des eGFP bzw. der eGFP-Fusionsproteine in transient transformierten WT- und *ppi2*-Protoplasten mittels einer Western-Blot-Analyse mit α GFP-Antikörpern. Pfeile markieren die Position von Vorläuferproteinen (helle Pfeile) und prozessierten Proteinen (dunkle Pfeile), ein Teil der Membran mit *Amido Black* gefärbten Proteinen ist als Ladekontrolle gezeigt. (B) Darstellung der Anteile Vorläuferproteins und prozessierten Proteins (proz. Protein) an der Gesamtheit transient exprimierten Proteins auf Grundlage einer Quantifizierung der in (A) mit *ImageJ* detektierten Signale.

Mit eGFP-spezifischen Antikörpern, konnte für heterolog exprimiertes FNR₁₋₅₅:eGFP im WT der Nachweis sowohl für die unprozessierte Proteinform bei ~36 kDa als auch die dominierende, prozessierte Form bei ~27 kDa erfolgen. Die intensiven Signale auf Höhe des prozessierten Proteins im WT zeigten, dass FNR₁₋₅₅:eGFP im Vergleich mit anderen chimären Konstrukten besonders stabil exprimiert und effektiv importiert wurde. Fd2₁₋₁₀₀:eGFP, E1 α ₁₋₁₀₀:eGFP, Lhcb4₁₋₁₀₀:eGFP, RbcS₁₋₁₀₀:eGFP und Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP waren im WT ebenfalls hauptsächlich in prozessierter Form nachweisbar. Abgesehen von RbcS₁₋₁₀₀:eGFP kamen die Substrate zu einem geringen Teil auch als unprozessierte Proteine in WT-Protoplasten vor, was mit den Beobachtungen der Fluoreszenz-Mikroskopie korrelierte. Nach Transformation der WT-Protoplasten mit RbcS₁₋₁₀₀:eGFP tauchte neben dem Signal für prozessierte Fusionsproteine ein weiteres Signal etwa auf Höhe des eGFP auf (Abb. 7).

Möglicherweise handelt es sich hierbei um ein Degradationsprodukt, das durch Abbau des RbcS-Anteils des chimären Proteins entsteht.

In *ppi2*-Protoplasten konnten in Western-Blot-Analysen die prozessierten Formen der Konstrukte FNR₁₋₅₅:eGFP, E1 α ₁₋₁₀₀:eGFP, Fd2₁₋₁₀₀:eGFP, Lhcb4₁₋₁₀₀:eGFP, RbcS₁₋₁₀₀:eGFP und Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP nachgewiesen werden, was den erfolgreichen Import dieser Substrate belegt (Abb. 7). Betrachtet man das Verhältnis von nicht-importierter zu importierter Form war der Import von FNR₁₋₅₅:eGFP in der Importmutante effizient, während die Vorläufer von E1 α ₁₋₁₀₀:eGFP und Fd2₁₋₁₀₀:eGFP die klar dominierende Form in transformierten *ppi2*-Protoplasten war. Die Western-Blot-Analysen der Lhcb4₁₋₁₀₀:eGFP exprimierenden Protoplasten zeigte ein im Vergleich zum Vorläufer stärkeres Signal auf Höhe des prozessierten Proteins und ein zum WT vergleichbares Verhältnis der Anteile von Vorläufer zu prozessiertem Protein. Das Signal in *ppi2* war sehr schwach, was auf eine geringe Transformations- oder Expressionsrate hinweisen könnte. Doch die Verschiebung des Verhältnisses von Vorläufer zu prozessiertem Protein zu Gunsten des prozessierten Proteins, beweist entweder eine wenig strikte Toc159-Abhängigkeit des Lhcb4-Imports oder eine geringe Stabilität des Lhcb4₁₋₁₀₀:eGFP-Vorläufers in *ppi2* verglichen mit den anderen analysierten Substraten. RbcS₁₋₁₀₀:eGFP konnte in etwa gleichem Maße in beiden Formen nachgewiesen werden, stärkere Signale wurden jedoch ober- und unterhalb der für das prozessierte und das unprozessierte Protein erwarteten Molekulargewichte detektiert. Das untere Signal wurde auch in WT-Protoplasten nachgewiesen und geht möglicherweise auf ein Abbauprodukt des Fusionsproteins zurück. Das obere Signal wurde nur in *ppi2*-Protoplasten detektiert, die Identität ist ungeklärt. Das Fusionsprotein Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP war in *ppi2* nahezu vollständig als Vorläuferprotein und nicht in prozessierter Form nachweisbar, während der WT fähig war das Konstrukt zu importieren (Abb. 7). Kein anderes der verwendeten Konstrukte zeigte eine so deutlich Verschiebung des Verhältnisses von Vorläufer zu reifem Protein wie Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP. Die Akkumulation des Vorläufers in *ppi2*-Protoplasten deckt sich mit der Identifizierung des Rnp29-Vorläufers in MS-Analysen mit *ppi2*-Keimlingen (Bischof *et al.*, 2011) und bestärkt die Annahme, dass der Vorläufer sehr stabil ist und Toc159-abhängig importiert wird.

3.2.2 Nachweis des Toc159-abhängigen Imports von Rnp29

Alle untersuchten eGFP-Fusionsproteine ließen sich ohne die Anwesenheit von Toc159 zum Teil in Chloroplasten transformierter *ppi2*-Protoplasten importieren. Das Konstrukt Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP wurde allerdings nur in sehr geringem Maß in prozessierter Form nachgewiesen. Um zu untersuchen, ob die geringe Importeffizienz direkt mit dem Verlust von Toc159 korreliert, sollte eine Co-Transformation

ERGEBNISSE

von Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP und Toc159 in *ppi2* Protoplasten stattfinden. Zusätzlich wurde der Toc159-abhängige Import von Fd2₁₋₁₀₀:eGFP geprüft (Abb. 8A).

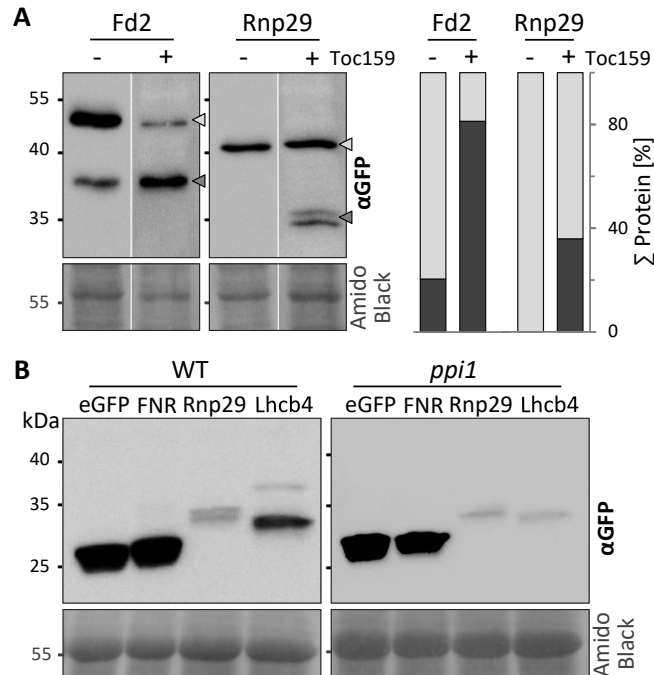


Abb. 8: Nachweis der Toc159-Abhängigkeit des Imports von Rnp29

(A) Western-Blot-Analyse (links) des rekonstituierten Imports der eGFP-Fusionsproteine Fd2₁₋₁₀₀:eGFP und Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP co-transformiert mit Toc159 in *ppi2*-Protoplasten, detektiert mit αGFP-Antikörpern, ein Teil der Membran mit *Amido Black* gefärbten Proteinen ist als Ladekontrolle gezeigt. Und Diagramm (rechts) zur Darstellung prozentualer Anteile des Vorläuferproteins und des prozessierten Proteins (proz. Protein) an der Gesamtheit nachzuweisenden Proteins auf Grundlage einer Quantifizierung der detektierten Signale mit *ImageJ*. (B) Nachweis der eGFP bzw. der eGFP-Fusionsproteine in transformierten WT- und *ppi1*-Protoplasten mittels einer Western-Blot-Analyse mit αGFP-Antikörpern, ein Teil der Membran mit *Amido Black* gefärbten Proteinen ist als Ladekontrolle gezeigt.

In Western-Blot-Analysen zeigte sich eine Verschiebung des Verhältnisses von Vorläufer zu reifem Protein in co-transformierten Protoplasten im Vergleich zu nur mit Fd2₁₋₁₀₀:eGFP transformierten Protoplasten zu Gunsten des prozessierten Proteins. Die Expression von Toc159 in den Toc159-defizienten Mutanten führte demnach zu einer Verbesserung des Imports von Fd2₁₋₁₀₀:eGFP in Plastiden von *ppi2*-Protoplasten, die nahezu die WT-Effizienz erreichte (Vergleich Abb. 8A mit Abb. 7 [S. 48]). Die Regeneration der Importfähigkeit durch die transiente Expression von Toc159 veränderte auch das Verhältnis des Vorläufers zum prozessierten Protein für das Konstrukt Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP. In co-transformierten Protoplasten war deutlich mehr prozessiertes Protein als charakteristische Doppelbande nachweisbar, als in nur mit Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP transformierten Protoplasten. Demnach lässt sich der Import von Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP, analog zu den Ergebnissen mit Fd2₁₋₁₀₀:eGFP, durch die gleichzeitige Expression von Toc159 in *ppi2*-Protoplasten verbessern. Allerdings wurde für Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP nicht die gleiche Effizienz wie im WT erreicht, wo fast ausschließlich Signale der

prozessierten Form zu detektieren waren (Vergleich Abb. 8A mit Abb. 7 [S. 48]). Die Akkumulation des Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP-Vorläufers in *ppi2* wird durch die transiente Expression von *Toc159* reduziert, was ein klarer Hinweis auf die Toc159-Abhängigkeit des Rnp29-Imports ist.

Die Funktion von Toc159 steht im engen Zusammenhang mit Toc33 (Ivanova *et al.*, 2004). Um eine Abhängigkeit des Rnp29-Imports von Toc33 zu untersuchen, wurde der Import von FNR₁₋₅₅:eGFP, Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP und Lhcb4₁₋₁₀₀:eGFP in Chloroplasten von *ppi1*-Protoplasten analysiert (Abb. 8B). Eine Western-Blot-Analyse zeigte, dass die Fusionsproteine maßgeblich in ihrer prozessierten Form und nicht als Vorläufer nachgewiesen werden können, was einen erfolgreichen Import der Proteine in Chloroplasten von *ppi1* impliziert. Die im Vergleich zum WT schwächeren Signale für die Proteine Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP und Lhcb4₁₋₁₀₀:eGFP in *ppi1* könnten auf eine geringere Transformationseffizienz oder eine verminderte Expressionsrate zurückzuführen sein und stehen nicht zwingend im Zusammenhang mit der Importfähigkeit der Mutante. Allerdings ist es offensichtlich, dass Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP in *ppi1*-Protoplasten vorrangig in prozessierter Form nachgewiesen werden konnte, während in *ppi2* der Vorläufer dominierte. Daraus lässt sich ableiten, dass der verminderte Rnp29-Import spezifisch auf den Verlust von Toc159 zurückgeht und für den Rnp29-Import ein funktioneller Importkomplex unabhängig von Toc33 gebildet werden kann.

3.3 Einfluss des N-Terminus auf die Akkumulation von Vorläuferproteinen

Die Beobachtung der Akkumulation stabiler Vorläuferproteine in *ppi2*-Protoplasten, die eGFP-Substrate unter einem 35S-Promoter exprimierten, ermöglicht die Untersuchung N-terminaler Modifikationen an Vorläuferproteinen und deren potentielle Funktion beim plastidären Import und der Proteinstabilität. Die zweite Aminosäureposition einer Proteinsequenz stellt eine Schlüsselposition für die N-terminale Modifikation in Form von NME und N-Ac dar. Bei 45% der kernkodierte Plastidenproteine steht Alanin an Position 2 der Proteinsequenz (Abb. 3 [S. 43]). Das erlaubt eine NME-abhängige N-Ac durch eine NAT des Typs NatA. Die Vermutung liegt nahe, dass ein Austausch der zweiten Aminosäure eine Veränderung der verantwortlichen Enzyme und damit der Modifikationen zur Folge hat. Auf Grundlage dieser Hypothese wurden neben der authentischen eGFP-Proteine weitere Protein-Varianten der Konstrukte Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP und Fd2₁₋₁₀₀:eGFP* generiert, in denen das Alanin an Position 2 gegen Glutamat (Rnp29₁₋₁₀₀A2E:eGFP), Asparagin (Rnp29₁₋₁₀₀A2N:eGFP) oder Prolin (Rnp29₁₋₁₀₀A2P:eGFP, Fd2₁₋₁₀₀A2P:eGFP) ausgetauscht wurde.

* ab dieser Stelle wurden Fd2-Konstrukte mit einer *linker*-Sequenz von 8 Aminosäuren anstatt 22 Aminosäuren eingesetzt

3.3.1 Ein Austausch der zweiten Aminosäure verändert die N-terminale Modifikation von Vorläuferproteinen

Zum Nachweis N-terminaler Modifikationen an den verschiedenen Rnp29- und Fd2-Varianten erfolgte eine transiente Transformation von *ppi2*-Protoplasten, in denen die Fusionsproteine als Vorläufer akkumulierten. Aus einem SDS-Gel wurden Banden, die das jeweilige unprozessierte Protein enthielten, bei etwa 40 kDa ausgeschnitten und die Proteine über einen *in gel* Verdau einer massenspektrometrischen Untersuchung zugänglich gemacht. Bei der gezielten Suche nach den N-terminalen Peptiden der Zielproteine wurde die Abspaltung oder der Verbleib des Methionins, dessen variable Oxidation und eine mögliche N-Ac des initialen Methionins oder der Folgeaminosäure nach NME berücksichtigt und in Form von *inclusion lists* in die Messungen eingebunden (Anhang 3 [S. 135]). Zusätzlich wurden verschiedene Ladungszustände der entsprechenden Peptide einbezogen. Nach Auswertung der MS-Daten konnte in jeder Probe das gesuchte N-terminale Peptid des Fusionsproteins nachgewiesen werden, wobei es ausschließlich mit dem in Tab. 10 aufgeführten N-Terminus identifiziert werden konnte.

Bei den authentischen Varianten Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP und Fd2₁₋₁₀₀:eGFP, mit einem Alanin an Position 2, konnte die NME-abhängige N-Ac bestätigt werden. Glutamat oder Asparagin an der zweiten Position in Rnp29₁₋₁₀₀A2E:eGFP und Rnp29₁₋₁₀₀A2N:eGFP verhinderte die Abspaltung des initialen Methionins und das N-terminale Methionin wurde NME-unabhängig acetyliert. Der Austausch des Alanins gegen Prolin in Rnp29₁₋₁₀₀A2P:eGFP und Fd2₁₋₁₀₀A2P:eGFP führte zu nicht-acetylierten N-Termini nach NME.

Die Zuverlässigkeit der identifizierten Peptide und ihrer Modifikationen zeigte sich an der Zahl der *peptide spectrum matches* (PSMs), einem hohen *ion score* und der Qualität der MS-Spektren (Tab. 10; Anhang 4 [S. 136]; Anhang 5 [S. 137]).

Tab. 10: MS-basierte Identifizierung N-terminaler Modifikationen verschiedener Rnp29- und Fd2-Varianten

Protein	N-terminales Peptid	Modifikation	# PSMs	<i>ion score</i> *
Rnp29	aASASSLALSSFNPK	NME; N-Ac	36	94,11
Rnp29 A2E	mEASASSLALSSFNPK	N-Ac	15	74,46
Rnp29 A2N	mNASASSLALSSFNPK	N-Ac	2	52,12
Rnp29 A2P	PASASSLALSSFNPK	NME	34	109,00
Fd2	aSTALSSAIVGTSFIR	NME; N-Ac	53	108,16
Fd2 A2P	PSTALSSAIVGTSFIR	NME	76	100,84

* von Mascot generierter *ion score*

3.3.2 Prolin an zweiter Position erhöht die Akkumulation von Vorläufern

Radioaktiv markierte RNP29-Vorläufer ließen sich in ihrer authentischen Form, mit Alanin an Position 2, ebenso wie in der A2P-Variante effektiv in isolierte WT-Chloroplasten importieren (Anhang 6 [S. 137]). Im Vergleich zu den RNP29-Vollängenproteinen waren nicht-importierte eGFP-Fusionsproteine resistenter gegenüber einem Protease-Verdau durch Thermolysin. In Protoplasten-basierten Importanalysen wurden die Rnp29-Varianten Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP, Rnp29₁₋₁₀₀A2E:eGFP, Rnp29₁₋₁₀₀A2N:eGFP und Rnp29₁₋₁₀₀A2P:eGFP in WT- und *ppi2*-Protoplasten exprimiert, um N-terminaler Modifikationen an Vorläuferproteinen und ihren Einfluss auf die Proteinstabilität *in vivo* zu untersuchen. In CLSM-Aufnahmen zeigte sich, dass alle Rnp29-Varianten erfolgreich in Plastiden von WT-Protoplasten importiert werden konnten (Abb. 9A). Zusätzlich konnten die eGFP-Konstrukte mittels Western-Blot-Analyse in WT- und *ppi2*-Protoplasten nachgewiesen werden (Abb. 9B). Im WT wurde vorrangig das prozessierte Protein als charakteristische Doppelbande detektiert. Ein sehr schwaches Signal auf Höhe des Vorläufers bei etwa 40 kDa konnte ebenfalls beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war in *ppi2*-Protoplasten keines der Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP-Fusionsproteine als reifes Protein in der Western-Blot-Analyse nachweisbar. Rnp29₁₋₁₀₀A2E:eGFP, Rnp29₁₋₁₀₀A2N:eGFP und Rnp29₁₋₁₀₀A2P:eGFP akkumulierten ebenso wie die authentische Rnp29-Variante als Vorläufer. Unterschiede in der Intensität der Signale zwischen verschiedenen Proben könnten auf abweichende Transformationsraten zurückgehen und weisen nicht direkt auf eine divergente Stabilität oder Importeffizienz hin. Quantifizierungen der Signalstärken des Western-Blots zeigten, dass der Anteil des prozessierten Proteins bei Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP, Rnp29₁₋₁₀₀A2E:eGFP und Rnp29₁₋₁₀₀A2N:eGFP im WT etwa 99% betrug (Abb. 9C). Nur ein sehr geringer Teil von etwa 1% wurde auf Höhe des unprozessierten Proteins bestimmt. Für Rnp29₁₋₁₀₀A2P:eGFP wurden Anteile des reifen Proteins von etwa 96% und des unprozessierten Proteins von etwa 4% ermittelt, die sich geringfügig von den anderen Varianten unterschieden. Der sehr geringe Anteil unprozessierten Proteins im Verhältnis zu reifem Protein aller untersuchten Rnp29-Varianten wies auf einen effektiven Import der Konstrukte oder/und eine schnelle Degradation der Vorläuferproteine in WT-Protoplasten hin. Im Falle der transient exprimierten Rnp29-Konstrukte in WT-Protoplasten erschwerte die geringe Menge der Vorläufer definitive Aussagen zum Verhalten verschiedener Rnp29-Varianten. In *ppi2*-Protoplasten konnten für alle Rnp29-Varianten nur Signale auf Höhe des unprozessierten, nicht aber des prozessierten Proteins quantifiziert werden (Abb. 9C), sodass hier auf Grund der geringen Abundanz der prozessierten Rnp29-Proteine in *ppi2* potentielle Unterschiede der verschiedenen Rnp29-Varianten nicht mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden konnten.

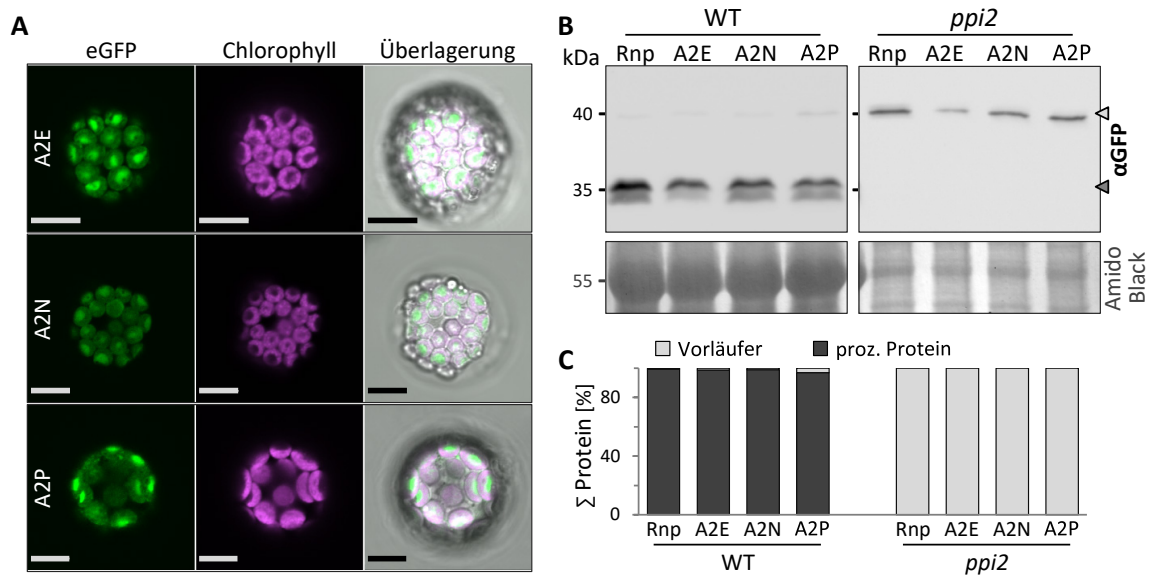


Abb. 9: Import verschiedener Rnp29:eGFP-Varianten in transient transformierten Protoplasten

(A) CLSM-Aufnahmen (LSM 510 Meta) von transient mit Rnp29₁₋₁₀₀A2E:eGFP, Rnp29₁₋₁₀₀A2N:eGFP oder Rnp29₁₋₁₀₀A2P:eGFP transformierten WT-Protoplasten. Gezeigt sind die eGFP-Fluoreszenz, die Chlorophyll-Fluoreszenz und eine Überlagerung beider Fluoreszenz-Signale mit einer Hellfeld-Aufnahme. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 µm.

(B) Nachweis der Rnp29-Varianten in transient transformierten WT- und *ppi2*-Protoplasten mittels einer Western-Blot-Analyse mit αGFP-Antikörpern. Pfeile markieren die Position von Vorläuferproteinen (helle Pfeile) und prozessierten Proteinen (dunkle Pfeile), ein Ausschnitt der Membran mit *Amido Black* gefärbten Proteinen ist als Ladekontrolle gezeigt.

(C) Darstellung der Anteile prozessierten Proteins (proz. Protein) und Vorläuferproteins an der Gesamtheit nachzuweisenden Proteins auf Grundlage einer Quantifizierung der in (B) mit *ImageJ* detektierten Signale.

Das Fd2₁₋₁₀₀:eGFP-Konstrukt konnte in vorangegangenen Versuchen erfolgreich in WT- und auch in *ppi2*-Protoplasten exprimiert und in Plastiden importiert werden, wobei sowohl die unprozessierte als auch die prozessierte Form in beiden Linien per Western-Blot-Analyse gut nachweisbar waren. CLSM-Aufnahmen zeigten, dass Fd2₁₋₁₀₀A2P:eGFP ebenso wie Fd2₁₋₁₀₀:eGFP erfolgreich in Plastiden von WT-Protoplasten importiert werden konnte (Abb. 10A). Dementsprechend wurden beide Fd2-Varianten in Western-Blot-Analysen überwiegend als reifes Protein detektiert (Abb. 10B). In *ppi2* akkumulierten die Varianten im Vergleich zum WT stärker als Vorläufer. In WT und auch in *ppi2* war jedoch der Anteil unprozessierten Proteins an der Gesamtheit nachzuweisenden Proteins höher bei Fd2₁₋₁₀₀A2P:eGFP als bei Fd2₁₋₁₀₀:eGFP (Abb. 10C). In WT- und in *ppi2*-Protoplasten konnte somit eine erhöhte Abundanz von Vorläuferprotein in Relation zur prozessierten Form durch den Austausch des Alanins an Position 2 gegen ein Prolin verzeichnet werden.

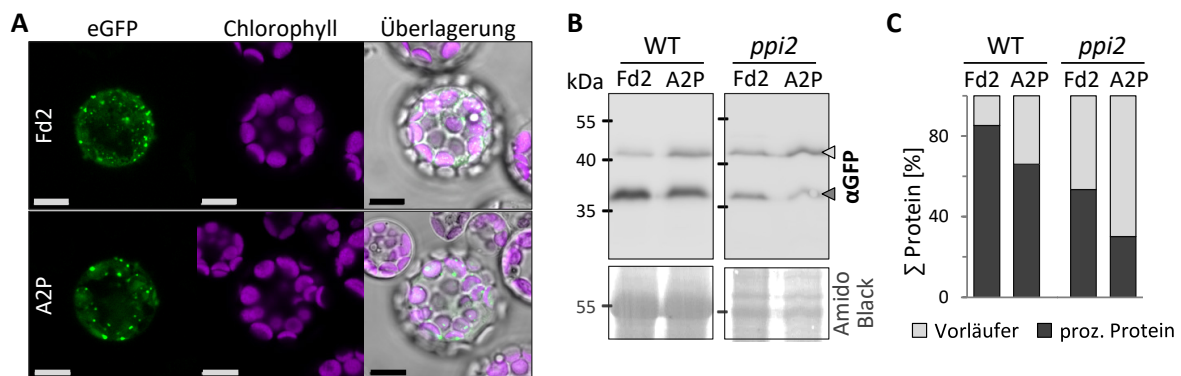


Abb. 10 Analyse von Fd₂₁₋₁₀₀:eGFP und Fd₂₁₋₁₀₀A2P:eGFP in Protoplasten

(A) CLSM-Aufnahmen (LSM 780) von transient mit Fd₂₁₋₁₀₀:eGFP oder Fd₂₁₋₁₀₀A2P:eGFP transformierten WT-Protoplasten. Gezeigt sind die eGFP-Fluoreszenz, die Chlorophyll-Fluoreszenz und eine Überlagerung beider Fluoreszenz-Signale mit einer Hellfeld-Aufnahme. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 µm. (B) Nachweis des in transient transformierten WT- und *ppi2*-Protoplasten heterolog exprimierten Fd₂₁₋₁₀₀:eGFP und Fd₂₁₋₁₀₀A2P:eGFP in einer Western-Blot-Analyse mit αGFP-Antikörpern. Pfeile markieren die Position von Vorläuferproteinen (helle Pfeile) und prozessierten Proteinen (dunkle Pfeile), ein Ausschnitt der Membran mit *Amido Black* gefärbten Proteinen ist als Ladekontrolle gezeigt. (C) Darstellung der Anteile des Vorläuferproteins und des prozessierten Proteins (proz. Protein) an der Gesamtheit nachzuweisenden Proteins auf Grundlage einer Quantifizierung der in (B) detektierten Signale mit *ImageJ*.

3.3.3 Die Inhibierung der Proteasom-Aktivität mit MG132 stabilisiert Vorläuferproteine in transient transformierten Protoplasten

Der Vergleich von Fd₂₁₋₁₀₀:eGFP und Fd₂₁₋₁₀₀A2P:eGFP zeigte Unterschiede im Verhältnis Vorläufer zu reifem Protein in transient transformierten Protoplasten. Die erhöhte Abundanz des Vorläufers nach Austausch des N-terminalen Alanins gegen Prolin könnte im Zusammenhang mit einer veränderten Stabilität der Proteine stehen. Es gibt Hinweise darauf, dass das 26S-Proteasom für den Abbau von Vorläuferproteinen im Cytosol verantwortlich ist (Lee *et al.*, 2009; Sako *et al.*, 2014).

Um die Beteiligung des Proteasoms an der Vorläufer-Degradation zu untersuchen, sollten WT- und *ppi2*-Protoplasten nach der Transformation mit MG132 behandelt werden. MG132 ist ein membranpermeables Peptid-Aldehyd, das effektiv die Chymotrypsin-ähnliche Funktion des 20S CP nach kovalenter Bindung des aktiven Zentrums inhibiert (Zhang *et al.*, 2009b). In der Annahme, dass sich weder Expressions- noch die Importrate ändern, kann die Abundanz von reifen und Vorläuferproteinen Aussagen über den potentiellen Zusammenhang von Proteasom und Vorläuferstabilität liefern.

Für die Versuche in WT- und *ppi2*-Protoplasten wurden die Konstrukte Fd₂₁₋₁₀₀:eGFP, Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP und RbcS₁₋₁₀₀:eGFP verwendet (Abb. 11; Anhang 7 [S. 138]). Außerdem wurde das Konstrukt

ERGEBNISSE

Fd2A2P₁₋₁₀₀:eGFP im Vergleich zu Fd₂₋₁₀₀:eGFP in WT-Protoplasten analysiert (Abb. 11). Zum Induktionszeitpunkt (0 h) bzw. 6 h und 12 h nach der Induktion mit MG132, in DMSO gelöst, oder DMSO wurden die Protoplasten geerntet und die gesamten Proteine einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Die erfolgreiche Inhibierung des Proteasoms mit MG132 führte zur Akkumulation von Proteasom-Zielproteinen, was sich in einer gesteigerten Abundanz polyubiquitiniertes Proteine bei Verwendung Ubiquitin-spezifischer Antikörper zeigte (Abb. 11).

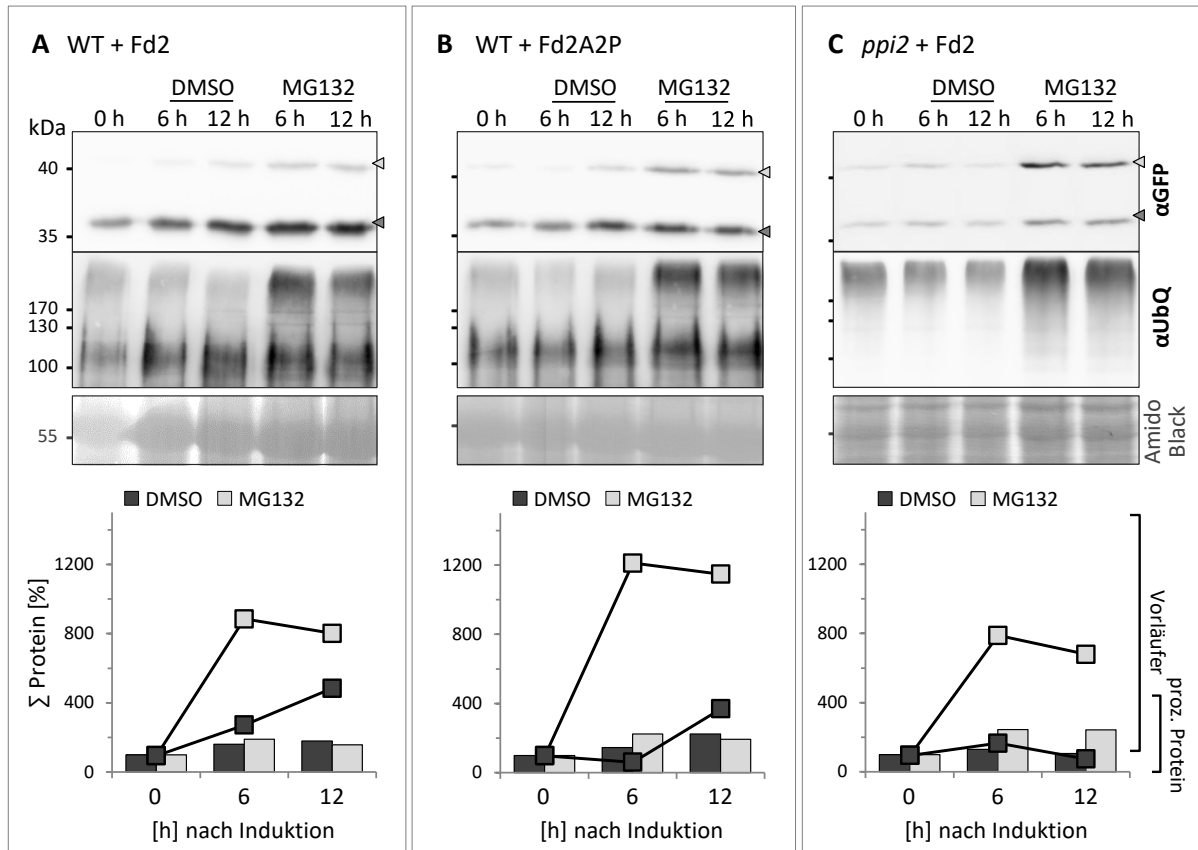


Abb. 11: Stabilisierung von Vorläuferproteinen in transient transformierten Protoplasten mit MG132

(A)-(C) Transient mit Fd₂₋₁₀₀:eGFP bzw. Fd2A2P₁₋₁₀₀:eGFP transformierte WT- bzw. *ppi2* Protoplasten wurden 17 h nach der Transformation mit DMSO oder MG132 (50 μM) versetzt. Zum Induktionszeitpunkt (0 h) bzw. 6 h und 12 h nach der Induktion wurden die Protoplasten geerntet und das heterolog exprimierte eGFP-Fusionsprotein in einer Western-Blot-Analyse (oben) immunologisch mit αGFP-Antikörpern nachgewiesen. Pfeile markieren die Position von Vorläuferproteinen (helle Pfeile) und prozessierten Proteinen (dunkle Pfeile). Polyubiquitinierte Proteine wurden mit Ubiquitin (αUbQ)-Antikörpern detektiert, ein Ausschnitt der entsprechenden Membranen mit *Amido Black*-gefärbten Proteinen ist als Ladekontrolle gezeigt. Die Signalintensitäten von Vorläuferproteinen und prozessierten Proteinen (proz. Proteine) wurden mit *ImageJ* auf Grundlage der im Western-Blot zu detektierenden Signale der Fusionsproteine mit αGFP-Antikörpern bestimmt und auf die Gesamtproteinmenge (*Amido Black*-Färbung) normalisiert. Die relativen Signalintensitäten 6 h und 12 h nach Induktion mit DMSO oder MG132 (50 μM) in Bezug auf die Signalintensität zum Induktionszeitpunkt (0 h) für Vorläufer (Linien) und prozessierte Proteine (Balken) sind grafisch dargestellt (unten).

ERGEBNISSE

Das Konstrukt Fd_{2₁₋₁₀₀}:eGFP konnte zum Induktionszeitpunkt im WT fast ausschließlich als prozessiertes Protein nachgewiesen werden (Abb. 11A). Auch in MG132 bzw. DMSO-behandelten Protoplasten dominierte die prozessierte Form. Im Vergleich zum Induktionszeitpunkt stieg die Abundanz des reifen Fusionsproteins in WT-Protoplasten nach 6 h und 12 h in DMSO leicht an und erreichte nach 12 h das 1,8-Fache des Bezugswertes am Induktionszeitpunkt. Die Abundanz des Fd_{2₁₋₁₀₀}:eGFP-Vorläufers stieg in DMSO-behandelten WT-Protoplasten ebenfalls stetig an. Nach 12 h konnte hier etwa das 4,9-Fache der Signalintensität in Bezug zum Induktionszeitpunkt verzeichnet werden. Die Diskrepanz im Anstieg der Abundanz von Vorläufer- und prozessierter Form weisen darauf hin, dass in WT-Protoplasten die Expressionsrate des Fd_{2₁₋₁₀₀}:eGFP die Import- und Degradationsrate überstieg, was im zeitlichen Verlauf zur Akkumulation von Vorläuferprotein führte. Dieser Effekt konnte durch den Einsatz von MG132 verstärkt werden. Die Inhibierung der Proteasom-Aktivität führte zur deutlichen Steigerung der unprozessierten Form des Fd_{2₁₋₁₀₀}:eGFP. Nach einer Inkubationszeit von 6 h erreichte die Abundanz des Vorläufers in WT-Protoplasten ein Maximum weit über dem Wert von DMSO-behandelten Protoplasten. Nach 12 h war die quantifizierte Signalintensität in MG132-behandelten Protoplasten etwas reduziert, aber immer noch gegenüber DMSO-behandelten Protoplasten erhöht. Diese leichte Reduzierung der Vorläufer-Abundanz könnte auf eine verminderte Expression, eine regenerierte Degradation oder eine erhöhte Importeffizienz zwischen 6 h und 12 h MG132-Wirkung zurückzuführen sein. Da allerdings die Abundanz des reifen Proteins in 6 h lang mit MG132-behandelten WT-Protoplasten das Maximum erreichte, ist eine gesteigerte Importeffizienz unwahrscheinlich und eine Veränderung der Expressionsrate oder Regeneration der Proteasom-Aktivität anzunehmen.

In vorangehenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass ein Austausch des Alanins an der zweiten Aminosäure-Position gegen Prolin in Fd_{2₁₋₁₀₀}A2P:eGFP einen Einfluss auf die N-terminale Modifikation des Fusionsproteins und dessen Akkumulation als Vorläufer hat. Eine Inhibierung der Proteasom-Aktivität mit MG132 zeigte, dass, wie für Fd_{2₁₋₁₀₀}:eGFP beobachtet, auch für Fd_{2₁₋₁₀₀}A2P:eGFP eine deutliche Abhängigkeit der Stabilität des Vorläufers zum Proteasom besteht (Abb. 11B). Eine relativ geringe Diskrepanz zwischen Fd_{2₁₋₁₀₀}A2P:eGFP-Vorläufer- und prozessierter Form im Vergleich zu Fd_{2₁₋₁₀₀}:eGFP deutet zunächst auf ein eher ausgeglichenes Verhältnis von Expressionsrate zu Import- und Degradationsrate hin. Bei Minderung der Proteasom-Aktivität durch MG132 wurde allerdings eine verstärkt gesteigerte Akkumulation von Vorläufer beobachtet, die auf einen hohen Anteil an normalerweise degradierten Vorläufer hinweisen könnten. Während das reife Protein sich vergleichbar verhielt, akkumulierte der Fd_{2₁₋₁₀₀}A2P:eGFP Vorläufer in MG132-behandelten WT-Protoplasten im Verhältnis zum Induktionszeitpunkt stärker als die Fd_{2₁₋₁₀₀}:eGFP-Variante. An diesem Punkt kann nicht absolut ausgeschlossen werden, dass dies auch auf

Unterschiede in der Expressionsrate oder Importeffizienz und nicht allein auf Stabilitätsunterschiede zurückzuführen ist.

Durch den Verlust von Toc159 ist der Import in *ppi2* vermindert und konstitutiv exprimiertes Fd2₁₋₁₀₀:eGFP akkumulierte im Vergleich zum WT vermehrt als Vorläufer (Abb. 11C). Eine Inhibierung der Proteasom-Aktivität verstärkte diesen Effekt und unprozessiertes Fd2₁₋₁₀₀:eGFP konnte in hohem Maße nachgewiesen werden. Die Abundanz reifer Proteine erhöhte sich in Bezug zu den DMSO-behandelten Protoplasten geringfügig nach 6 h und 12 h Inkubation transient transformierter *ppi2*-Protoplasten mit MG132.

Über den beobachteten Zeitraum war die nachzuweisende Menge an unprozessiertem eGFP-Fusionsprotein in MG132-behandelten WT- und auch *ppi2*-Protoplasten stets erhöht gegenüber der Menge in mit DMSO-behandelten Protoplasten. Diese Beobachtung konnte auch mit Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP und RbcS₁₋₁₀₀:eGFP gemacht werden (Anhang 7 [S. 138]). Die deutliche Stabilisierung der Vorläufer bestärkt die Annahme eines Proteasom-abhängigen Abbaus von Vorläuferproteinen. Die akute Inhibierung des Proteasoms mit relativ hohen MG132-Konzentrationen führte in transient transformierten Protoplasten zu keiner bzw. zu einer geringfügigen Steigerung reifen Proteins. Ein Einfluss auf die Abundanz von reifen Plastidenproteinen nach langfristiger Akkumulation von Vorläufern, durch Veränderung der Proteasom-Funktion über die gesamte pflanzliche Entwicklung hinweg oder eine MG132-induzierte Proteasom-Inhibierung *in planta*, ist dennoch nicht auszuschließen.

3.4 Analysen zur Veränderung plastidärer Eigenschaften und des Proteasoms nach Mutation von *Rpn8A*

Es gibt Hinweise darauf, dass an der Regulation der Vorläuferproteine das 26S-Proteasom maßgeblich beteiligt ist (Lee *et al.*, 2009; Sako *et al.*, 2014). Eine Inhibierung des Proteasoms mit MG132 in transient transformierten Protoplasten führte nachweislich zur Akkumulation von Vorläuferproteinen (Abb. 11 [S. 56]; Anhang 7 [S. 138]), was ein weiteres Argument für einen Proteasom-abhängigen Abbau von Vorläuferproteinen ist. Die Regulation von TOC-Untereinheiten und die retrograde Signaltransduktion sind ebenfalls Prozesse, die im Zusammenhang mit dem UPS stehen und Einfluss auf die Plastidenbiogenese und die Abundanz von Plastidenproteinen haben (Ling und Jarvis, 2015; Tokumaru *et al.*, 2017). Die E3-Ligase SP1 interagiert direkt mit Komponenten des TOC-Komplexes. In ihrer Funktion als E3-Ligase katalysiert SP1 die kovalente Bindung von Ubiquitin-Resten an TOC-Komponenten, die nach Polyubiquitinierung dem 26S-Proteasom zugänglich gemacht und degradiert werden. Somit stellt SP1 einen möglichen Kandidaten der Verbindung

zwischen Plastid und Proteasom her. Es konnte gezeigt werden, dass ein Verlust von SP1 den Phänotyp der Toc33-Mutante *ppi1* verbessert (Ling *et al.*, 2012). Die Mutation der regulatorischen Proteasom-Untereinheit Rpn8A hatte eine ähnliche Auswirkung auf den *ppi1*-Phänotyp (Ling *et al.*, 2012). Das Protein Rpn8A ist ein Bestandteil des Deckels der 19S-Untereinheit. Im Folgenden sollte untersucht werden, inwieweit die Mutation dieser regulatorischen Proteasom-Untereinheit plastidäre Prozesse beeinflusst und welche Veränderungen auf Proteinebene dem zu Grunde liegen.

3.4.1 Die T-DNA-Linie *rpn8a-2* zeigt wenige Abweichungen im Phänotyp

Die regulatorische 19S-Untereinheit des 26S-Proteasoms ist für die Erkennung, Deubiquitinierung, Entfaltung und Translokation der Zielproteine sowie das Öffnen des Zugangs zum 20S CP verantwortlich. Die Mutation einer regulatorischen Untereinheit des Deckels oder der Basis des 19S RP in sogenannten RP-Mutanten kann in drastischen Phänotypen resultieren, die die Gametenentwicklung, das Wurzelwachstum, Wuchs- und Blattmorphologie sowie Reaktionen auf biotische und abiotische Faktoren betreffen können (Smalle *et al.*, 2003; Kurepa *et al.*, 2008; Book *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Ueda *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012).

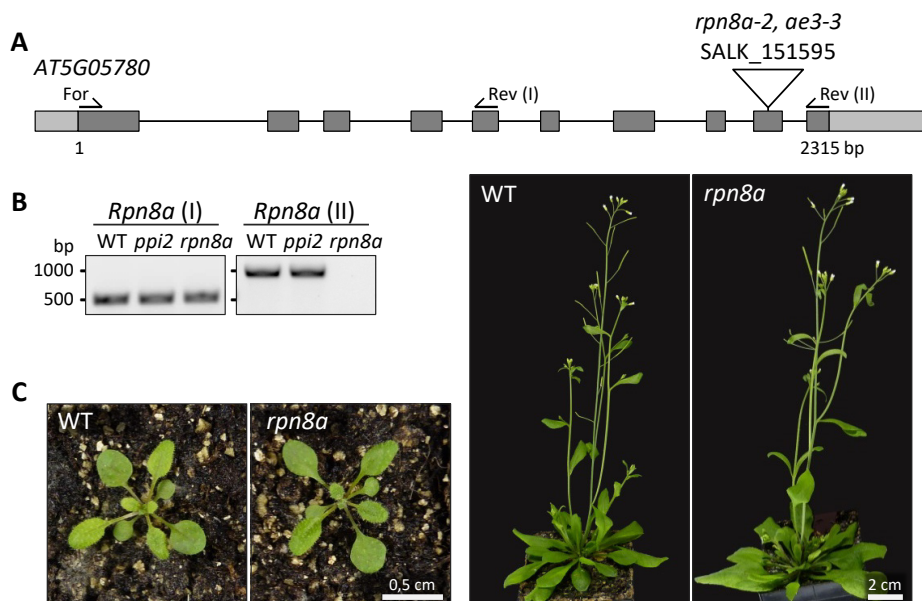


Abb. 12: Die T-DNA-Insertionslinie *rpn8a*

(A) Schematische Darstellung des RPN8a-kodierenden Gens *AT5G05780*. Die Position der T-DNA-Insertion in der Linie SALK_151595 im Exon 9 ist markiert. (B) Transkriptanalyse von *RPN8a* in WT, *ppi2* und *rpn8a* mittels cDNA-Amplifikation mit zwei *RPN8a*-spezifischen Primer-Kombinationen (Position der Primer in (A) vermerkt), aufgetrennt in einem Agarose-Gel. (C) WT und *rpn8a* für 18 d (links) und 35 d (rechts) auf Erde unter Langtagbedingungen angezogen.

Die *Arabidopsis*-Linie *rpn8a-2* (im Folgenden *rpn8a*), auch bekannt als *ae3-3*, besitzt eine T-DNA-Insertion im Exon 9 des Rpn8A-kodierenden Gens *At5G05780* (Huang *et al.*, 2006; Abb. 12A). Eine Transkriptanalyse mittels cDNA-Amplifikation zeigte, dass in der homozygoten T-DNA-Linie *rpn8a* kein vollständiges *Rpn8A*-Transkript nachweisbar war (Abb. 12B). Eine Amplifikation des Bereichs *upstream* der T-DNA-Insertion führte hingegen zu einem Fragment, sodass möglicherweise ein verkürztes N-terminales Rpn8A-Peptid exprimiert wird. In der *toc159*-Mutante *ppi2*, wie auch im WT, konnte sowohl das kürzere als auch das vollständige cDNA-Fragment amplifiziert werden.

Trotz der Mutation einer Proteasom-Untereinheit in *rpn8a*-Pflanzen unterschieden sie sich phänotypisch nicht vom Wildtyp (Abb. 12C). Sie glichen dem WT nach 18 d und 35 d in Wuchs und Blüte. Die Ermittlung des durchschnittlichen Frischgewichts 28 d alter Keimlinge, die in Flüssigkultur mit zuckerhaltigem Medium angezogen wurden, ergab jedoch eine geringe Steigerung der Frischmasse der *rpn8a*-Keimlinge in Bezug zu WT-Keimlingen (Abb. 13A). Bei der Analyse des Wurzelwachstums wurden für *rpn8a*-Pflanzen nach 7 d im Vergleich zum WT geringfügig längere Wurzeln ermittelt (Abb. 13B). Nach 17 d auf ½ MS-Medium unter Kurztagbedingungen wies die Mutante allerdings eine signifikant verminderte durchschnittliche Wurzellänge auf, die auf ein reduziertes Wurzelwachstum in *rpn8a* hinwies.

Für einige RP-Mutanten wurde eine Hypersensitivität gegenüber Salzstress beschrieben (Smalle *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011). Eine Analyse der Keimungsfähigkeit auf NaCl-haltigem Medium sollte zeigen, ob dies auch auf *rpn8a*-zutrifft. In drei unabhängigen Anzuchten wurden insgesamt 150 Samen des WT und *rpn8a* angezogen und der Anteil an Pflanzen bestimmt, die nach der Keimung fähig waren Keimblätter auszubilden (Abb. 13C). Auf NaCl-Medium war der Anteil der ergrünten Keimlinge bei *rpn8a* geringer als im WT, wobei die Keimungsrate in beiden Linien ähnlich blieb. Die Sensitivität des WT und der *rpn8a*-Linie gegenüber dem Osmotikum Mannitol unterschied sich hingegen nicht. Diese Beobachtung deutete auf eine NaCl-Hypersensitivität der *rpn8a* Keimlinge gegenüber dem WT hin.

Zur weiteren Charakterisierung wurde ein Vergleich funktioneller Photosynthese-Parameter von WT und der *rpn8a*-Mutante durchgeführt. In dunkeladaptierten Keimlingen wurde eine durchschnittliche maximale Photosyntheseleistung des PSII (maximale *PSII Quantum Yield*) von $0,808 \pm 0,006$ für WT und $0,809 \pm 0,005$ für *rpn8a* mittels *imaging-pulse amplitude modulation (imaging-PAM)*-Fluorometrie bestimmt (Abb. 13E). Die Messungen waren in drei biologischen Replikaten sehr stabil und zeigten zunächst keinen Unterschied zwischen WT und Mutante in der maximalen *PSII Quantum Yield*. Pflanzen beider Linien besitzen demnach eine ähnliche PSII-Kapazität. Dementsprechend zeigte eine Analyse der Pigmentzusammensetzung keinen signifikanten Unterschied im Gehalt an Chlorophyll a, Chlorophyll b und Carotinoiden in WT und *rpn8a* (Abb. 13D).

ERGEBNISSE

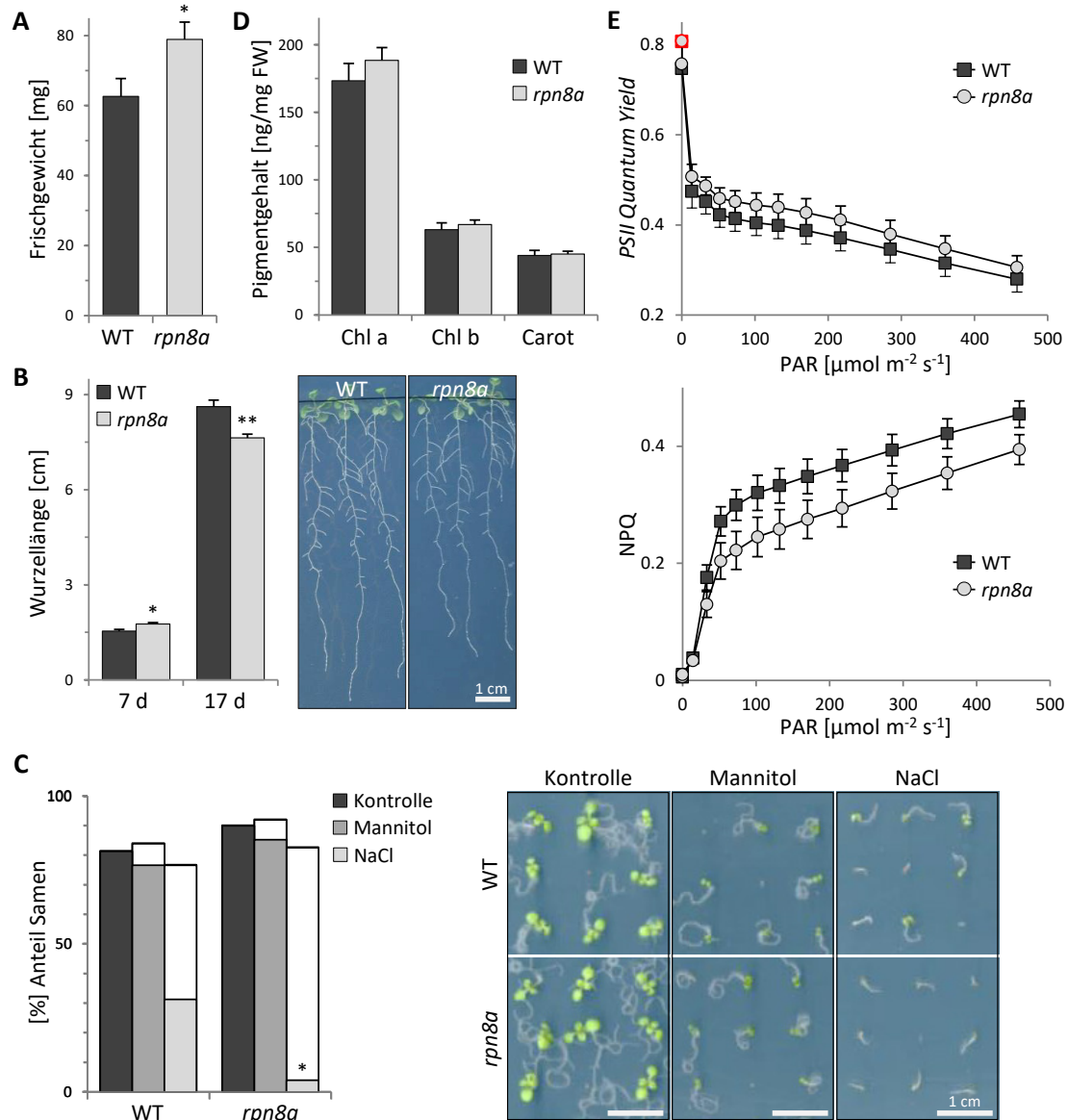


Abb. 13: Physiologische Eigenschaften von *rpn8a*

(A) Das durchschnittliche Frischgewicht 28 d alter WT- und *rpn8a*-Keimlinge ($n = 36$). Die Fehlerbalken entsprechen der SEM. * $p \leq 0,05$ (t-Test) (B) Mittelwerte der Wurzellängen ($n = 30$) von WT und *rpn8a* nach 7 d und 17 d auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium mit 3% Zucker sind im Balkendiagramm mit SEM dargestellt (links). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$ (t-Test). Exemplarisch sind Bilder von 17 d alten Wurzeln von WT und *rpn8a* gezeigt (rechts). (C) Anteil der auf $\frac{1}{2}$ MS-Platten mit 3% Zucker (Kontrolle) und Zusatz von 250 mM Mannitol bzw. 150 mM NaCl gekeimter Samen, die nicht ergrünten (weiße Balken) oder ergrünten (grau-Töne) von der Gesamtheit ausgelegter WT und *rpn8a*-Samen ($n = 150$) nach 14 d unter Kurztagbedingungen im Balkendiagramm (links) dargestellt. Exemplarisch sind Bilder der analysierten Keimlinge (rechts) gezeigt. (D) Der gemittelte Gehalt mit SEM von Chlorophyll a, Chlorophyll b und Carotinoiden pro Frischgewicht (FW) aus 28 d alten WT- und *rpn8a*-Keimlingen ($n = 24$). (E) Mit *imaging-PAM*-Fluorometer erstellte Lichtkurven zeigen die operative PSII Quantum Yield (oben) mit maximaler PSII Quantum Yield (rot umrandet) sowie das *non-photochemical quenching*, NPQ (unten) in Abhängigkeit von der kurzzeitigen Adaption 28 d alter WT- und *rpn8a*-Keimlinge ($n = 18$) an *photosynthetically active radiation* (PAR) von $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bis $458 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die Fehlerbalken entsprechen der SD.

Nach Anregung des PSII mit einem sättigenden Messlichtimpuls und der damit verbundenen vollständigen Reduzierung des Plastochinonpools erfolgen die Weiterleitung der Elektronen und die Regeneration des PSII. Die Reaktionszentren des PSII werden wieder „geöffnet“ und das Plastochinon oxidiert. Weitere Fluoreszenz-Messungen nach kurzzeitiger (20 s) Adaption des PSII an steigende Strahlungsintensitäten (*photosynthetically active radiation*, PAR) ermöglichten die Erstellung einer Lichtkurve, die die operative Photosyntheseleistung des PSII (*PSII operating efficiency*) dokumentiert (Abb. 13E). Typischerweise nimmt die *PSII Quantum Yield* im Verlauf der Lichtkurve ab, die absorbierte Energie muss demnach zunehmend anderweitig abgegeben werden. Es zeigte sich bei Messungen an Keimlingen des WT und der *rpn8a*-Linie, dass die *PSII Quantum Yield* der Mutante gegenüber dem WT nach Adaption des PSII an Strahlungsintensitäten von $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bis $458 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ signifikant ($p \leq 0,05$) erhöht war. Parallel zur gesteigerten *PSII operating efficiency* konnte mit Strahlungsintensitäten von $14 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bis $458 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ eine entsprechende, signifikante ($p \leq 0,05$) Reduzierung des NPQ von *rpn8a* im Vergleich zum WT beobachtet werden (Abb. 13E). Das legt nahe, dass die Energie des absorbierten aktinischen Messimpulslichts in der Mutante verstärkt zur Anregung photochemischer Prozesse genutzt werden kann und weniger in nicht-photochemisch nutzbare Energie (Wärme) umgesetzt wird als im WT.

Physiologische Veränderungen in RP-Mutanten gehen oftmals mit einer modifizierten Proteasom-Aktivität einher, die sich unter anderem in einer gesteigerten MG132-Resistenz und einer abweichenden Abundanz polyubiquitinerter Proteine äußern kann (Smalle et al., 2003; Kurepa et al., 2008; Book et al., 2009). Zur Ermittlung der MG132-Sensitivität der RP-Mutante *rpn8a* wurden sterilisierte Samen der Linie im Vergleich zum WT in $\frac{1}{2}$ MS-Medium mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors MG132 oder DMSO 5 d lang in Dunkelheit belassen. Die Länge des Hypokotyls der etiolierten Keimlinge wurde als Indikator für die MG132-Sensitivität analysiert (Abb. 14A-B). Eine geringe Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ und $1 \mu\text{M}$ MG132 hatte keinen deutlichen Einfluss auf die Elongation des Hypokotyls im WT oder *rpn8a*. Bei Konzentrationen von $15 \mu\text{M}$ und höher konnte eine Inhibierung des Hypokotyl-Wachstums durch MG132 beobachtet werden. Die Inhibierung der Entwicklung wurde mit steigender MG132-Konzentration stärker. Bei der maximal getesteten MG132-Konzentration von $200 \mu\text{M}$ konnte im WT kein Hypokotyl ausgebildet werden, die Entwicklung war nur bis zum Durchbrechen der Samenschale durch die Wurzel vorangeschritten. Beim Vergleich der etiolierten Keimlinge von *rpn8a* und dem WT bei MG132-Konzentrationen $\geq 15 \mu\text{M}$ wurde deutlich, dass die Mutante signifikant längeres Hypokotyl aufwies und auch bei einer Konzentration von $200 \mu\text{M}$ zum Teil fähig war Hypokotyl auszubilden. Diese Beobachtung deutete auf eine geringere Sensitivität der *rpn8a*-Keimlinge gegenüber dem Proteasom-Inhibitor hin.

Eine Veränderung der Proteasom-Funktion kann zu Unterschieden im Ubiquitinierungsmusters des Proteoms führen. Ein Vergleich der Abundanz der Gesamtheit der polyubiquitinierten Proteine in einer Western-Blot-Analyse mit Ubiquitin-spezifischen Antikörpern zeigte hingegen weder einen Unterschied des WT zu der E3-Ligase-Mutante *sp1-2* noch zu der RP-Mutante *rpn8a* auf (Abb. 14C). Demnach besteht in *rpn8a* zwar keine deutliche universelle Veränderung des Ubiquitinierungsmusters des Proteoms, allerdings weist die gesteigerte Resistenz gegenüber MG132 auf eine erhöhte Proteasom-Aktivität hin.

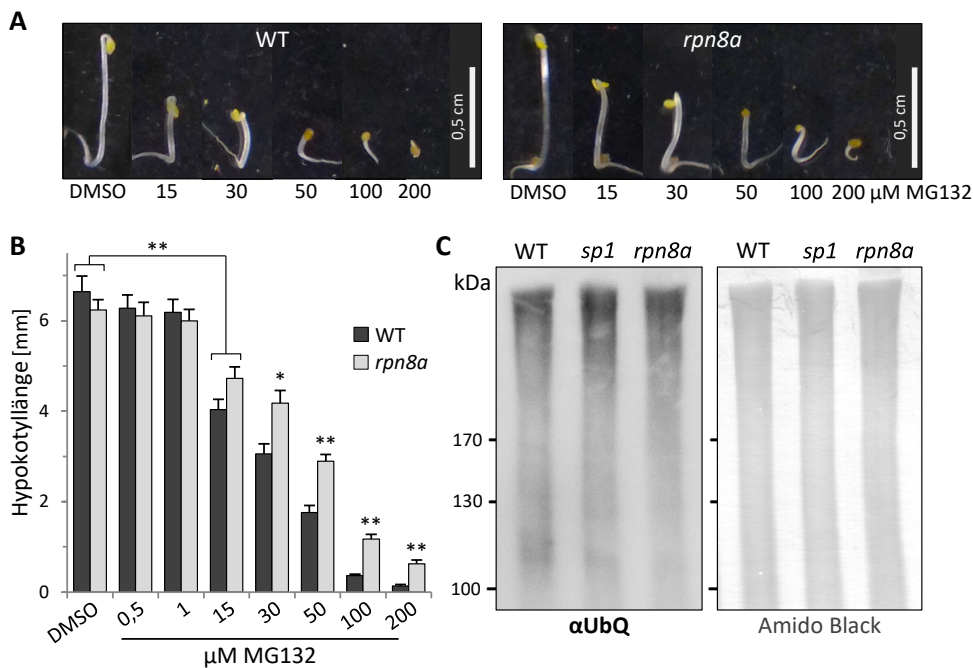


Abb. 14: Die Proteasom-Aktivität von *rpn8a*

(A) Inhibierung der Hypokotyl-Elongation in 5 d lang etiolierten WT- und *rpn8a*-Keimlingen durch verschiedene Konzentrationen des Proteasom-Inhibitors MG132 im Vergleich zu nur mit DMSO behandelten etiolierten Keimlingen. (B) Mittelwerte der Hypokotyllängen mit SEM von 5 d in DMSO- bzw. MG132-haltigem ½ MS-Medium mit 0,8% Saccharose etiolierten Keimlingen (n = 24). * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,001 (t-Test) (C) Nachweis polyubiquitinerter Proteine mit Ubiquitin-spezifischen Antikörpern (αUbQ) in einer Western-Blot-Analyse nach Auftrennung von 20 μg des Gesamtproteins aus 28 d alten WT-, *sp1*- und *rpn8a*-Keimlingen auf einem 6%igen SDS-Gel. Ein Ausschnitt der entsprechenden Membran mit *Amido Black* gefärbten Proteinen ist als Ladekontrolle gezeigt.

3.4.2 Der Vergleich von WT, *sp1* und *rpn8a* auf Proteinebene zeigt Unterschiede der T-DNA-Linien zueinander und zum WT auf

Phänotypisch ist die Mutante *rpn8a* dem WT ähnlich, jedoch zeigten sich bei den physiologischen Untersuchungen signifikante Unterschiede in der Photosyntheseleistung, dem Wurzelwachstum, der NaCl- und MG132-Sensitivität. Zur näheren Charakterisierung der Linie sollte eine Analyse des

Proteoms im Vergleich zum WT stattfinden. Parallel sollte die SP1-Mutante *sp1-2* (im Folgenden *sp1*) untersucht werden. Ein Vergleich des Proteoms der Mutanten *sp1* und *rpn8a* mit dem WT sollte zeigen, ob es Ähnlichkeiten zwischen den Degradationsmutanten gibt, die auf einen gemeinsamen Wirkmechanismus hinweisen.

Gesamtprotein wurde aus 28 d alten Keimlingen der *Arabidopsis*-Linien *sp1*, *rpn8a* und des WT in drei unabhängigen Experimenten extrahiert und in je drei technischen Replikaten massenspektrometrisch untersucht. Eine Quantifizierung wurde über die Intensität der drei abundantesten tryptischen Peptide eines Proteins in Bezug zu einem internen Standard realisiert (10 fmol/Injektion) (Silva *et al.*, 2006). Aus den von *ProteinLynx Global Server* (PLGS) identifizierten Proteinen wurden jene ausgeschlossen, die mit einem PLGS-internen Bewertungsmaßstab (*protein.AutoCurate*) als unzuverlässig (*red*) bewertet wurden. Zusätzlich galt als Kriterium für eine sichere Identifizierung, dass die Proteine in mindestens zwei aus drei biologischen und drei aus neun technischen Replikaten der jeweiligen Linie quantifiziert worden sein mussten. Insgesamt trafen diese stringenten Kriterien in Summe aller Proben auf 1455 verschiedene *Arabidopsis*-Proteine zu (Abb. 15A; digitaler Anhang). In allen drei Linien wurde eine ähnliche Anzahl Proteine quantifiziert: im WT 1190 Proteine, in *sp1* 1180 Proteine und in *rpn8a* 1188 Proteine. Der Großteil (947 Proteine) war in allen Linien vertreten. Achtundachtzig Proteine wurden ausschließlich im WT identifiziert, 96 Proteine in *sp1* und 115 Proteine nur in *rpn8a*. Qualitativ waren sich die Linien demnach sehr ähnlich. Für die quantitative Analyse wurden die Mengen (fmol) der einzelnen Proteine in *parts per million* (ppm) für jedes Replikat bestimmt und gemittelt. Ein Streudiagramm, in dem \log_2 des Verhältnisses der Proteinkonzentrationen in *sp1* zum WT gegen den \log_2 des Verhältnisses von *rpn8a* zum WT aufgetragen ist, zeigte, dass die meisten Proteine nahe um den Koordinatenursprung streuen (Abb. 15B). Das verdeutlicht, dass in den Linien *sp1* und *rpn8a* im Bezug zum WT nur wenig differenzielle Proteinregulation stattfindet.

Als Grenzwerte für relevante Veränderungen in der Proteinabundanz wurden eine 1,5-fache Änderung gegenüber dem WT mit einem Signifikanzwert von $p \leq 0,05$ (t-Test) definiert. Die Darstellung des Verhältnisses der Proteinmengen einzelner Proteine der Linien *sp1* bzw. *rpn8a* zum WT in Abhängigkeit von ihrem p-Wert machte deutlich, dass in den Mutanten nur wenige relevante Veränderungen gegenüber dem WT auftraten (Abb. 15C-D). In *sp1* fielen zwei Proteine mit einem besonders großen Abundanzunterschied im Vergleich zum WT auf (Abb. 15C). Für das im Cytosol lokalisierte Hitzeschockprotein Hsp70B (AT1G16030) wurde in *sp1* im Vergleich zum WT die 4-fache Proteinmenge ermittelt. Ein ribosomales Protein der L2 Familie (AT4G36130; RPL8C), ein struktureller Bestandteil der 60S Untereinheit des Ribosoms, das eine Funktion in der Proteinbiosynthese hat, wurde in *sp1* deutlich runterreguliert identifiziert. Neben diesen zwei Proteinen gab es keine

ERGEBNISSE

auffälligen Veränderungen in der Abundanz einzelner Proteine in *sp1* gegenüber dem WT. Hsp70B wurde in *rpn8a* zwar ebenfalls in 1,7-fach erhöhter Menge quantifiziert, die Änderung war allerdings nicht signifikant und RPL8C wurde in *rpn8a* nicht identifiziert. Relevante Änderungen der Proteinmenge, die in beiden Mutanten im Vergleich zum WT auftraten, betrafen ausschließlich *Filamentous temperature sensitive H 5* (FtsH5, AT5G42270), eine plastidäre Metalloprotease, die funktionell der Proteindegradation zugeordnet ist. Es konnten keine weiteren relevanten Gemeinsamkeiten in der Proteinregulation festgestellt werden.

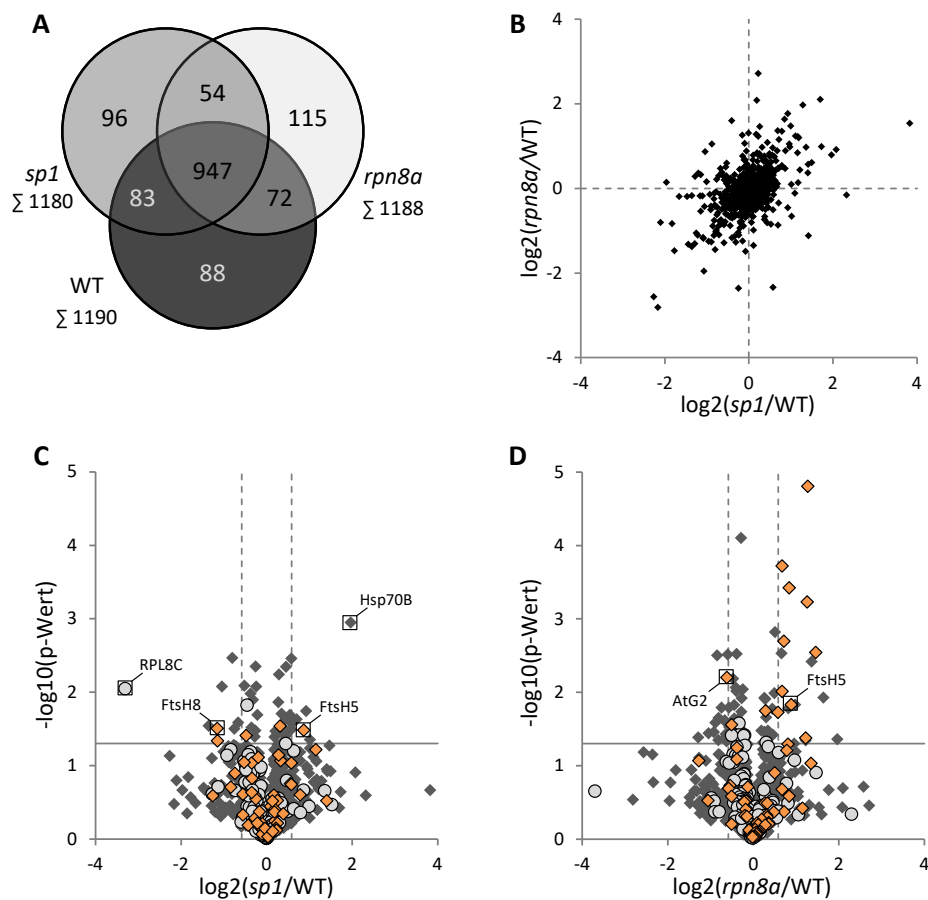


Abb. 15: Gesamtproteom der Linien *sp1* und *rpn8a* im Vergleich zum WT

(A) Venn-Diagramm zu MS-Analysen des Gesamtproteoms von *sp1*, *rpn8a* und dem WT mit Anzahl der Proteine, die in mindestens zwei biologischen und drei technischen Replikaten quantifiziert wurden. (B) Streudiagramm mit 947 Proteinen, die in allen Linien quantifiziert wurden, vergleicht die Regulation von *sp1* und *rpn8a* im Bezug zum WT. (C) und (D) Streudiagramm zeigt die Regulation quantifizierter Proteine von *sp1* (C) und *rpn8a* (D) im Verhältnis zum WT in Abhängigkeit zum entsprechenden p-Wert (t-Test). Gesamtproteine (dunkelgrau), Proteine mit Funktion in der Proteindegradation (orange) und der Proteinsynthese (hellgrau) sowie Grenzen für $p \leq 0,05$ (durchgezogene Linie) und Regulationen > 1,5-fach (gestrichelte Linie) sind dargestellt.

ERGEBNISSE

Eine funktionelle Gruppierung aller identifizierten Proteine zeigte, dass in *rpn8a* viele regulierte Proteine am Proteinmetabolismus, speziell der -degradation, nicht aber der -synthese, beteiligt sind (Abb. 15D). Das kernlokalisierte Protein AtG2 (AT3G51800) ist das einzige signifikant um mehr als das 1,5-Fache runterregulierte Protein in *rpn8a* mit einer annotierten Funktion in der Proteindegradation. Neun Proteine dieser funktionellen Gruppe waren relevant erhöht. Acht dieser neun Proteine sind Bestandteile des 20S CP des Proteasoms (Tab. 11). Im Einzelnen handelte es sich um vier Alpha- und vier Beta-Untereinheiten des 20S CP, die in *rpn8a* signifikant 1,6-fach bis 2,7-fach im Vergleich zum WT gesteigert vorlagen. Im Kontrast dazu wurden keine Komponenten des Deckels der 19S regulatorischen Einheit des 26S-Proteasoms in *rpn8a* identifiziert, während in WT fünf und in *sp1* zwei der insgesamt dreizehn von Book *et al.* (2010) beschriebenen Untereinheiten zu finden waren. Qualitativ und auch quantitativ waren Untereinheiten, die die Basis der 19S regulatorischen Einheit bilden, in allen drei Linien vergleichbar vertreten.

Tab. 11: Signifikant veränderte Proteine von *sp1* bzw. *rpn8a* mit Funktion in der Proteindegradation

AGI-Locus	Protein	Beschreibung	Lokalisierung ^a	<i>sp1</i> ^b	p-Wert ^c	<i>rpn8a</i> ^b	p-Wert ^c
<i>AT2G05840</i>	PAA2	20S CP Alpha Untereinheit	Cytosol, Nukleus	0,45	0,05	1,25	0,32
<i>AT1G79210</i>	PAB2		Cytosol, Nukleus	1,13	0,25	2,42	1,57 x 10 ⁻⁵
<i>AT3G14290</i>	PAE2		Cytosol, Nukleus	1,07	0,36	1,59	1,91 x 10 ⁻⁴
<i>AT5G42790</i>	PAF1		Cytosol, Nukleus	1,20	0,61	2,75	2,89 x 10 ⁻³
<i>AT2G27020</i>	PAG1		Cytosol, Nukleus	0,90	0,69	2,39	5,91 x 10 ⁻⁴
<i>AT3G22630</i>	PBD1	20S CP Beta Untereinheit	Cytosol, Nukleus	1,17	0,71	2,34	0,04
<i>AT1G13060</i>	PBE1		Cytosol, Nukleus	1,25	0,03	1,64	2,02 x 10 ⁻³
<i>AT3G60820</i>	PBF1		Cytosol	1,15	0,57	1,79	3,78 x 10 ⁻⁴
<i>AT1G56450</i>	PBG1		Cytosol, Nukleus	0,92	0,63	1,59	0,01
<i>AT3G51800</i>	AtG2	M24 Metallo- peptidase	Nukleus	0,79	0,09	0,65	0,01
<i>AT5G42270</i>	FtsH5	FtsH Metallo- protease	Plastid	1,83	0,03	1,85	0,01
<i>AT1G06430</i>	FtsH8		Plastid	0,45	0,03	0,69	0,19

^a aus SUBA3 MS-Liste; ^b Verhältnis der Proteinmengen ppm_{Mut}/ppm_{WT}; ^c errechnet mit t-Test; signifikant (p ≤ 0,05) veränderte Konzentrationsverhältnisse sind fett gedruckt.

Im Folgenden sollten Plastidenproteine im Detail betrachtet werden, da die Änderungen der Proteinabundanz in *sp1* und *rpn8a*, die plastidäre Proteine betreffen, hinsichtlich der postulierten Verbindung plastidärer Prozesse und des UPS von besonderem Interesse waren.

In Western-Blot-Analysen wurde die Abundanz verschiedener plastidärer Proteine mit einer Funktion im Import oder der Photosynthese geprüft (Abb. 16). In drei unabhängigen Experimenten zeigte sich, dass die Abundanz der photosynthetischen Proteine Lhcb4, OEC33 und FNR im Gesamtproteinextrakt

ERGEBNISSE

beider Degradationsmutanten vergleichbar zum WT war. Im Zusammenhang mit SP1 sind TOC-Importkomponenten von Bedeutung und in Übereinstimmung mit Daten von Ling *et al.* (2012) und Ling und Jarvis (2015) konnte Toc75 in *sp1*-Proben mittels Western-Blot-Analysen in höherer Konzentration nachgewiesen werden. Eine relative Quantifizierung der Western-Blot-Signale ergab eine Steigerung gegenüber dem WT auf die 1,8-fache Menge (Abb. 16). Die Western-Blot-Analyse mit Toc132-spezifischen Antikörpern deutete darauf hin, dass in allen drei Linien vergleichbare Mengen dieser TOC-Komponente vorlagen.

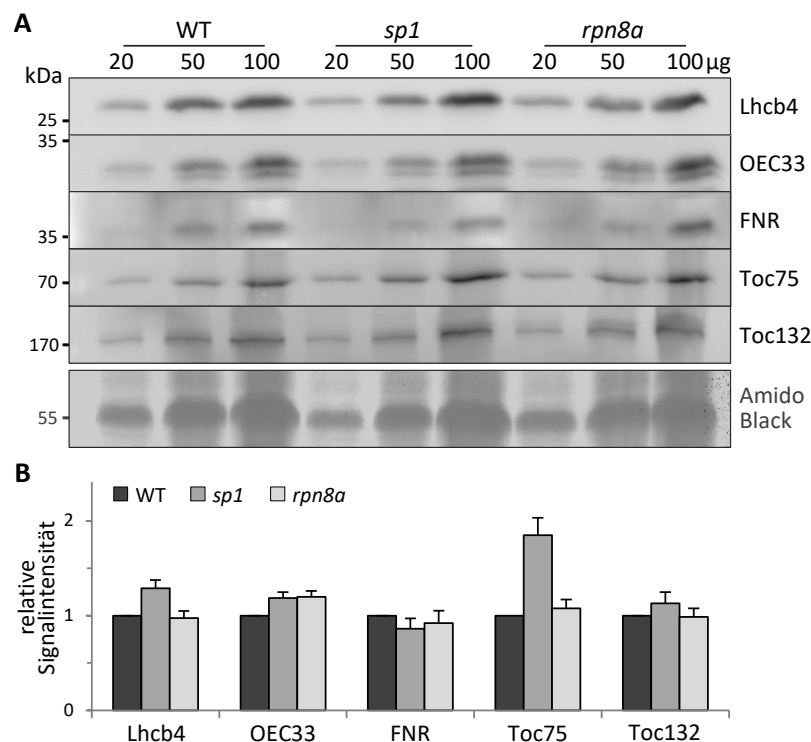


Abb. 16: Immunologischer Nachweis plastidärer Proteine in *sp1*, *rpn8a* und WT

(A) Nachweis ausgewählter plastidärer Proteine mit spezifischen Antikörpern mit einer Western-Blot-Analyse in 20 µg, 50 µg und 100 µg des Gesamtproteins aus 28 d alten WT-, *sp1*- und *rpn8a*-Keimlingen, ein Ausschnitt der Membran mit *Amido Black* gefärbten Proteinen ist als Ladekontrolle gezeigt. (B) Signalintensitäten der Western-Blot-Signale normalisiert auf die Gesamtproteinmenge (*Amido Black*-Färbung) und im Verhältnis zum WT, quantifiziert mit *ImageJ*, Mittelwerte (n = 9) mit SEM dargestellt.

In massenspektrometrischen Untersuchungen wurden 453 Proteine in den Linien *sp1*, *rpn8a* und dem WT sicher identifiziert und quantifiziert, die in Plastiden lokalisiert sind (Abb. 17A). Im Einzelnen wurden 390 Proteine im WT, 374 Proteine in *sp1* und 388 Proteine in *rpn8a* quantifiziert. Die Schnittmenge der Proteine aller drei Linien enthielt 320 verschiedene Plastidenproteine. Einige Proteine wurden ausschließlich in einer Linie identifiziert: 19 Proteine in WT, 22 Proteine in *sp1* und 33 Proteine in *rpn8a*. Eine Gegenüberstellung der Abundanz plastidärer Proteine der Mutantenlinien

ERGEBNISSE

sp1 und *rpn8a* jeweils im Verhältnis zum WT in einem Streudiagramm zeigte, dass die meisten Datenpunkte nahe dem Koordinatenursprung lagen (Abb. 17B). Die Verteilung der Punkte im Koordinatensystem konzentrierte sich auf die Quadranten I und III, was eine tendenziell ähnliche Regulation in den beiden Mutanten im Bezug zum WT vermuten ließ. Bei Betrachtung der Änderung von der Proteinkonzentration in Abhängigkeit des entsprechenden p-Werts (t-Test), als Ausdruck für die Signifikanz der Veränderung, wurde jedoch deutlich, dass weder in *sp1* noch in *rpn8a* starke Unterschiede zum WT in der Abundanz einzelner plastidärer Proteine zu verzeichnen waren (Abb. 17C-D). Eine Betrachtung von Proteinen mit einer Funktion in der Photosynthese zeigte, dass diese Proteine keiner deutlichen Regulation unterlagen. Die Photosyntheseproteine sind in grünen Pflanzen enorm abundant, so ergaben sich nach Addition der Konzentrationen aller an der Photosynthese beteiligten Proteine sehr hohe Proteinanteile von ~223600 ppm im WT, ~236300 ppm in *sp1* und ~238350 ppm in *rpn8a*. Von den drei funktionellen Subkategorien der Photosynthese Lichtreaktion, Photorespiration und Calvin-Zyklus war in beiden Mutanten nur die Abundanz von Gesamtproteinen der Lichtreaktion im Vergleich zum WT verändert (Anhang 8 [S. 139]). Aus der Betrachtung der Gesamtheit aller photosynthetischen Proteine ging hervor, dass *sp1* und *rpn8a* im Vergleich zum WT tendenziell ähnlich erhöhte Mengen von an der Lichtreaktion beteiligten Proteinen aufwiesen. Signifikante Änderungen betrafen allerdings nur sehr wenige einzelne Proteine dieser funktionellen Gruppe (Abb. 17C-D). In *sp1* wurden die am PSII beteiligten Proteine PsbR (AT1G79040) und das Plastiden-kodierte PsbC (ATCG00280) in gering veränderten Mengen um das 1,3-Fache bzw. das 1,2-Fache quantifiziert. PsbC wurde auch in *rpn8a* als signifikant verändert identifiziert. Die Konzentrationen der Proteine PsbC, PsbD (ATCG00270) und FNR1 (AT5G66190) waren in *rpn8a* jeweils etwa um das 1,2-Fache im Vergleich zum WT erhöht.

Bei Betrachtung aller Plastidenproteine waren in *sp1* zwei Proteine in ihrer Konzentration um mindestens das 1,5-Fache signifikant ($p \leq 0,05$) verringert: das Ribonukleoprotein Rnp29A (AT3G53460) und FtsH8 (AT1G06430) (Abb. 17). Eine weitere plastidäre Metalloprotease, FtsH5 (AT5G42270), war in *sp1* ebenfalls verändert. FtsH5 wurde sowohl in *sp1* als auch in *rpn8a* in höherer Konzentration als im WT quantifiziert. Obwohl Western-Blot-Analysen eine Steigerung der Konzentration von Toc75 zeigten (Abb. 16), war in den massenspektrometrischen Untersuchungen des Proteoms Toc75-III (AT3G46740) im WT und der *sp1*-Linie ohne quantitativen Unterschied ($\text{ppm}_{sp1}/\text{ppm}_{WT} = 0,94$) identifiziert. Toc33 (AT1G02280) wurde allerdings ausschließlich in *sp1* gefunden.

In *rpn8a* wurden eine kleine Untereinheit der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RbcS2B, AT5G38420) und *RuBisCO accumulation factor 1.1* (Raf1.1, AT5G28500) in signifikant höherer Konzentration identifiziert (Abb. 17). Beide Proteine sind kernkodierte Plastidenproteine. RbcS2B ist

ein Bestandteil der RuBisCO, die essentiell an der CO₂-Fixierung und Photorespiration beteiligt ist. Die korrespondierende, plastidenkodierte große Untereinheit RbcL (ATCG00490) wurde ebenfalls in *rpn8a* identifiziert, unterschied sich aber in ihrer Abundanz nicht von RbcL im WT.

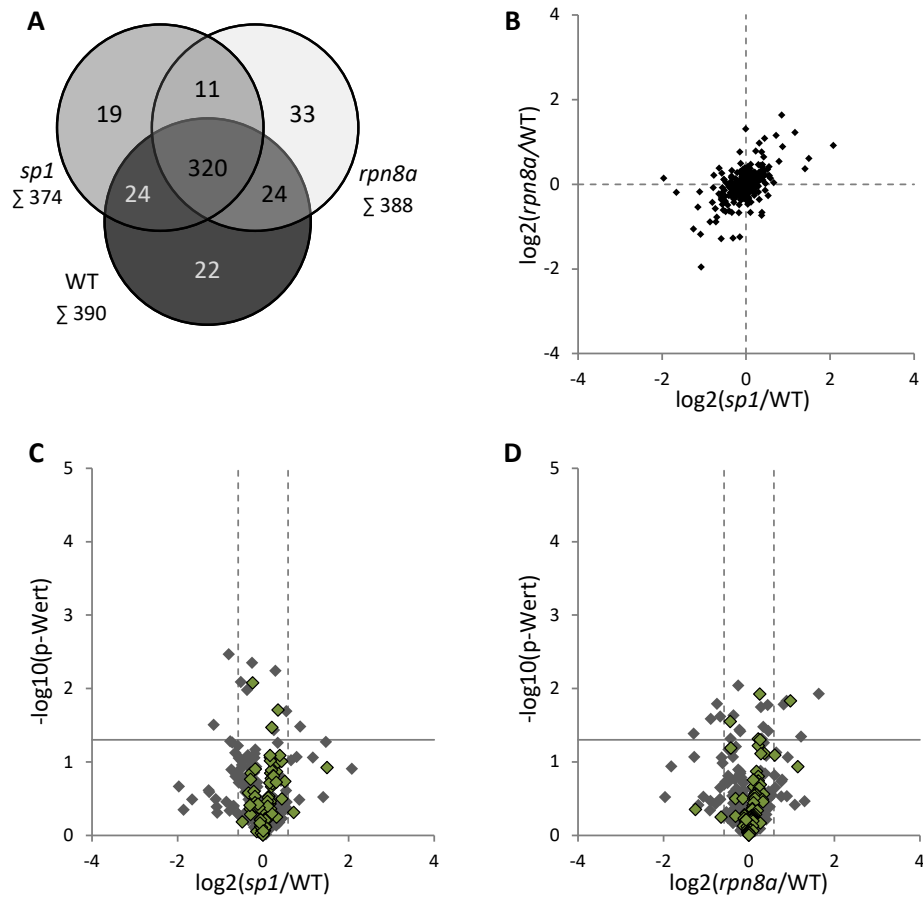


Abb. 17: Plastidproteine der Linien *sp1* und *rpn8a* im Vergleich zum WT

(A) Venn-Diagramm zu MS-Analysen zeigt Plastidproteine von *sp1*, *rpn8a* und dem WT mit Anzahl der Proteine, die in mindestens zwei biologischen und drei technischen Replikaten quantifiziert wurden. (B) Streudiagramm mit 320 plastidären Proteinen, die in allen Linien quantifiziert wurden, vergleicht die Regulation von *sp1* und *rpn8a* im Bezug zum WT. (C) und (D) Streudiagramm zeigt die Regulation quantifizierter Proteine von *sp1* (C) und *rpn8a* (D) im Verhältnis zum WT in Abhängigkeit zum entsprechenden p-Wert (t-Test). Plastidproteine (dunkelgrau), Proteine mit Funktion in der Photosynthese (grün) sowie Grenzen für $p \leq 0,05$ (durchgezogene Linie) und Regulationen $> 1,5$ -fach (gestrichelte Linie) sind dargestellt.

Zusammengefasst sind die Unterschiede in Gesamtproteom und Plastidproteom in den Degradationsmutanten *sp1* und *rpn8a* gegenüber dem WT sehr gering. Es konnte zwar eine deutliche Steigerung der 20S-Proteasom-Untereinheiten und eine leicht erhöhte Konzentration von RbcS2B sowie Raf1.1 in *rpn8a* verzeichnet werden, weitere möglicherweise relevante Veränderungen bei plastidären Proteinen waren unter den gewählten Versuchsbedingungen jedoch nicht zu verzeichnen.

3.4.3 Die Mutation von *Rpn8A* in *ppi2* verbessert die Plastiden strukturell und funktionell

In der Einzelmutante *rpn8a* konnten erste Hinweise auf eine veränderte Proteasom-Komposition und -Aktivität gefunden werden. Der Einfluss auf plastidäre Prozesse war unter den gewählten Versuchsbedingungen allerdings gering. Anders als im WT akkumulierten Vorläufer unter normalen Umständen in der Importmutante *ppi2* (Bischof *et al.*, 2011). Da ein Zusammenhang zwischen plastidären Vorläufern und dem Proteasom besteht, könnte die erhöhte Abundanz von Vorläufern in *ppi2* den Druck auf das Degradationssystem steigern. Durch Kreuzung der Linien *sp1* und *rpn8a* mit *ppi2* sollten Degradations- und Importdefekte in den Doppelmutanten *sp1 ppi2* und *rpn8a ppi2* kombiniert und die Auswirkungen auf Plastiden untersucht werden.

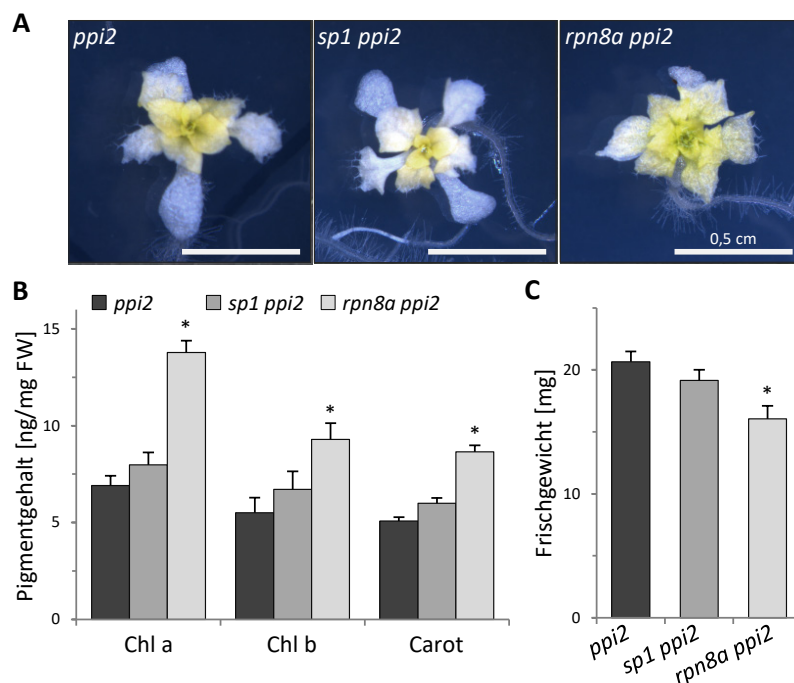


Abb. 18: Eigenschaften der Doppelmutanten im Vergleich zu *ppi2*

(A) Keimlinge, die 32 d auf ½ MS-Medium mit 3% Zucker unter Kurztagbedingungen mit $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Licht angezogen wurden. (B) Mittelwerte mit SEM der Frischgewichte 28 d alter Keimlinge ($n = 66$). * $p \leq 0,001$ (t- Test) (C) Mittelwerte mit SEM des Gehalts von Chlorophyll a (Chl a), Chlorophyll b (Chl b) und Carotinoiden (Carot) pro mg Frischgewicht (FW) in 28 d alten Keimlingen ($n = 18$). * $p \leq 0,001$ (t-Test)

Optisch unterschieden sich die Einzelmutante *ppi2* und die Doppelmutante *sp1 ppi2* nicht voneinander (Abb. 18A). Die Keim- und Folgeblätter der Keimlinge waren gelblich-weiß, nur um das Apikalmeristem gab es Bereiche, die in älteren Pflanzen leicht ergrüneten. Die Mutante *rpn8a ppi2* wurde hingegen kräftiger grün im Vergleich zu *ppi2*. Die Bestimmung der Pigmentkonzentrationen in den Mutanten bestätigte den optischen Eindruck und ergab signifikante Unterschiede zwischen *ppi2*

und *rpn8a ppi2*, aber nicht zwischen *ppi2* und *sp1 ppi2* (Abb. 18B). In der Mutante *rpn8a ppi2* konnte im Vergleich zu *ppi2* eine höhere Konzentration an Chlorophyll a, Chlorophyll b und auch Carotinoiden verzeichnet werden, während der Pigmentgehalt in *sp1 ppi2* der Einzelmutante glich. Die Ermittlung des Frischgewichts zeigte, dass für *rpn8a ppi2*- im Vergleich zu *ppi2*- und *sp1 ppi2*-Keimlingen das Frischgewicht signifikant verringert war (Abb. 18C).

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Mutation von *Rpn8A* Auswirkungen auf die Struktur von Plastiden hat. Es wurden transmissions-elektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen der Plastiden von *ppi2* und *rpn8a ppi2* sowie vom WT und *rpn8a* gemacht (Abb. 19A) und die Anzahl der Granaschichten der jeweils drei größten Granastapel in 153 Plastiden von Mesophyllzellen bestimmt (Abb. 19B). In Chloroplasten des WT sind deutliche interne Membranstrukturen in Form von Stroma- und Granathylakoiden zu erkennen. Eine Quantifizierung der Anzahl der Schichten von Granathylakoiden ergab, dass im WT bis zu 56 Schichten einen Stapel bilden können. Meistens wurden Grana mit 5-15 Schichten (Median 9) beobachtet. Die Plastiden der Degradationsmutante *rpn8a* ähnelten optisch in Größe und Struktur WT-Chloroplasten. Ähnlich zum WT besaß der Großteil der Grana 4-14 Schichten (Median 8).

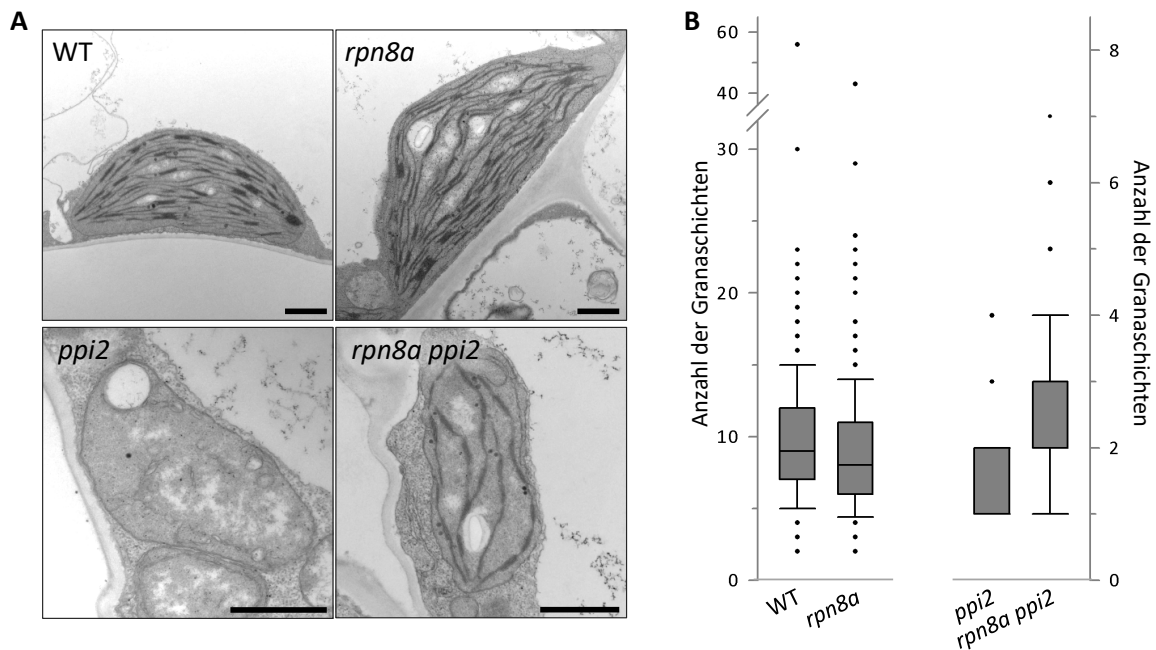


Abb. 19: Verbesserung der Plastidenstruktur in der *rpn8a ppi2* gegenüber *ppi2*

(A) TEM-Aufnahmen von repräsentativen Plastiden 28 d alter Keimlinge. Die Maßstabsbalken entsprechen 1 µm. (B) Von je 153 Plastiden aus Mesophyllzellen, in denen mind. drei Granathylakoide nach dem Schnitt in einer fokussierbaren Ebene lagen, wurden die Schichten der drei höchsten Granastapel pro Plastid gezählt und ihre Verteilung in einem Boxplot dargestellt (n = 459).

In Übereinstimmung mit den Daten von Bauer *et al.* (2000) waren die Plastiden in *ppi2* massiv degeneriert. Differenzierte Membranstrukturen waren nur rudimentär vorhanden. In *ppi2*-Plastiden wurden maximal vier Schichten in einem Grana gezählt. Allerdings besaßen die analysierten Thylakoide fast ausschließlich zwei oder eine Schicht (Median 1). Die Plastiden von *rpn8a ppi2* ähnelten eher *ppi2*-Plastiden als WT-Plastiden. Im Vergleich zu *ppi2* waren die Thylakoidstrukturen in *rpn8a ppi2* jedoch deutlich differenzierter und bildeten ein komplexes, zusammenhängendes Netzwerk. Die Plastiden schienen strukturierter und es war eine eindeutige Stapelung der Thylakoide zu erkennen, die in *ppi2* nahezu vollständig fehlte. In *rpn8a ppi2* konnten Grana beobachtet werden, die aus bis zu sieben Schichten gebildet wurden. Die Verteilung der betrachteten Granathylakoide in *rpn8a ppi2* erstreckte sich über 1-4 Schichten. Für 50% der Grana in der Doppelmutante wurde eine Schichtzahl von 2-3 ermittelt (Median 2). Der Unterschied in der Anzahl der Granaschichten zwischen *ppi2*- und *rpn8a ppi2*-Plastiden war statistisch signifikant (t-Test, $p = 5,78 \times 10^{-15}$).

Die Granathylakoide sind komplexe Strukturen aus zusammenhängenden Intermembranen, in denen besonders viele Pigmente und photosynthetische Komplexe lokalisiert sind. Die deutliche Steigerung der Zahl an Thylakoidstapeln und die erhöhte Konzentration an Chlorophyll a und Chlorophyll b in der Doppelmutante *rpn8a ppi2* im Vergleich zu *ppi2* könnte auch auf funktioneller Ebene Einfluss nehmen. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden Messungen von Photosynthese-Parametern der Mutanten *ppi2*- und *rpn8a ppi2* mit dem *imaging-PAM*-Fluorometer durchgeführt (Abb. 20). Für jede Linie wurden PSII-Parameter von Pflanzen aus drei unabhängigen Anzuchten bestimmt. In dunkeladaptierten Pflanzen wurde zunächst die maximale *PSII Quantum Yield* bestimmt (Abb. 20A). Es zeigte sich im Vergleich der beiden Linien *ppi2* und *rpn8a ppi2* ein signifikanter Unterschied: Die durchschnittliche maximale *PSII Quantum Yield* betrug $0,469 \pm 0,039$ für *ppi2*-Pflanzen und $0,554 \pm 0,085$ für *rpn8a ppi2*-Pflanzen. Auch bei Betrachtung der *PSII operating efficiency* in einer Lichtkurve zeigte sich eine gesteigerte Photosyntheseleistung der *rpn8a ppi2*-Pflanzen im Vergleich zu *ppi2* nach Adaption an PAR zwischen $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und $458 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Abb. 20A). Ab einer PAR von $285 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ glichen sich die *PSII Quantum Yield* beider Linien immer näher an. Bei der Ermittlung des NPQ wies die Doppelmutante durchschnittlich höhere Werte auf als die Einzelmutante (Abb. 20B). Mit steigender PAR stieg die Differenz im NPQ, anders als die der *PSII operating efficiency*, stetig an. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Experimenten waren sehr groß, was der Grund für die hohen Standardabweichungen der Messwerte ist. Das NPQ der Linie *rpn8a ppi2* war in jedem biologischen Replikat jedoch stets höher als das von *ppi2*.

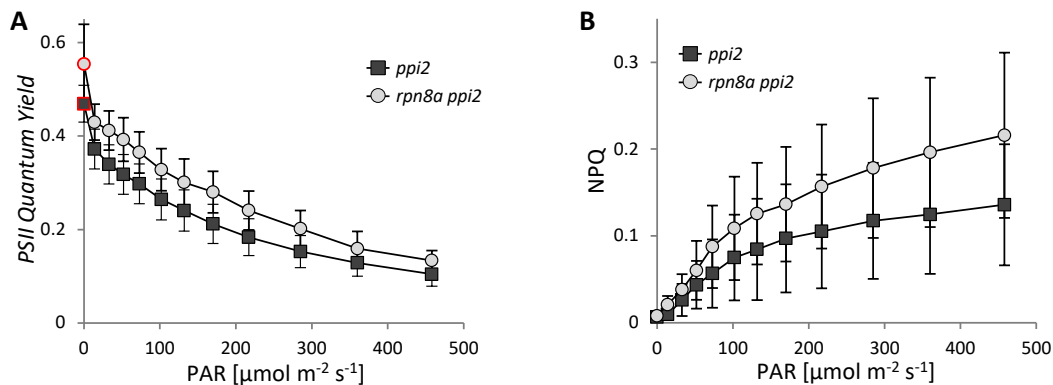


Abb. 20: Funktionelle Veränderung des PSII in *rpn8a ppi2* und *ppi2*

Mit *imaging-PAM*-Fluorometer erstellte Lichtkurven, mit *photosynthetically active radiation* (PAR) von $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bis $458 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 42 d alter *ppi2*- und *rpn8a ppi2*-Keimlinge. Dargestellt sind (A) die PSII Quantum Yield mit maximaler PSII Quantum Yield (rot umrandet) sowie (B) das *non-photochemical quenching* (NPO). Die Messpunkte entsprechen Mittelwerten ($n = 18$) mit SD.

3.4.4 *sp1 ppi2* und *rpn8a ppi2* sind auf Proteinebene divergent gegenüber *ppi2* verändert

Die Mutation der Gene für die 26S-Proteasom-Untereinheit Rpn8A und die Importkomponente Toc159 in der Doppelmutante *rpn8a ppi2* führte auf Ebene des Phänotyps zu einer deutlichen Veränderung in der Plastidenstruktur und im Pigmentgehalt von *rpn8a ppi2* im Vergleich zu *ppi2*. Photosynthetische Parameter waren in der Doppelmutante gegenüber der Einzelmutante ebenfalls signifikant verändert. Die Doppelmutante *sp1 ppi2* zeigte keine deutliche Komplementation des Phänotyps von *ppi2*. Eine quantitative massenspektrometrische Analyse des Gesamtproteins aus Keimlingen der Linien *sp1 ppi2* und *rpn8a ppi2* im Vergleich zu *ppi2*, sollte Aufschluss über Mechanismen und Hintergründe der phänotypischen Unterschiede auf Proteinebene geben. Identifizierte Proteine wurden nach den stringenten Kriterien selektiert, die auch für Analysen in WT, *sp1* und *rpn8a* galten (Kapitel 3.4.2 [S. 63]).

Eine Zahl von 2322 verschiedenen *Arabidopsis*-Proteinen konnte in den Linien *ppi2*, *sp1 ppi2* und *rpn8a ppi2* quantifiziert werden (Abb. 21A; digitaler Anhang). Die Anzahl der verschiedenen identifizierten Proteine war in *rpn8a ppi2* mit 2023 Proteinen am höchsten. In *ppi2* und *sp1 ppi2* wurden 1940 und 1963 verschiedene Proteine identifiziert. Aus der Gesamtheit aller Proteine enthielt die Schnittmenge der drei untersuchten Linien 1668 Proteine.

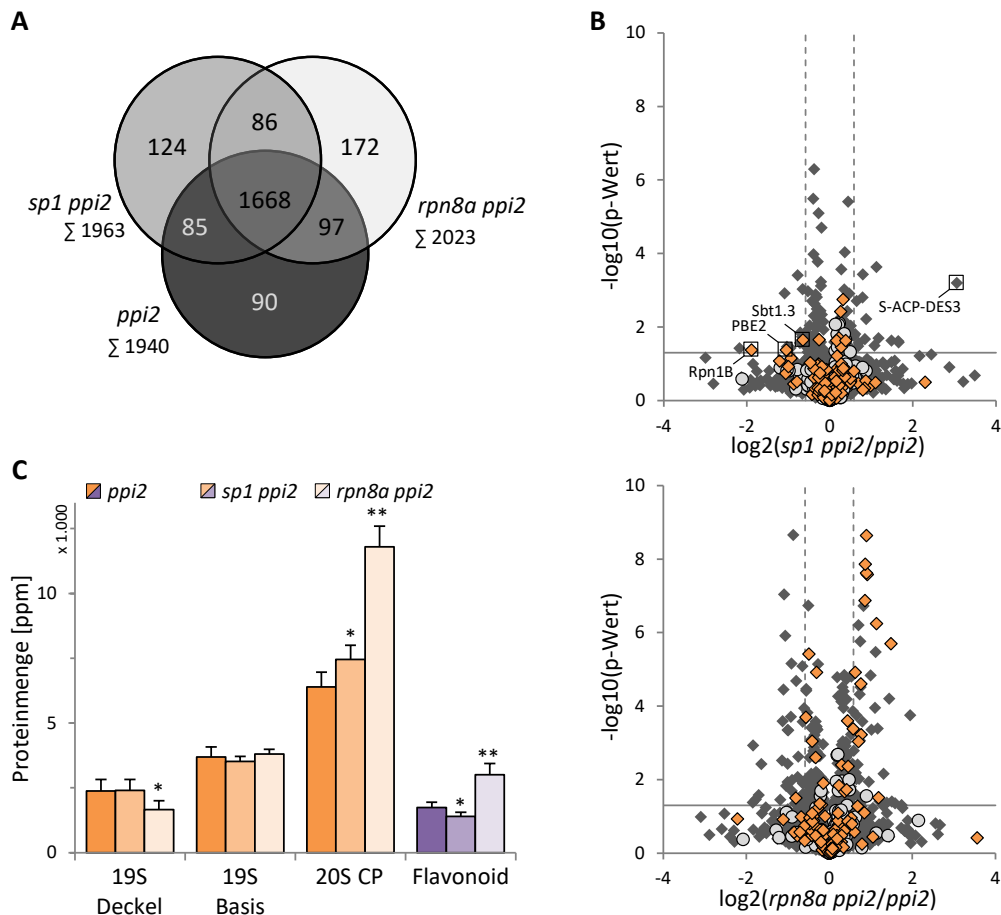


Abb. 21: Gesamtproteom der Linien *sp1 ppi2* und *rpn8a ppi2* im Vergleich zu *ppi2*

(A) Venn-Diagramm zu MS-Analysen des Gesamtproteoms von *sp1 ppi2*, *rpn8a ppi2* und *ppi2* mit Anzahl der Proteine, die in mindestens zwei biologischen und drei technischen Replikaten quantifiziert wurden. (B) Streudiagramme zeigen die Regulation quantifizierter Proteine von *sp1 ppi2* (oben) und *rpn8a ppi2* (unten) im Verhältnis zu *ppi2* in Abhängigkeit zum entsprechenden p-Wert (t-Test). Gesamtproteine (dunkelgrau), Proteine mit Funktion in der Proteindegradation (orange) und der Proteinsynthese (hellgrau) sowie Grenzen für $p \leq 0,05$ (durchgezogene Linie) und Regulationen $> 1,5$ -fach (gestrichelte Linie) sind dargestellt. (C) Gemittelte Abundanzen mit SD der Gesamtheit aller quantifizierten Untereinheiten der Komponenten des 26S-Proteasoms (orange) und an der Flavonoidbiosynthese beteiligter Proteine (violett) aus massenspektrometrischen Analysen ($n = 9$) mit *ppi2*, *sp1 ppi2* und *rpn8a ppi2*. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$

Um die Signifikanz von Veränderungen in der Abundanz einzelner Proteine zu verdeutlichen, wurde das Verhältnis der Proteinkonzentrationen der Proteine der Linien *sp1 ppi2* und *rpn8a ppi2* zu *ppi2* in Abhängigkeit ihres p-Werts (t-Test) dargestellt (Abb. 21B). Ein Vergleich der so entstandenen Streudiagramme für *sp1 ppi2* und *rpn8a ppi2* zeigte, dass *sp1 ppi2* gegenüber *ppi2* weniger signifikante Veränderungen aufwies als *rpn8a ppi2*. In *sp1 ppi2* überschritten nur wenige Proteine die gesetzten Grenzwerte, die eine Regulation um mindestens das 1,5-Fache im Vergleich zu *ppi2* und einen Signifikanzwert von $p \leq 0,05$ vorgaben. Vierzehn Proteine waren nach den genannten Kriterien in *sp1 ppi2* signifikant runter- und 15 Proteine signifikant hochreguliert. Unter den runterregulierten Proteinen waren drei Proteine, die eine Rolle in der Proteindegradation spielen: eine Untereinheit in

der Basis des 19S RP Rpn1B (AT4G28470), eine Beta-Untereinheit des 20S CP PBE2 (AT3G26340) und Subtilase 1.3 (Sbt1.3; AT5G51750) (Abb. 21B). Für Rpn1B konnte auch in *rpn8a ppi2* eine Reduzierung auf die Hälfte der Proteinmenge verglichen mit *ppi2* festgestellt werden. Für PBE2 wurde eine 1,5-fache Steigerung der Proteinkonzentration verzeichnet. Beide Änderungen waren in *rpn8a ppi2* nicht signifikant. Subtilase 1.3 wurde in *rpn8a ppi2* im Gegensatz zu Beobachtungen in *sp1 ppi2* signifikant hochreguliert. Die *stearoyl-acyl carrier protein-desaturase 3* (S-ACP-DES3, AT5G16230) wurde in *sp1 ppi2* ebenfalls als signifikant verändert beobachtet. Das Protein ist an der Fettsäure-Biosynthese im Chloroplasten beteiligt (Kachroo *et al.*, 2006). Die Proteinkonzentration der S-ACP-DES3 war in *sp1 ppi2* im Vergleich zu *ppi2* um das 8-Fache erhöht, während in *rpn8a ppi2* keine signifikante Änderung festzustellen war. Insgesamt waren nur fünf Proteine in *sp1 ppi2* und *rpn8a ppi2* gegenüber *ppi2* signifikant gleichermaßen reguliert. Sie sind in Anhang 9 [S. 139] aufgeführt.

Bei Betrachtung des gesamten Proteoms wurden in *rpn8a ppi2* 82 Proteine identifiziert, die mit einem Signifikanzwert von $p \leq 0,05$ im Vergleich zu *ppi2* mindestens 1,5-fach in ihrer Konzentration verändert waren. Darunter waren 46 Proteine hochreguliert (Anhang 10 [S. 140]) und 36 Proteine runterreguliert (Anhang 11 [S. 142]). Die relevant veränderten Proteine ließen sich funktionellen Gruppen (BINs) zuordnen. Funktionelle Gruppen, in denen mehrere Proteine ähnlich reguliert sind, waren von besonderem Interesse, da diese auf die biologischen Auswirkungen der Mutation hinweisen könnten (Abb. 22). Die meisten hochregulierten Proteine gehörten den funktionellen Gruppen Proteinmetabolismus (BIN 29), Sekundärmetabolismus (BIN 16) und Photosynthese (BIN 1) an. Runterregulierte Proteine waren funktionell häufig den BINs Aminosäuremetabolismus (BIN 13), Stress (BIN 20) und sonstige Enzymfamilien (BIN 26) zugeordnet. Sechs hoch- und vier runterregulierte Proteine sind funktionell bislang unzureichend charakterisiert (BIN 35, nicht zugeordnet). Diese Proteine wiesen keine offensichtlichen Gemeinsamkeiten auf.

Der größte Anteil der hochregulierten Proteine ist an Prozessen, den Proteinmetabolismus betreffend, speziell an der Proteindegradation, beteiligt (Abb. 21B; Abb. 22). Unter den 13 signifikant veränderten Proteinen in *rpn8a ppi2* mit Funktion in der Degradation sind 11 Komponenten der katalytischen 20S-Proteasomeinheit. In allen drei Albinomutanten wurden je neun Alpha-Untereinheiten des 20S CP quantifiziert. In *ppi2* wurden außerdem acht, in *sp1 ppi2* zehn und in *rpn8a ppi2* sogar alle elf von Book *et al.* (2010) in *A. thaliana* beschriebenen Beta-Untereinheiten identifiziert, sodass die Proteomanalysen ein nahezu vollständiges Bild der Proteine des 20S CP lieferten. Sechs der in *rpn8a ppi2* und *ppi2* quantifizierten Alpha- und fünf der Beta-Untereinheiten waren mehr als 1,5-fach höher abundant in der Doppelmutante als in der Einzelmutante. Eine Addition aller 20S CP-Untereinheiten in den Albinomutanten zeigte eine 1,8-fache Steigerung der

ERGEBNISSE

Abundanz der katalytischen Proteasomeinheit in *rpn8a ppi2* in Bezug zu *ppi2* (Abb. 21C). In *sp1 ppi2* wurde zwar PBE2 als Beta-Untereinheit des 20S CP als signifikant geringer konzentriert beobachtet, in Summe wurde dennoch auch in *sp1 ppi2* mehr der katalytischen 20S-Proteasomeinheit quantifiziert als in *ppi2*. Das 20S CP war in Summe 1,2-fach in *sp1 ppi2* gegenüber *ppi2* erhöht.

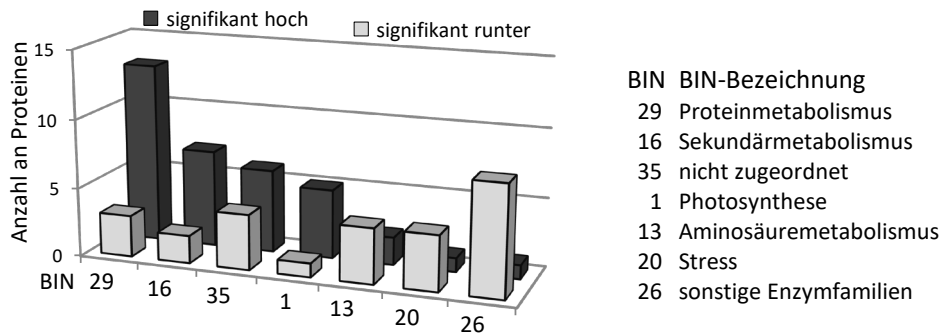


Abb. 22: Funktionelle Gruppierung signifikant veränderter Proteine in *rpn8a ppi2*

Anzahl der Proteine aus *rpn8a ppi2*, die in MS-Analysen gegenüber *ppi2* signifikant mind. 1,5-fach hoch- oder runterreguliert waren ($p \leq 0,05$), wurden *mapman*-Funktionsgruppen (BIN) zugeordnet. Dargestellt sind die Anzahl der Proteine von Funktionsgruppen, die mind. drei hoch- bzw. runterregulierte Proteine enthielten.

Die gesteigerte Abundanz der katalytischen Einheit des 26S-Proteasoms in den Doppelmutanten korrelierte allerdings nicht mit der Regulation der 19S-Einheit (Abb. 21C). Proteine des Deckels der regulatorischen 19S-Proteasomeinheit waren in der Gesamtheit signifikant geringer abundant speziell in *rpn8a ppi2* verglichen mit *ppi2* und *sp1 ppi2*, während die Abundanz der 19S RP-Basis in Summe unverändert in allen drei Albinomutanten war. Diese Beobachtungen weisen auf eine unabhängige Regulation der Hauptbestandteile des 26S-Proteasoms hin, die spezifisch in *rpn8a ppi2* zur deutlichen Steigerung des 20S CP und Reduzierung des 19S Deckels führte. Dabei wiesen sieben quantifizierte Untereinheiten des Deckels eine reduzierte Abundanz in *rpn8a ppi2* auf und zwei wurden ausschließlich in *ppi2* identifiziert, darunter Rpn8A. Das Homologe Rpn8B (AT3G11270) wurde hingegen nur in *rpn8a ppi2* identifiziert und war somit die einzige Untereinheit des Deckels, für die eine in Bezug zu *ppi2* höhere Abundanz angenommen werden kann. Rpn8B erreichte allerdings nur die 0,7-fache Konzentration im Vergleich zu Rpn8A in *ppi2* (Anhang 12 [S. 144]).

Den zweitgrößten Anteil an signifikant gegenüber *ppi2* hochregulierten Proteinen in *rpn8a ppi2* nahmen sieben Proteine, die der Funktionsgruppe Sekundärmetabolismus (BIN 16) zugeordnet sind, ein (Abb. 22). Interessanterweise sind vier dieser Proteine an der Flavonoidbiosynthese beteiligt. Flavonoide sind eine Gruppe von sekundären Pflanzenstoffen, die ausgehend von Coumaroyl-Coenzym A aus der Phenylpropanoid-Biosynthese und Malonyl-Coenzym A synthetisiert werden. In *A. thaliana* existieren 54 verschiedene Flavonole, Anthocyane und Proanthocyane (Saito *et al.*, 2013),

an deren Synthese und Modifikation zahlreiche Enzyme beteiligt sind. Eine Addition der Proteinkonzentrationen aller an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Enzyme in den Albinolinien zeigte, dass diese Proteine im Vergleich zu *ppi2* spezifisch in *rpn8a ppi2* höher abundant waren, während sie in *sp1 ppi2* in ihrer Gesamtheit sogar leicht reduziert waren (Abb. 21C). Ein Schlüsselenzym der Synthese, die Chalkonsynthase (CHS, AT5G13930), wurde ausschließlich in *rpn8a ppi2* identifiziert. Die Chalkonisomerase (CHI, AT3G55120) war im Vergleich zu *ppi2* signifikant 1,2-fach erhöht und das ihr funktionell ähnliche Protein *CHI-Like 1* (AT5G05270) wurde wiederum nur in *rpn8a ppi2* quantifiziert. Auch die Flavon-3-Hydroxylase (F3H, AT3G51240) und die Flavonol-Synthase (FLS, AT5G08640) sind Enzyme, die an der Synthese des Flavonoidgrundgerüsts beteiligt sind und in *rpn8a ppi2* signifikant 1,7-fach und 2,0-fach gegenüber *ppi2* erhöht waren. Außerdem wurden die beiden Glycosyltransferasen Flavonoid 3-O-glucosyltransferase (Ugt78D2, AT5G17050) und Flavonol 7-O-rhamnosyltransferase (Ugt89C1, AT1G06000) signifikant in der 1,7- bzw. 1,6-fachen Konzentration bezogen auf *ppi2* quantifiziert.

Eine weitere Gruppe gegenüber *ppi2* signifikant deutlich höher abundanter Proteine in der Doppelmutante *rpn8a ppi2* stellten Proteine dar, die an der Photosynthese (*BIN 1*) beteiligt sind (Abb. 22). Insgesamt wurden in den Albinolinien 446 Proteine identifiziert, die in Plastiden lokalisiert sind (Abb. 23A). Die größte Anzahl plastidärer Proteine, von 401 Proteinen, wurde in *rpn8a ppi2* identifiziert. In *sp1 ppi2* sind 378 und in *ppi2* sind 363 in Plastiden lokalisierte Proteine identifiziert worden. In einer Darstellung der Signifikanz in Abhängigkeit von der Regulation in der jeweiligen Doppelmutante im Vergleich zu *ppi2* wurde ersichtlich, dass in *sp1 ppi2*, anders als in *rpn8a ppi2*, plastidäre Proteine kaum einer relevanten Regulation im Vergleich zu *ppi2* unterlagen (Abb. 23B).

In *rpn8a ppi2* zeigten sich insbesondere einige photosynthetische Proteine signifikant gegenüber *ppi2* hochreguliert. Zweiundsechzig der 446 Plastidenproteine besaßen eine Funktion in der Photosynthese. Darunter zählten Proteine, die eine Rolle in der Lichtreaktion, dem Calvin-Zyklus oder der Photorespiration spielen. Eine Addition der Konzentrationen von Proteinen der funktionellen Photosynthese-Subgruppen in *ppi2* und den beiden Doppelmutanten, verdeutlichte eine signifikante Steigerung der Abundanz von Proteinen, die an der Lichtreaktion beteiligt sind, in *rpn8a ppi2* (Abb. 23C). Dabei wurden in *ppi2* die Konzentrationen von 24, in *sp1 ppi2* von 20 und in *rpn8a ppi2* von 33 der insgesamt 35 quantifizierten Proteine der Lichtreaktion addiert. Die gemeinsame Schnittmenge umfasste 19 Proteine, die in allen drei Albinolinien identifiziert wurden. Somit sind elf an der Lichtreaktion beteiligte Proteine ausschließlich in *rpn8a ppi2* und nicht in *ppi2* oder *sp1 ppi2* quantifiziert worden, was auf eine höhere Abundanz dieser Proteine in *rpn8a ppi2* hinweist (Tab. 12). Darunter befanden sich sowohl kernkodierte als auch plastidenkodierte Proteine. Beispielsweise wurden die Proteine D1 (ATCG00020, *psbA*) und D2 (ATCG00270, *psbD*), welche die Reaktionszentren

des PSII bilden, ausschließlich in *rpn8a ppi2* nachgewiesen. Auch andere plastidenkodierte, an lichtinduzierten, photochemischen Prozessen beteiligte Proteine, wie CP43 (ATCG00280, psbC) und Cytochrome f (ATCG00450, petA) sowie die kerncodierten Untereinheiten des PSI *psaD2* (AT1G03130), *psaE2* (AT2G20260) und *psaN* (AT5G64040) wurden spezifisch in *rpn8a ppi2* und nicht in *sp1 ppi2* oder *ppi2* identifiziert. Die gesteigerte Abundanz der Lichtreaktion zugeordneter Proteine geht jedoch nicht allein auf die höhere Zahl an identifizierten Proteinen zurück. Auch bei Betrachtung der 19 in allen Linien quantifizierten Proteine, bleibt der Unterschied von *rpn8a ppi2* im Vergleich zu den beiden anderen Albinomutanten signifikant.

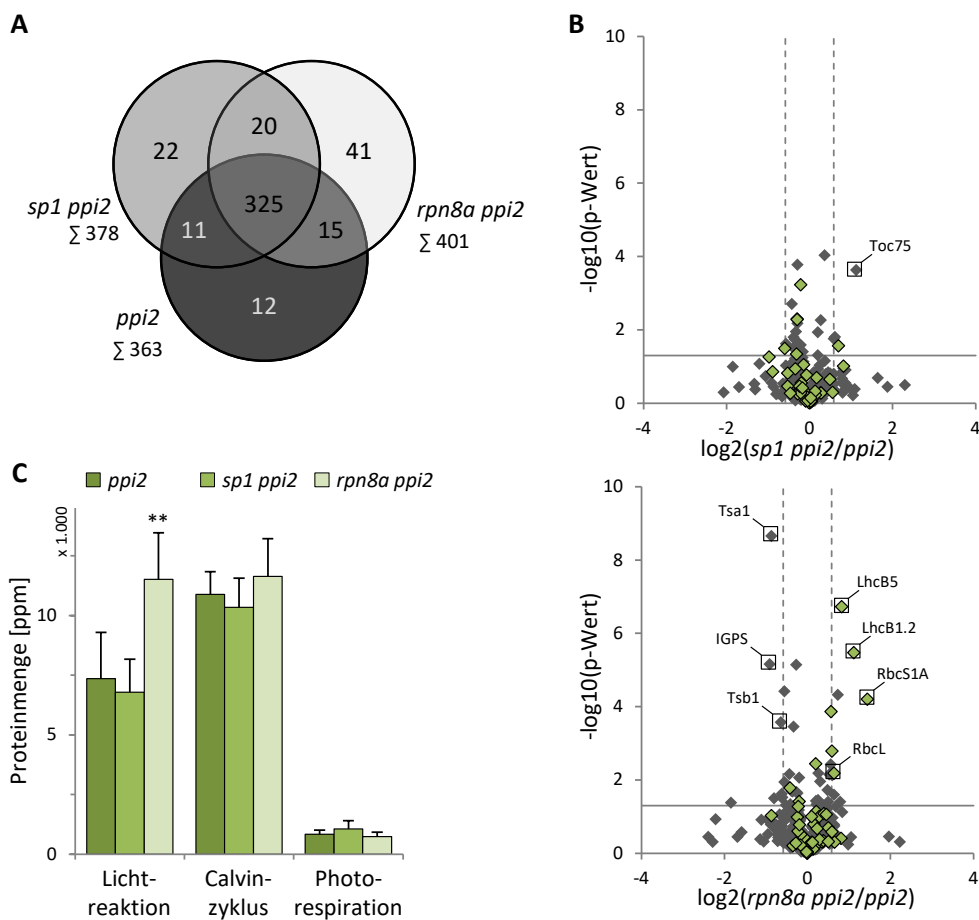


Abb. 23: Plastidproteine der Linien *sp1 ppi2* und *rpn8a ppi2* im Vergleich zu *ppi2*

(A) Venn-Diagramm zu MS-Analysen zeigt Plastidproteine von *sp1 ppi2*, *rpn8a ppi2* und *ppi2* mit Anzahl der Proteine, die in mindestens zwei biologischen und drei technischen Replikaten quantifiziert wurden. (B) Streudiagramme zeigen die Regulation quantifizierter Plastidproteine von *sp1 ppi2* (oben) und *rpn8a ppi2* (unten) im Verhältnis zu *ppi2* in Abhängigkeit zum entsprechenden p-Wert (t-Test). Plastidproteine (dunkelgrau) und Proteine mit Funktion in der Photosynthese (grün) sowie Grenzen für $p \leq 0,05$ (durchgezogene Linie) und Regulationen $> 1,5$ -fach (gestrichelte Linie) sind dargestellt. (C) Gemittelte Abundanzen mit SD der Gesamtheit aller plastidären Proteine, die Funktionen in der Photosynthese haben, aus massenspektrometrischen Analysen ($n = 9$) mit *ppi2*, *sp1 ppi2* und *rpn8a ppi2*; ** $p \leq 0,001$

ERGEBNISSE

Unter den gemeinsam in *ppi2* und *rpn8a ppi2* identifizierten Proteinen der Lichtreaktion finden sich drei Proteine, die in der Doppelmutante mehr als 1,5-fach höher in Bezug auf *ppi2* reguliert sind (Tab. 12). Zwei dieser Proteine gehören zum LHCII. Lhcb1.2 (AT1G29910) und Lhcb5 (AT4G10340) sind kernkodierte Chlorophyll a/b-Bindeproteine, die im LHCII, in den Granathylakoiden assoziiert mit den Photosystemen, bei der Aufnahme und dem Transfer von Lichtenergie für photochemische Prozesse eine Rolle spielen. Das in *rpn8a ppi2* 1,5-fach gesteigerte Protein *non-photochemical quenching 4* (NPQ4, PsbS, AT1G4457) gehört ebenfalls zur Familie der Chlorophyll a/b-Bindeproteine. Es ist an der Regulation der photoprotektiven Ableitung absorbiertes Lichtenergie in Form von Wärme (NPQ) involviert (Li *et al.*, 2000).

Tab. 12: Signifikant 1,5-Fach verändert sowie ausschließlich in *rpn8 ppi2* identifizierte Proteine der Lichtreaktion (BIN 1.1) und RuBisCO

AGI-Locus	Protein	Komplex	Funktion ^a	<i>rpn8a ppi2</i> ^b	p-Wert ^c
AT1G29910	Lhcb1.2	LHCII	Lichtsammelkomplex-II	2,73	6,29 x 10 ⁻⁵
AT4G10340	Lhcb5			1,77	1,88 x 10 ⁻⁷
AT1G15820	Lhcb6			+	
AT1G44575	psbS	Photosystem II	Photoprotektion des PSII	1,51	1,63 x 10 ⁻³
ATCG00020	psbA, D1		PSII-Reaktionszentrum	+	
ATCG00270	psbD, D2			+	
ATCG00280	psbC, CP43		bindet Chlorophyll und stellt Liganden für OEC bereit	+	
AT2G30790	psbP2		putative Regulation des OEC	+	
AT1G03600	psb27-H1		PSII-Reparatur	+	
ATCG00540	petA, Cytochrom f		Cytochrom b6-f	Elektronentransfer	+
AT3G47470	Lhca4	Photosystem I	Lichtsammelkomplex-I	+	
AT1G03130	psaD2		bindet Fd und FNR an PSI	+	
AT2G20260	psaE2		stabilisiert Interaktion von psaC und PSI-Kern	+	
AT5G64040	psaN		ermöglicht Interaktion zwischen Plastocyanin und PSI	+	
AT1G67090	RbcS1A	RuBisCO	CO ₂ -Fixierung	2,17	3,37 x 10 ⁻⁶
ATCG00490	RbcL		Photorespiration	1,56	6,59 x 10 ⁻³

^a entnommen aus uniprot.org; ^b Verhältnis der Proteinmengen ppm_{*rpn8a ppi2*}/ppm_{*ppi2*}; ^c p-Wert errechnet mit t-Test; + ausschließlich in *rpn8a ppi2* identifiziert

ERGEBNISSE

Die Anzahl der identifizierten Proteine, die dem Calvin-Zyklus und der Photorespiration zugeordnet sind, war in allen drei Albinolinien vergleichbar (Abb. 23C). Die Gesamtheit der Proteine, die im Zusammenhang mit diesen Prozessen stehen, waren in beiden Doppelmutanten *sp1 ppi2* und *rpn8a ppi2* verglichen mit *ppi2* nicht verändert. Dennoch waren die Proteinkonzentrationen von zwei dem Calvin-Zyklus zugeordneten RuBisCO-Untereinheiten, die kleine Untereinheit RbcS1A (AT1G67090) und die plastidenkodierte RbcL (ATCG00490), in *rpn8a ppi2* gegenüber *ppi2* signifikant 2,2- bzw. 1,6-Fach erhöht (Tab. 12).

Western-Blot-Analysen bestätigten die erhöhte Abundanz von photosynthetischen Proteinen, insbesondere von Lhcb4 und des D1-Proteins, in *rpn8a ppi2* im Vergleich zu *ppi2* und *sp1 ppi2* (Abb. 24). Die Abundanz der Importkomponenten Toc75 und Toc132 war hingegen spezifisch in *sp1 ppi2* gesteigert. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung konnte in den MS-Analysen Toc75-III (AT3G46740) in *sp1 ppi2* signifikant 2,2-fach höher konzentriert im Vergleich zu *ppi2* quantifiziert werden, während es in *rpn8a ppi2* gegenüber *ppi2* unverändert war (Abb. 23B). Des Weiteren wurden in den Proben der Albinolinien drei Untereinheiten des TOC-Komplexes gefunden. Toc33 (AT1G02280) und Toc34 (AT5G05000) wurden ausschließlich in *sp1 ppi2*, nicht aber in *ppi2* oder *rpn8a ppi2* quantifiziert. Die zwei massenspektrometrisch identifizierten Proteine der inneren Chloroplastenhüllmembran Tic110 (AT1G06950) und Tic40 (AT5G16620) waren quantitativ in allen drei Mutanten vergleichbar.

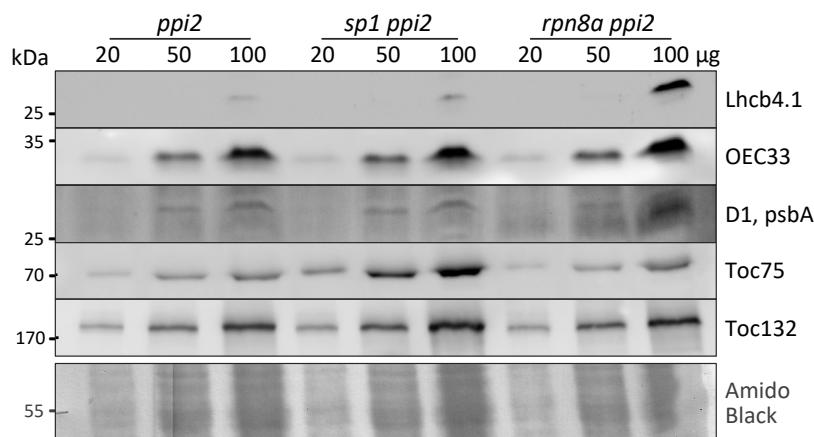


Abb. 24: Immunologischer Nachweis plastidärer Proteine in *ppi2*, *sp1 ppi2* und *rpn8a ppi2*

Nachweis ausgewählter plastidärer Proteine mit spezifischen Antikörpern mit einer Western-Blot-Analyse in 20 µg, 50 µg und 100 µg des Gesamtproteins aus 28 d alten *ppi2*-, *sp1 ppi2* und *rpn8a ppi2*, ein Teil der Membran mit *Amido Black* gefärbten Proteinen ist als Ladekontrolle gezeigt.

Unter den in *rpn8a ppi2* signifikant mindestens das 1,5-Fache in ihrer Proteinmenge verminderten Proteinen, waren vier Proteine, die eine Rolle im Aminosäuremetabolismus (*BIN 13*) spielen (Abb. 22). Die Proteine Indol-3-Glycerol-Phosphat-Synthase (IGPS, AT2G04400), Tryptophan-Synthase Alpha 1 (Tsa1, AT3G54640) und Tryptophan-Synthase Beta 1 (Tsb1, AT5G54810) wurden mehr als das 1,5-Fache verringert in *rpn8a ppi2* quantifiziert (Abb. 23B). Sie sind an der Synthese der aromatischen Aminosäure Tryptophan beteiligt und waren in *sp1 ppi2* gegenüber *ppi2* nicht verändert. Ein weiteres Enzym dieses Syntheseweges Anthranilat-Synthase Alpha 1 (Asa1, AT5G05730) wurde in *ppi2* und *sp1 ppi2*, nicht aber in *rpn8a ppi2* identifiziert. Möglicherweise sind diese Beobachtungen ein Hinweis auf eine Veränderung des Aminosäure-Metabolismus in *rpn8a ppi2*.

Zusammengefasst zeigten sich in *sp1 ppi2* und *rpn8a ppi2* in Bezug auf die Einzelmutante *ppi2* nur wenige Gemeinsamkeiten in der Regulation des Proteoms. In *sp1 ppi2* waren meist nur einzelne Proteine im Vergleich zu *ppi2* verändert. Allerdings wurden auch drei Komponenten des TOC-Komplexes ausschließlich oder signifikant höher abundant in *sp1 ppi2* nachgewiesen. In *rpn8a ppi2* wurden mehrere, funktionell zusammengehörige Proteine analog reguliert. Dabei wurden sowohl Proteine des 20S-Proteasoms und der Flavonoidbiosynthese als auch der Photosynthese-Lichtreaktion gegenüber *ppi2* höher abundant nachgewiesen, die im Zusammenhang mit dem divergenten Phänotyp der Doppelmutante stehen könnten. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung wurden bestärkt durch Western-Blot-Analysen, in denen festgestellt werden konnte, dass Lhcb4, ein Protein des LHCII und D1, höher abundant in *rpn8a ppi2* waren, verglichen mit *ppi2* und *sp1 ppi2*. Außerdem zeigte der immunologische Nachweis von Komponenten des TOC-Komplexes, dass Toc132 wenig, Toc75 hingegen deutlich vermehrt in *sp1 ppi2* nachweisbar im Vergleich zu *ppi2* und *rpn8a ppi2* war, was sich ebenfalls mit den MS-Daten deckt. Bei OEC33 (At3g50820/At5g66570) zeigten sich weder im Western-Blot noch in den massenspektrometrischen Untersuchungen Differenzen zwischen den Doppelmutanten und der Einzelmutante *ppi2*. Des Weiteren wurde eine reduzierte Konzentration von Enzymen des Aminosäure-Metabolismus, speziell der Tryptophan-Biosynthese, festgestellt. Möglicherweise ist dies ein erster Hinweis auf den beobachteten Wachstumsphänotyp, der im Kontrast zu der verbesserten Plastiden-Konstitution steht. Listen aller um das $\geq 1,5$ -Fache signifikant hoch- bzw. runterregulierten Proteine in *rpn8a ppi2* in Bezug auf *ppi2* sind im Anhang 10 [S. 140] und Anhang 11 [S. 142] zu finden.

3.5 Untersuchungen zur Aufklärung funktioneller Mechanismen in *rpn8a*-Mutanten

Die Mutation von *Rpn8A* hatte in der Einzelmutante *rpn8a* kaum Auswirkungen auf den Phänotyp. Die sekundäre Mutation der regulatorischen 26S-Untereinheit in *ppi2* führte hingegen zu einer

Verbesserung physiologischer und funktioneller Eigenschaften der Plastiden, die auf nachweisliche Veränderungen des Proteoms zurückgehen. Im Folgenden soll untersucht werden, welcher mechanistische Zusammenhang zwischen dem veränderten Proteasom und den plastidären Prozessen bestehen könnte.

3.5.1 Quantitative Transkriptanalysen zu plastidären und UPS-zugehörigen Proteinen weisen auf differenzielle Regulationsmechanismen hin

Die Proteomanalysen zeigten in *rpn8a ppi2* Änderungen im Vergleich zu *ppi2*, die sowohl cytosolische als auch plastidäre Proteine betrafen. Die differenzielle Regulation der entsprechenden Proteine kann auf verschiedenen Ebenen stattfinden: eine Regulation auf Transkriptebeine, indem veränderte Transkriptmengen zu einer veränderten Proteinabundanz führen, oder eine posttranslationale Regulation auf Proteinebene, die auf einer veränderten Stabilität der Proteine basiert. Die gezielte Analyse der Transkriptmengen ausgewählter Gene, die für plastidenlokalisierte oder UPS-zugehörige Proteine kodieren, in *rpn8a* und *rpn8a ppi2* in Relation zu den Kontroll-Linien WT und *ppi2* mittels qRT-PCR, sollte näheren Aufschluss über die Regulationsebene geben, die der Änderung der Proteinmenge zu Grunde liegt.

Transkriptanalysen zu plastidären Proteinen

Eine Steigerung der Proteinmenge konnte sowohl für importierte als auch für in Plastiden synthetisierte Proteine der Photosynthese gezeigt werden. Bei der Initiation der Transkription plastidärer Gene spielen Sigma-Faktoren eine entscheidende Rolle. Um die mögliche Beteiligung von Sigma-Faktoren als Regulatoren der Transkription zu untersuchen, wurden zur quantitativen Analyse der Transkripte in WT, *rpn8a*, *ppi2* und *rpn8a ppi2* die Plastidengene *Rbcl*, *psbA* und *psaJ*, *psbN* sowie *ndhF* einbezogen. Die Expression jedes dieser Gene weist eine spezifische, wenn auch nicht absolute Abhängigkeit von einem Sigma-Faktor auf (SIG1/*Rbcl*, SIG2/*psbA* und *psaJ*, SIG3/*psbN* und SIG4/*ndhF*) (Privat *et al.*, 2003; Favory, 2005; Zghidi *et al.*, 2007; Nagashima *et al.*, 2014; Chi *et al.*, 2015). Die analysierte cDNA wurde durch reverse Transkription von RNA aus 28 d alten Pflanzen gewonnen. Als Referenz-Gen wurde *Aktin 7* (AT5G09810) gewählt, für das in den Proteomanalysen keine quantitative Veränderung auf Proteinebene verzeichnet wurde.

Die Auswertung der qRT-PCR zeigte, dass die Transkripte der fünf plastidären Gene in der WT-ähnlichen Mutante *rpn8a* erhöht in Bezug zum WT vorlagen (Abb. 25). Für die Transkriptmenge von *Rbcl* war der Unterschied in *rpn8a* im Vergleich zum WT signifikant, während in der Doppelmutante *rpn8a ppi2* in Bezug auf *ppi2* eine tendenziell verringerte Transkriptmenge ermittelt wurde. Ein Vergleich der Regulation der Expression von *psaJ*, *psbA*, *psbN*, *ndhF* und *Rbcl* in *ppi2* und *rpn8a ppi2*

zeigte keine Steigerung der Transkriptlevel in der Doppelmutante. Die ermittelte Expression von *psbN*, *ndhF* und *RbcL* war in *rpn8a ppi2* sogar geringer als in *ppi2*, während *psaJ* und *psbA* eine gegenüber *ppi2* gesteigerte Expression aufwiesen. Allerdings war keiner dieser Unterschiede signifikant, was darauf hindeutet, dass die Expression der untersuchten Plastidengene in den *rpn8a*-Mutanten im Vergleich zu den Kontroll-Linien WT bzw. *ppi2* nahezu unverändert ist. Die kernkodierte Plastidenproteine RbcS und Lhcb5 wurden in MS-basierten Proteomanalysen in erhöhter Konzentration in *rpn8a ppi2* verglichen mit *ppi2* quantifiziert und Lhcb4 konnte in Western-Blot-Analysen ebenfalls in gesteigertem Maße in der Doppelmutante detektiert werden. Hier, wie auch in einem Gen, das die Zeta-Carotendesaturase (ZDS) kodiert, zeigten sich in der qRT-PCR keine signifikanten Veränderungen des Transkriptlevel der kernkodierten plastidären Proteine in den *rpn8a*-Mutanten, die eine Steigerung der Proteinabundanz zur Folge haben könnten.

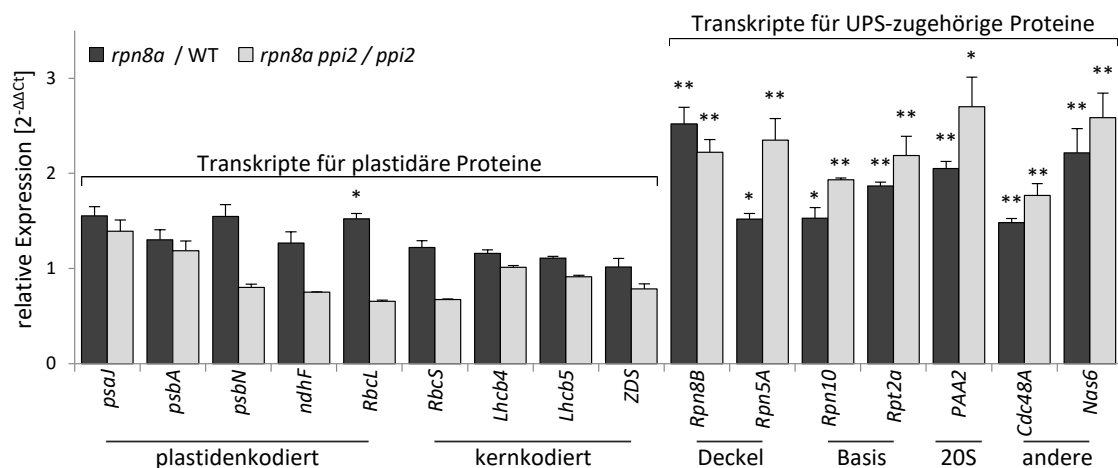


Abb. 25: Quantitative Transkriptanalysen zu plastidären und UPS-zugehörigen Proteinen

Die Transkriptmengen von neun Genen, die plastidäre Proteine kodierenden (fünf plastiden- und vier kernlokalisierte Gene) und sieben Genen, die für Proteine des UPS kodieren (vier kodieren Bestandteile des 19S Deckels oder der Basis, eins eine 20S CP-Untereinheit und zwei andere UPS-zugehörige Proteine) wurden mittels qRT-PCR in 28 d alten Keimlingen analysiert. Die Mittelwerte (n = 3) mit SEM der ermittelten Expression der Gene aus *rpn8a*-Keimlingen ist relativ zur Expression in gleich angezogenem WT und aus *rpn8a ppi2*-Keimlingen ist relativ zur Expression in gleich angezogenen *ppi2*-Keimlingen, normalisiert auf die Transkriptmenge des Referenzgens *Aktin 7* (*AT5G09810*) dargestellt. * signifikant gegenüber der Kontrolle veränderte Transkriptmengen mit $p \leq 0,05$ (t-Test) ** signifikant gegenüber der Kontrolle veränderte Transkriptmengen mit $p \leq 0,01$ (t-Test)

Aus den Ergebnissen der quantitativen Transkriptanalyse zu plastidären Proteinen lässt sich schließen, dass eine Regulation auf Transkriptebene für die gegenüber *ppi2* höher in der Doppelmutante abundanten Proteine D1, RbcL, RbcS und die beiden LHCII-Proteine Lhcb4 und Lhcb5 ausgeschlossen werden kann und eine posttranskriptionale Regulation stattfinden muss. Eine Gegenüberstellung der relativen Expression auf Transkript- und Proteinebene zeigte, dass keine

lineare Korrelation vorlag und die Proteine Lhcb5, RbcS und RbcL eine andere Regulation aufwiesen als ihre Transkripte (Abb. 26). Ein genereller Effekt der Transkriptregulation durch veränderte Funktionen der Sigma-Faktoren in *rpn8a ppi2* im Vergleich zu *ppi2* ist, nach der quantitativen Analyse indikativer Gene, unwahrscheinlich und bestärkt die Hypothese einer Stabilisierung der höher in *rpn8a ppi2* konzentrierten Plastidenproteine.

Transkriptanalysen zu UPS-zugehörigen Proteinen

Die Analyse des Proteoms in WT, *ppi2* und *rpn8a*-Mutanten führten zur Identifizierung von 38 der insgesamt 54 von Book *et al.* (2010) beschriebenen konstitutiven Untereinheiten des 26S Proteasoms. Untereinheiten des 20S CP waren in *rpn8a*-Mutanten auf Proteinebene deutlich hochreguliert, während Untereinheiten des 19S RP-Deckels eher unterrepräsentiert waren. Es erfolgte die exemplarische Untersuchung der Expression ausgewählter Gene, die für Proteine der 26S-Proteasom-Einheiten 19S RP-Deckel, 19S RP-Basis bzw. 20S CP kodieren. Als Vertreter für Untereinheiten des 19S RP-Deckels wurden die Transkripte von *Rpn8B*, das paraloge Gen zu *Rpn8A*, und *Rpn5A* quantifiziert. *Rpn10* und *Rpt2A*, Untereinheiten der 19S Basis, und die 20S CP-Alpha-Untereinheit *PAA2* wurden ebenfalls auf Transkriptebene in den *rpn8a*-Mutanten *rpn8a* und *rpn8a ppi2* mittels qRT-PCR im Vergleich zu den Kontroll-Linien WT bzw. *ppi2* analysiert. Zusätzlich erfolgte die Analyse der Expression von Genen, die für den Proteasom assoziierten Faktor *cell division control protein A* (*Cdc48A*) und für das in *A. thaliana* zu Hefe homologe RP-Chaperon *non-ATPase subunit* (*Nas6*) kodieren. Beide Proteine stehen im Zusammenhang mit dem UPS und sind Teil des Proteasom-Stress-Regulons (PSR) (Gladman *et al.*, 2016).

Die Bestimmung der Transkriptmenge zeigte eine signifikante Steigerung der Expression aller ausgewählten PSR-Gene in *rpn8a* und *rpn8a ppi2* im Verhältnis zum WT bzw. *ppi2* (Abb. 25). Dies ist zum einen ein Hinweis darauf, dass das PSR in den *rpn8a*-Mutanten induziert wird und zum anderen, dass die Transkriptregulation nur teilweise mit der Proteinabundanz korreliert. Von fünf der auf Transkriptebene analysierten UPS-zugehörigen Proteine konnte in *rpn8a ppi2* und *ppi2* das entsprechende Protein in MS-Analysen identifiziert und quantifiziert werden. Ein Vergleich der relativen Expression in *rpn8a ppi2* in Bezug auf *ppi2* mit dem Verhältnis der Proteinmengen beider Linien zueinander zeigte, dass nur im Fall von *PAA2* und *Cdc48A* ein linearer Zusammenhang zwischen Transkriptmenge und Proteinabundanz bestand (Abb. 26). Für die Komponenten des 19S RP wurde eine Diskrepanz zwischen relativer Expression und Proteinabundanz festgestellt. Die signifikant erhöhten Expressionsraten resultierten bei *Rpn5A*, *Rpn10* und *Rpt2A* nicht in entsprechend gesteigerten Proteinmengen, was auf eine posttranskriptionale oder posttranslationale Regulation dieser 26S-Untereinheiten hinweist.

ERGEBNISSE

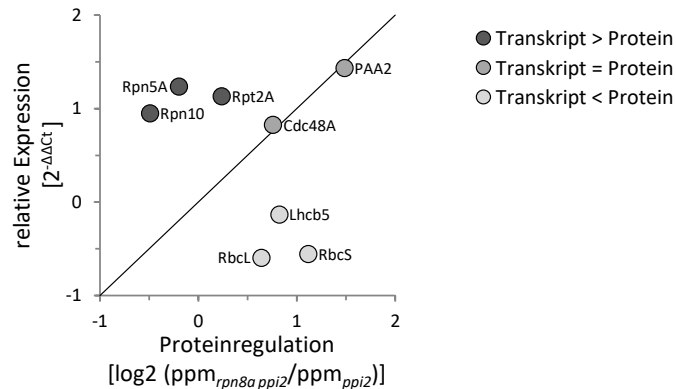


Abb. 26: Verhältnis der Transkript- zur Proteinregulation in *rpn8a ppi2*

Dargestellt ist das Verhältnis der Proteinmengen $\text{ppm}_{rpn8a ppi2}/\text{ppm}_{ppi2}$ zur relativen Expression $2^{-\Delta\Delta C_t}$ in *rpn8a ppi2*. Datenpunkte auf der Geraden zeigen eine lineare Korrelation von relativer Expression und Proteinregulation.

3.5.2 Untersuchung zur Import-Fähigkeit von *rpn8a*-Mutanten

Die höhere Abundanz kernkodierter plastidärer Proteine, wie beispielsweise RbcS und LHC-Proteinen insbesondere in der *rpn8a ppi2*-Mutante im Vergleich zur Einzelmutante *ppi2*, könnte im Zusammenhang mit einer verbesserten Importfähigkeit stehen. Dabei könnte der Einfluss des UPS auf die Stabilität von Importkomponenten oder von Vorläuferproteinen eine Rolle spielen. Die Importfähigkeit und eine gesteigerte Akkumulation von Vorläufern sollten in einer Protoplasten-basierter Import-Analyse untersucht werden. Die in transient transformierten WT-, *rpn8a*-, *ppi2*- und *rpn8a ppi2*-Protoplasten exprimierten eGFP-Konstrukte wurden mittels Western-Blot-Analyse detektiert (Abb. 27).

Transient in Protoplasten exprimiertes eGFP ohne Transitpeptid wurde nicht prozessiert, während nach N-terminaler Fusion von Transitpeptid-enthaltenden AS-Sequenzen plastidärer Proteine an eGFP in den Konstrukten FNR₁₋₅₅:eGFP, E1 α ₁₋₁₀₀:eGFP, Lhcb4₁₋₁₀₀:eGFP, Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP und RbcS₁₋₁₀₀:eGFP eine Prozessierung der eGFP-Fusionsproteine in allen vier untersuchten Linien beobachtet werden konnte. Sowohl in WT- als auch in *rpn8a*-Protoplasten wurde nach transienter Transformation mit entsprechenden eGFP-Fusionsproteinen hauptsächlich die prozessierte Form der Konstrukte nachgewiesen (Abb. 27A). Für FNR₁₋₅₅:eGFP, E1 α ₁₋₁₀₀:eGFP und Lhcb4₁₋₁₀₀:eGFP wurden deutliche Signale auf Höhe der Vorläuferproteine detektiert. Dabei war der Anteil von Vorläuferproteinen an der Gesamtheit nachgewiesener eGFP-Proteine in WT und *rpn8a* für Lhcb4₁₋₁₀₀:eGFP etwa gleich (Abb. 27B). Für FNR₁₋₅₅:eGFP und E1 α ₁₋₁₀₀:eGFP wurde in *rpn8a*-Protoplasten ein leicht erhöhter Anteil der eGFP-Konstrukte als Vorläufer ermittelt.

ERGEBNISSE

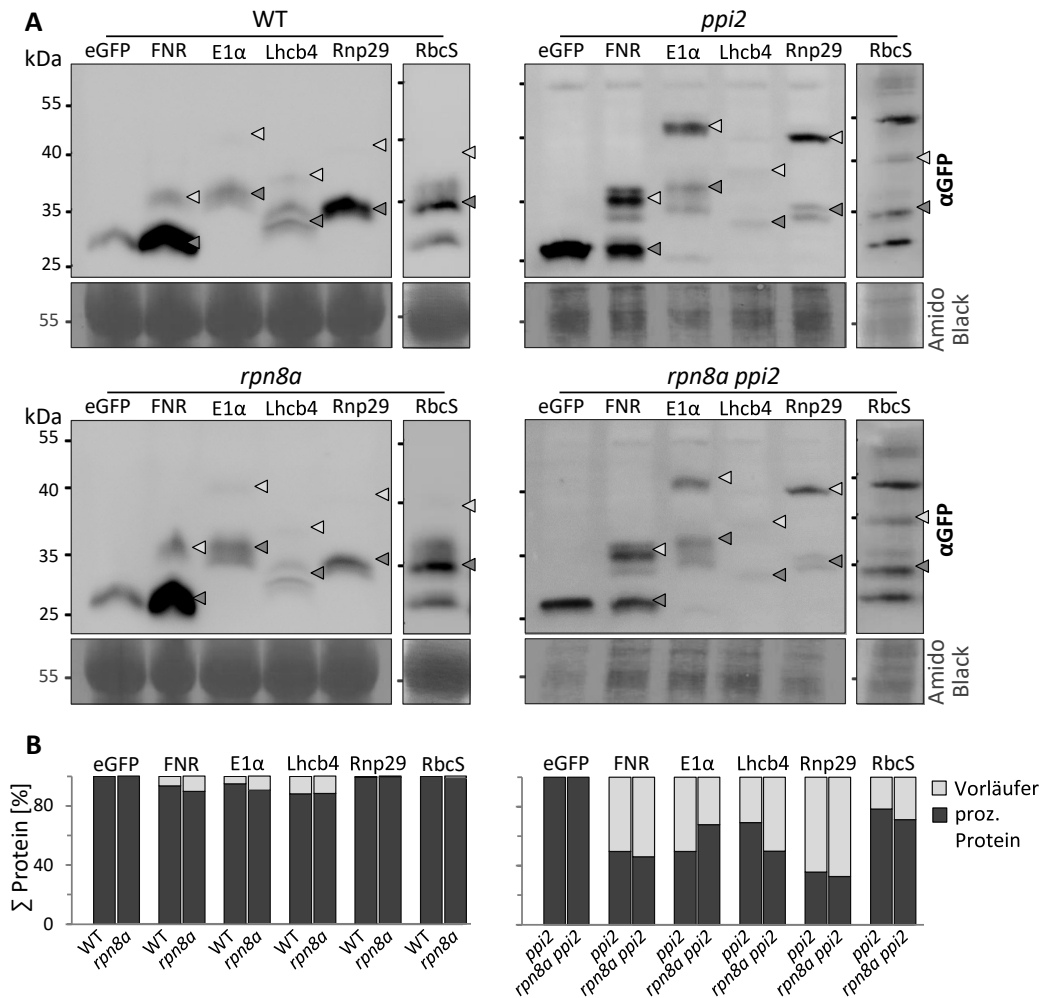


Abb. 27: Importfähigkeit von *rpn8a*-Mutanten

(A) Nachweis des eGFP bzw. der eGFP-Fusionsproteine in transient transformierten WT- und *rpn8a*- sowie *ppi2*- und *rpn8a ppi2*-Protoplasten mittels einer Western-Blot-Analyse mit α GFP-Antikörpern. Pfeile markieren die Position von Vorläuferproteinen (helle Pfeile) und prozessierten Proteinen (dunkle Pfeile), ein Teil der Membran mit Amido Black gefärbten Proteinen ist als Ladekontrolle gezeigt. (B) Prozentuale Anteile des Vorläuferproteins und des prozessierten Proteins (proz. Protein) an der Gesamtheit nachzuweisenden Proteins auf Grundlage einer Quantifizierung der in (A) mit *ImageJ* detektierten Signale.

In *ppi2*- und *rpn8a ppi2*-Protoplasten konnten die Fusionsproteine FNR₁₋₅₅:eGFP, E1 α ₁₋₁₀₀:eGFP, Lhcb4₁₋₁₀₀:eGFP, Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP und RbcS₁₋₁₀₀:eGFP in ihrer nicht-prozessierten und ihrer prozessierten Form nachgewiesen werden (Abb. 27A). Die Intensität aller Signale in *rpn8a ppi2* waren im Vergleich zu den Signalen in *ppi2* geringer. Die Signalintensität kann allerdings nicht als Indiz für die Stabilität der eGFP-Fusionsproteine gelten, da sie abhängig von der Transformationseffizienz und der Expressionsrate ist, die beide unbekannt sind. Eine Veränderung der Abundanz von Vorläuferproteinen gegenüber dem entsprechenden prozessierten Protein war in *rpn8a ppi2* im Vergleich zu *ppi2* kaum ersichtlich (Abb. 27B). Doch, ähnlich wie in den grünen Linien beobachtet, gab es eine Tendenz zur erhöhten Akkumulation der eGFP-Konstrukte in Form von

Vorläuferproteinen in der *rpn8a*-Mutante *rpn8a ppi2*. Mit Ausnahme von E1 α_{1-100} :eGFP war für alle analysierten eGFP-Fusionsproteine der Anteil von Vorläuferproteinen in *rpn8a ppi2* im Vergleich zu *ppi2* höher.

Eine Veränderung des Verhältnisses von Vorläufer- zu prozessiertem Protein konnte in *rpn8a*- bzw. *rpn8a ppi2*-Protoplasten im Vergleich zu WT- bzw. *ppi2*-Protoplasten mit verschiedenen Substraten beobachtet werden. Es gab keine Steigerung der prozessierten Form in Relation zum Vorläufer, wie sie bei einem effizienteren Import zu beobachten wäre. Eine leichte Zunahme an Vorläuferprotein in *rpn8a* oder *rpn8a ppi2* könnte jedoch auf eine Stabilisierung des Vorläufers hinweisen, wenn man eine vergleichbare Importeffizienz voraussetzt. Es ist möglich, dass über die gesamte pflanzliche Entwicklung hinweg eine subtile Veränderung der Vorläuferstabilität durch Modifikation der Proteasom-Spezifität und/oder -Aktivität erfolgt und Einfluss auf die gesteigerte Proteinabundanz plastidärer Proteine insbesondere in *rpn8a ppi2* hat, oder dass eine Regulation der Abundanz von Plastidenproteinen nach dem Import vorliegt.

3.5.3 Vergleich der MG132- und mutationsbasierten Inhibierung des Proteasoms auf Proteinebene

Vorangegangene Versuche zeigten, dass die Mutation von *Rpn8A* Einfluss auf das Proteasom hat. Die Aktivierung des PSR in *rpn8a*-Mutanten ist ein Hinweis auf proteolytischen Stress, der auch durch Inhibierung des Proteasoms induziert werden kann. Demnach stellte sich die Frage, ob eine Reduzierung der Proteasom-Aktivität die Ursache für den Phänotyp der *rpn8a ppi2*-Mutante sein könnte. Ein Vergleich des Proteoms von MG132-behandelten Pflanzen mit dem Proteom der *rpn8a*-Mutanten sollte nun zeigen, ob es auf Proteinebene Parallelen zwischen der Auswirkung von Mutation und Inhibitor-Behandlung gibt. Wenn die beobachteten Veränderungen des Proteoms in *rpn8a*-Linien gegenüber den entsprechenden Kontroll-Linien mit einer MG132-Behandlung nachgestellt werden könnten, würde dies auf einen ähnlichen Wirk-Mechanismus des inhibierten und durch Mutation veränderten Proteasoms schließen lassen.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurden 28 d alte WT- bzw. *ppi2*-Keimlinge in MG132 bzw. DMSO-haltiges Medium umgesetzt und für 30 h inkubiert. Es folgte eine MS-basierte Analyse des Gesamtproteins, die zur Identifizierung von 1155 Proteinen in mit MG132-behandelten WT-Keimlingen und 1210 Proteinen in mit DMSO-behandelten Proben führte (Abb. 28A; digitaler Anhang). Die Schnittmenge beider Proben enthielt 1034 Proteine. Ein Vergleich zu MS-Daten unbehandelter WT- und *rpn8a*-Keimlinge (bereits in Kapitel 3.4.2 [S. 63] beschrieben) zeigte, dass eine Anzahl von 851 Proteinen in allen vier Proben identifiziert werden konnten. Die Darstellung des Verhältnisses der Proteinkonzentrationen einzelner Proteine in MG132 zu Kontrollproben mit DMSO

ERGEBNISSE

in Abhängigkeit von ihrem p-Wert verdeutlichte, dass einige Proteine signifikante Änderungen in der Proteinabundanz aufwiesen (Abb. 28B). Von insgesamt 38 signifikant um mehr als 1,5-fach im Vergleich zur Kontrolle veränderten Proteinen, hatten 18 Proteine eine Funktion bei der Degradation. Darunter war Ubiquitin (Ubq6, AT2G47110 und Ubq8, AT3G09790) und 16 Untereinheiten des 26S Proteasoms. Unter den restlichen 20 signifikant höher abundanten Proteinen fanden sich Proteine, die mit abiotischem Stress im Zusammenhang stehen, wie die Hitzeschockproteine Hsp70 (AT3G12580) und Hsp91 (AT1G79930) oder die Glutathion-S-Transferase 1 (Gst1, AT1G02930). Vierzehn Proteine, die keine funktionellen Gemeinsamkeiten, zeigten waren in MG132-behandelten WT-Keimlingen im Vergleich zu mit DMSO-behandelten Keimlingen signifikant um mehr als das 1,5-Fache in ihrer Abundanz verringert. Sieben dieser Proteine sind in Plastiden lokalisiert (Abb. 28C).

Nach MS-Analysen von *ppi2*-Keimlingen, die mit MG132 behandelt wurden, konnten 1368 Proteine und in der gleich angezogenen Kontrolle, die in DMSO inkubiert wurde, 1270 Proteine quantifiziert werden (Abb. 28A). 1161 Proteine wurden gemeinsam in beiden Proben identifiziert. Das Verhältnis der Proteinkonzentrationen von behandelter zu unbehaltener Probe dieser Proteine wurde bestimmt und in Abb. 28B in Abhängigkeit zur Signifikanz dargestellt. Für 37 Proteine konnte in den MG132-behandelten *ppi2*-Proben eine signifikante Steigerung der Proteinkonzentration um mindestens das 1,5-Fache im Vergleich zur unbehaltener Kontrolle festgestellt werden. Zwanzig dieser Proteine wurde eine Funktion in der Protein-Degradation zugeschrieben, wobei es sich vorrangig um Proteasom-Untereinheiten handelte. Unter den übrigen 17 Proteinen, die ebenfalls in Relation zur unbehaltener Probe signifikant mehr als 1,5-fach höher abundant in der *ppi2*-Probe nach MG132-Behandlung waren, fanden sich unter anderem die potentiell akzessorischen Faktoren des Proteasoms Cdc48A (AT3G09840) und Cdc48B (AT3G53230) sowie im Zusammenhang mit Stress stehende Proteine, wie Glutaredoxin 4 (Grx4, AT3G15660), Glutamat-Decarboxylase 1 (Gad1, AT5G17330) und Peroxidase 30 (AT3G21770).

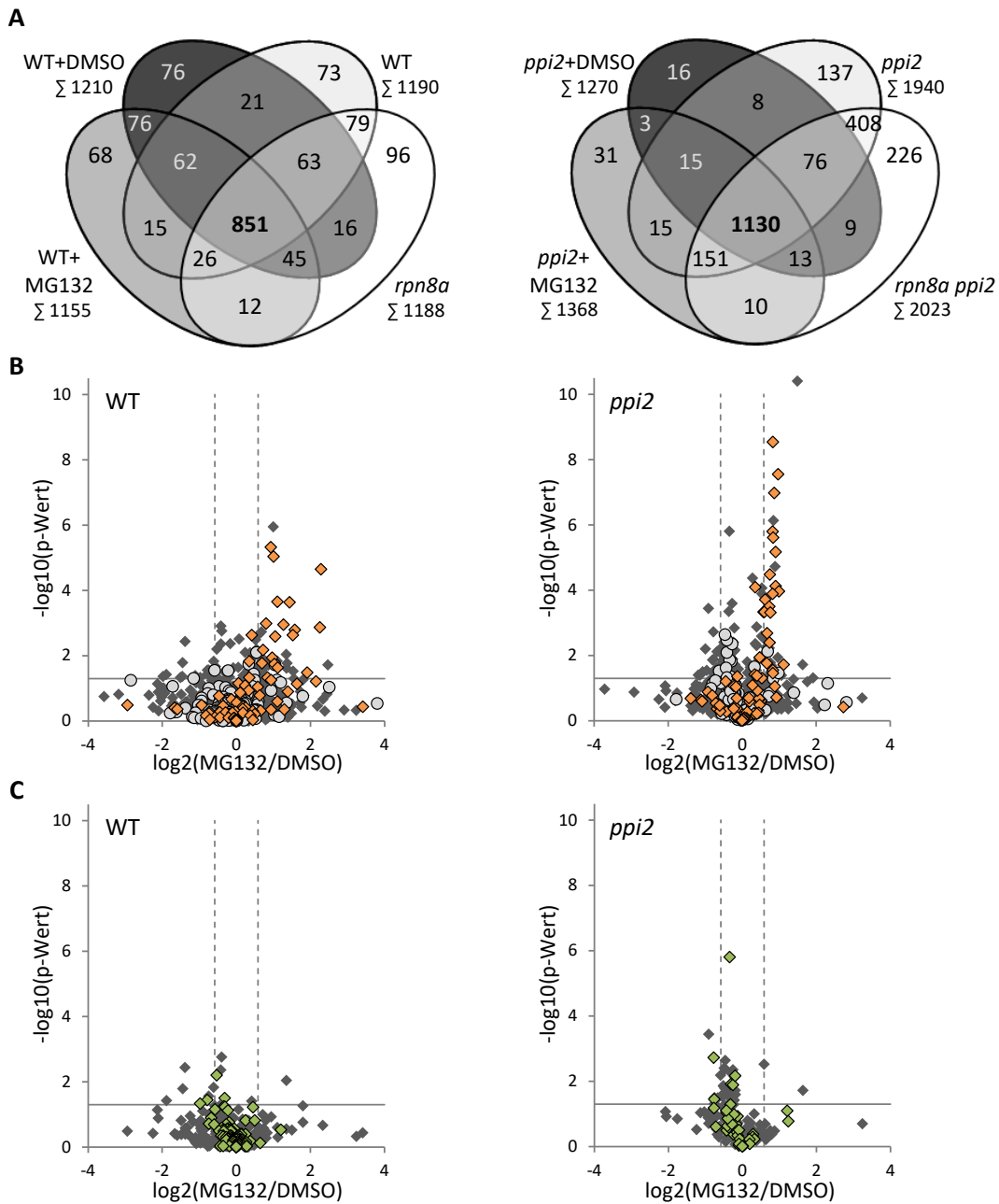


Abb. 28: Auswirkung der MG132-Behandlung auf das Proteom von WT- bzw. *ppi2*-Keimlingen

(A) Venn-Diagramme zu MS-Analysen von Gesamtprotein aus 28 d angezogene WT- bzw. *ppi2*-Keimlingen, 30 h mit DMSO oder MG132 (50 μ M) behandelt, und unbehandeltem WT und *rpn8a*-Keimlingen bzw. *ppi2* und *rpn8a ppi2*-Keimlingen mit Anzahl der Proteine, die in mindestens zwei biologischen und drei technischen Replikaten quantifiziert wurden. (B) und (C) Streudiagramme zeigen die Regulation quantifizierter Gesamtproteine (B) und Plastiden lokalisierter Proteine (C) von MG132-behandeltem WT bzw. *ppi2* im Verhältnis zu DMSO-behandeltem WT bzw. *ppi2* in Abhängigkeit zum entsprechenden p-Wert (t-Test). In (B) sind Gesamtproteine (dunkelgrau), Proteine mit Funktion in der Proteindegradation (orange) und der Proteinsynthese (hellgrau) gekennzeichnet. In (C) sind Plastidenproteine (dunkelgrau) und Proteine mit Funktion in der Photosynthese (grün) gekennzeichnet. Grenzen für $p \leq 0,05$ (durchgezogene Linie) und Regulationen $> 1,5$ -fach (gestrichelte Linie) sind dargestellt.

Dreiundzwanzig der in MG132- bzw. DMSO-behandelten *ppi2*-Keimlingen quantifizierte Proteine zeigten eine signifikant geringere Abundanz um mehr als das 1,5-Fache in MG132-Proben im Vergleich zur Kontrolle. Ebenso wie im WT gab es auch hier keine funktionellen Gemeinsamkeiten der runterregulierten Proteine. Sieben dieser Proteine sind in Plastiden lokalisiert. Eine Betrachtung der Konzentrationsverhältnisse aller identifizierten, plastidären Proteine, zeigte eine Reduzierung der Proteinabundanz plastidärer Proteine nach Behandlung der *ppi2*-Keimlinge mit MG132 (Abb. 28C). Die Reduzierung betraf Photosynthese- und Nicht-Photosynthese-Proteine und steht im Kontrast zu der beobachteten Steigerung der Abundanz von an der Lichtreaktion beteiligten Proteinen in der Doppelmutante *rpn8a ppi2* gegenüber *ppi2* (Abb. 23 [S. 78]). Die MG132-Behandlung beeinträchtigt möglicherweise die Plastiden-Konstitution, besonders in *ppi2*. Die Steigerung der Proteinmenge von Glutathion-S-Transferasen (GSTs) in MG132-behandelten WT- und *ppi2*-Keimlingen im Vergleich zu unbehandelten Keimlingen ist ebenfalls ein Indiz für vermehrten Stress, der im Zusammenhang mit der Proteasom-Hemmung durch MG132 steht und nicht in *rpn8a*-Mutanten beobachtet werden konnte (Abb. 29A). In der Doppelmutante *rpn8a ppi2* ist die Menge an GSTs sogar signifikant reduziert, was Unterschiede in der Stressadaption MG132-inhibierter und durch Mutation von *Rpn8A* veränderter Degradationssysteme bestärkt.

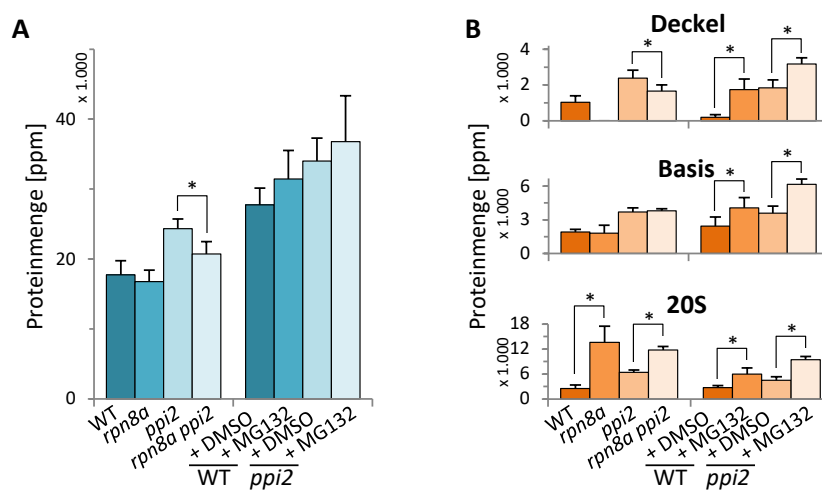


Abb. 29: Vergleich der Proteinmengen von Glutathion-S-Transferasen und Proteasom-Untereinheiten in MG132-behandelten und unbehandelten Keimlingen

Gemittelte Abundanzen der Proteinmengen aus massenspektrometrischen Analysen (n = 9) mit SD, vergleichend in den *rpn8a*-Mutanten *rpn8a* bzw. *rpn8a ppi2* mit WT bzw. *ppi2* sowie MG132-behandelten WT- und *ppi2*-Keimlingen mit entsprechenden DMSO-Kontrollen von (A) mit *MapMan* annotierten Glutathion-S-Transferasen und (B) Untereinheiten der Komponenten des 26S-Proteasoms. * p ≤ 0,001 (t-Test)

Ein weiterer Unterschied im Proteom MG132-behandelter Keimlinge und der *rpn8a*-Mutanten, wird deutlich bei der näheren Betrachtung der Mengen von Proteinen, die die Proteasom-Subkomplexe Deckel, Basis und 20S CP bilden (Abb. 29B). Die Summe der Proteinmengen aller konstitutiven

Untereinheiten des 26S-Proteasoms zeigte eine signifikant gesteigerte Abundanz der regulatorischen Komponenten Deckel und Basis des 19S RP sowie der katalytischen Komponente 20S CP in MG132-behandelten Proben gegenüber den Kontrollproben sowohl im WT als auch in *ppi2*. Eine Übersicht zu allen in den MS-Analysen identifizierten Untereinheiten des 26S-Proteasoms und von anderen PSR-Genen kodierten Proteinen ist in Form einer *heat map* in Abb. 30 dargestellt. Die *heat map* zeigt die Regulation der Proteine unabhängig von der Signifikanz der Veränderung. Zusätzlich zu diesen Proteinen sind Proteine, die nur in einer der ins Verhältnis zu setzenden Proben quantifiziert werden konnten, dargestellt. So lässt sich erkennen, dass nicht nur ein Großteil der betrachteten Proteine in MG132-behandelten Proben oder *rpn8a*-Mutanten gegenüber der entsprechenden Kontrolle hochreguliert waren, sondern auch häufig nur dort identifiziert wurden. In MG132-behandelten Proben traf dies auf nahezu alle Untereinheiten des 26S-Proteasoms zu. Nur Rpn3b in MG132-behandelten *ppi2*-Keimlingen, Rpn1A, PAA1 und PBD1 in MG132-behandeltem WT-Keimlingen sowie Rpt5b in beiden MG132-behandelten Proben zeigten eine entgegengesetzte Tendenz. Für die Proteine Rpn3a, Rpn7 und Rpn10 wurde nach der Proteasom-Inhibierung mit MG132 eine unveränderte Proteinabundanz in *ppi2*-Keimlingen nachgewiesen. Proteine, die von anderen PSR-Genen kodiert werden, konnten, abgesehen von Ubp6 und Mdh2, mehr oder ausschließlich in MG132-Proben quantifiziert werden.

Mit Ausnahme von Rpn8B waren durchgehend alle Untereinheiten des 19S RP-Deckels in der Einzelmutante *rpn8a* und der Doppelmutante *rpn8a ppi2* unterrepräsentiert gegenüber der Kontrolle. Von den insgesamt 15 in *rpn8a ppi2* identifizierten Basis-Untereinheiten waren sieben geringer abundant in der Doppelmutante in Bezug zur Einzelmutante *ppi2*. Sechs Untereinheiten wurden in höherer Konzentration in *rpn8a ppi2* und zwei Untereinheiten ausschließlich in der Doppelmutante und nicht in *ppi2* quantifiziert. Die Verringerung der Proteinkonzentration betraf in *rpn8a ppi2* vor allem RPN-Untereinheiten der Basis, die eine Funktion in der Erkennung von ubiquitinierten Proteinen und bei der Assoziation des Komplexes eine Rolle spielen. In *rpn8a* waren vier der zehn identifizierten 19S RP-Basis-Untereinheiten geringer abundant als im WT. In Summe veränderte sich die Proteinmenge der Basis-Untereinheiten durch die *Rpn8A*-Mutation allerdings nicht, während durch die MG132-Inhibierung auch Proteine der 19S RP-Basis akkumulierten (Abb. 29B). Untereinheiten des 20S CP waren ebenso wie nach MG132-Behandlung mit wenigen Ausnahmen auch in *rpn8a*-Mutanten höher abundant, während andere Proteine, die von PSR-Genen kodiert werden, zum Teil gegensätzlich reguliert waren. Cdc48B war beispielsweise nur nach MG132-Behandlung höher abundant. Das zu 91% identische Homologe wurde allerdings auch in *rpn8a*-Mutanten im Vergleich mit den entsprechenden Kontrollen vermehrt quantifiziert.

ERGEBNISSE

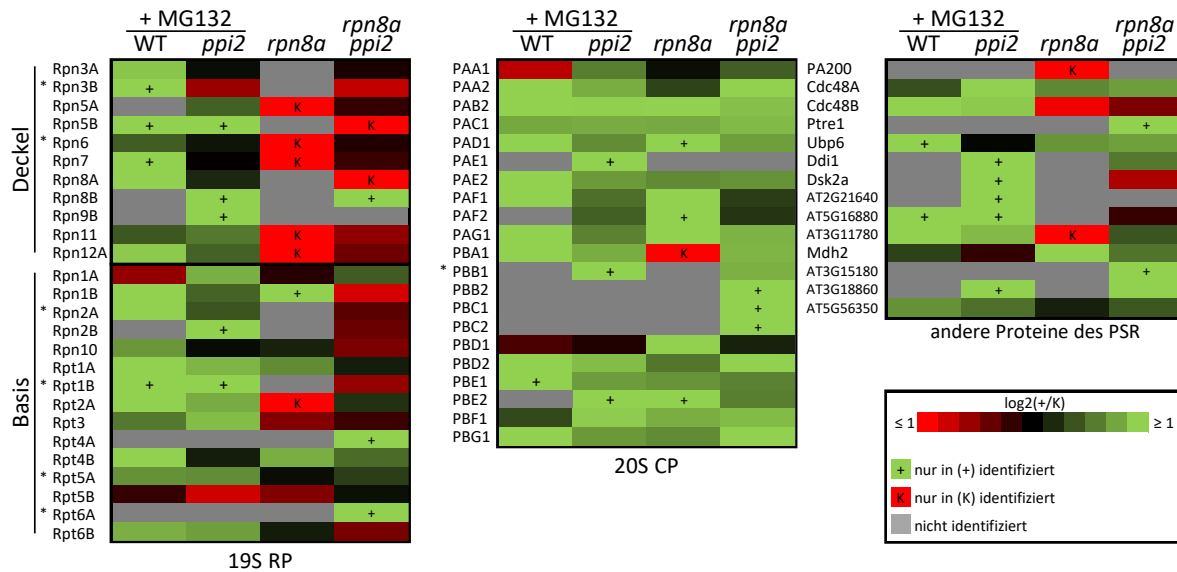


Abb. 30: Regulation von Proteasomuntereinheiten und weiterer Proteine des PSR

Die *heat map* zeigt die Regulation ($\log_2(+/K)$) aller in MS-Analysen identifizierten konstitutiven Untereinheiten des 19S RP, des 20S CP und weiterer Proteine, die von PSR-Genen kodiert werden. Das Verhältnis der Proteinabundanz in Proteasom-beeinträchtigten Keimlingen (+) zu den entsprechenden Kontrollen (K) ist in einem Farb-Code dargestellt (d.h. MG132-behandelte WT- und *ppi2*-Keimlinge sind in Relation zu DMSO-behandelten WT- und *ppi2*-Keimlingen, die *rpn8a*-Mutanten *rpn8a* und *rpn8a ppi2* in Relation zu unbehandeltem WT und *ppi2*-Keimlingen gesetzt). Mit * versehene Proteine sind nach Gladman *et al.* (2016) nicht Teil des PSR. Rotes Feld mit „K“ – das Protein, wurde ausschließlich in der Kontrolle identifiziert; grünes Feld mit „+“ – das Protein wurde ausschließlich in MG132- bzw. *rpn8a*-Proben identifiziert

Zusammenfassend gibt es Gemeinsamkeiten zwischen dem Proteom von Keimlingen mit MG132-induzierter und genetisch basierter Beeinträchtigung der Proteasom-Funktion. Dazu gehört die gesteigerte Abundanz von 20S CP-Untereinheiten und anderen Proteinen, die von PSR-Genen kodiert werden. Andererseits scheint die Zusammensetzung des 26S-Proteasoms in MG132-behandelten Keimlingen sehr unterschiedlich zu der von *rpn8a*-Mutanten zu sein, wie ein Vergleich der regulatorischen 19S RP-Komponenten zeigte. In *rpn8a*-Mutanten wurden außerdem weniger stressassoziierte Proteine hochreguliert. Die GST-Konzentration war in *rpn8a* und *rpn8a ppi2* im Vergleich zur Kontrolle sogar geringer, während sie nach MG132-Behandlung in WT und *ppi2*-Keimlingen anstieg. Außerdem waren Plastidenproteine in MG132-behandelten Keimlingen eher unterrepräsentiert, während sie in *rpn8a*-Mutanten, vor allem in *rpn8a ppi2*, in höherer Konzentration in Relation zur Kontrolle auftraten. Dieser Vergleich zeigt, dass es regulatorische Unterschiede nach Veränderung der Proteasom-Aktivität durch MG132-Behandlung und Verlust der 19S RP-Komponente Rpn8A gibt, die möglicherweise auf Abweichungen in der Proteasom-Zusammensetzung beruhen.

3.5.4 Anzucht unter Schwachlichtbedingungen ändert physiologische und photosynthetische Eigenschaften

Licht spielt eine entscheidende Rolle bei der Chloroplastenbiogenese (Waters und Langdale, 2009). Erhöhte Lichtintensitäten während der Entwicklung führen zur Langzeitadaptation der Chloroplasten auf physiologischer und molekularer Ebene, die zur optimalen Photosyntheseleistung beitragen und der Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) bei Lichtstress entgegenwirken. Dazu gehören die Reduzierung von Granathylakoiden, photosynthetischen Proteinen und Pigmenten (Weston *et al.*, 2000). Da diese Parameter in *rpn8a ppi2* gegenüber *ppi2* verändert waren, stellte sich die Frage, ob eine geringere Lichtsensitivität in *rpn8a ppi2* ein Grund für die Modifikation der *ppi2*-Plastiden nach Mutation von *Rpn8A* sein könnte. Unter der Annahme, dass normale Lichtbedingungen von $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in den Albinolinien bereits Lichtstress induziert, wurden für diesen Versuch Pflanzen unter schwachen Lichtbedingungen von $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen (SL-Pflanzen) (Abb. 31A).

Im Vergleich zu unter Normallicht angezogenen Pflanzen (NL-Pflanzen) zeigten unter Schwachlicht kultivierte *ppi2*- und auch *rpn8a ppi2*-Pflanzen eine signifikante Steigerung des Frischgewichts, während die geringe Lichtintensität eine Reduzierung des Frischgewichts von WT und *rpn8a* zur Folge hatte (Abb. 31B).

In Fluoreszenz-basierter Analyse des PSII zeigte sich in *ppi2* und *rpn8a ppi2* eine Verbesserung der PSII-Leistung in SL-Pflanzen im Vergleich zu NL-Pflanzen in der Steigerung der maximalen *PSII Quantum Yield* (Abb. 31C). In *ppi2* wurde eine Steigerung von $0,469 \pm 0,039$ auf $0,614 \pm 0,046$ und in *rpn8a ppi2* von $0,554 \pm 0,085$ auf $0,699 \pm 0,021$ verzeichnet, die auf eine verbesserte Energieableitung absorbierten Lichts im PSII dunkeladaptierten Pflanzen hinwies. Die maximale *PSII Quantum Yield* von SL-Pflanzen der Linie *ppi2* näherten sich demnach NL-Pflanzen der Linie *rpn8a ppi2* an. In einer Lichtkurve unterschied sich der Verlauf der *PSII operating efficiency* bei Adaption an Strahlungsintensitäten zwischen $14 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bis $458 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ hingegen kaum zwischen *ppi2* und *rpn8a ppi2* oder den unterschiedlichen Anzuchtbedingungen. Bei schwachen Lichtintensitäten angezogener WT und *rpn8a* zeigten bei Messungen der maximalen *PSII Quantum Yield* keine Veränderungen im Vergleich mit NL-Pflanzen, im Verlauf der Lichtkurve war hingegen eine deutliche Reduzierung der *PSII operating efficiency* in WT und gleichermaßen in *rpn8a* zu verzeichnen, die auf Schwächen in der Elektronenverwertung gegenüber NL-Pflanzen hindeutete.

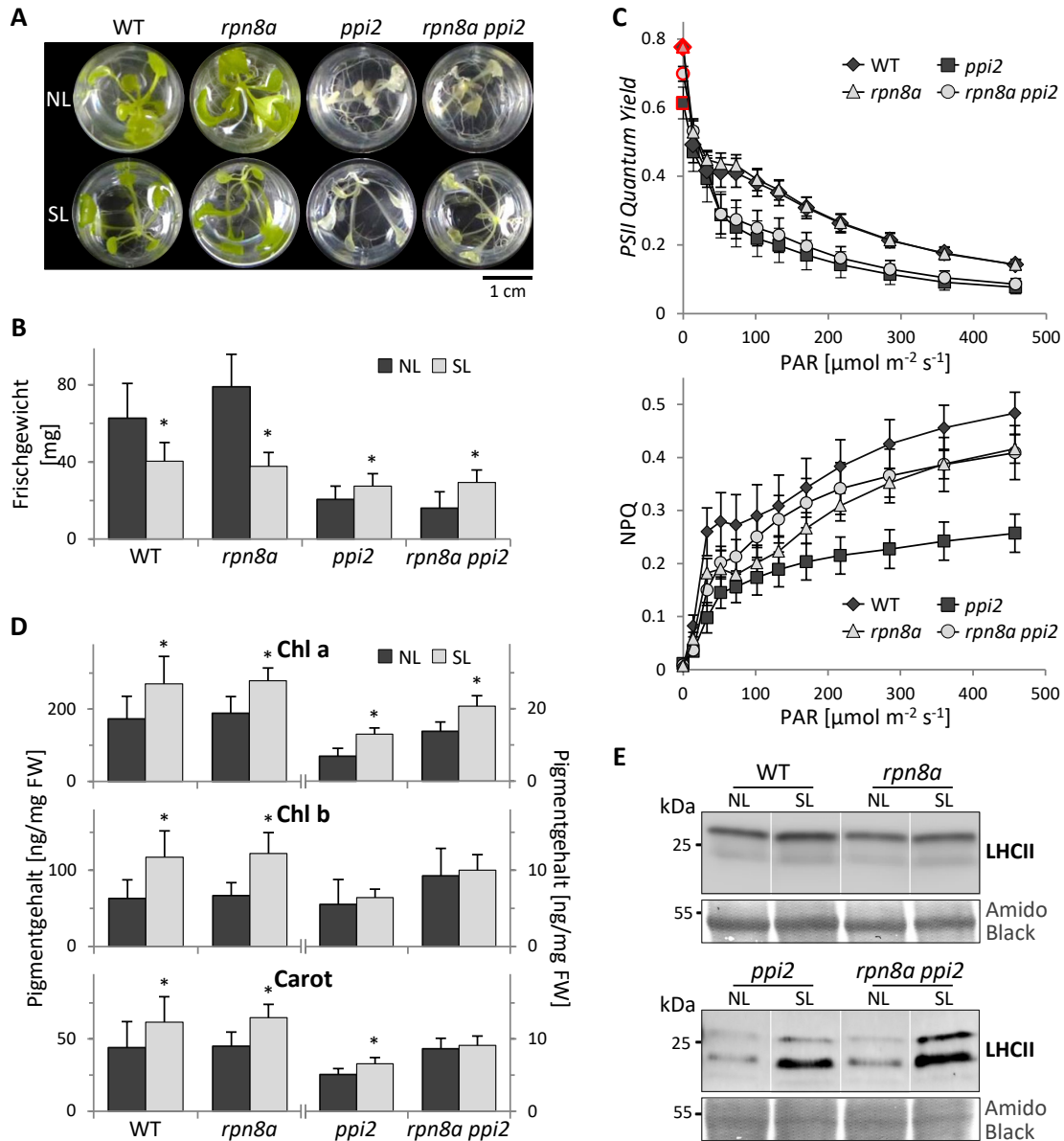


Abb. 31: Einfluss der Lichtbedingungen auf Eigenschaften von WT und Mutanten

(A) Bilder je eines 28 d in Flüssigkultur unter Kurztagbedingungen bei Lichtintensitäten von $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Normallicht, NL) oder $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Schwachlicht, SL) angezogenem WT-, *rpn8a*-, *ppi2*- und *rpn8a ppi2*-Keimlings in einem well einer 24-well-Platte. (B) Mittelwerte der Frischgewichte 28 d alter Keimlinge ($n = 36$ für WT und *rpn8a* bzw. $n = 66$ für *ppi2* und *rpn8a ppi2* aus drei unabhängigen Anzuchten) mit SD. * $p \leq 0,001$ (t-Test) (C) Mit *imaging-PAM*-Fluorometer erstellte Lichtkurven, mit *photosynthetically active radiation* (PAR) von $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bis $458 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 42 d alter *ppi2*- und *rpn8a ppi2*- sowie 28 d alter WT- und *rpn8a*-Keimlinge, angezogen unter SL-Bedingungen. Dargestellt sind die *PSII Quantum Yield* (oben) mit maximaler *PSII Quantum Yield* (rot umrandet) sowie das *non-photochemical quenching*, NPQ (unten). Die Messpunkte entsprechen Mittelwerten ($n = 21$ aus drei biologischen Replikaten) mit SD. (D) Mittelwerte mit SD des Gehalts von Chlorophyll a (Chl a), Chlorophyll b (Chl b) und Carotinoiden (Carot) pro mg Frischgewicht (FW) in 28 d alten Keimlingen ($n = 24$ für WT und *rpn8a* bzw. $n = 18$ für *ppi2* und *rpn8a ppi2* aus drei unabhängigen Anzuchten). * $p \leq 0,001$ (t-Test) (E) Immunologischer Nachweis der LHCII-Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen Lhcb2 (untere Bande) und Lhcb4 (obere Bande) mit einer Western-Blot-Analyse in $50 \mu\text{g}$ Gesamtprotein aus 28 d alten WT- und *rpn8a*-Keimlingen bzw. in $100 \mu\text{g}$ Gesamtprotein aus 28 d alten *ppi2*- und *rpn8a ppi2*-Keimlingen aus Anzuchten unter NL- und SL-Bedingungen, ein Ausschnitt der Membran mit *Amido Black* gefärbten Proteinen ist als Ladekontrolle gezeigt.

Bei Bestimmung des NPQ, zeigten die SL-Pflanzen der Doppelmutante *rpn8a ppi2*, wie auch für NL-Pflanzen beschrieben (Vergleich Abb. 20 [S. 73]), signifikant erhöhte NPQ-Werte im Verlauf der Lichtkurve im Vergleich zu *ppi2* (Abb. 31C). Generell wiesen die SL-Pflanzen der Albinolinien deutlich höhere NPQ-Werte im Vergleich zu NL-Pflanzen auf, während die Anzuchtbedingungen in den grünen Linien nur geringfügige Auswirkungen auf das NPQ hatten. In SL-Pflanzen war das NPQ der Einzelmutante *rpn8a* gegenüber dem NPQ des WT bei Adaption an Lichtintensitäten zwischen $14 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bis $458 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ signifikant erhöht. Auch dies stimmt mit Beobachtungen für NL-Pflanzen überein (Vergleich Abb. 13E [S. 61]). Die Änderung der Anzuchtbedingungen beeinflusste neben dem Frischgewicht und den genannten PSII-Parametern die Pigmentkonzentrationen in NL- und SL-Pflanzen (Abb. 31D). In WT und *rpn8a* konnte bei niedrigen Lichtbedingungen eine signifikant erhöhte Konzentration photosynthetischer Pigmente Chlorophyll a, Chlorophyll b und Carotinoiden verzeichnet werden. Auch in den Albinomutanten konnte eine signifikant erhöhte Abundanz von Chlorophyll a in SL-Pflanzen festgestellt werden. Der Chlorophyll a-Gehalt von SL-Pflanzen der Linie *ppi2* war niedriger als unter gleichen Bedingungen angezogenen *rpn8a ppi2*-Pflanzen, aber ähnlich zum Gehalt von NL-Pflanzen der Linie *rpn8a ppi2*. Chlorophyll b war im Vergleich der unterschiedlichen Lichtbedingungen in beiden Albinolinien nicht signifikant verändert und die Konzentration der Carotinoide war in *ppi2*, aber nicht in *rpn8a ppi2* signifikant erhöht. Eine Western-Blot-Analyse zeigte, dass neben den photosynthetischen Pigmenten auch die Pigment-assoziierten LHCII-Proteine Lhcb4 und Lhcb2 in SL-Pflanzen im Vergleich zu NL-Pflanzen stärker akkumulierten (Abb. 31E). In *ppi2* und *rpn8a ppi2* wurde dies besonders deutlich.

Die Untersuchungen von SL- im Vergleich zu NL-Pflanzen zeigten, dass die Linien *ppi2* und *rpn8a ppi2* unter Schwachlichtbedingungen fähig sind mehr Biomasse zu produzieren und mehr photosynthetische Pigmente und Proteine zu akkumulieren, während im WT und in *rpn8a* ähnliche Adaptionen der Pigmente und Proteine keinen Zuwachs der Frischmasse zur Folge hatten. Demnach hemmt das Schwachlicht das Wachstum in den grünen Linien, fördert allerdings die Albinolinien. Die beobachteten Unterschiede in der Adaption der PSII-Parameter in *ppi2* und *rpn8a ppi2*, im Vergleich zu WT und *rpn8a*, könnten dabei eine Rolle spielen.

Der Vergleich von *ppi2* und *rpn8a ppi2* zeigte, dass Änderungen in Pigmentgehalt, maximaler *PSII Quantum Yield* und NPQ, die bereits bei Anzucht der NL-Pflanzen beobachtet wurden, auch bei Anzucht unter schwachen Lichtbedingungen bestehen blieben. Unter schwachen Lichtbedingungen angezogene *ppi2*-Keimlinge ähnelten im Pigmentgehalt und PSII-Parametern NL-Pflanzen der Linie *rpn8a ppi2*, sodass der Phänotyp durch Reduzierung des Lichtstresses annähernd nachgestellt werden konnte.

4 DISKUSSION

4.1 Akkumulation und Import von Vorläuferproteinen bei Überexpression in Toc159-defizienten Protoplasten

In der Regel verbleiben Vorläuferproteine nur kurzzeitig im Cytosol. Ihre Konzentration wird durch verschiedene Mechanismen gering gehalten: ein effizienter Import ins Zielorganell, eine effektive Degradation im Cytosol und eine Regulation der Genexpression basierend auf retrograder Signaltransduktion. Während des Importprozesses in Plastiden werden die plastidären Vorläuferproteine überwiegend durch die stromale Prozessierungspeptidase im Stroma zu reifen Proteinen prozessiert (Richter und Lamppa, 1998). Demnach unterscheiden sich Vorläufer von den entsprechenden prozessierten Proteinen durch die N-terminale Sequenz des Transitpeptides. Um Vorläuferproteine zu identifizieren und sie von den reifen Proteinen abzugrenzen, müssen in Sequenz-basierten Analysen Peptide des spaltbaren Transitpeptids identifiziert werden oder eine Größenaufftrennung zur Separation von Vorläufer und reifem Protein stattfinden. Normalerweise lassen sich plastidäre Proteine im WT nur als reife Proteine und nicht als unprozessierte Vorläuferproteine auffinden (Bischof *et al.*, 2011). Bei Inhibierung des Imports durch den Verlust des TOC-Rezeptorproteins Toc159 in der Mutante *ppi2* akkumulieren allerdings potentielle Vorläufer *in planta* und können massenspektrometrisch nachgewiesen werden (Bischof *et al.*, 2011). Die transiente Expression von chimären Fusionsproteinen mit N-terminalem Transitpeptid, unter der Kontrolle eines konstitutiven 35S-Promoters, in *ppi2*-Protoplasten steigert zusätzlich die Akkumulation von Vorläuferproteinen und erleichtert die Identifizierung dieser Proteine mittels Western-Blot-Analyse (Lee *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2008).

4.1.1 Der Import von eGFP-Fusionsproteinen erfolgt auch ohne Toc159

Confocal laser scanning microscopy (CLSM)-Aufnahmen von transient transformierten WT-Protoplasten belegten, dass die Fusion der N-terminalen 100 Aminosäuren ausgewählter Plastidenproteine eine Plastiden-Lokalisierung des Reporterproteins eGFP vermittelte (Abb. 6 [S. 47], Anhang 2 [S. 134]). In Western-Blot-Analysen wurden im WT neben der dominierenden prozessierten Form auch unprozessierte Vorläufer der verwendeten Konstrukte nachgewiesen (Abb. 7 [S. 48]). Möglicherweise hing dies mit der Überexpression der Fusionsproteine unter der Kontrolle eines 35S-Promoters zusammen. Bei Reduzierung der Importeffizienz durch Verlust des Toc159-Proteins in *ppi2* verstärkte sich die Akkumulation der konstitutiv exprimierten Konstrukte als Vorläufer. Davon waren Konstrukte betroffen, deren Import potentiell Toc159-abhängig oder Toc159-unabhängig ist. RbcS und Fd2 sind als Toc159-abhängige Substrate beschrieben (Ma *et al.*, 1996; Kouranov und Schnell,

1997; Lee *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004). Eine Abhängigkeit des Imports von RbcS von Toc159 wurde aus der Affinität von Toc159 zu RbcS in Interaktionsstudien und auch aus *in vivo*-Untersuchungen von stabil mit RbcS:GFP-Fusionsprotein transformierten *ppi2* geschlossen (Smith *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu PDH-E1 α :eGFP akkumulierte RbcS:GFP bei konstitutiver Expression in stabil transformierten *ppi2* als Vorläufer (Smith *et al.*, 2004). Für Fd2 konnte eine Interaktion mit Toc159 *in vitro* ebenfalls gezeigt werden (Ma *et al.*, 1996; Kouranov und Schnell, 1997; Smith *et al.*, 2004), während PDH-E1 α und andere nicht-photosynthetische Proteine nur eine geringe Affinität zu Toc159 aufwiesen und als Toc159-unabhängige Substrate beschrieben wurden (Smith *et al.*, 2004). Eine Co-Transformation von Toc159 und RbcS:GFP-Fusionsprotein in *ppi2*-Protoplasten verbesserte den Import des RbcS-Konstruktes (Lee *et al.*, 2003). Eine Co-Transformation von Toc159 und Fd2₁₋₁₀₀:eGFP verbesserte ebenfalls die Importeffizienz des Fd2-Konstruktes (Abb. 8 [S. 50]). Doch trotz der Belege für eine Abhängigkeit des Imports von Fd2 und RbcS von Toc159 wurde in transient transformierten *ppi2*-Protoplasten der Plastidenimport von Fd2₁₋₁₀₀:eGFP und RbcS₁₋₁₀₀:eGFP durch den Verlust von Toc159 nicht vollständig verhindert, sondern nur reduziert und war nicht deutlich verschieden zu E1 α ₁₋₁₀₀:eGFP (Abb. 7 [S. 48]). Auch Lee *et al.* (2003) beschrieben nach Analysen des Plastidenimports in transient transformierten Protoplasten den Import von RbcS:GFP-Fusionsprotein in *ppi2*-Protoplasten analog zu den in dieser Arbeit erhobenen Daten (Abb. 7 [S. 48]). Daraus ist zu schließen, dass auch Toc159-abhängige Substrate bei Überexpression in Abwesenheit dieser TOC-Untereinheit unabhängig von Toc159 importiert werden können.

Neben Toc159 existieren drei weitere Vertreter der Toc159-Familie in *A. thaliana*, die verantwortlich für einen Toc159-unabhängigen Import von Proteinen mit N-terminalem Transitpeptid sein könnten. Toc132 und Toc120 wird eine zu Toc159 differentielle Substratspezifität für nicht-photosynthetische Proteine zugesprochen (Ivanova *et al.*, 2004; Inoue *et al.*, 2010). Eine Überexpression von Toc132 oder Toc120 kann den Verlust von Toc159 in *ppi2* nicht ausgleichen (Ivanova *et al.*, 2004; Kubis *et al.*, 2004). Die Überexpression von Toc90 bewirkt hingegen eine geringfügige Verbesserung des *ppi2*-Phänotyps und weist demnach auf eine partiell redundante Funktion von Toc90 und Toc159 hin (Infanger *et al.*, 2011). Auch Toc159-Konstrukte, in denen die A-Domäne fehlt, sind fähig *ppi2 in vivo* zu komplementieren (Lee *et al.*, 2003). Die A-Domäne, die innerhalb der Mitglieder der Toc159-Proteinfamilie sehr variabel ist, ist demnach für die Funktion des TOC-Rezeptors in der Plastidenbiogenese *in vivo* nicht essentiell. *In vitro* Experimente (Inoue *et al.*, 2010) und die Untersuchung physikochemischer Eigenschaften der A-Domäne (Richardson *et al.*, 2009) geben allerdings Hinweise darauf, dass sie an der Spezifität des Rezeptors für Vorläuferproteine oder anderen Protein-Protein-Interaktionen der Initiation beteiligt sein könnte. Der Import von konstitutiv exprimierten Substraten in *ppi2*-Protoplasten könnte, auf Grund ihrer hohen Präsenz im Cytosol, auf

unspezifische Importprozesse über im TOC-Komplex assembliertes Toc132, Toc120 oder Toc90 zurückgehen. Der Vergleich von *ppi2* zum WT zeigt jedoch deutlich, dass der Import über einen Toc159-unabhängigen Weg für die untersuchten Substrate weniger effizient ist (Abb. 7 [S. 48]).

4.1.2 Rnp29 als spezielles Toc159-abhängiges Imports substrat

Trotz des drastischen Plastidenphänotyps von *ppi2* wurden in quantitativen Proteomanalysen von Bischof *et al.* (2011) 74% der plastidären Proteine in *ppi2* in Bezug zum WT in ihrer Abundanz unverändert als reife Proteine nachgewiesen. Die Mehrheit dieser Proteine wies keine signifikante Änderung auf Transkriptebene in *ppi2* im Vergleich zum WT auf. Auch das kernkodierte Plastidenprotein Rnp29 war weder in den Transkript- noch in den Proteomanalysen differentiell in *ppi2* reguliert (Bischof *et al.*, 2011). Die unveränderte Transkript- und Proteinmenge deuteten auf einen Toc159-unabhängigen Plastidenimport von Rnp29 hin. Dem widersprach die nachweisliche Akkumulation von Rnp29 als Vorläuferprotein in *ppi2* (Bischof *et al.*, 2011). Analysen in transient transformierten Protoplasten zeigten im Vergleich zu anderen Substraten sogar eine sehr deutliche Akkumulation von Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP als Vorläufer in *ppi2*, während die reife Form des Konstrukts kaum nachweisbar war (Abb. 7 [S. 48]). Eine Co-Transformation von Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP und Toc159 zeigte, dass *ppi2*-Protoplasten nach Expression von Toc159 fähig waren mehr Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP zu importieren und bestätigte eine Abhängigkeit des Imports dieses Proteins von Toc159 (Abb. 8A [S. 50]). Die in Protoplasten beobachtete Importeffizienz korrelierte allerdings nicht mit der Abundanz des Proteins in Plastiden *in planta*. Trotz sehr geringer Importeffizienz erreichte die Abundanz von endogenem, reifem Rnp29 im Gesamtprotein von *ppi2* ein WT-Level (Abb. 4B [S. 45]).

Die angewendete Analyse des Imports in Protoplasten erlaubte eine Untersuchung unabhängig von transkriptionaler Regulation über einen kurzen Zeitraum in Pflanzen eines definierten Alters. Es ist denkbar, dass der beobachtete effektive Import des Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP-Konstruktes in WT-Protoplasten *in planta* in diesem Entwicklungsstadium nicht von essentieller Bedeutung ist und, auf Grund einer hohen Stabilität des reifen Proteins in Plastiden, auch ohne die Funktion von Toc159 ein WT-ähnliches Proteinlevel des Rnp29 in *ppi2* erreicht wird. Die Spezifität der Importmaschinerie ändert sich im Laufe der Entwicklung den Ansprüchen der Plastiden entsprechend (Li und Teng, 2013). Möglicherweise wird Rnp29 nur zu einem bestimmten Zeitpunkt der Entwicklung effektiv Toc159-unabhängig in *ppi2* importiert. Rnp29 erreicht sein maximales Expressionslevel bereits 96 h nach der Keimung (Wang *et al.*, 2006), was einen Import des Proteins in einem frühen Entwicklungsstadium bedeuten könnte. Die Analysen der transient transformierten *ppi2*-Protoplasten zeigten, dass der Import von Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP zu einem sehr geringen Teil in Protoplasten aus 32 d-alten Keimlingen auch Toc159-unabhängig stattfindet (Abb. 7 [S. 48]). Die Rnp29-Abundanz könnte auch durch den

stetigen Import kleiner Mengen von Rnp29 die gesamte Entwicklung der Pflanze hinweg realisiert werden. Dies könnte im Zusammenhang mit einer hohen Stabilität des Rnp29-Vorläufers im Cytosol stehen. Dafür sprechen die hohe Abundanz des Proteins als Vorläufer bei stetiger Expression und gleichzeitiger Inhibierung des Imports in *ppi2*-Protoplasten (Abb. 7 [S. 48]) und die Identifizierung des Rnp29-Vorläufers in Proteomanalysen von *ppi2* (Bischof *et al.*, 2011). Im Gegensatz zu Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP war in Untersuchungen transient transformierter *ppi2*-Protoplasten Lhcb4₁₋₁₀₀:eGFP kaum als Vorläufer nachweisbar (Abb. 7 [S. 48]). Dies könnte auf eine diverse Stabilität von Vorläuferproteinen im Cytosol hinweisen und eröffnet eine neue posttranskriptionale Regulationsebene plastidärer Proteine, die Einfluss auf den Import und die Abundanz der Proteine in Plastiden nehmen könnte.

4.2 Bedeutung N-terminaler Aminosäuren und N-Acetylierung von Vorläuferproteinen

Analysen von Proteinsequenzen kernkodierter Proteine von *A. thaliana* zeigten, dass in Plastiden lokalisierten Proteinen häufiger als in mitochondrialen oder cytosolischen Proteinen Alanin an der Aminosäureposition 2 vorkommt (Abb. 3 [S. 43]). Nach Abspaltung des initialen Methionins wird das N-terminal exponierte Alanin acetyliert. Die Acetylierung des N-Terminus (N-Ac) von plastidären Vorläuferproteinen in *A. thaliana* wurde von Bischof *et al.* (2011) in einer MS-basierten Proteom-Studie gezeigt und am Beispiel von Fd2 und Rnp29 in eigenen Analysen bestätigt (Tab. 10 [S. 52]). Die Veränderung der zweiten Aminosäure war ausreichend, um N-terminale Modifikationen zu beeinflussen. Der Austausch des Alanins in Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP gegen Glutamat oder Asparagin verhinderte die Exzision des initialen Methionins (*N-terminal methionine excision*, NME), aber nicht die N-Ac. In Analogie zu Hefe und Säugern kann man annehmen, dass die ausbleibende NME die für die N-Ac verantwortlichen N-Acetyltransferasen (NATs) in Pflanzen verändert. Die modifizierten Rnp29-Substrate Rnp29₁₋₁₀₀A2E:eGFP und Rnp29₁₋₁₀₀A2N:eGFP fielen somit nicht länger in das Substratspektrum von NatA, sondern wären nun Substrate der NME-unabhängig agierenden NatB. Die identifizierte N-Ac des initialen Methionins der transient exprimierten Proteine in *ppi2* zeigte, dass Vorläuferproteine sowohl von NME-abhängigen NATs des Typs NatA als auch von NME-unabhängigen NATs des Typs NatB acetyliert werden können. Die Variation von Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP zu Rnp29₁₋₁₀₀A2E:eGFP und Rnp29₁₋₁₀₀A2N:eGFP hatte keinen Einfluss auf das Verhältnis der Abundanz von unprozessiertem zu prozessiertem Protein (Abb. 9 [S. 54]). Untersuchungen des Proteins *Suppressor of Npr1, Constitutive 1 (Snc1)* aus *A. thaliana* zeigten allerdings, dass die Acetylierung durch diverse NATs regulatorische Effekte haben kann: Snc1 weist zwei N-terminale Isoformen auf, von denen eine NatA-abhängig, die andere NatB-abhängig acetyliert wird (Xu *et al.*, 2015). Die NatA-

abhängige Acetylierung fungierte als Degron, während die NatB-abhängige Acetylierung Snc1 stabilisierte (Xu *et al.*, 2015). Auch in Hefe konnte die Stabilisierung eines NatB-Substrates in *nat3Δ*-Zellen beobachtet werden, die auf einen N-Ac-abhängigen Abbau des Proteins im Zusammenhang mit der ER-lokalisierten E3-Ligase Doa10 hinwies (Hwang *et al.*, 2010). Ein Austausch der zweiten Aminosäure Asparagin gegen Lysin oder Glycin, die äußerst selten N-acetyliert vorliegen, führte zu langlebigeren Proteinen (Hwang *et al.*, 2010). In einem weiteren, Golgi-assoziierten Protein aus Hefe konnte ebenfalls ein Ac/N-Degron identifiziert werden, das durch Assemblierung des Proteins in einen Komplex maskiert werden kann, ansonsten durch die E3-Ligase *General negative regulator of transcription subunit 4* (Not4) erkannt wird (Shemorry *et al.*, 2013).

Die einzige bislang bekannte E3-Ligase, die im Zusammenhang mit Vorläuferstabilität in *A. thaliana* steht, ist *carboxy terminus of Hsc70-interacting protein* (Chip) (Lee *et al.*, 2009). Chip interagiert indirekt mit Vorläuferproteinen über die Bindung der C-terminalen Region von Hsc70-4 (Lee *et al.*, 2009) und ist somit kein Ac/N-Recognin. In *A. thaliana* existieren allerdings vier Not4-Homologe und zwei Doa10-Homologe, die eine potentielle Funktion als Ac/N-Recognin ausüben (Mark Bailey, nicht publizierte Daten) und auch an der N-Ac-abhängigen Regulation von Vorläuferproteinen beteiligt sein könnten. Die N-Ac könnte in Vorläuferproteinen als Ac/N-Degron fungieren, das möglicherweise durch Assemblierung in *guidance* Komplexen maskiert wird. In transformierten Protoplasten zeigten Vorläuferproteine der Rnp29₁₋₁₀₀A2P:eGFP- und Fd2₁₋₁₀₀A2P:eGFP-Varianten, die freies Prolin am N-Terminus aufwiesen, gegenüber den authentischen Varianten Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP und Fd2₁₋₁₀₀:eGFP, die mit N-acetyliertem Alanin begannen, vor allem in der importdefizienten Mutante *ppi2* eine im Verhältnis zur Gesamtheit transient exprimierten Proteins erhöhte Abundanz (Abb. 9 [S. 54]; Abb. 10 [S. 55]). Dies könnte ein Hinweis auf die Bedeutung der Acetylierung bei der Destabilisierung von Vorläuferproteinen sein. Andererseits ließ sich Fd2₁₋₁₀₀A2P:eGFP bei Inhibierung des Proteasoms mit MG132 in transient transformierten Protoplasten besser stabilisieren (Abb. 11 [S. 56]), was für einen erhöhten Proteasom-abhängigen Abbau des nicht-acetylierten Konstrukts im Vergleich zu Fd2₁₋₁₀₀:eGFP argumentiert und gegen eine Funktion der N-Ac als Degradationssignal.

Eine weitere Möglichkeit, die in Betracht gezogen werden sollte, ist die Bedeutung der N-Ac bei der Translokation von Proteinen. Die fehlende N-Ac in Rnp29₁₋₁₀₀A2P:eGFP und Fd2₁₋₁₀₀A2P:eGFP resultierte nicht in einer Fehllokalisierung der Substrate (Abb. 9 [S. 54]; Abb. 10 [S. 55]). Eine N-Ac ist demnach nicht essentiell für eine Lokalisierung der eGFP-Fusionsproteine in Plastiden. Dennoch könnte die N-terminale Modifikation Einfluss auf den Importprozess nehmen. Bei der Untersuchung von *Arabidopsis*-Kinasen konnte beispielsweise beobachtet werden, dass N-Myristoylierung und N-Palmitoylierung eine plastidäre Lokalisierung verhindern (Stael *et al.*, 2011). Der Austausch des Glycins an Aminosäureposition 2 gegen ein Alanin oder Valin in der *calcium-dependent protein kinase*

CDPK16 vermittelte eine Plastiden-Lokalisierung dieses ursprünglich an der Plasmamembran lokalisierten Proteins, während die Einführung eines Myristoylierungs- und Palmitoylierungssignals eine verminderte Lokalisierung von FNR und RbcS in Plastiden veranlasste (Stael *et al.*, 2011). Damit einhergehend beschrieben Forte *et al.* (2011), dass eine N-Ac eine Lokalisierung von Proteinen ins ER hemmt, sodass die N-Ac den Verbleib von Proteinen im Cytosol begünstigen könnte. Im Cytosol interagieren Vorläuferproteine mit Proteinen wie Hsp70 oder Hsp90, was einerseits den Import erleichtert und andererseits einer potentiellen Aggregation entgegenwirkt. Es gibt Beispiele, die belegen, dass N-Ac auch eine Rolle bei Protein-Interaktionen zukommen kann (Arnesen *et al.*, 2010; Scott *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2016; Oh *et al.*, 2017). Für plastidäre Vorläuferproteine ist somit auch eine Funktion der N-Ac, die mit Protein-Interaktionen im Zusammenhang steht, während des Imports oder als Schutz vor einem Abbau denkbar.

Es ist nicht auszuschließen, dass die Veränderung des Alanins an zweiter Position in Prolin in den Fd2:eGFP- und Rnp29:eGFP-Fusionproteinen neben der fehlenden N-Ac auch andere Auswirkungen auf das entsprechende Konstrukt hatte. Als einzige zyklische Aminosäure nimmt Prolin strukturell eine besondere Stellung unter den proteinogenen Aminosäuren ein, die unter Umständen massiven Einfluss auf die Proteinstruktur hat. An Aminosäureposition 2 sind Veränderungen der intramolekularen Struktur unwahrscheinlich. Importanalysen in isolierten WT-Chloroplasten zeigten, dass Rnp29 A2P-Varianten effektiv importiert werden können (Anhang 6 [S.137]), sodass der Import durch den Aminosäureaustausch *in vitro* nicht beeinträchtigt wird. Dennoch sind strukturelle Effekte *in vivo* nicht völlig auszuschließen. Zudem konnte gezeigt werden, dass das N-terminale Prolin in Hefe als sogenanntes Pro/N-Degron für das Pro/N-Recognin Gid4 fungiert und die Lebensdauer von Enzymen der Glyconeogenese im Vergleich zu P2S-Varianten der gleichen Proteine verkürzt (Chen *et al.*, 2017). Die Möglichkeit, dass neben der fehlenden N-Ac auch das eingebrachte Prolin Einfluss auf Struktur und Stabilität der untersuchten eGFP-Fusionsproteine nehmen könnte, sollte berücksichtigt werden. Um im experimentellen Ansatz den Aminosäureaustausch zur Reduzierung der N-Ac zu umgehen, wäre eine Analyse von NAT-Mutanten denkbar, in denen Vorläuferproteine nicht länger acetyliert werden würden. Der *knockout* der katalytischen und akzessorischen NatA-Untereinheiten Naa10 und Naa15 ist in *A. thaliana* allerdings letal (Linster *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2016). Analysen dieser Mutanten wiesen auf eine Bedeutung der N-Ac in der frühen embryonalen Entwicklung hin, die bislang allerdings nicht in Zusammenhang mit konkreten Substraten gebracht werden konnte (Feng *et al.*, 2016). Mutanten mit verringerter NatA-Aktivität sind hingegen lebensfähig (Linster *et al.*, 2015). Sie könnten bei der weiteren Klärung der Bedeutung der N-Ac auch in Bezug auf Vorläuferproteine von Nutzen sein.

4.3 Ein Defekt der Proteasom-Untereinheit Rpn8A erzeugt proteolytischen Stress und beeinflusst die Proteasom-Aktivität

Stressfaktoren wie Hitze, Licht, die Wirkung von Pathogenen und Chemikalien oder auch die durch Mutation hervorgerufene Störung von Proteinen und der Funktion von Proteinkomplexen kann in der Zelle vielseitige Auswirkungen haben und auch zur vermehrten Akkumulation missgefalteter, funktionsgestörter oder überschüssiger Proteine führen. Die Akkumulation solcher Proteine kann proteolytischen Stress erzeugen, der durch Aggregation und Veränderung der Proteinhomöostase verursacht wird. Eine Reaktion der pflanzlichen Zelle auf proteolytischen Stress ist die Induktion des Proteasom-Stress-Regulons (PSR) (Kurepa *et al.*, 2009; Gladman *et al.*, 2016). Untereinheiten des Proteasoms und andere Komponenten, die eine Funktion bei proteolytischem Stress haben, sind Teil des PSR (Gladman *et al.*, 2016).

4.3.1 Steigerung der Abundanz und Aktivität des 20S-Proteasoms in *rpn8a*-Mutanten

Auf Proteinebene konnte in *rpn8a* eine gegenüber dem WT signifikant 1,6-fach bis 2,7-fach erhöhte Abundanz von vier Alpha- und vier Beta-Untereinheiten des 20S CP beobachtet werden (Tab. 11 [S. 66]). In Summe wurde eine deutliche, signifikante Steigerung von 20S CP-Untereinheiten nachgewiesen, während Untereinheiten der 19S RP-Basis unverändert waren und Untereinheiten des 19S RP-Deckels ausschließlich im WT identifiziert wurden (Abb. 29B [S. 90]). In der Doppelmutante *rpn8a ppi2* konnten nahezu alle konstitutiven Proteasom-Untereinheiten identifiziert werden, was ein sehr detailliertes Bild der Zusammensetzung des Proteasoms ergab. Es zeigte sich, dass in Übereinstimmung mit der Einzelmutante Untereinheiten des 20S CP in *rpn8a ppi2* in Summe 1,8-fach erhöht vorlagen, die Abundanz von Proteinen, die die 19S RP-Basis bilden, unverändert war und Proteine des 19S RP Deckels in der *ppi2*-Mutante 1,4-fach verstärkt waren (Abb. 21C [S. 74]). Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass in den *rpn8a*-defekten Mutanten im Vergleich zu den Kontrollen mehr freies 20S-Proteasom vorliegt.

In anderen RP-Mutanten wurde eine Steigerung der Abundanz einzelner Proteasom-Untereinheiten immunologisch nachgewiesen, wobei hier RP- und CP-Untereinheiten betroffen waren: In *rpt2a*-, *rpn1a*- und *rpn5a*-Mutanten waren sowohl Rpn12A als auch PBA1 im Vergleich zum WT höher abundant (Book *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2012) und Yang *et al.* (2004) beschrieben eine erhöhte Abundanz von CP- und Basis-Untereinheiten in *rpn10*- und *rpn12a*-Mutanten, die mit veränderten Transkriptmengen korrelierte, während Untereinheiten des Deckels entgegen ihrer Transkriptregulation auf Proteinebene unverändert waren. Die Analysen von Proteasom-Komplexen

aus verschiedenen RP-Mutanten zeigten eine verstärkte Dissoziation des 26S-Proteasoms in freie 19S RP- und 20S CP-Einheiten in den Mutanten im Vergleich zum WT (Kurepa *et al.*, 2008; Book *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011) und eine reduzierte Ubiquitin-abhängige Proteasom-Aktivität in *rpt2a*, *rpn10* und *rpn12a* (Kurepa *et al.*, 2008). Die Reduzierung der 26S-Proteasom-Funktion in den RP-Mutanten resultierte in einer gesteigerten 20S-Proteasom-Aktivität (Kurepa *et al.*, 2008; Kurepa und Smalle, 2008). Die veränderte Proteasom-Aktivität korrelierte mit einer erhöhten MG132-Toleranz (Kurepa *et al.*, 2008), analog zu der in *rpn8a* beobachteten MG132-Hyposensitivität (Abb. 14 [S. 63]). In den Mutanten *rpn10* und *rpn5a* wurde außerdem eine Akkumulation polyubiquitinerter Proteine beobachtet (Smalle *et al.*, 2003; Kurepa *et al.*, 2008; Book *et al.*, 2009; Gladman *et al.*, 2016), die zusätzlich auf eine reduzierte Ubiquitin-abhängige Degradation in diesen Linien hinwies. In den RP-Mutanten *rpt2a* und *rpn12a* wurde trotz reduzierter 26S-Proteasom-Aktivität keine deutliche Veränderung des Ubiquitinierungslevels im Vergleich zum WT festgestellt (Kurepa *et al.*, 2008). Somit schließt das unveränderte Ubiquitinierungsmuster in *rpn8a* eine Veränderung der Proteasom-Aktivität keinesfalls aus, sondern deckt sich mit Beobachtungen von Kurepa *et al.* (2008). In Zusammenhang mit den verifizierten Abundanzen der Proteasom-Subkomplexe und der MG132-Hyposensitivität lässt dies auf eine reduzierte 26S- und erhöhte 20S-Proteasom-Aktivität schließen.

4.3.2 Regulation der Abundanz von RP-Untereinheiten in *rpn8a*

In der *rpn8a*-Einzel- und der *rpn8a ppi2*-Doppelmutante konnte eine deutliche Steigerung der Transkriptlevel einiger PSR-Gene nachgewiesen werden, die im Zusammenhang mit dem Defekt der regulatorischen Proteasom-Untereinheit Rpn8A steht (Abb. 25 [S. 83]). Diese Beobachtung ist, neben der veränderten Abundanz der Untereinheiten und der MG132-Hyposensitivität, ein weiterer Hinweis darauf, dass in *rpn8a*-Mutanten eine Veränderung der Proteasom-Funktion vorliegt und eine Transkriptregulation analog zu MG132-behandelten Pflanzen und den von Gladman *et al.* (2016) untersuchten *rpn10*- bzw. *rpn12a*-Mutanten stattfindet. Der größte Teil der PSR-Gene kodiert für Untereinheiten des 26S-Proteasoms (Yang *et al.*, 2004; Book *et al.*, 2009; Gladman *et al.*, 2016). In den Transkriptanalysen der *rpn8a*-Mutanten waren sowohl Gene, die für Proteine des regulatorischen als auch des katalytischen Subkomplexes kodieren hochreguliert (Abb. 25 [S. 83]). Während die Proteinabundanz der 20S CP-Untereinheit PAA2 in *rpn8a ppi2* mit den Ergebnissen der Transkriptanalysen korrelierte, konnte eine Diskrepanz für die 19S RP-Untereinheiten Rpn5A, Rpn10 und Rpt2A festgestellt werden (Abb. 26 [S. 85]). Bei den RP-Einheiten wirkte sich die signifikant erhöhte Transkriptmenge nicht direkt auf die Abundanz der entsprechenden Proteine aus.

In MG132-behandelten WT- und *ppi2*-Pflanzen zeigte sich auf Proteinebene hingegen bezüglich der Proteasom-Untereinheiten eine zu den *rpn8a*-Mutanten unterschiedliche Regulation (Abb. 29B

[S. 90]). Die Inhibierung des Proteasoms mit MG132 führte sowohl im WT als auch in *ppi2*-Pflanzen zu einer signifikanten Steigerung der Abundanz aller 26S-Subkomplexe. In Summe waren Proteine des 19S RP-Deckels als auch der Basis in *rpn8a ppi2* im Vergleich zur Kontrolle um das 1,7-Fache und das 20S CP um das 2,1-Fache höher abundant. Obwohl also eine Induktion des PSR sowohl in *rpn8a*-Mutanten als auch in MG132-behandelten Pflanzen zu verzeichnen war, gab es auf Proteinebene einen deutlichen Unterschied in der MG132-induzierten und durch die Mutation von *Rpn8A* induzierten Proteasom-Regulation. Anders als in MG132-behandelten Pflanzen findet in *rpn8a*-Mutanten demnach eine Regulation statt, die zur Diskrepanz zwischen Transkript- und Proteinlevel führt und besonders bei Proteinen des Deckels zum Tragen kommt. Generell ist die Proteinabundanz letztendlich das Ergebnis vielschichtiger Regulationen, die neben der transkriptionalen Regulation auf Genebene und der Prozessierung und Degradation der mRNA und, *downstream* der Transkription, die Translation, Lokalisierung, Modifikationen und Degradation von Proteinen umfasst (Vogel und Marcotte, 2012). Die Veränderung der Abundanz einer Untereinheit, die in einem Komplex assoziiert ist, zieht oftmals die selektive Proteolyse weiterer Untereinheiten des Komplexes nach sich (Scazzari *et al.*, 2015). Die Assemblierung des 19S RP-Deckels erfolgt in Hefe mehreren Teilschritten und wird vermutlich unabhängig von Basis- oder 20S CP-Untereinheiten vollzogen (Budenholzer *et al.*, 2017). Rpn11 assoziiert mit Rpn8 zu einem Heterodimer. Rpn5, Rpn6 und Rpn9 formen mit dem Rpn11/Rpn8-Heterodimer ein Modul, das mit einem zweiten Modul aus Rpn3 und Rpn7 assoziiert. Rpn12 interagiert mit Rpn8 und Rpn3 und komplettiert die Assemblierung des Deckels (Budenholzer *et al.*, 2017). Die C-terminalen helikalen Bereiche der Proteine spielen in der Assoziation eine entscheidende Rolle und bilden ein Helix-Bündel (Estrin *et al.*, 2013). In Hefe wurde gezeigt, dass die Deletion der C-terminalen Helix von Rpn8 massive Auswirkungen auf die Assemblierung des Deckels hat, sodass keine Bildung von Intermediaten des 19S RP-Deckels zustande kommen (Estrin *et al.*, 2013). Die zentrale Rolle von Rpn8 könnte in *A. thaliana* analog zur Situation in Hefe sein, sodass das Fehlen der Untereinheit in den *rpn8a*-Mutanten die Assemblierung des RP-Komplexes und -Intermediaten behindert und dadurch den Abbau der nicht-assoziierten Untereinheiten fordert. In MG132-behandelten Pflanzen können die Proteasom-Untereinheiten durch Anwesenheit aller Untereinheiten korrekt assoziieren und stabilisiert werden (Abb. 29B [S. 90]; Abb. 30 [S. 92]).

4.3.3 *rpn8a* zeigt im Vergleich zu anderen RP-Mutanten einen eher schwach ausgeprägten Phänotyp

Im WT bildet Rpn8A mit anderen RP-Untereinheiten einen funktionellen 19S RP-Komplex, der eine essentielle Funktion in der Zelle erfüllt. Die Veränderung einer der Untereinheiten kann Effekte auf

den gesamten Komplex haben und sich auf die Aktivität des Proteasoms auswirken. Es ist anzunehmen, dass eine Veränderung der Aktivität des Proteasoms durch Verlust oder Modifikation einzelner 19S RP-Untereinheiten ähnliche Phänotypen hervorruft, die auf generelle Funktionen des Komplexes schließen lassen. Bei Vergleichen verschiedener RP-Mutanten, wurden in der Tat zum Teil ähnliche Defekte beobachtet, die auf eine gemeinsame Veränderung der Proteasom-Aktivität in RP-Mutanten zurückgehen könnten (Kurepa *et al.*, 2008; Book *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Ueda *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012). Die Ermittlung einer MG132-Hyposensitivität und die Induktion des PSR sind Hinweise auf Veränderungen der Proteasom-Aktivität in *rpn8a* (Abb. 14 [S. 63]; Abb. 25 [S. 83]), wie sie auch in anderen RP-Mutanten beobachtet wurden. Physiologische Untersuchungen von *rpn8a* zeigten eine signifikant reduzierte Wurzelelongation und eine NaCl-Hypersensitivität (Abb. 13 [S. 61]). In den RP-Mutanten *rpt2a*, *rpt5a*, *rpn10* und *rpn12a* wurde ebenfalls ein verringertes Wurzelwachstum nachgewiesen (Smalle *et al.*, 2002; Smalle *et al.*, 2003; Ueda *et al.*, 2004; Kurepa *et al.*, 2008; Ueda *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012) und eine NaCl-Hypersensitivität wurde auch für *rpn1a* und *rpn10* gezeigt (Smalle *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011). Für *rpn1a*-, *rpn5a*-, *rpn10*- und *rpn12a*-Mutanten wurde zusätzlich eine reduzierte Wachstumsrate beobachtet (Smalle *et al.*, 2003; Smalle *et al.*, 2002; Kurepa *et al.*, 2008; Book *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009), die in der untersuchten *rpn8a*-Linie nicht zu verzeichnen war. Im Gegenteil, unter Kurztagbedingungen war das Frischgewicht von *rpn8a*-Keimlingen gegenüber WT-Keimlingen sogar signifikant erhöht (Abb. 13A [S. 61]). Für die *rpn8a*-Mutante *asymmetric leaves enhancer 3-1 (ae3-1; Ökotyp Landsberg erecta)* wurden neben schmalen, langen Blättern, verzögerter Blüte, kleinerem Wuchs und veränderten Trichomen auch Unterschiede in der Leitbündelstruktur beobachtet, die auf einen Defekt in der adaxialen/abaxialen Identität zurückzuführen sein könnten (Huang *et al.*, 2006). Rpn8A und andere Proteasom-Untereinheiten wurden als Verstärker des Phänotyps der *asymmetric leaves 2 (AS2)*-Mutante *as2-101* identifiziert, was eine Rolle des Proteasoms in der Ausbildung der Blattpolarität impliziert (Huang *et al.*, 2006). Diese Beobachtungen unterstreichen die Bedeutung von Rpn8 *in planta*. Zwei weitere von Huang *et al.* (2006) untersuchte *rpn8a*-Linien mit Hintergrund Ökotyp *Columbia rpn8a-1 (ae3-2)* und auch *rpn8a-2 (ae3-3)* wiesen, übereinstimmend mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten, einen WT-ähnlichen Habitus auf, was auf Unterschiede der einzelnen *A. thaliana*-Ökotypen hinweist. Die Ausprägung von Phänotypen, wie die reduzierte MG132-Sensitivität, die Hemmung der Wurzelelongation und des Wuchses, korrelierten in Analysen von *rpt2a*, *rpn10* und *rpn12a* mit der Stärke der Veränderung der Proteasom-Aktivität (Kurepa *et al.*, 2008). Dass *rpn8a* nach eigenen Untersuchungen recht geringe Unterschiede zum WT zeigte, die auf generelle Störungen des Proteasoms zurückzuführen sein könnten, belegt, dass die Mutante nur wenig in der Proteasom-Funktion beeinträchtigt ist.

Trotz der kollektiven Beteiligung der RP-Untereinheiten in einem gemeinsamen funktionellen Komplex, bestehen zwischen RP-Mutanten phänotypische Abweichungen, die auf differenzierte Beteiligung der einzelnen Untereinheiten hindeuten. Verringerte Fertilität auf Grund von Defekten in der Gametogenese oder Embryogenese wurden zum Beispiel für *rpt2a*, *rpt5a*, *rpn1a*, *rpn5a* und *rpn10* beschrieben (Brukhin, 2005; Book *et al.*, 2009; Gallois *et al.*, 2009; Fatimababy *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011), ist in *rpn8a* allerdings nicht beobachtet worden. Andererseits wurde eine Änderung photosynthetischer Parameter, wie sie in dieser Arbeit für *rpn8a*-Mutanten verzeichnet wurde (Abb. 13E [S. 61]; Abb. 20 [S. 73]), bislang für keine andere RP-Mutante beschrieben. Messungen mit einem *imaging*-PAM-Fluorometer haben gezeigt, dass in einer Lichtkurve mit Adaption der Pflanzen an steigende Lichtintensitäten die *rpn8a*-Linie gegenüber dem WT eine erhöhte operative *PSII Quantum Yield* und ein reduziertes NPQ aufwies. Während *rpn8a* auch unter Langtagbedingungen in ihrer Erscheinung dem WT glich (Abb. 12 [S. 59]), wurde für *rpt2a*, *rpn1a*, *rpn10* und *rpn12a* eine verstärkte Photosensitivität ermittelt (Smalle *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2012). Interessanterweise zeigte eine *A. thaliana*-Linie, die den Transkriptionsfaktor NAM/ATAF1/CUC2* 78 (Nac78) überexprimierte, eine erhöhte *PSII Quantum Yield* nach Adaption an hohe Lichtbedingungen und eine gesteigerte 20S-Abundanz (Yabuta *et al.*, 2011). Nac78 ist an der Regulation des PSR beteiligt (Gladman *et al.*, 2016) und spielt auch eine Rolle bei der Induktion von Genen, die an der Flavonoid-Biosynthese beteiligt sind (Morishita *et al.*, 2009). Demnach besteht möglicherweise ein Zusammenhang des PSR und der Adaption an Lichtbedingungen, der auch in *rpn8a*-Mutanten zum Tragen kommt (siehe auch Kapitel 4.4.4 [S. 112]).

Neben der Funktion im Proteasom sind für RP-Untereinheiten auch Funktionen darüber hinaus denkbar. Abweichungen der Phänotypen von RP-Mutanten könnten auf differenzielle Funktionen einzelner Untereinheiten außerhalb des Proteasoms zurückgehen. In Hefe wurde beispielsweise gezeigt, dass Rpn5 neben dem 19S RP auch im *constitutive photomorphogenesis 9* (Cop9)-Signalosom (CSN) inkorporieren kann (Yu *et al.*, 2011), und für extraproteasomales Rpn10 wird ein *shuttle*-Funktion für ubiquitinierte Substrate oder Ubiquitin-Bindeproteine postuliert (Matiuhin *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009a), die auch in *A. thaliana* eine Rolle spielen könnte (Keren-Kaplan *et al.*, 2016). Es gibt allerdings keine Hinweise darauf, dass auch andere konstitutive RP-Untereinheiten Funktionen neben ihrer Funktion als integrale Proteasom-Untereinheit ausüben. Variationen der Phänotypen von RP-Mutanten sind wahrscheinlich eher das Resultat unterschiedlicher Kompensationsmechanismen einzelner Linien, wobei in *A. thaliana* stets die Existenz von Homologen, mit potentiell redundanter Funktion, berücksichtigt werden muss.

* No Apical Meristem/Arabidopsis Transcription Activation Factor 1/Cup-Shaped Cotyledons 2

4.3.4 Rpn8B könnte den Verlust von Rpn8A in *rpn8a*-Mutanten kompensieren

Transkriptanalysen zeigten, dass in der RP-Mutante *rpn8a* kein vollständiges Rpn8A-Transkript generiert wird (Abb. 12 [S. 59]). Eine verkürzte mRNA war hingegen nachweisbar, die potentiell zu einem verkürzten Protein führen könnte. Proteomanalysen gaben jedoch keinen Hinweis darauf, dass Rpn8A in den *rpn8a*-Mutanten, *rpn8a* oder *rpn8a ppi2*, vorkommt. Während in *ppi2* Rpn8A sicher identifiziert werden konnte, wurde in *rpn8a ppi2* ausschließlich das Rpn8A-Paraloge Rpn8B nachgewiesen.

Die hohe Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen der Rpn8-Paraloge, Rpn8A und Rpn8B, aus *A. thaliana* von 95% suggeriert eine ähnliche Funktionalität der Proteine (Book *et al.*, 2009; Anhang 12 [S. 144]). Eine Mutation beider Paraloge ist letal (Huang *et al.*, 2006), was zum einen die essentielle Bedeutung von Rpn8 in *A. thaliana* hervorhebt und zum anderen ein Argument für eine redundante Funktion beider Homologe ist. Nach Kreuzung mit der *assymetric leaves 2 (AS2)*-Mutante *as2-101* zeigten *rpn8a* und *rpn8b* dennoch unterschiedliche Phänotypen (Huang *et al.*, 2006). Als Grund dafür wären spezifische Funktionen der einzelnen Rpn8-Homologe denkbar. Trotz einer hohen Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz und Hinweisen auf redundante Funktionen der Homologen Rpn5A und Rpn5B, resultierte die Überexpression der einzelnen Untereinheiten im WT in unterschiedlichen Phänotypen, sodass die Rpn5-Homologen neben gemeinsamen wohlmöglich auch spezifische Funktionen ausüben (Book *et al.*, 2009). Es ist unklar, ob dies auch auf Rpn8A und Rpn8B zutrifft. Wahrscheinlicher ist allerdings, dass die Unterschiede der *rpn8*-Mutanten auf verschiedenen Expressionslevel der Paraloge beruhen. Für *Rpt2A*, *Rpt5A*, *Rpn1A* und *Rpn5A* wurden im Vergleich zum korrespondierenden Paralog höhere Expressionslevel verzeichnet, was mit dem stärker ausgeprägten Phänotyp in den entsprechenden *knockout*-Mutanten korrelierte (Yang *et al.*, 2004; Brukhin, 2005; Book *et al.*, 2009; Gallois *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011). Ein ähnlicher Kompensationsmechanismus könnte auch für *Rpn8A/B* existieren, wobei im WT *Rpn8A* das funktionell dominanter Homologe mit höherem Expressionslevel ist (Yang *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2006). *Rpn8B* ist durch proteolytischen Stress induzierbar (Yabuta *et al.*, 2011; Gladman *et al.*, 2016). In *rpn8a*-Mutanten wurde eine signifikant erhöhte Transkriptmenge für *Rpn8B* ermittelt (Abb. 25 [S. 83]). Auf Proteinebene erreichte Rpn8B in der Doppelmutante *rpn8a ppi2* etwa das 0,7-Fache der in *ppi2* ermittelten Rpn8A-Konzentration (Anhang 12 [S. 144]). Letztendlich könnte die erhöhte Menge an Rpn8B den Verlust der Rpn8A-Funktion in den *rpn8a*-Mutanten nahezu vollständig kompensieren und der Grund für die subtilen Auswirkungen der Mutation sein.

4.4 Einfluss der *Rpn8A*-Mutation auf plastidäre Prozesse

Wie die Auswirkungen des Toc159-Verlustes in *ppi2* zeigen, ist zur Entwicklung und dem Erhalt leistungsfähiger Plastiden ein effektiver Proteinimport essentiell. Der Importdefekt wirkt sich auf die Abundanz plastidärer Proteine und auch auf die Struktur und Funktionalität von Plastiden aus (Bauer *et al.*, 2000). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Folgen des Importdefekts durch eine sekundäre Mutation der RP-Untereinheit Rpn8A in *ppi2* gemildert werden konnten.

Vergleiche der Mutanten *ppi2* und *rpn8a ppi2* hinsichtlich der Abundanz plastidärer Proteine mit Funktion in der Photosynthese, der Thylakoidstruktur in Plastiden und dem Gehalt photosynthetischer Pigmente ergab, dass *rpn8a ppi2* verbesserte Eigenschaften aufwies. Die plastidären Proteine des PSII-Reaktionszentrums D1, D2 und CP43 sowie einige Proteine des LHCII wurden in Proteomanalysen signifikant erhöht oder ausschließlich in der Doppelmutante quantifiziert (Tab. 12 [S. 79]). Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Plastiden zeigten in *rpn8a ppi2* verstärkt gestapelte Bereiche, in denen das PSII lokalisiert ist (Abb. 19 [S. 71]) und sowohl Chlorophyll als auch Carotinoide wurden vermehrt in *rpn8a ppi2* nachgewiesen (Abb. 18B [S. 70]). Auf funktioneller Ebene spiegelten sich diese Beobachtungen in der Steigerung der Leistungsfähigkeit des PSII und des NPQ wieder (Abb. 20 [S. 73]). Die gesteigerte *PSII Quantum Yield* in der Doppelmutante gegenüber *ppi2* weist auf eine effizientere Lichtabsorption und effektiveren Energietransfer am PSII hin. Neben photosynthetischen Proteinen ist Chlorophyll, gebunden von LHC-Proteinen, essentiell an diesen Prozessen beteiligt. Als Folge des Importdefekts in *ppi2* ist die Mutante nicht fähig strukturelle und biochemische Voraussetzungen zu schaffen, um effektiv photosynthetische Pigmente zu synthetisieren und zu akkumulieren, während in der Doppelmutante *rpn8a ppi2* eine gesteigerte Abundanz verzeichnet werden konnte. Gleichzeitig stellt Chlorophyll eine potentielle Gefahr von photooxidativen Schädigungen durch die Generierung von ROS dar. Photoprotektive Mechanismen und eine strenge Koordination der Chlorophyll-Biosynthese, die an die plastidäre Konstitution angepasst ist, sind essentiell für das Überleben und die Entwicklung der Pflanze.

4.4.1 Rpn8A und SP1 beeinflussen Plastiden auf funktionell unterschiedlichen Wegen

In vorangehenden Studien konnte gezeigt werden, dass die E3-Ligase SP1 verantwortlich für die Ubiquitinierung von TOC-Komponenten ist (Ling *et al.*, 2012). Die Modifikation steht im Zusammenhang mit einer Degradation über das UPS, da polyubiquitiniertes Toc33 bei Behandlung mit MG132 akkumulierte (Ling *et al.*, 2012). Diese Beobachtung und die Tatsache, dass die Mutation von *Rpn8A* eine ähnliche Verbesserung des Phänotyps der *toc33*-Mutante *ppi1* hinsichtlich des

Chlorophyllgehalts aufwies (Ling *et al.*, 2012), führten zur Annahme, dass Rpn8A und SP1 Komponenten eines gemeinsamen Regulationsweges sind. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass SP1 selbst UPS-abhängig reguliert wird (Ling *et al.*, 2012).

Der Verlust von SP1 in der *toc33*-Mutante *ppi1* resultierte in einer erhöhten Zahl von Lamellen der Grana-Thylakoide und einer gesteigerten maximalen *PSII Quantum Yield* im Vergleich mit der Einzelmutante *ppi1* (Ling *et al.*, 2012). Somit hatte die zusätzliche Mutation von *SP1* in der Importmutante *ppi1* ähnliche Auswirkungen auf den Phänotyp wie die sekundäre Mutation von *Rpn8A* in *ppi2*. In der Doppelmutante *sp1 ppi1* und auch der *sp1*-Einzelmutante konnte *in vitro* ein verbesserter Import photosynthetischer Proteine nachgewiesen werden (Ling *et al.*, 2012). Analysen des Imports verschiedener heterolog exprimierter eGFP-Fusionsproteine in Protoplasten der *rpn8a*-Mutanten ergaben im Vergleich zu entsprechend transient transformierten WT- bzw. *ppi2*-Protoplasten keinen deutlichen Anhaltspunkt für eine veränderte Importeffizienz (Abb. 27 [S. 86]).

Die modifizierte Importrate in *sp1*-Mutanten stand im Zusammenhang mit einer gesteigerten Abundanz insbesondere von Toc33 und Toc75 (Ling *et al.*, 2012). Die erhöhte Abundanz von Toc75 in *sp1* konnte in eigenen Studien bestätigt und auch in *sp1 ppi2* verifiziert werden (Abb. 16 [S. 67]; Abb. 23 [S. 78]; Abb. 24 [S. 80]). Eine Veränderung des Chlorophyllgehalts oder der Konzentration photosynthetischer Proteine konnte hingegen in *sp1 ppi2* nicht beobachtet werden (Abb. 18B [S. 70]; Abb. 23 [S. 78]). In *rpn8a ppi2* konnte eine Verbesserung der plastidären Eigenschaften im Vergleich zur Einzelmutante *ppi2* verzeichnet werden, allerdings war keine Akkumulation von TOC-Komponenten festzustellen (Abb. 24 [S. 80]). Im Gegensatz dazu wurde in *rpn8a*-Mutanten auf Grund von proteolytischem Stress eine klare Regulation der Proteasom-Untereinheiten nachgewiesen, die in *sp1*-Mutanten ebenso wenig wie die Regulation von an der Flavonoid-Biosynthese beteiligter Proteine stattfand (Abb. 15 [S. 65]; Abb. 21 [S. 74]). Die Unterschiede bei der partiellen Komplementation des *ppi2*-Phänotyps und die geringen Übereinstimmungen in der Regulation des Proteoms von Einzel- und Doppelmutanten (Anhang 9 [S. 139]), lassen den Schluss zu, dass SP1 und Rpn8A plastidäre Prozesse auf unterschiedlichen Wegen beeinflussen.

4.4.2 Änderungen in Pigment- und Proteinkonzentrationen gehen nicht auf Transkriptregulationen zurück

In *rpn8a ppi2* konnte in Bezug auf *ppi2* eine erhöhte Konzentration von Chlorophyll und an der Photosynthese beteiligter Proteine nachgewiesen werden. Die Chlorophyll-Biosynthese findet in den Chloroplasten statt, wobei einzelne Teilabschnitte der Synthese im Stroma ablaufen oder an Membranen gekoppelt sind (Wang und Grimm, 2015). Alle Enzyme, die an der Synthese von Tetrapyrrolen beteiligt sind (Tanaka *et al.*, 2011), sind im Zellkern kodiert und müssen in die Plastiden

importiert werden. Die konstitutive Expression der Transkriptionsfaktoren Glk1 und Glk2 stimulierte die Expression dieser Gene und LHC-kodierender Gene (Waters *et al.*, 2009), was eine Co-Regulation der Chlorophyll-Biosynthese und der Photosynthese belegt. Auch *ppi2*-Mutanten, die Glk1 überexprimieren, zeigten Änderungen für Chlorophyll-Synthese- und Photosynthese-relevante Gene auf Transkriptebene und akkumulierten sowohl mehr Chlorophyll als auch an der Photosynthese beteiligte Proteine (Kakizaki *et al.*, 2009). Ähnlich zu den von Kakizaki *et al.* (2009) generierten Glk1-überexprimierenden *ppi2*-Linien, zeigten Vergleiche von *ppi2* und *rpn8a ppi2* höhere Konzentrationen photosynthetischer Pigmente in der Doppelmutante (Abb. 18B [S. 70]). Von insgesamt 11 in *ppi2* und *rpn8a ppi2* identifizierten Proteinen, die an der Chlorophyll-Biosynthese beteiligt sind, war die Geranylgeranyl-Diphosphat-Reduktase signifikant um das 1,5-Fache erhöht (Anhang 10 [S. 140]). Das Enzym reduziert Geranylgeranyl-Diphosphat, das auch der Vorläufer von Carotinoiden ist, zu Phytol-Diphosphat (Tanaka *et al.*, 2011). Keine weiteren Enzyme der Tetrapyrrol-Synthese waren in der Doppelmutante signifikant verändert. Demnach gibt es keinen eindeutigen Nachweis dafür, dass die erhöhte Abundanz am Syntheseweg beteiligter Enzyme eine Steigerung der Chlorophyllkonzentration in *rpn8a ppi2* bedingt. Es gibt Hinweise darauf, dass die Tetrapyrrol-Biosynthese auch durch Protein-Protein-Interaktionen reguliert wird (Wang und Grimm, 2015). Beispielsweise interagiert das Membran-assoziierte Protein *Fluorescent* (Flu) mit Schlüsselenzymen der Chlorophyll-Biosynthese und inhibiert die Synthese von 5-Aminolävulinsäure (ALA) bei Dunkelheit in einer Metabolit-abhängigen *feedback*-Regulation (Meskauskiene *et al.*, 2001; Kauss *et al.*, 2012). So könnte die Chlorophyll-Biosynthese unabhängig von der Abundanz beteiligter Enzyme reguliert sein.

Die höhere Konzentration photosynthetischer Pigmente korrelierte in der Doppelmutante *rpn8a ppi2* mit der erhöhten Akkumulation von Pigment-bindenden Proteinen (Tab. 12 [S. 79]). Bei fünf Proteinen, die verstärkt oder ausschließlich in der Doppelmutante identifiziert wurden, handelte es sich um Chlorophyll-bindende Proteine der peripheren und inneren Lichtsammelkomplexe. Obwohl in Proteomanalysen eine höhere Abundanz photosynthetischer Proteine in *rpn8a ppi2* verzeichnet wurde, bestand kein direkter Zusammenhang zur Transkriptregulation im Kern lokalisierte Gene (Abb. 26 [S. 85]), die auf eine Glk1-abhängige Transkriptregulation im Zuge einer veränderten retrograden Signaltransduktion schließen lassen würden. Die Koordination von Pigmentgehalt und Proteinabundanz findet demnach nicht auf Transkriptebene, sondern unabhängig von einer transkriptionalen Regulation statt.

4.4.3 Proteasom-abhängige Regulation von Vorläuferproteinen

Auf Grund der bereits vorgebrachten Argumentation ist es wahrscheinlich, dass die in *rpn8a ppi2* gegenüber *ppi2* veränderten plastidären Eigenschaften auf einer posttranskriptionalen Regulation plastidärer Proteine beruht, die direkt oder indirekt im Zusammenhang mit dem UPS steht. Die Aktivität und/oder Spezifität des Proteasoms ist in *rpn8a*-Mutanten verändert, was Auswirkungen auf einzelne oder mehrere Substrate haben kann. Die modifizierte Abundanz der Proteasom-Untereinheiten und die gesteigerte MG132-Resistenz der *rpn8a*-Mutanten weisen auf eine erhöhte Aktivität des 20S-Proteasoms und eine reduzierte Aktivität des 26S-Proteasoms hin. In MG132-behandelten Protoplasten konnte die Stabilisierung von Vorläuferproteinen induziert werden (Abb. 11 [S. 56]; Anhang 7 [S. 138]), was eine Proteasom-Beteiligung an der Regulation der Vorläufer im Cytosol zeigt. Es gibt weitere Hinweise darauf, dass Vorläuferproteine Ubiquitin-abhängig über das 26S-Proteasom degradiert werden (Lee et al., 2009; Sako et al., 2014; Shanmugabalaji et al., 2018). Auch mitochondriale Vorläufer werden im Cytosol ubiquitiniert und im Zuge einer Protein-Qualitätskontrolle über das 26S-Proteasom abgebaut (Radke et al., 2008; Bragoszewski et al., 2013). Eine Inhibierung der Proteasom-Aktivität resultierte in Hefezellen in einer gesteigerten Akkumulation von Proteinen des mitochondrialen Intermembranraums, die den *mitochondrial import and assembly (MIA)-pathway* nutzen (Bragoszewski et al., 2013). Demnach könnten dem UPS-zugeführten Proteine importfähige Vorläufer sein und der Proteinimport und die Proteindegradation kompetitive Prozesse darstellen (Bragoszewski et al., 2017). Die Anreicherung von plastidären Vorläuferproteinen im Cytosol bei Reduzierung der 26S-Aktivität nach Mutation von *Rpn8A* könnte somit eine Steigerung des Imports dieser Proteine zur Folge haben.

Eine gesteigerte Präsenz von Vorläuferproteinen birgt allerdings die Gefahr der Aggregation akkumulierender Vorläufer im Cytosol. Ein verringertes Wachstum, wie es anhand des verminderten Frischgewichts in *rpn8a ppi2* verzeichnet wurde (Abb. 18C [S. 70]), könnte die Konsequenz der Akkumulation von plastidären Vorläufern und anderen Zielproteinen des 26S-Proteasoms sein. Die Steigerung der Konzentration von Vorläuferproteinen könnte andererseits den ineffektiven Import nach Verlust von Toc159 in geringem Maße ausgleichen und die Menge an reifem Protein in Plastiden erhöhen. Durch den so gesteigerten Gehalt importierter Proteine könnte die Plastiden-Konstitution der Albinolinie *rpn8a ppi2* verbessert werden. Importversuche in mit diversen eGFP-Fusionsproteinen transient transformierten Protoplasten wiesen nur geringe Unterschiede in der Abundanz von Vorläufer- und reifem Proteinen in *ppi2* und *rpn8a ppi2* auf (Abb. 27 [S. 86]). Es ist möglich, dass während der Entwicklung die potentielle Stabilisierung von Vorläufern im Zusammenhang mit einem veränderten Import steht und Einfluss auf das Proteom der Plastiden hat. Die MG132-induzierte Akkumulation von Vorläuferproteinen hatte jedoch in Protoplasten keine

höhere Konzentration an reifem Protein zur Folge (Abb. 27 [S. 86]). Zudem konnte in MG132 behandelten Keimlingen des WT oder der *ppi2*-Linie keine gesteigerte Menge photosynthetischer Proteine nachgewiesen werden (Abb. 28 [S. 89]), obwohl eine Inhibierung des Proteasoms und eine Akkumulation von Vorläufern stattfindet. Proteomstudien mit *A. thaliana* nach Inhibierung der Proteasom-Aktivität mit Syringolin A zeigten ebenfalls, dass 38% der plastidären Proteine runterreguliert waren (Svozil *et al.*, 2014). Die Regulation betraf vor allem Proteine mit einer Funktion in der Photosynthese (Svozil *et al.*, 2014). Dass die partielle Komplementation von *ppi2* durch die Proteasomveränderung nach *Rpn8A*-Mutation nicht durch die Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren nachgestellt werden kann, kann verschiedene Gründe haben. Während die chemisch induzierte Inhibierung des Proteasoms unvermittelt, kurzzeitig und massiv ist, besteht die mutationsbasierte Inhibierung in *rpn8a*-Mutanten über die gesamte Entwicklung der Pflanze hinweg. Kompensationsmechanismen, wie das PSR, wirken der Proteasom-Veränderung und dem damit verbundenem proteolytischem Stress adaptiv entgegen. In der Regulation der Abundanz einzelner Proteasom-Subkompartimente bestand ein deutlicher Unterschied zwischen MG132-induzierten Pflanzen und *rpn8a*-Mutanten (Abb. 29B [S. 90]; Abb. 30 [S. 92]), der Einfluss auf Aktivität- und Spezifität des Degradationsapparates hat und eine Diskrepanz in der Abundanz plastidärer Proteine begründen könnte. Vergleiche des Proteoms von MG132-behandelten WT- und *ppi2*-Keimlingen mit *rpn8a*-Mutanten zeigten außerdem eine Reduzierung von stressinduzierten GSTs in den RP-Mutanten, aber nicht in MG132-behandelten Keimlingen (Abb. 29 A [S. 90]).

4.4.4 Photoprotektive Mechanismen und oxidativer Stress in *ppi2* und *rpn8a ppi2*

Photoautotrophe Pflanzen nutzen die Lichtenergie zur Produktion energiereicher Kohlenwasserstoffe, die ihre Entwicklung und das Wachstum fördern. Bei akuter Überlastung der Photosysteme durch übermäßige Anregung von Chlorophyll mit Lichtenergie entstehen reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) durch die Übertragung von Energie eines Triplett-Chlorophylls auf molekularen Sauerstoff (Pospíšil, 2016). Untersuchungen von WT- und *ppi2*-Pflanzen unter normalen und Schwachlicht-Bedingungen haben gezeigt, dass normale Lichtbedingungen essentiell für das effektive Wachstum des WT sind, sich allerdings negativ auf das Wachstum von *ppi2* auswirken (Abb. 31 [S. 94]). *Ppi2* vermeidet die Bildung von ROS durch Reduzierung photosynthetischer Pigmente und Proteine (Bauer *et al.*, 2000; Kakizaki *et al.*, 2009; Bischof *et al.*, 2011), während im WT effektive Mechanismen existieren, die der Gefahr von ROS entgegenwirken. Die Anzucht des WT unter schwachen Lichtbedingungen wirkte sich negativ auf dessen Wachstum aus (Abb. 31 [S. 94]), sodass im WT die Gefahr von ROS gegenüber der Photosyntheseleistung eine

untergeordnete Rolle spielt. Eine Reduzierung der Lichtintensität wirkte sich hingegen positiv auf die Konstitution der *ppi2*-Plastiden aus (Abb. 31 [S. 94]). Die albinotischen Pflanzen waren fähig mehr photosynthetische Pigmente und Proteine zu akkumulieren. Dies zeigt, dass die Chloroplasten-Entwicklung in *ppi2* nicht ausschließlich durch die verringerte Importkompetenz, sondern auch durch Licht-induzierten Stress beschränkt ist. Interessanterweise ähnelten unter schwachen Lichtbedingungen angezogene *ppi2*-Pflanzen in Pigment-Gehalt und funktionellen PSII-Parametern unter normalen Lichtbedingungen angezogenen *rpn8a ppi2*-Pflanzen, sodass eine Verringerung von Lichtstress in *ppi2*-Pflanzen den Effekt der *Rpn8A*-Mutation in *ppi2* teilweise nachahmen konnte (Abb. 31 [S. 94]). Demnach könnte ein Grund für die modifizierten plastidären Eigenschaften von *ppi2* durch die *Rpn8A*-Mutation auf verbesserter Vermeidung und Tilgung von ROS basieren.

Carotinoide sind essentiell an der Photoprotektion der Photosysteme im Zuge des NPQ und dem Schutz vor ROS involviert (Mirkovic *et al.*, 2017). Der gesteigerte Carotinoidgehalt könnte den erhöhten NPQ von *rpn8a ppi2* im Vergleich zu *ppi2* bedingen. Das Protein PsbS, das signifikant um mehr als das 1,5-Fache in der Doppelmutante identifiziert wurde, ist ebenfalls in diesem Prozess beteiligt. PsbS aktiviert den NPQ durch Interaktion mit LHCII-Proteinen (Correa-Galvis *et al.*, 2016). *In vitro*-Versuche mit isolierten Thylakoiden wiesen auf eine Bedeutung der Grana-Stapelung beim Xanthophyll-abhängigen NPQ hin (Goss *et al.*, 2007). Der erhöhte Anteil gestapelter Thylakoid-Membranen in *rpn8a ppi2* begünstigt also ebenfalls den NPQ. Der schnell induzierbare, pH- und Carotinoid-abhängige NPQ spielt eine entscheidende Rolle in der Adaption an kurzzeitig wechselnde Lichtbedingungen. Untersuchungen von *Arabidopsis*-Mutanten mit Defekten in diesem Mechanismus zeigten allerdings keine Anzeichen von photooxidativen Stress unter stetigen Starklichtbedingungen, sondern glichen die Defekte mit erhöhten Mengen von Antioxidantien und reduzierten Antennenkomplexe aus (Golan *et al.*, 2006). Demnach kommt dem schnell induzierbaren NPQ unter konstanten Lichtbedingungen in den von Golan *et al.* (2006) untersuchten, WT-ähnlichen Mutanten nur eine untergeordnete Rolle zu. Bei Erhöhung der Chlorophyll-Konzentration in der Albinolinie *rpn8a ppi2* im Vergleich zu *ppi2* könnte die gesteigerte Photoprotektion hingegen ausschlaggebend für die Plastiden-Konstitution sein. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass Carotinoide neben der Funktion bei der Photoprotektion als Antioxidans wirken und in photosynthetischen Bakterien und Pflanzen eine Bedeutung bei der Assemblierung und Stabilisierung von Pigment-Protein-Komplexen haben. Beispielsweise führten Störungen der Carotinoid-Biosynthese zur Reduzierung funktioneller PSII-Komplexe in Cyanobakterien (Sozer *et al.*, 2010) und in *Arabidopsis*-Mutanten mit eingeschränkter Xanthophyll-Synthese konnte eine reduzierte Stabilität von LHCII-Trimeren beobachtet werden (Lokstein *et al.*, 2002; Dall'Osto *et al.*, 2007). An der Carotinoid-Biosynthese beteiligte Proteine sind im Kerngenom kodiert und müssen in Plastiden importiert werden, sodass

Import-Effekte Einfluss auf die Abundanz dieser Proteine nehmen könnten. Das Transkriptlevel der Zeta-Carotendesaturase (ZDS), ein Enzym der Carotinoid-Biosynthese, war in *rpn8a ppi2* gegenüber *ppi2* nicht verändert (Abb. 25 [S. 83]). In Proteomanalysen konnte weder in *ppi2* noch in *rpn8a ppi2* eines der 16 Proteine der Carotinoid-Biosynthese (Ruiz-Sola und Rodríguez-Concepción, 2012) identifiziert werden, sodass anhand der Proteom-Daten keine Aussage zu potentiell veränderten Konzentrationen dieser Proteine getroffen werden können, die eine erhöhte Carotinoid-Biosynthese bedingen könnten.

Schlüsselenzyme der Flavonoid-Biosynthese waren hingegen in Bezug zu *ppi2* höher abundant oder ausschließlich in der Doppelmutante *rpn8a ppi2* identifiziert (Abb. 21 [S. 74]; Anhang 10 [S. 140]). Die deutliche Steigerung von Enzymen, die initial an der Synthese und der Modifikation von Flavonoiden beteiligt sind, weist letztendlich darauf hin, dass in *rpn8a ppi2* im Vergleich zu *ppi2* mehr Flavonoide gebildet werden. Welcher Art diese Flavonoide sind, lässt sich an dieser Stelle nur vermuten. Die meisten in den MS-Analysen identifizierten Proteine der Flavonoidbiosynthese sind beteiligt an der Synthese des Flavonoidgrundgerüsts. Ugt78D2 transferiert Glucose sowohl an Flavonol- als auch an Anthocyan-Aglycoside und es gibt Hinweise, dass das Enzym eine entscheidende, aber keine solitäre Rolle in der Akkumulation von Anthocyanen spielt (Tohge *et al.*, 2005). Die Mutante *rpn8a ppi2* zeigte unter den untersuchten Wachstumsbedingungen keine auffällige Akkumulation von Anthocyanen, dennoch ist anzunehmen, dass die beobachtete signifikante Steigerung der Enzymkonzentrationen im Vergleich zu *ppi2* auch eine Auswirkung auf Metabolitebene hat. Flavonoide spielen eine Rolle bei der Photoprotektion. Die *Arabidopsis*-Mutante *tt3 tt4* mit Defiziten in der Dihydroflavonol 4-Reduktase und der Chalkonsynthase (CHS) der Anthocyan-Biosynthese zeigte unter hohen Lichteinstrahlungen im Vergleich zum WT eine erhöhte ROS-Produktion, eine reduzierte Chlorophyll-Konzentration und eine geminderte PSII-Leistung (Zhang *et al.*, 2012). *Arabidopsis*-Linien mit einem gesteigerten Gehalt von Anthocyanidinen nach Überexpression von CHS besaßen hingegen eine erhöhte Resistenz gegenüber ROS (Zhang *et al.*, 2017). Die CHS-Überexpressionslinien zeigten unter langanhaltendem Lichtstress eine im Vergleich zum WT gesteigerte maximale PSII Quantum Yield und höhere Konzentrationen an RuBisCO-Untereinheiten (Zhang *et al.*, 2017). Ähnlich zu den CHS-Mutanten von Zhang *et al.* (2012) zeigten Proteomanalysen von *rpn8a ppi2* im Vergleich mit *ppi2* ebenfalls einen höheren Anteil an RuBisCO und gesteigerte maximale PSII Quantum Yield (Abb. 20 [S. 73]; Tab. 11 [S. 66]). An der Regulation von Enzymen der Flavonoid-Biosynthese ist der Transkriptionsfaktor Nac78 beteiligt (Morishita *et al.*, 2009). Eine Funktion von Nac78 sowohl bei der Induktion von Genen für Enzyme der Flavonoid-Biosynthese als auch für Proteasom-Untereinheiten (Yabuta *et al.*, 2011; Gladman *et al.*, 2016) suggeriert eine Co-

DISKUSSION

Regulation beider Prozesse und verknüpft proteolytischen Stress mit photoprotektiven Mechanismen.

Bei oxidativem Stress und der Degradation oxidierten Proteine ist die Ubiquitin-unabhängige Degradation über das 20S-Proteasom von besonderer Bedeutung. Das freie 20S-Proteasom besitzt im Vergleich zum 26S-Proteasom eine höhere Resistenz gegenüber oxidativem Stress (Reinheckel *et al.*, 1998) und ist aktiver gegenüber oxidativ modifizierten Proteinen (Davies, 2001). In Rpn9-defizienten Hefestämmen wurde eine gesteigerte 20S- und verminderte 26S-Aktivität beobachtet, was den Zellen eine erhöhte Resistenz gegenüber H₂O₂ vermittelte (Inai und Nishikimi, 2002). Auch in *A. thaliana* führte die in Bezug auf den WT verstärkte Abundanz und Aktivität des 20S-Proteasoms in den RP-Mutanten *rpt2a*, *rpn10* und *rpn12a* zu einer Steigerung der Resistenz gegenüber Paraquat- bzw. H₂O₂-induziertem oxidativem Stress (Kurepa *et al.*, 2008). Interessanterweise steigerte die Vorbehandlung von Neuronzellen mit niedrigen Konzentrationen von Proteasom-Inhibitoren ebenfalls die Resistenz dieser Zellen gegenüber oxidativer Schädigung (Lee *et al.*, 2004). Die verringerte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress basiert auf der partiellen Einschränkung der Proteasom-Aktivität in Proteasom-Mutanten und Proteasom-Inhibitoren ausgesetzten Zellen, dem so erzeugten proteolytischen Stress und der daraus resultierenden Induktion des PSR. Die nachgewiesene Modifikation der Proteasom-Aktivität, 20S-Abundanz und Induktion des PSR in *rpn8a*-Mutanten könnte zur Steigerung der Resistenz gegenüber oxidativem Stress in *rpn8a ppi2* beitragen und indirekt Einfluss auf die Plastidenbiogenese haben. Die Doppelmutante *rpn8a ppi2* wies bei der Anzucht unter Schwachlichtbedingungen allerdings im Vergleich zu unter Normallicht angezogenen Pflanzen, wie auch *ppi2*, eine erhöhte Pigment- und LHCII-Konzentration sowie veränderte PSII-Parameter auf (Abb. 31 [S. 94]). Die Veränderung der plastidären Eigenschaften in *rpn8a ppi2* gegenüber *ppi2* geht demnach nicht ausschließlich auf die Reduzierung des licht-induzierten oxidativen Stresses zurück, kann aber durchaus Einfluss nehmen.

ZUSAMMENFASSUNG

Für die Existenz plastidärer Vorläuferproteine gibt es *in vivo* auf Grund ihrer geringen Abundanz und der eingeschränkten Nachweisbarkeit nur wenige Belege (Lee *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2009; Bischof *et al.*, 2011). In dieser Arbeit wurde ein experimentelles System etabliert, um Vorläuferproteine in transient transformierten Protoplasten anzureichern und nachfolgenden Untersuchungen zugänglich zu machen. So konnte die MS-basierte Identifizierung N-terminaler Modifikationen von Vorläuferproteinen erfolgen. Auf Grundlage der Proteinsequenzen wurde eine Methionin-Exzision (NME) und anschließende N-terminale Acetylierung (N-Ac) für die Mehrheit kernkodierter plastidärer Proteine vorhergesagt. Die Analysen von Vorläuferproteinen bewiesen die NME-abhängige N-Ac am N-Terminus von Rnp29- und Fd2-Konstrukten. In Rnp29-Varianten, die anstelle eines Alanins ein Asparagin oder Glutamat an Aminosäure-Position 2 aufwiesen, erfolgte trotz ausbleibender NME eine N-Ac. Der Austausch der Aminosäuren beeinflusste weder die Lokalisierung noch das Verhältnis von unprozessierter und reifer Form der Proteine. Welche Funktion die N-Ac in Bezug auf plastidäre Vorläuferproteine hat, ist bislang nicht bekannt. Der Austausch des Alanins an Position 2 gegen ein Prolin in Rnp29- und Fd2-Konstrukten, erlaubte eine NME, verhinderte allerdings die N-Ac. Rnp29 A2P ließ sich *in vitro* effektiv importieren. In Protoplasten akkumulierten die Prolin-Varianten jedoch stärker als Vorläuferproteine, was auf eine gesteigerte Stabilität der Vorläuferproteine ohne N-Ac hinweist.

Eine Stabilisierung von Vorläuferproteinen konnte außerdem durch die Inhibierung des 26S-Proteasoms mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 in transient transformierten Protoplasten erreicht werden. Diese Beobachtung bestärkte die Annahme, dass das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) an der Degradation von Vorläuferproteinen im Cytosol und somit an der Regulation plastidärer Prozesse beteiligt ist. Um dies näher zu untersuchen wurde die *A. thaliana* T-DNA-Linie *rpn8a*, mit Defekt in einer regulatorischen Proteasom-Untereinheit, charakterisiert. Untersuchungen der Transkriptlevel zeigten die Induktion von Genen des Proteasom-Stress-Regulons (PSR, Gladman *et al.*, 2016), was darauf schließen lässt, dass in *rpn8a*-Mutanten proteolytischer Stress besteht. Quantitative MS-Analysen bestätigten in diesem Zusammenhang eine gesteigerte Abundanz von Untereinheiten der katalytischen 20S Einheit in *rpn8a*-Mutanten. Untereinheiten der regulatorischen 19S Einheit des 26S-Proteasoms waren hingegen auf Proteinebene geringer abundant. Dennoch wies eine Untersuchung der MG132-Sensitivität auf eine gesteigerte Proteasom-Aktivität in *rpn8a* hin, die unter Berücksichtigung der Protein-Daten auf eine reduzierte 26S- und erhöhte 20S-Proteasom-Aktivität schließen ließ. Trotz der veränderten Proteasom-Aktivität zeigte *rpn8a* keine Veränderung in der Gesamtheit polyubiquitiniertes Proteine. Auch phänotypisch wies *rpn8a* nur subtile

ZUSAMMENFASSUNG

Abweichungen zum WT auf. Möglicherweise ist dies auf die Komplementation durch das Rpn8A-Homologe Rpn8B zurückzuführen, dessen Expression in *rpn8a*-Mutanten hochreguliert war. Bei der Anpassung an schrittweise veränderte Lichtbedingungen zeigte die Mutante eine erhöhte *PSII Quantum Yield* und reduzierten NPQ. Die veränderten PSII-Eigenschaften könnten der Grund für das leicht, aber signifikant erhöhte Frischgewicht der *rpn8a*-Mutante im Vergleich zum WT sein.

Die Kombination der Proteasom-Veränderung in *rpn8a* und dem Import-Defekt in der *toc159*-Mutante *ppi2* führte zu einer partiellen Komplementation des Plastiden-Phänotyps in der Doppelmutante *rpn8a ppi2*. Die Doppelmutante zeigte morphologische, physiologische und funktionelle Veränderungen, die auf eine verbesserte Plastidenbiogenese deuten, wie stärker differenzierte Thylakoid-Strukturen, einen gesteigerten Gehalt photosynthetischer Pigmente und eine erhöhte Photosyntheseleistung im Vergleich zur Einzelmutante *ppi2*. Auf Proteinebene ließ sich eine gesteigerte Abundanz von Proteinen, die an der Photosynthese beteiligt sind, nachweisen. Darunter waren kernkodierte Proteine des PSII-Lichtsammelkomplexes, plastidenkodierte Proteine des PSII- und PSI-Kernkomplexes und auch die Untereinheiten der RuBisCO. Quantitative Transkriptanalysen von Genen, die plastidäre Proteine kodieren, wiesen darauf hin, dass die Regulation auf posttranskriptionaler Ebene stattfindet.

Das Proteasom hat direkt oder indirekt Auswirkungen auf multiple zelluläre Vorgänge, sodass plastidäre Prozesse wahrscheinlich auf mehreren Wegen beeinflusst werden. In Abwesenheit der E3-Ligase SP1 werden TOC-Untereinheiten stabilisiert, was zu einer Milderung des *ppi1*-Phänotyps führte (Ling *et al.*, 2012). Die sekundäre Mutation von *SP1* hatte jedoch keine Auswirkung auf den Phänotyp von *ppi2*. Zudem wiesen *sp1*- und *rpn8a*-Mutanten auf Proteinebene keine Gemeinsamkeiten in der Proteinregulation gegenüber dem WT auf. Das zeigt, dass die Plastidenbiogenese auf unterschiedlichen UPS-vermittelten Wegen reguliert wird. Eine kurzzeitige Inhibierung der Proteasom-Aktivität mit MG132 führte nicht direkt zur Steigerung der Abundanz photosynthetischer Proteine. Die Veränderung der Proteasom-Komposition und die Adaption an proteolytischen Stress während der pflanzlichen Entwicklung in *rpn8a*-Mutanten sind demnach für die Proteasom-vermittelte Kontrolle der Plastidenbiogenese von Bedeutung. Die Stabilisierung von Vorläuferproteinen im Cytosol sowie die Anpassung an Stress könnten dabei eine zentrale Rolle spielen.

LITERATURVERZEICHNIS

- Agne, B., Infanger, S., Wang, F., Hofstetter, V., Rahim, G., Martin, M., Lee, D. W., Hwang, I., Schnell, D., Kessler, F.** (2009): A toc159 import receptor mutant, defective in hydrolysis of GTP, supports preprotein import into chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry* 284, 13/2009, S. 8670–8679.
- Agne, B., Kessler, F.** (2009): Protein transport in organelles. The Toc complex way of preprotein import. *The FEBS Journal* 276, 5/2009, S. 1156–1165.
- Aiken, C. T., Kaake, R. M., Wang, X., Huang, L.** (2011): Oxidative stress-mediated regulation of proteasome complexes. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 10, 5/2011, R110.006924.
- Alonso, J. M.** (2003): Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301, 5633/2003, S. 653–657.
- Andersson, B., Anderson, J. M.** (1980): Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *Biochimica et biophysica acta* 593, 2/1980, S. 427–440.
- Arfin, S. M., Bradshaw, R. A.** (1988): Cotranslational processing and protein turnover in eukaryotic cells. *Biochemistry* 27, 21/1988, S. 7979–7984.
- Arnesen, T.** (2011): Towards a functional understanding of protein N-terminal acetylation. *PLoS biology* 9, 5/2011, e1001074.
- Arnesen, T., Starheim, K. K., van Damme, P., Evjenth, R., Dinh, H., Betts, M. J., Ryningen, A., Vandekerckhove, J., Gevaert, K., Anderson, D.** (2010): The chaperone-like protein HYPK acts together with NatA in cotranslational N-terminal acetylation and prevention of Huntingtin aggregation. *Molecular and cellular biology* 30, 8/2010, S. 1898–1909.
- Arnesen, T., van Damme, P., Polevoda, B., Helsens, K., Evjenth, R., Colaert, N., Varhaug, J. E., Vandekerckhove, J., Lillehaug, J. R., Sherman, F., Gevaert, K.** (2009): Proteomics analyses reveal the evolutionary conservation and divergence of N-terminal acetyltransferases from yeast and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 20/2009, S. 8157–8162.
- Baldwin, A., Wardle, A., Patel, R., Dudley, P., Park, S. K., Twell, D., Inoue, K., Jarvis, P.** (2005): A molecular-genetic study of the *Arabidopsis* Toc75 gene family. *Plant Physiology* 138, 2/2005, S. 715–733.
- Barber, J., Andersson, B.** (1992): Too much of a good thing. Light can be bad for photosynthesis. *Trends in biochemical sciences* 17, 2/1992, S. 61–66.
- Bauer, J., Chen, K., Hiltbunner, A., Wehrli, E., Eugster, M., Schnell, D., Kessler, F.** (2000): The major protein import receptor of plastids is essential for chloroplast biogenesis. *Nature* 403, 6766/2000, S. 203–207.
- Baugh, J. M., Viktorova, E. G., Pilipenko, E. V.** (2009): Proteasomes can degrade a significant proportion of cellular proteins independent of ubiquitination. *Journal of Molecular Biology* 386, 3/2009, S. 814–827.
- Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F., Seemüller, E.** (1998): The Proteasome. Paradigm of a Self-Compartmentalizing Protease. *Cell* 92, 3/1998, S. 367–380.
- Ben-Nissan, G., Sharon, M.** (2014): Regulating the 20S proteasome ubiquitin-independent degradation pathway. *Biomolecules* 4, 3/2014, S. 862–884.
- Besche, H. C., Sha, Z., Kukushkin, N. V., Peth, A., Hock, E.-M., Kim, W., Gygi, S., Gutierrez, J. A., Liao, H., Dick, L., Goldberg, A. L.** (2014): Autoubiquitination of the 26S proteasome on Rpn13 regulates breakdown of ubiquitin conjugates. *The EMBO journal* 33, 10/2014, S. 1159–1176.
- Bienvenut, W. V., Sumpton, D., Martinez, A., Lilla, S., Espagne, C., Meinel, T., Giglione, C.** (2012): Comparative large scale characterization of plant versus mammal proteins reveals similar and idiosyncratic N- α -acetylation features. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 11, 6/2012, M111.015131.
- Birol, M., Echaliier, A.** (2014): Structure and function of MPN (Mpr1/Pad1 N-terminal) domain-containing proteins. *Current protein & peptide science* 15, 5/2014, S. 504–517.
- 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. *The Plant cell* 23, 11/2011, S. 3911–3928.
- Björn, L. O., Govindjee, G.** (2009): The evolution of photosynthesis and chloroplasts. *Current Science* 96, 11/2009, S. 1466–1474.
- Book, A. J., Gladman, N. P., Lee, S.-S., Scalf, M., Smith, L. M., Vierstra, R. D.** (2010): Affinity Purification of the *Arabidopsis* 26 S Proteasome Reveals a Diverse Array of Plant Proteolytic Complexes. *Journal of Biological Chemistry* 285, 33/2010, S. 25554–25569.
- Book, A. J., Smalle, J., Lee, K.-H., Yang, P., Walker, J. M., Casper, S., Holmes, J. H., Russo, L. A., Buzzinotti, Z. W., Jenik, P. D., Vierstra, R. D.** (2009): The RPN5 subunit of the 26s proteasome is essential for gametogenesis, sporophyte development, and complex assembly in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 21, 2/2009, S. 460–478.
- Börner, T.** (2017): The discovery of plastid-to-nucleus retrograde signaling—a personal perspective. *Protoplasma* 254, 5/2017, S. 1845–1855.
- Bradford, M. M.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 1976, S. 248–254.
- Bragoszewski, P., Gornicka, A., Sztolszterer, M. E., Chacinska, A.** (2013): The ubiquitin-proteasome system regulates mitochondrial intermembrane space proteins. *Molecular and cellular biology* 33, 11/2013, S. 2136–2148.

LITERATURVERZEICHNIS

- Bragoszewski, P., Turek, M., Chacinska, A.** (2017): Control of mitochondrial biogenesis and function by the ubiquitin-proteasome system. *Open biology* 7, 4/2017.
- Breiman, A., Fieulaine, S., Meinnel, T., Giglione, C.** (2016): The intriguing realm of protein biogenesis. Facing the green co-translational protein maturation networks. *Biochimica et biophysica acta* 1864, 5/2016, S. 531–550.
- Bruce, B. D.** (2001): The paradox of plastid transit peptides. Conservation of function despite divergence in primary structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1541, 1-2/2001, S. 2–21.
- Bruce, B. D.** (2000): Chloroplast transit peptides. Structure, function and evolution. *Trends in cell biology* 10, 10/2000, S. 440–447.
- Brukhin, V.** (2005): The RPN1 Subunit of the 26S Proteasome in Arabidopsis Is Essential for Embryogenesis. *THE PLANT CELL ONLINE* 17, 10/2005, S. 2723–2737.
- Budenholzer, L., Cheng, C. L., Li, Y., Hochstrasser, M.** (2017): Proteasome Structure and Assembly. *Journal of Molecular Biology* 429, 22/2017, S. 3500–3524.
- Chau, V., Tobias, J. W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D. J., Gonda, D. K., Varshavsky, A.** (1989): A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science (New York, N.Y.)* 243, 4898/1989, S. 1576–1583.
- Cheminant, S., Wild, M., Bouvier, F., Pelletier, S., Renou, J.-P., Erhardt, M., Hayes, S., Terry, M. J., Genschik, P., Achard, P.** (2011): DELLAs regulate chlorophyll and carotenoid biosynthesis to prevent photooxidative damage during seedling deetiolation in Arabidopsis. *The Plant cell* 23, 5/2011, S. 1849–1860.
- Chen, K., Chen, X., Schnell, D. J.** (2000): Initial binding of preproteins involving the Toc159 receptor can be bypassed during protein import into chloroplasts. *Plant Physiology* 122, 3/2000, S. 813–822.
- Chen, L.-J., Li, H.-m.** (2017): Stable megadalton TOC-TIC supercomplexes as major mediators of protein import into chloroplasts. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 92, 2/2017, S. 178–188.
- Chen, P., Hochstrasser, M.** (1996): Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. *Cell* 86, 6/1996, S. 961–972.
- Chen, S.-J., Wu, X., Wadas, B., Oh, J.-H., Varshavsky, A.** (2017): An N-end rule pathway that recognizes proline and destroys gluconeogenic enzymes. *Science (New York, N.Y.)* 355, 6323/2017.
- Chi, W., He, B., Mao, J., Jiang, J., Zhang, L.** (2015): Plastid sigma factors: Their individual functions and regulation in transcription. *Biochimica et biophysica acta* 1847, 9/2015, S. 770–778.
- Chotewutmontri, P., Holbrook, K., Bruce, B. D.** (2017): Plastid Protein Targeting. Preprotein Recognition and Translocation. *International review of cell and molecular biology* 330, 2017, S. 227–294.
- Constan, D., Patel, R., Keegstra, K., Jarvis, P.** (2004): An outer envelope membrane component of the plastid protein import apparatus plays an essential role in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 38, 1/2004, S. 93–106.
- Correa-Galvis, V., Poschmann, G., Melzer, M., Stühler, K., Jahns, P.** (2016): PsbS interactions involved in the activation of energy dissipation in Arabidopsis. *Nature plants* 2, 2016, S. 15225.
- Coux, O., Tanaka, K., Goldberg, A. L.** (1996): Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annual review of biochemistry* 65, 1996, S. 801–847.
- Dahlmann, B., Kopp, F., Kuehn, L., Niedel, B., Pfeifer, G., Hegerl, R., Baumeister, W.** (1989): The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from eukaryotes to archaebacteria. *FEBS letters* 251, 1-2/1989, S. 125–131.
- Dal Vechio, F. H., Cerqueira, F., Augusto, O., Lopes, R., Demasi, M.** (2014): Peptides that activate the 20S proteasome by gate opening increased oxidized protein removal and reduced protein aggregation. *Free radical biology & medicine* 67, 2014, S. 304–313.
- Dall'Osto, L., Fiore, A., Cazzaniga, S., Giuliano, G., Bassi, R.** (2007): Different roles of alpha- and beta-branch xanthophylls in photosystem assembly and photoprotection. *Journal of Biological Chemistry* 282, 48/2007, S. 35056–35068.
- Davies, K. J.** (2001): Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie* 83, 3-4/2001, S. 301–310.
- Dinh, T. V., Bienvenut, W. V., Linster, E., Feldman-Salit, A., Jung, V. A., Meinnel, T., Hell, R., Giglione, C., Wirtz, M.** (2015): Molecular identification and functional characterization of the first N α -acetyltransferase in plastids by global acetylome profiling. *Proteomics* 15, 14/2015, S. 2426–2435.
- Dohmen, R. J., Willers, I., Marques, A. J.** (2007): Biting the hand that feeds. Rpn4-dependent feedback regulation of proteasome function. *Biochimica et biophysica acta* 1773, 11/2007, S. 1599–1604.
- Dörfel, M. J., Lyon, G. J.** (2015): The biological functions of Naa10 - From amino-terminal acetylation to human disease. *Gene* 567, 2/2015, S. 103–131.
- Dutta, S., Teresinski, H. J., Smith, M. D.** (2014): A Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screen to Examine the Substrate Specificity of atToc159 and atToc132, Two Arabidopsis Chloroplast Preprotein Import Receptors. *PLoS one* 9, 4/2014, e95026.
- Elsasser, S., Chandler-Militello, D., Muller, B., Hanna, J., Finley, D.** (2004): Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome. *The Journal of biological chemistry* 279, 26/2004, S. 26817–26822.
- Erales, J., Coffino, P.** (2014): Ubiquitin-independent proteasomal degradation. *Biochimica et biophysica acta* 1843, 1/2014, S. 216–221.
- Estrin, E., Lopez-Blanco, J. R., Chacón, P., Martín, A.** (2013): Formation of an intricate helical bundle dictates the assembly of the 26S proteasome lid. *Structure* 21, 9/2013, S. 1624–1635.
- Fabre, B., Lambour, T., Delobel, J., Amalric, F., Monsarrat, B., Burlet-Schiltz, O., Bousquet-Dubouch, M.-P.** (2013): Subcellular distribution and dynamics of active proteasome complexes unraveled by a workflow combining in vivo complex cross-linking and quantitative proteomics. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 12, 3/2013, S. 687–699.

LITERATURVERZEICHNIS

- Fatimababy, A. S., Lin, Y.-L., Usharani, R., Radjaccomare, R., Wang, H.-T., Tsai, H.-L., Lee, Y., Fu, H.** (2010): Cross-species divergence of the major recognition pathways of ubiquitylated substrates for ubiquitin/26S proteasome-mediated proteolysis. *The FEBS Journal* 277, 3/2010, S. 796–816.
- Favory, J.-J.** (2005): Specific function of a plastid sigma factor for *ndhF* gene transcription. *Nucleic acids research* 33, 18/2005, S. 5991–5999.
- 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. *Molecular plant* 4, 6/2011, S. 1133–1145.
- Feng, J., Li, R., Yu, J., Ma, S., Wu, C., Li, Y., Cao, Y., Ma, L.** (2016): Protein N-terminal acetylation is required for embryogenesis in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 67, 15/2016, S. 4779–4789.
- Ferrández-Ayela, A., Micol-Ponce, R., Sánchez-García, A. B., Alonso-Peral, M. M., Micol, J. L., Ponce, M. R.** (2013): Mutation of an Arabidopsis NatB N-alpha-terminal acetylation complex component causes pleiotropic developmental defects. *PLoS one* 8, 11/2013, e80697.
- Finley, D.** (2009): Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annual review of biochemistry* 78, 2009, S. 477–513.
- Finley, D., Chen, X., Walters, K. J.** (2016): Gates, Channels, and Switches. *Elements of the Proteasome Machine. Trends in biochemical sciences* 41, 1/2016, S. 77–93.
- Finley, D., Ciechanover, A., Varshavsky, A.** (2004): Ubiquitin as a central cellular regulator. *Cell* 116, 2004, S. 29–34.
- Fitter, D. W., Martin, D. J., Copley, M. J., Scotland, R. W., Langdale, J. A.** (2002): GLK gene pairs regulate chloroplast development in diverse plant species. *The Plant Journal* 31, 6/2002, S. 713–727.
- Flores-Pérez, Ú., Jarvis, P.** (2013): Molecular chaperone involvement in chloroplast protein import. *Biochimica et biophysica acta* 1833, 2/2013, S. 332–340.
- Forté, G. M. A., Pool, M. R., Stirling, C. J.** (2011): N-terminal acetylation inhibits protein targeting to the endoplasmic reticulum. *PLoS biology* 9, 5/2011, e1001073.
- Frottin, F., Espagne, C., Traverso, J. A., Mauve, C., Valot, B., Lelarge-Trouverie, C., Zivy, M., Noctor, G., Meinel, T., Giglione, C.** (2009): Cotranslational proteolysis dominates glutathione homeostasis to support proper growth and development. *The Plant cell* 21, 10/2009, S. 3296–3314.
- Frottin, F., Martinez, A., Peynot, P., Mitra, S., Holz, R. C., Giglione, C., Meinel, T.** (2006): The proteomics of N-terminal methionine cleavage. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 5, 12/2006, S. 2336–2349.
- Fu, H., Doelling, J. H., Arendt, C. S., Hochstrasser, M., Vierstra, R. D.** (1998): Molecular organization of the 20S proteasome gene family from Arabidopsis thaliana. *Genetics* 149, 2/1998, S. 677–692.
- Fu, H., Doelling, J. H., Rubin, D. M., Vierstra, R. D.** (1999): Structural and functional analysis of the six regulatory particle triple-A ATPase subunits from the Arabidopsis 26S proteasome. *The Plant Journal* 18, 5/1999, S. 529–539.
- Fu, H., Lin, Y.-L., Fatimababy, A. S.** (2010): Proteasomal recognition of ubiquitylated substrates. *Trends in Plant Science* 15, 7/2010, S. 375–386.
- Gallois, J.-L., Guyon-Debast, A., Lecureuil, A., Vezon, D., Carpentier, V., Bonhomme, S., Guerche, P.** (2009): The Arabidopsis Proteasome RPT5 Subunits Are Essential for Gametophyte Development and Show Accession-Dependent Redundancy. *THE PLANT CELL ONLINE* 21, 2/2009, S. 442–459.
- Gao, J., Barroso, C., Zhang, P., Kim, H.-M., Li, S., Labrador, L., Lightfoot, J., Gerashchenko, M. V., Labunskyy, V. M., Dong, M.-Q., Martinez-Perez, E., Colaiácovo, M. P.** (2016): N-terminal acetylation promotes synaptonemal complex assembly in *C. elegans*. *Genes & development* 30, 21/2016, S. 2404–2416.
- Gibbs, D. J.** (2015): Emerging Functions for N-Terminal Protein Acetylation in Plants. *Trends in Plant Science* 20, 10/2015, S. 599–601.
- Giglione, C., Boularot, A., Meinel, T.** (2004): Protein N-terminal methionine excision. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 61, 12/2004, S. 1455–1474.
- Gladman, N. P., Marshall, R. S., Lee, K.-H., Vierstra, R. D.** (2016): The Proteasome Stress Regulon Is Controlled by a Pair of NAC Transcription Factors in Arabidopsis. *The Plant cell* 28, 6/2016, S. 1279–1296.
- Glickman, M. H., Rubin, D. M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V. A., Finley, D.** (1998): A Subcomplex of the Proteasome Regulatory Particle Required for Ubiquitin-Conjugate Degradation and Related to the COP9-Signalosome and eIF3. *Cell* 94, 5/1998, S. 615–623.
- Golan, T., Müller-Moule, P., Niyogi, K. K.** (2006): Photoprotection mutants of Arabidopsis thaliana acclimate to high light by increasing photosynthesis and specific antioxidants. *Plant, cell & environment* 29, 5/2006, S. 879–887.
- Goldberg, A. L.** (2012): Development of proteasome inhibitors as research tools and cancer drugs. *The Journal of cell biology* 199, 4/2012, S. 583–588.
- Goss, R., Oroszi, S., Wilhelm, C.** (2007): The importance of grana stacking for xanthophyll cycle-dependent NPQ in the thylakoid membranes of higher plants. *Physiologia plantarum* 131, 3/2007, S. 496–507.
- Grimmer, J., Rödiger, A., Hoehenwarter, W., Helm, S., Baginsky, S.** (2014): The RNA-binding protein RNP29 is an unusual Toc159 transport substrate. *Frontiers in plant science* 5, 2014, S. 258.
- Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D. M., Huber, R., Glickman, M. H., Finley, D.** (2000): A gated channel into the proteasome core particle. *Nature structural biology* 7, 11/2000, S. 1062–1067.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D., Huber, R.** (1997): Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386, 6624/1997, S. 463–471.
- Grune, T., Merker, K., Sandig, G., Davies, K. J. A.** (2003): Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochemical and biophysical research communications* 305, 3/2003, S. 709–718.

LITERATURVERZEICHNIS

- Grziwa, A., Baumeister, W., Dahlmann, B., Kopp, F.** (1991): Localization of subunits in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum* by immunoelectron microscopy. *FEBS letters* 290, 1-2/1991, S. 186–190.
- Gutensohn, M., Schulz, B., Nicolay, P., Flügge, U. I.** (2000): Functional analysis of the two *Arabidopsis* homologues of Toc34, a component of the chloroplast protein import apparatus. *The Plant Journal* 23, 6/2000, S. 771–783.
- Haass, C., Selkoe, D. J.** (2007): Soluble protein oligomers in neurodegeneration. Lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 2/2007, S. 101–112.
- Heijne, G., Steppuhn, J., Herrmann, R. G.** (1989): Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *European journal of biochemistry* 180, 3/1989, S. 535–545.
- Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U., Wolf, D. H.** (1997): The Active Sites of the Eukaryotic 20 S Proteasome and Their Involvement in Subunit Precursor Processing. *Journal of Biological Chemistry* 272, 40/1997, S. 25200–25209.
- Helm, S., Dobritzsch, D., Rödiger, A., Agne, B., Baginsky, S.** (2014): Protein identification and quantification by data-independent acquisition and multi-parallel collision-induced dissociation mass spectrometry (MS(E)) in the chloroplast stroma proteome. *Journal of proteomics* 98, 2014, S. 79–89.
- Henriques, R., Jang, I.-C., Chua, N.-H.** (2009): Regulated proteolysis in light-related signaling pathways. *Current opinion in plant biology* 12, 1/2009, S. 49–56.
- Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A. L., Rose, I. A.** (1980): Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 4/1980, S. 1783–1786.
- Hershko, A., Ciechanover, A., Varshavsky, A.** (2000): Basic Medical Research Award. The ubiquitin system. *Nature Medicine* 6, 10/2000, S. 1073–1081.
- Hershko, A., Heller, H., Eytan, E., Kaklij, G., Rose, I. A.** (1984): Role of the alpha-amino group of protein in ubiquitin-mediated protein breakdown. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81, 22/1984, S. 7021–7025.
- Hiltbrunner, A., Bauer, J., Alvarez-Huerta, M., Kessler, F.** (2001): Protein translocon at the *Arabidopsis* outer chloroplast membrane. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 79, 5/2001, S. 629–635.
- Hiltbrunner, A., Grünig, K., Alvarez-Huerta, M., Infanger, S., Bauer, J., Kessler, F.** (2004): AtToc90, a new GTP-binding component of the *Arabidopsis* chloroplast protein import machinery. *Plant Molecular Biology* 54, 3/2004, S. 427–440.
- Hinnah, S. C., Wagner, R., Sveshnikova, N., Harrer, R., Soll, J.** (2002): The Chloroplast Protein Import Channel Toc75. Pore Properties and Interaction with Transit Peptides. *Biophysical Journal* 83, 2/2002, S. 899–911.
- Hirano, H., Kimura, Y., Kimura, A.** (2016): Biological significance of co- and post-translational modifications of the yeast 26S proteasome. *Journal of proteomics* 134, 2016, S. 37–46.
- Hirsch, S., Muckel, E., Heemeyer, F., Heijne, G. von, Soll, J.** (1994): A receptor component of the chloroplast protein translocation machinery. *Science (New York, N.Y.)* 266, 5193/1994, S. 1989–1992.
- Hoecker, U.** (2005): Regulated proteolysis in light signaling. *Current opinion in plant biology* 8, 5/2005, S. 469–476.
- Hofmann, N. R., Theg, S. M.** (2005): Chloroplast outer membrane protein targeting and insertion. *Trends in Plant Science* 10, 9/2005, S. 450–457.
- Hooper, C. M., Tanz, S. K., Castleden, I. R., Vacher, M. A., Small, I. D., Millar, A. H.** (2014): SUBAcon. A consensus algorithm for unifying the subcellular localization data of the *Arabidopsis* proteome. *Bioinformatics (Oxford, England)* 30, 23/2014, S. 3356–3364.
- Hough, R., Pratt, G., Rechsteiner, M.** (1987): Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate. *The Journal of biological chemistry* 262, 17/1987, S. 8303–8313.
- Huang, W., Pi, L., Liang, W., Xu, B., Wang, H., Cai, R., Huang, H.** (2006): The Proteolytic Function of the *Arabidopsis* 26S Proteasome Is Required for Specifying Leaf Adaxial Identity. *THE PLANT CELL ONLINE* 18, 10/2006, S. 2479–2492.
- Husnjak, K., Elsasser, S., Zhang, N., Chen, X., Randles, L., Shi, Y., Hofmann, K., Walters, K. J., Finley, D., Dikic, I.** (2008): Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature* 453, 7194/2008, S. 481–488.
- Hust, B., Gutensohn, M.** (2006): Deletion of core components of the plastid protein import machinery causes differential arrest of embryo development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant biology (Stuttgart, Germany)* 8, 1/2006, S. 18–30.
- Hwang, C.-S., Shemorry, A., Varshavsky, A.** (2010): N-terminal acetylation of cellular proteins creates specific degradation signals. *Science (New York, N.Y.)* 327, 5968/2010, S. 973–977.
- Inai, Y., Nishikimi, M.** (2002): Increased degradation of oxidized proteins in yeast defective in 26S proteasome assembly. *Archives of biochemistry and biophysics* 404, 2/2002, S. 279–284.
- Infanger, S., Bischof, S., Hiltbrunner, A., Agne, B., Baginsky, S., Kessler, F.** (2011): The chloroplast import receptor Toc90 partially restores the accumulation of Toc159 client proteins in the *Arabidopsis thaliana* ppi2 mutant. *Molecular plant* 4, 2/2011, S. 252–263.
- Inoue, H., Rounds, C., Schnell, D. J.** (2010): The molecular basis for distinct pathways for protein import into *Arabidopsis* chloroplasts. *The Plant cell* 22, 6/2010, S. 1947–1960.
- Ivanova, Y., Smith, M. D., Chen, K., Schnell, D. J.** (2004): Members of the Toc159 import receptor family represent distinct pathways for protein targeting to plastids. *Molecular Biology of the Cell* 15, 7/2004, S. 3379–3392.
- Ivey, R. A., Subramanian, C., Bruce, B. D.** (2000): Identification of a Hsp70 recognition domain within the rubisco small subunit transit peptide. *Plant Physiology* 122, 4/2000, S. 1289–1299.
- Jackson-Constan, D.** (2001): *Arabidopsis* Genes Encoding Components of the Chloroplastic Protein Import Apparatus. *Plant Physiology* 125, 4/2001, S. 1567–1576.

LITERATURVERZEICHNIS

- Jarvis, P., Chen, L.-J., Li, H.-m., Peto, C. A., Fankhauser, C., Chory, J.** (1998): An Arabidopsis Mutant Defective in the Plastid General Protein Import Apparatus. *Science* 282, 5386/1998, S. 100–103.
- Jarvis, P., López-Juez, E.** (2013): Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. *Nature reviews. Molecular cell biology* 14, 12/2013, S. 787–802.
- Jelic, M., Soll, J., Schleiff, E.** (2003): Two Toc34 homologues with different properties. *Biochemistry* 42, 19/2003, S. 5906–5916.
- Jiang, X., Li, H., Wang, T., Peng, C., Wang, H., Wu, H., Wang, X.** (2012): Gibberellin indirectly promotes chloroplast biogenesis as a means to maintain the chloroplast population of expanded cells. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 72, 5/2012, S. 768–780.
- Jung, T., Catalgol, B., Grune, T.** (2009): The proteasomal system. *Molecular aspects of medicine* 30, 4/2009, S. 191–296.
- Kachroo, A., Shanklin, J., Whittle, E., Lapchyk, L., Hildebrand, D., Kachroo, P.** (2006): The Arabidopsis stearyl-acyl carrier protein-desaturase family and the contribution of leaf isoforms to oleic acid synthesis. *Plant Molecular Biology* 63, 2/2006, S. 257–271.
- Kakizaki, T., Matsumura, H., Nakayama, K., Che, F.-S., Terauchi, R., Inaba, T.** (2009): Coordination of Plastid Protein Import and Nuclear Gene Expression by Plastid-to-Nucleus Retrograde Signaling. *Plant physiology* 151, 3/2009, S. 1339–1353.
- Karlin-Neumann, G. A., Tobin, E. M.** (1986): Transit peptides of nuclear-encoded chloroplast proteins share a common amino acid framework. *The EMBO journal* 5, 1/1986, S. 9–13.
- Kauss, D., Bischof, S., Steiner, S., Apel, K., Meskauskiene, R.** (2012): FLU, a negative feedback regulator of tetrapyrrole biosynthesis, is physically linked to the final steps of the Mg(++)-branch of this pathway. *FEBS letters* 586, 3/2012, S. 211–216.
- Keegstra, K., Olsen, L. J., Theg, S. M.** (1989): Chloroplastic Precursors and their Transport Across the Envelope Membranes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40, 1/1989, S. 471–501.
- Keren-Kaplan, T., Zeev Peters, L., Levin-Kravets, O., Attali, I., Kleifeld, O., Shohat, N., Artzi, S., Zucker, O., Pilzer, I., Reis, N., Glickman, M. H., Ben-Aroya, S., Prag, G.** (2016): Structure of ubiquitylated-Rpn10 provides insight into its autoregulation mechanism. *Nature communications* 7, 2016, S. 12960.
- Kessler, F., Blobel, G., Patel, H. A., Schnell, D. J.** (1994): Identification of two GTP-binding proteins in the chloroplast protein import machinery. *Science (New York, N.Y.)* 266, 5187/1994, S. 1035–1039.
- Kikuchi, S., Bédard, J., Hirano, M., Hirabayashi, Y., Oishi, M., Imai, M., Takase, M., Ide, T., Nakai, M.** (2013): Uncovering the protein translocon at the chloroplast inner envelope membrane. *Science (New York, N.Y.)* 339, 6119/2013, S. 571–574.
- Kim, H.-K., Kim, R.-R., Oh, J.-H., Cho, H., Varshavsky, A., Hwang, C.-S.** (2014): The N-terminal methionine of cellular proteins as a degradation signal. *Cell* 156, 1-2/2014, S. 158–169.
- Köhler, D., Montandon, C., Hause, G., Majovsky, P., Kessler, F., Baginsky, S., Agne, B.** (2015): Characterization of chloroplast protein import without Tic56, a component of the 1-megadalton translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts. *Plant physiology* 167, 3/2015, S. 972–990.
- Kouranov, A., Schnell, D. J.** (1997): Analysis of the interactions of preproteins with the import machinery over the course of protein import into chloroplasts. *The Journal of cell biology* 139, 7/1997, S. 1677–1685.
- Kourtz, L., Ko, K.** (1997): The Early Stage of Chloroplast Protein Import Involves Com70. *Journal of Biological Chemistry* 272, 5/1997, S. 2808–2813.
- Koussevitzky, S., Nott, A., Mockler, T. C., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M., Lim, J., Mittler, R., Chory, J.** (2007): Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science (New York, N.Y.)* 316, 5825/2007, S. 715–719.
- Kubis, S., Baldwin, A., Patel, R., Razzaq, A., Dupree, P., Lilley, K., Kurth, J., Leister, D., Jarvis, P.** (2003): The Arabidopsis *ppi1* mutant is specifically defective in the expression, chloroplast import, and accumulation of photosynthetic proteins. *The Plant cell* 15, 8/2003, S. 1859–1871.
- 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. *The Plant cell* 16, 8/2004, S. 2059–2077.
- Kurepa, J., Smalle, J. A.** (2008): To misfold or to lose structure?: Detection and degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Plant signaling & behavior* 3, 6/2008, S. 386–388.
- Kurepa, J., Toh-e, A., Smalle, J. A.** (2008): 26S proteasome regulatory particle mutants have increased oxidative stress tolerance. *The Plant Journal* 53, 1/2008, S. 102–114.
- Kurepa, J., Wang, S., Li, Y., Smalle, J.** (2009): Proteasome regulation, plant growth and stress tolerance. *Plant signaling & behavior* 4, 10/2009, S. 924–927.
- Laemmli, U. K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 5259/1970, S. 680–685.
- Lander, G. C., Estrin, E., Matyskiela, M. E., Bashore, C., Nogales, E., Martin, A.** (2012): Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature* 482, 7384/2012, S. 186–191.
- Lee, C.-S., Tee, L. Y., Warmke, T., Vinjamoori, A., Cai, A., Fagan, A. M., Snider, B. J.** (2004): A proteasomal stress response. Pre-treatment with proteasome inhibitors increases proteasome activity and reduces neuronal vulnerability to oxidative injury. *Journal of neurochemistry* 91, 4/2004, S. 996–1006.
- Lee, D. W., Jung, C., Hwang, I.** (2013): Cytosolic events involved in chloroplast protein targeting. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833, 2/2013, S. 245–252.

LITERATURVERZEICHNIS

- Lee, D. W., Kim, J. K., Lee, S., Choi, S., Kim, S., Hwang, I.** (2008): Arabidopsis nuclear-encoded plastid transit peptides contain multiple sequence subgroups with distinctive chloroplast-targeting sequence motifs. *The Plant cell* 20, 6/2008, S. 1603–1622.
- Lee, J., Kim, D. H., Hwang, I.** (2014): Specific targeting of proteins to outer envelope membranes of endosymbiotic organelles, chloroplasts, and mitochondria. *Frontiers in plant science* 5, 2014, S. 173.
- Lee, K. H., Kim, S. J., Lee, Y. J., Jin, J. B., Hwang, I.** (2003): The M domain of atToc159 plays an essential role in the import of proteins into chloroplasts and chloroplast biogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 278, 38/2003, S. 36794–36805.
- Lee, K.-E., Heo, J.-E., Kim, J.-M., Hwang, C.-S.** (2016): N-Terminal Acetylation-Targeted N-End Rule Proteolytic System. The Ac/N-End Rule Pathway. *Molecules and cells* 39, 3/2016, S. 169–178.
- Lee, K.-H., Marshall, R. S., Slivick, L. M., Vierstra, R. D.** (2012): Genetic analyses of the Arabidopsis 26S proteasome regulatory particle reveal its importance during light stress and a specific role for the N-Terminus of RPT2 in development. *Plant signaling & behavior* 7, 8/2012, S. 973–978.
- Lee, K.-H., Minami, A., Marshall, R. S., Book, A. J., Farmer, L. M., Walker, J. M., Vierstra, R. D.** (2011): The RPT2 subunit of the 26S proteasome directs complex assembly, histone dynamics, and gametophyte and sporophyte development in Arabidopsis. *The Plant cell* 23, 12/2011, S. 4298–4317.
- Lee, S., Lee, D. W., Lee, Y., Mayer, U., Stierhof, Y.-D., Lee, S., Jürgens, G., Hwang, I.** (2009): Heat shock protein cognate 70-4 and an E3 ubiquitin ligase, CHIP, mediate plastid-destined precursor degradation through the ubiquitin-26S proteasome system in Arabidopsis. *The Plant cell* 21, 12/2009, S. 3984–4001.
- Leister, D.** (2012): Retrograde signaling in plants. From simple to complex scenarios. *Frontiers in plant science* 3, 2012, S. 135.
- Li, H.-m., Teng, Y.-S.** (2013): Transit peptide design and plastid import regulation. *Trends in Plant Science* 18, 7/2013, S. 360–366.
- Li, W., Bengtson, M. H., Ulbrich, A., Matsuda, A., Reddy, V. A., Orth, A., Chanda, S. K., Batalov, S., Joazeiro, C. A. P.** (2008): Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS one* 3, 1/2008, e1487.
- Li, X., Matilainen, O., Jin, C., Glover-Cutter, K. M., Holmberg, C. I., Blackwell, T. K.** (2011): Specific SKN-1/Nrf stress responses to perturbations in translation elongation and proteasome activity. *PLoS Genetics* 7, 6/2011, e1002119.
- Li, X. P., Björkman, O., Shih, C., Grossman, A. R., Rosenquist, M., Jansson, S., Niyogi, K. K.** (2000): A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* 403, 6768/2000, S. 391–395.
- Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C.** (2001): Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. In: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc.
- Liere, K., Börner, T.** (2007): Transcription and transcriptional regulation in plastids. In: Bock, R. (Hrsg.): *Cell and Molecular Biology of Plastids*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S. 121–174.
- Lin, Y. L., Sung, S. C., Tsai, H. L., Yu, T. T., Radjacomare, R., Usharani, R., Fatimababy, A. S., Lin, H. Y., Wang, Y. Y., Fu, H.** (2011): The Defective Proteasome but Not Substrate Recognition Function Is Responsible for the Null Phenotypes of the Arabidopsis Proteasome Subunit RPN10WOA. *The Plant cell* 23, 7/2011, S. 2754–2773.
- Ling, Q., Huang, W., Baldwin, A., Jarvis, P.** (2012): Chloroplast Biogenesis Is Regulated by Direct Action of the Ubiquitin-Proteasome System. *Science* 338, 6107/2012, S. 655–659.
- Ling, Q., Jarvis, P.** (2015): Regulation of Chloroplast Protein Import by the Ubiquitin E3 Ligase SP1 Is Important for Stress Tolerance in Plants. *Current Biology* 25, 19/2015, S. 2527–2534.
- Linster, E., Stephan, I., Bienvenut, W. V., Maple-Grødem, J., Myklebust, L. M., Huber, M., Reichelt, M., Sticht, C., Møller, S. G., Meinel, T., Arnesen, T., Giglione, C., Hell, R., Wirtz, M.** (2015): Downregulation of N-terminal acetylation triggers ABA-mediated drought responses in Arabidopsis. *Nature communications* 6, 2015, S. 7640.
- Liu, C.-W., Corboy, M. J., DeMartino, G. N., Thomas, P. J.** (2003): Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science (New York, N.Y.)* 299, 5605/2003, S. 408–411.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D.** (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 25, 4/2001, S. 402–408.
- Lokstein, H., Tian, L., Polle, J. E.W., DellaPenna, D.** (2002): Xanthophyll biosynthetic mutants of Arabidopsis thaliana. Altered nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence is due to changes in Photosystem II antenna size and stability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1553, 3/2002, S. 309–319.
- Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W., Huber, R.** (1995): Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science (New York, N.Y.)* 268, 5210/1995, S. 533–539.
- Luan, B., Huang, X., Wu, J., Mei, Z., Wang, Y., Xue, X., Yan, C., Wang, J., Finley, D. J., Shi, Y., Wang, F.** (2016): Structure of an endogenous yeast 26S proteasome reveals two major conformational states. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, 10/2016, S. 2642–2647.
- Ma, Y., Kouranov, A., LaSala, S. E., Schnell, D. J.** (1996): Two components of the chloroplast protein import apparatus, IAP86 and IAP75, interact with the transit sequence during the recognition and translocation of precursor proteins at the outer envelope. *The Journal of cell biology* 134, 2/1996, S. 315–327.
- Magin, R. S., March, Z. M., Marmorstein, R.** (2016): The N-terminal Acetyltransferase Naa10/ARD1 Does Not Acetylate Lysine Residues. *The Journal of biological chemistry* 291, 10/2016, S. 5270–5277.
- Marshall, R. S., Li, F., Gemperline, D. C., Book, A. J., Vierstra, R. D.** (2015): Autophagic Degradation of the 26S Proteasome Is Mediated by the Dual ATG8/Ubiquitin Receptor RPN10 in Arabidopsis. *Molecular cell* 58, 6/2015, S. 1053–1066.

LITERATURVERZEICHNIS

- Marshall, R. S., McLoughlin, F., Vierstra, R. D.** (2016): Autophagic Turnover of Inactive 26S Proteasomes in Yeast Is Directed by the Ubiquitin Receptor Cue5 and the Hsp42 Chaperone. *Cell reports* 16, 6/2016, S. 1717–1732.
- Martin, W., Herrmann, R. G.** (1998): Gene Transfer from Organelles to the Nucleus. How Much, What Happens, and Why? *Plant Physiology* 118, 1/1998, S. 9–17.
- Martinez, A., Traverso, J. A., Valot, B., Ferro, M., Espagne, C., Ephritikhine, G., Zivy, M., Giglione, C., Meinel, T.** (2008): Extent of N-terminal modifications in cytosolic proteins from eukaryotes. *Proteomics* 8, 14/2008, S. 2809–2831.
- Matiuhin, Y., Kirkpatrick, D. S., Ziv, I., Kim, W., Dakshinamurthy, A., Kleifeld, O., Gygi, S. P., Reis, N., Glickman, M. H.** (2008): Extraproteasomal Rpn10 restricts access of the polyubiquitin-binding protein Dsk2 to proteasome. *Molecular cell* 32, 3/2008, S. 415–425.
- May, T., Soll, J.** (2000): 14-3-3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants. *The Plant cell* 12, 1/2000, S. 53–64.
- Meiners, S., Heyken, D., Weller, A., Ludwig, A., Stangl, K., Kloetzel, P.-M., Krüger, E.** (2003): Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of Mammalian proteasomes. *Journal of Biological Chemistry* 278, 24/2003, S. 21517–21525.
- Meinel, T., Peynot, P., Giglione, C.** (2005): Processed N-termini of mature proteins in higher eukaryotes and their major contribution to dynamic proteomics. *Biochimie* 87, 8/2005, S. 701–712.
- Meskauskiene, R., Nater, M., Goslings, D., Kessler, F., op den Camp, R., Apel, K.** (2001): FLU. A negative regulator of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 22/2001, S. 12826–12831.
- Miras, S., Salvi, D., Piette, L., Seigneurin-Berny, D., Grunwald, D., Reinbothe, C., Joyard, J., Reinbothe, S., Rolland, N.** (2007): Toc159- and Toc75-independent import of a transit sequence-less precursor into the inner envelope of chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry* 282, 40/2007, S. 29482–29492.
- Mirkovic, T., Ostroumov, E. E., Anna, J. M., van Grondelle, R., Govindjee, Scholes, G. D.** (2017): Light Absorption and Energy Transfer in the Antenna Complexes of Photosynthetic Organisms. *Chemical reviews* 117, 2/2017, S. 249–293.
- Morishita, T., Kojima, Y., Maruta, T., Nishizawa-Yokoi, A., Yabuta, Y., Shigeoka, S.** (2009): Arabidopsis NAC transcription factor, ANAC078, regulates flavonoid biosynthesis under high-light. *Plant & cell physiology* 50, 12/2009, S. 2210–2222.
- Nada, A., Soll, J.** (2004): Inner envelope protein 32 is imported into chloroplasts by a novel pathway. *Journal of cell science* 117, Pt 17/2004, S. 3975–3982.
- Nagashima, A., Hanaoka, M., Motohashi, R., Seki, M., Shinozaki, K., Kanamaru, K., Takahashi, H., Tanaka, K.** (2014): DNA Microarray Analysis of Plastid Gene Expression in an Arabidopsis Mutant Deficient in a Plastid Transcription Factor Sigma, SIG2. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 68, 3/2014, S. 694–704.
- Nakai, M.** (2015): The TIC complex uncovered. The alternative view on the molecular mechanism of protein translocation across the inner envelope membrane of chloroplasts. *Biochimica et biophysica acta* 1847, 9/2015, S. 957–967.
- Nakrieko, K.-A., Mould, R. M., Smith, A. G.** (2004): Fidelity of targeting to chloroplasts is not affected by removal of the phosphorylation site from the transit peptide. *European journal of biochemistry* 271, 3/2004, S. 509–516.
- Nanjo, Y., Oka, H., Ikarashi, N., Kaneko, K., Kitajima, A., Mitsui, T., Muñoz, F. J., Rodríguez-López, M., Baroja-Fernández, E., Pozueta-Romero, J.** (2006): Rice plastidial N-glycosylated nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase is transported from the ER-golgi to the chloroplast through the secretory pathway. *The Plant cell* 18, 10/2006, S. 2582–2592.
- Nevo, R., Charuvi, D., Tsabari, O., Reich, Z.** (2012): Composition, architecture and dynamics of the photosynthetic apparatus in higher plants. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 70, 1/2012, S. 157–176.
- Oh, J.-H., Hyun, J.-Y., Varshavsky, A.** (2017): Control of Hsp90 chaperone and its clients by N-terminal acetylation and the N-end rule pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, 22/2017, E4370-E4379.
- Olson, J. M., Blankenship, R. E.** (2004): Thinking about the evolution of photosynthesis. *PHOTOSYNTHESIS RESEARCH* 80, 1-3/2004, S. 373–386.
- Paila, Y. D., Richardson, L. G., Schnell, D. J.** (2015): New Insights into the Mechanism of Chloroplast Protein Import and Its Integration with Protein Quality Control, Organelle Biogenesis and Development. *Journal of Molecular Biology*, 2015.
- Panigrahi, R., Adina-Zada, A., Whelan, J., Vrieland, A.** (2013): Ligand recognition by the TPR domain of the import factor Toc64 from *Arabidopsis thaliana*. *PloS one* 8, 12/2013, e83461.
- Perry, S. E., Keegstra, K.** (1994): Envelope membrane proteins that interact with chloroplastic precursor proteins. *The Plant cell* 6, 1/1994, S. 93–105.
- Pesaresi, P.** (2003): Cytoplasmic N-Terminal Protein Acetylation Is Required for Efficient Photosynthesis in Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE* 15, 8/2003, S. 1817–1832.
- Pick, E., Hofmann, K., Glickman, M. H.** (2009): PCI complexes. Beyond the proteasome, CSN, and eIF3 Troika. *Molecular cell* 35, 3/2009, S. 260–264.
- Pilon, M., Rietveld, A. G., Weisbeek, P. J., Kruijff, B. de** (1992): Secondary structure and folding of a functional chloroplast precursor protein. *The Journal of biological chemistry* 267, 28/1992, S. 19907–19913.
- Polevoda, B., Arnesen, T., Sherman, F.** (2009): A synopsis of eukaryotic Nalpha-terminal acetyltransferases. Nomenclature, subunits and substrates. *BMC proceedings* 3 Suppl 6, 2009, S2.
- Polevoda, B., Sherman, F.** (2003): N-terminal Acetyltransferases and Sequence Requirements for N-terminal Acetylation of Eukaryotic Proteins. *Journal of Molecular Biology* 325, 4/2003, S. 595–622.

LITERATURVERZEICHNIS

- Polge, C., Jaquinod, M., Holzer, F., Bourguignon, J., Walling, L., Brouquisse, R.** (2009): Evidence for the Existence in *Arabidopsis thaliana* of the Proteasome Proteolytic Pathway. *ACTIVATION IN RESPONSE TO CADMIUM*. The Journal of biological chemistry 284, 51/2009, S. 35412–35424.
- Pospišil, P.** (2016): Production of Reactive Oxygen Species by Photosystem II as a Response to Light and Temperature Stress. *Frontiers in plant science* 7, 2016, S. 1950.
- Privat, I., Hakimi, M.-A., Buhot, L., Favory, J.-J., Mache-Lerbs, S.** (2003): Characterization of *Arabidopsis* plastid sigma-like transcription factors SIG1, SIG2 and SIG3. *Plant molecular biology* 51, 3/2003, S. 385–399.
- 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. *Journal of Molecular Biology* 367, 5/2007, S. 1330–1346.
- Qbadou, S., Becker, T., Mirus, O., Tews, I., Soll, J., Schleiff, E.** (2006): The molecular chaperone Hsp90 delivers precursor proteins to the chloroplast import receptor Toc64. *The EMBO journal* 25, 9/2006, S. 1836–1847.
- Radhakrishnan, S. K., den Besten, W., Deshaies, R. J.** (2014): p97-dependent retrotranslocation and proteolytic processing govern formation of active Nrf1 upon proteasome inhibition. *eLife* 3, 2014, e01856.
- Radhakrishnan, S. K., Lee, C. S., Young, P., Beskow, A., Chan, J. Y., Deshaies, R. J.** (2010): Transcription factor Nrf1 mediates the proteasome recovery pathway after proteasome inhibition in mammalian cells. *Molecular cell* 38, 1/2010, S. 17–28.
- Radke, S., Chander, H., Schäfer, P., Meiss, G., Krüger, R., Schulz, J. B., Germain, D.** (2008): Mitochondrial protein quality control by the proteasome involves ubiquitination and the protease Omi. *Journal of Biological Chemistry* 283, 19/2008, S. 12681–12685.
- Reid, B. G., Flynn, G. C.** (1997): Chromophore Formation in Green Fluorescent Protein. *Biochemistry* 36, 22/1997, S. 6786–6791.
- Reinheckel, T., Sitte, N., Ullrich, O., Kuckelkorn, U., Davies, K. J., Grune, T.** (1998): Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. *The Biochemical journal* 335 (Pt 3), 1998, S. 637–642.
- Rial, D. V., Arakaki, A. K., Ceccarelli, E. A.** (2000): Interaction of the targeting sequence of chloroplast precursors with Hsp70 molecular chaperones. *European journal of biochemistry* 267, 20/2000, S. 6239–6248.
- Richardson, L. G., Jelokhani-Niaraki, M., Smith, M. D.** (2009): The acidic domains of the Toc159 chloroplast preprotein receptor family are intrinsically disordered protein domains. *BMC biochemistry* 10, 2009, S. 35.
- Richardson, L. G., Paila, Y. D., Siman, S. R., Chen, Y., Smith, M. D., Schnell, D. J.** (2014): Targeting and assembly of components of the TOC protein import complex at the chloroplast outer envelope membrane. *Frontiers in plant science* 5, 2014, S. 269.
- Richter, S., Lamppa, G. K.** (1998): A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 13/1998, S. 7463–7468.
- Rödiger, A., Agne, B., Baerenfaller, K., Baginsky, S.** (2014): *Arabidopsis* proteomics. A simple and standardizable workflow for quantitative proteome characterization. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 1072, 2014, S. 275–288.
- Ross, S., Giglione, C., Pierre, M., Espagne, C., Meinnel, T.** (2005): Functional and developmental impact of cytosolic protein N-terminal methionine excision in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 137, 2/2005, S. 623–637.
- Ruban, A. V., Johnson, M. P., Duffy, C. D. P.** (2012): The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. *Biochimica et biophysica acta* 1817, 1/2012, S. 167–181.
- Ruiz-Sola, M. Á., Rodríguez-Concepción, M.** (2012): Carotenoid biosynthesis in *Arabidopsis*. A colorful pathway. *The Arabidopsis book* 10, 2012, e0158.
- Ruprecht, M., Bionda, T., Sato, T., Sommer, M. S., Endo, T., Schleiff, E.** (2010): On the impact of precursor unfolding during protein import into chloroplasts. *Molecular plant* 3, 3/2010, S. 499–508.
- Ruschak, A. M., Religa, T. L., Breuer, S., Witt, S., Kay, L. E.** (2010): The proteasome antechamber maintains substrates in an unfolded state. *Nature* 467, 7317/2010, S. 868–871.
- Saeki, Y., Sone, T., Toh-e, A., Yokosawa, H.** (2002): Identification of ubiquitin-like protein-binding subunits of the 26S proteasome. *Biochemical and biophysical research communications* 296, 4/2002, S. 813–819.
- Saito, K., Yonekura-Sakakibara, K., Nakabayashi, R., Higashi, Y., Yamazaki, M., Tohge, T., Fernie, A. R.** (2013): The flavonoid biosynthetic pathway in *Arabidopsis*: Structural and genetic diversity. *Plant Physiology and Biochemistry* 72, 2013, S. 21–34.
- Sakamoto, W., Miyagishima, S.-Y., Jarvis, P.** (2008): Chloroplast biogenesis. Control of plastid development, protein import, division and inheritance. *The Arabidopsis book* 6, 2008, e0110.
- Sako, K., Yanagawa, Y., Kanai, T., Sato, T., Seki, M., Fujiwara, M., Fukao, Y., Yamaguchi, J.** (2014): Proteomic Analysis of the 26S Proteasome Reveals Its Direct Interaction with Transit Peptides of Plastid Protein Precursors for Their Degradation. *Journal of Proteome Research* 13, 7/2014, S. 3223–3230.
- Sambrook, J., Russell, D. W.** (op. 2001): *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanches, M., Alves, B. S. C., Zanchin, N. I. T., Guimaraes, B. G.** (2007): The crystal structure of the human Mov34 MPN domain reveals a metal-free dimer. *Journal of Molecular Biology* 370, 5/2007, S. 846–855.
- Santner, A., Estelle, M.** (2010): The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 61, 6/2010, S. 1029–1040.
- Scazzari, M., Amm, I., Wolf, D. H.** (2015): Quality control of a cytoplasmic protein complex. Chaperone motors and the ubiquitin-proteasome system govern the fate of orphan fatty acid synthase subunit Fas2 of yeast. *The Journal of biological chemistry* 290, 8/2015, S. 4677–4687.

LITERATURVERZEICHNIS

- Schleiff, E., Jelic, M., Soll, J.** (2003): A GTP-driven motor moves proteins across the outer envelope of chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 8/2003, S. 4604–4609.
- Schmidt, M., Finley, D.** (2014): Regulation of proteasome activity in health and disease. *Biochimica et biophysica acta* 1843, 1/2014, S. 13–25.
- Schnell, D. J., Blobel, G.** (1993): Identification of intermediates in the pathway of protein import into chloroplasts and their localization to envelope contact sites. *The Journal of cell biology* 120, 1/1993, S. 103–115.
- Schnell, D. J., Kessler, F., Blobel, G.** (1994): Isolation of components of the chloroplast protein import machinery. *Science* (New York, N.Y.) 266, 5187/1994, S. 1007–1012.
- Schweitzer, A., Aufderheide, A., Rudack, T., Beck, F., Pfeifer, G., Plitzko, J. M., Sakata, E., Schulten, K., Förster, F., Baumeister, W.** (2016): Structure of the human 26S proteasome at a resolution of 3.9 Å. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, 28/2016, S. 7816–7821.
- Scott, D. C., Monda, J. K., Bennett, E. J., Harper, J. W., Schulman, B. A.** (2011): N-terminal acetylation acts as an avidity enhancer within an interconnected multiprotein complex. *Science* (New York, N.Y.) 334, 6056/2011, S. 674–678.
- Seedorf, M., Waegemann, K., Soll, J.** (1995): A constituent of the chloroplast import complex represents a new type of GTP-binding protein. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 7, 3/1995, S. 401–411.
- Shanmugabalaji, V., Chahtane, H., Accossato, S., Rahire, M., Gouzerh, G., Lopez-Molina, L., Kessler, F.** (2018): Chloroplast Biogenesis Controlled by DELLA-TOC159 Interaction in Early Plant Development. *Current biology : CB* 28, 16/2018, 2616-2623.e5.
- Sharma, B., Joshi, D., Yadav, P. K., Gupta, A. K., Bhatt, T. K.** (2016): Role of Ubiquitin-Mediated Degradation System in Plant Biology. *Frontiers in plant science* 7, 2016, S. 806.
- Shemorry, A., Hwang, C.-S., Varshavsky, A.** (2013): Control of protein quality and stoichiometries by N-terminal acetylation and the N-end rule pathway. *Molecular cell* 50, 4/2013, S. 540–551.
- Shen, B.-R., Zhu, C.-H., Yao, Z., Cui, L.-L., Zhang, J.-J., Yang, C.-W., He, Z.-H., Peng, X.-X.** (2017): An optimized transit peptide for effective targeting of diverse foreign proteins into chloroplasts in rice. *Scientific reports* 7, 2017, S. 46231.
- Sherman, F., Stewart, J. W., Tsunasawa, S.** (1985): Methionine or not methionine at the beginning of a protein. *BioEssays* 3, 1/1985, S. 27–31.
- Shi, Y., Chen, X., Elsasser, S., Stocks, B. B., Tian, G., Lee, B.-H., Shi, Y., Zhang, N., Poot, S. A. H. de, Tuebing, F., Sun, S., Vannoy, J., Tarasov, S. G., Engen, J. R., Finley, D., Walters, K. J.** (2016): Rpn1 provides adjacent receptor sites for substrate binding and deubiquitination by the proteasome. *Science* (New York, N.Y.) 351, 6275/2016.
- Shibahara, T., Kawasaki, H., Hirano, H.** (2002): Identification of the 19S regulatory particle subunits from the rice 26S proteasome. *The FEBS Journal* 269, 5/2002, S. 1474–1483.
- Silva, G. M., Netto, L. E. S., Simoes, V., Santos, L. F. A., Gozzo, F. C., Demasi, M. A. A., Oliveira, C. L. P., Bicev, R. N., Klitzke, C. F., Sogayar, M. C., Demasi, M.** (2012): Redox control of 20S proteasome gating. *Antioxidants & redox signaling* 16, 11/2012, S. 1183–1194.
- Silva, J. C., Gorenstein, M. V., Li, G.-Z., Vissers, J. P. C., Geromanos, S. J.** (2006): Absolute quantification of proteins by LCMSE. A virtue of parallel MS acquisition. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 5, 1/2006, S. 144–156.
- Silva, R. D., Martinho, R. G.** (2015): Developmental roles of protein N-terminal acetylation. *Proteomics* 15, 14/2015, S. 2402–2409.
- Smalle, J., Kurepa, J., Yang, P., Babiyuchuk, E., Kushnir, S., Durski, A., Vierstra, R. D.** (2002): Cytokinin growth responses in Arabidopsis involve the 26S proteasome subunit RPN12. *The Plant cell* 14, 1/2002, S. 17–32.
- Smalle, J., Kurepa, J., Yang, P., Emborg, T. J., Babiyuchuk, E., Kushnir, S., Vierstra, R. D.** (2003): The pleiotropic role of the 26S proteasome subunit RPN10 in Arabidopsis growth and development supports a substrate-specific function in abscisic acid signaling. *The Plant cell* 15, 4/2003, S. 965–980.
- Smalle, J., Vierstra, R. D.** (2004): The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annual Review of Plant Biology* 55, 2004, S. 555–590.
- Smeekens, S., van Steeg, H., Bauerle, C., Bettenbroek, H., Keegstra, K., Weisbeek, P.** (1987): Import into chloroplasts of a yeast mitochondrial protein directed by ferredoxin and plastocyanin transit peptides. *Plant Molecular Biology* 9, 4/1987, S. 377–388.
- Smith, D. M., Chang, S.-C., Park, S., Finley, D., Cheng, Y., Goldberg, A. L.** (2007): Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. *Molecular cell* 27, 5/2007, S. 731–744.
- Smith, M. D., Rounds, C. M., Wang, F., Chen, K., Afitlhile, M., Schnell, D. J.** (2004): atToc159 is a selective transit peptide receptor for the import of nucleus-encoded chloroplast proteins. *The Journal of cell biology* 165, 3/2004, S. 323–334.
- Sohrt, K., Soll, J.** (2000): Toc64, a New Component of the Protein Translocon of Chloroplasts. *The Journal of cell biology* 148, 6/2000, S. 1213–1222.
- Sommer, M., Rudolf, M., Tillmann, B., Tripp, J., Sommer, M. S., Schleiff, E.** (2013): Toc33 and Toc64-III cooperate in precursor protein import into the chloroplasts of Arabidopsis thaliana. *Plant, cell & environment* 36, 5/2013, S. 970–983.
- Sozer, O., Komenda, J., Ughy, B., Domonkos, I., Laczkó-Dobos, H., Malec, P., Gombos, Z., Kis, M.** (2010): Involvement of carotenoids in the synthesis and assembly of protein subunits of photosynthetic reaction centers of Synechocystis sp. PCC 6803. *Plant & cell physiology* 51, 5/2010, S. 823–835.
- Stael, S., Bayer, R. G., Mehler, N., Teige, M.** (2011): Protein N-acylation overrides differing targeting signals. *FEBS letters* 585, 3/2011, S. 517–522.

LITERATURVERZEICHNIS

- Svozil, J., Hirsch-Hoffmann, M., Dudler, R., Gruissem, W., Baerenfaller, K.** (2014): Protein abundance changes and ubiquitylation targets identified after inhibition of the proteasome with syringolin A. *Molecular & cellular proteomics* : MCP 13, 6/2014, S. 1523–1536.
- Tanaka, K.** (2009): The proteasome. Overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* 85, 1/2009, S. 12–36.
- Tanaka, R., Kobayashi, K., Masuda, T.** (2011): Tetrapyrrole Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis book* 9, 2011, e0145.
- Tanz, S. K., Castleden, I., Hooper, C. M., Vacher, M., Small, I., Millar, H. A.** (2013): SUBA3. A database for integrating experimentation and prediction to define the SUBcellular location of proteins in *Arabidopsis*. *Nucleic acids research* 41, Database issue/2013, D1185-91.
- Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L. A., Rhee, S. Y., Stitt, M.** (2004): mapman: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal* 37, 6/2004, S. 914–939.
- Tohge, T., Nishiyama, Y., Hirai, M. Y., Yano, M., Nakajima, J.-i., Awazuwara, M., Inoue, E., Takahashi, H., Goodenowe, D. B., Kitayama, M., Noji, M., Yamazaki, M., Saito, K.** (2005): Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing an MYB transcription factor. *The Plant Journal* 42, 2/2005, S. 218–235.
- Tokumaru, M., Adachi, F., Toda, M., Ito-Inaba, Y., Yazu, F., Hirosawa, Y., Sakakibara, Y., Suiko, M., Kakizaki, T., Inaba, T.** (2017): Ubiquitin-Proteasome Dependent Regulation of the GOLDEN2-LIKE 1 Transcription Factor in Response to Plastid Signals. *Plant Physiology* 173, 1/2017, S. 524–535.
- Tomko, R. J., Funakoshi, M., Schneider, K., Wang, J., Hochstrasser, M.** (2010): Heterohexameric ring arrangement of the eukaryotic proteasomal ATPases: implications for proteasome structure and assembly. *Molecular cell* 38, 3/2010, S. 393–403.
- Tranel, P. J., Froehlich, J., Goyal, A., Keegstra, K.** (1995): A component of the chloroplastic protein import apparatus is targeted to the outer envelope membrane via a novel pathway. *The EMBO journal* 14, 11/1995, S. 2436–2446.
- Überlacker, B., Werr, W.** (1996): Vectors with rare-cutter restriction enzyme sites for expression of open reading frames in transgenic plants. *Molecular Breeding* 2, 3/1996, S. 293–295.
- Ueda, M., Matsui, K., Ishiguro, S., Kato, T., Tabata, S., Kobayashi, M., Seki, M., Shinozaki, K., Okada, K.** (2011): *Arabidopsis* RPT2a encoding the 26S proteasome subunit is required for various aspects of root meristem maintenance, and regulates gametogenesis redundantly with its homolog, RPT2b. *Plant & cell physiology* 52, 9/2011, S. 1628–1640.
- Ueda, M., Matsui, K., Ishiguro, S., Sano, R., Wada, T., Paponov, I., Palme, K., Okada, K.** (2004): The HALTED ROOT gene encoding the 26S proteasome subunit RPT2a is essential for the maintenance of *Arabidopsis* meristems. *Development* 131, 9/2004, S. 2101–2111.
- Unno, M., Mizushima, T., Morimoto, Y., Tomisugi, Y., Tanaka, K., Yasuoka, N., Tsukihara, T.** (2002): The Structure of the Mammalian 20S Proteasome at 2.75 Å Resolution. *Structure* 10, 5/2002, S. 609–618.
- Varshavsky, A.** (2006): The early history of the ubiquitin field. *Protein science* : a publication of the Protein Society 15, 3/2006, S. 647–654.
- Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W. H., Yates, J. R. 3., Koonin, E. V., Deshaies, R. J.** (2002): Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science (New York, N.Y.)* 298, 5593/2002, S. 611–615.
- Vierstra, R.** (2003): The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends in Plant Science* 8, 3/2003, S. 135–142.
- Villarejo, A., Burén, S., Larsson, S., Déjardin, A., Monné, M., Rudhe, C., Karlsson, J., Jansson, S., Lerouge, P., Rolland, N., Heijne, G. von, Grebe, M., Bako, L., Samuelsson, G.** (2005): Evidence for a protein transported through the secretory pathway en route to the higher plant chloroplast. *Nature cell biology* 7, 12/2005, S. 1224–1231.
- Vogel, C., Marcotte, E. M.** (2012): Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature reviews. Genetics* 13, 4/2012, S. 227–232.
- Wang, B.-C., Wang, H.-X., Feng, J.-X., Meng, D.-Z., Qu, L.-J., Zhu, Y.-X.** (2006): Post-translational modifications, but not transcriptional regulation, of major chloroplast RNA-binding proteins are related to *Arabidopsis* seedling development. *Proteomics* 6, 8/2006, S. 2555–2563.
- Wang, F., Deng, X. W.** (2011): Plant ubiquitin-proteasome pathway and its role in gibberellin signaling. *Cell research* 21, 9/2011, S. 1286–1294.
- Wang, P., Grimm, B.** (2015): Organization of chlorophyll biosynthesis and insertion of chlorophyll into the chlorophyll-binding proteins in chloroplasts. *PHOTOSYNTHESIS RESEARCH* 126, 2-3/2015, S. 189–202.
- Wang, S., Kurepa, J., Hashimoto, T., Smalle, J. A.** (2011): Salt Stress-Induced Disassembly of *Arabidopsis* Cortical Microtubule Arrays Involves 26S Proteasome-Dependent Degradation of SPIRAL1CW. *The Plant cell* 23, 9/2011, S. 3412–3427.
- Wang, S., Kurepa, J., Smalle, J. A.** (2009): The *Arabidopsis* 26S proteasome subunit RPN1a is required for optimal plant growth and stress responses. *Plant & cell physiology* 50, 9/2009, S. 1721–1725.
- Wang, X., Yen, J., Kaiser, P., Huang, L.** (2010): Regulation of the 26S proteasome complex during oxidative stress. *Science signaling* 3, 151/2010, ra88.
- Waters, M. T., Langdale, J. A.** (2009): The making of a chloroplast. *The EMBO journal* 28, 19/2009, S. 2861–2873.

LITERATURVERZEICHNIS

- Waters, M. T., Wang, P., Korkaric, M., Capper, R. G., Saunders, N. J., Langdale, J. A.** (2009): GLK transcription factors coordinate expression of the photosynthetic apparatus in Arabidopsis. *The Plant cell* 21, 4/2009, S. 1109–1128.
- Wessel, D., Flügge, U. I.** (1984): A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical biochemistry* 138, 1/1984, S. 141–143.
- Weston, E., Thorogood, K., Vinti, G., López-Juez, E.** (2000): Light quantity controls leaf-cell and chloroplast development in Arabidopsis thaliana wild type and blue-light-perception mutants. *Planta* 211, 6/2000, S. 807–815.
- Wienk, H. L., Czisch, M., Kruijff, B. de** (1999): The structural flexibility of the preferredoxin transit peptide. *FEBS letters* 453, 3/1999, S. 318–326.
- Wienk, H. L. J., Wechselberger, R. W., Czisch, M., Kruijff, B. de** (2000): Structure, Dynamics, and Insertion of a Chloroplast Targeting Peptide in Mixed Micelles †. *Biochemistry* 39, 28/2000, S. 8219–8227.
- Woodson, J. D., Perez-Ruiz, J. M., Schmitz, R. J., Ecker, J. R., Chory, J.** (2013): Sigma factor-mediated plastid retrograde signals control nuclear gene expression. *The Plant Journal* 73, 1/2013, S. 1–13.
- Xu, F., Huang, Y., Li, L., Gannon, P., Linster, E., Huber, M., Kapos, P., Bienvenut, W., Polevoda, B., Meinel, T., Hell, R., Giglione, C., Zhang, Y., Wirtz, M., Chen, S., Li, X.** (2015): Two N-terminal acetyltransferases antagonistically regulate the stability of a nod-like receptor in Arabidopsis. *The Plant cell* 27, 5/2015, S. 1547–1562.
- Yabuta, Y., Osada, R., Morishita, T., Nishizawa-Yokoi, A., Tamoi, M., Maruta, T., Shigeoka, S.** (2011): Involvement of Arabidopsis NAC transcription factor in the regulation of 20S and 26S proteasomes. *Plant science : an international journal of experimental plant biology* 181, 4/2011, S. 421–427.
- Yang, P., Fu, H., Walker, J., Papa, C. M., Smalle, J., Ju, Y.-M., Vierstra, R. D.** (2004): Purification of the Arabidopsis 26 S proteasome: biochemical and molecular analyses revealed the presence of multiple isoforms. *The Journal of biological chemistry* 279, 8/2004, S. 6401–6413.
- Yu, T. S., Li, H.** (2001): Chloroplast protein translocon components atToc159 and atToc33 are not essential for chloroplast biogenesis in guard cells and root cells. *Plant physiology* 127, 1/2001, S. 90–96.
- Yu, Z., Kleifeld, O., Lande-Atir, A., Bsoul, M., Kleiman, M., Krutauz, D., Book, A., Vierstra, R. D., Hofmann, K., Reis, N., Glickman, M. H., Pick, E.** (2011): Dual function of Rpn5 in two PCI complexes, the 26S proteasome and COP9 signalosome. *Molecular Biology of the Cell* 22, 7/2011, S. 911–920.
- Zghidi, W., Merendino, L., Cottet, A., Mache, R., Lerbs-Mache, S.** (2007): Nucleus-encoded plastid sigma factor SIG3 transcribes specifically the psbN gene in plastids. *Nucleic acids research* 35, 2/2007, S. 455–464.
- Zhang, D., Chen, T., Ziv, I., Rosenzweig, R., Matiuhin, Y., Bronner, V., Glickman, M. H., Fushman, D.** (2009a): Together, Rpn10 and Dsk2 can serve as a polyubiquitin chain-length sensor. *Molecular cell* 36, 6/2009, S. 1018–1033.
- Zhang, Q., Su, L.-J., Chen, J.-W., Zeng, X.-Q., Sun, B.-Y., Peng, C.-L.** (2012): The antioxidative role of anthocyanins in Arabidopsis under high-irradiance. *Biologia Plantarum* 56, 1/2012, S. 97–104.
- Zhang, S., Shi, Y., Jin, H., Liu, Z., Zhang, L., Zhang, L.** (2009b): Covalent complexes of proteasome model with peptide aldehyde inhibitors MG132 and MG101. Docking and molecular dynamics study. *Journal of molecular modeling* 15, 12/2009, S. 1481–1490.
- Zhang, X.-H., Zheng, X.-T., Sun, B.-Y., Peng, C.-L., Chow, W. S.** (2017): Over-expression of the CHS gene enhances resistance of Arabidopsis leaves to high light. *Environmental and Experimental Botany*, 2017.

ANHANG

Anhang 1: Sequenzen zu den verwendeten eGFP-Konstrukten im Plasmid pRT100mod

Als Ausgangsvektor für weitere Plasmide wurde pRT100mod_eGFP verwendet. Insertionen der DNA-Sequenzen von Interesse erfolgten über gekennzeichnete Restriktionsschnittstellen innerhalb der als Klonierungsstelle bezeichneten Sequenz.

pRT100mod_eGFP

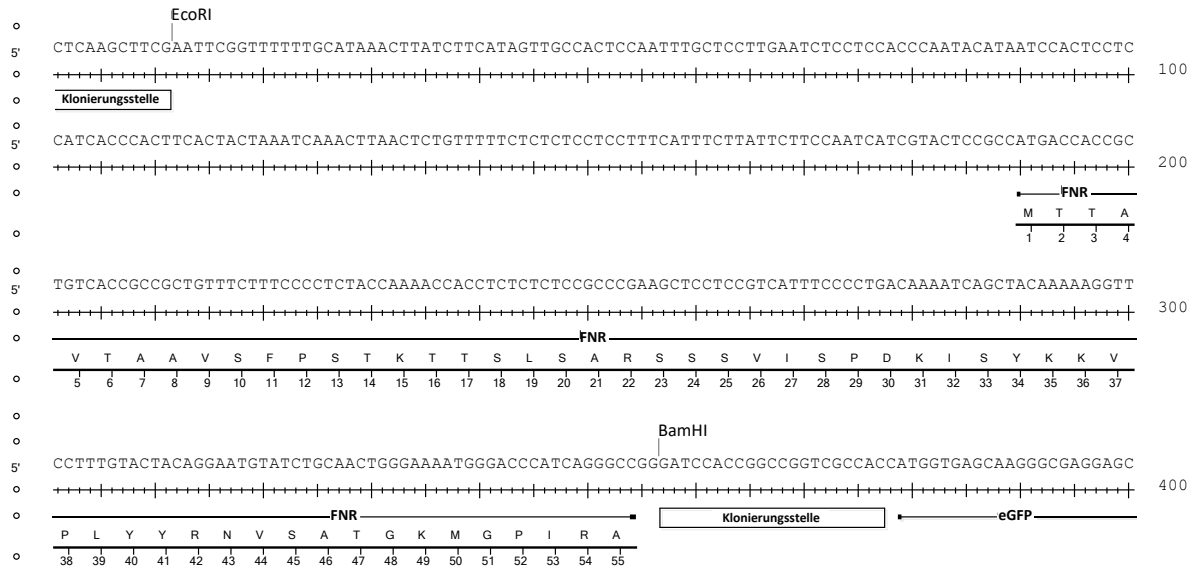
DNA sequence of pRT100mod_eGFP with restriction sites (BamHI, NcoI, EcoRI, XbaI) and a central eGFP gene. The eGFP gene is flanked by two 'Klonierungsstelle' (cloning sites). The amino acid sequence of eGFP is shown below the DNA sequence, starting with a start codon (M) and ending with a stop codon (Q).

5' AGATAATATCTTCGCAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGACCTCGAGAGCTTTATTTTACAACAATTACCAACAACAACA 100
|
|
| EcoRI
|
5' AACAAACAACAACATTACAATTACTATTTACAATTACAGTCGAGCGGCCCGGGGATCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCGCAGTCGACGGTACCGCGGG 200
|
| Klonierungsstelle
|
5' CCCGGGATCCACCGGCCGGTCCACCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACG 300
|
| Klonierungsstelle eGFP
| M V S K G E E L F T G V V P I L V E L D G D V N
| 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
|
5' GCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCGTGCCCTG 400
|
| eGFP
| G H K F S V S G E G E G D A T Y G K L T L K F I C T T G K L P V P W
| 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58
|
5' GCCCACCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGAGTCTCAGCCGTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAA 500
|
| eGFP
| P T L V T T L T Y G V Q C F S R Y P D H M K Q H D F F K S A M P E
| 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91
|
5' GGCTACGTCAGGAGCGACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCTGGTGAACCGCATCG 600
|
| eGFP
| G Y V Q E R T I F F K D D G N Y K T R A E V K F E G D T L V N R I
| 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124
|
5' AGCTGAAGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCA 700
|
| eGFP
| E L K G I D F K E D G N I L G H K L E Y N Y N S H N V Y I M A D K Q
| 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158
|
5' GAAGAACGGCATCAAGGTGAAGTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCTGCAGCTCGCCGACCCTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAG 800
|
| eGFP
| K N G I K V N F K I R H N I E D G S V Q L A D H Y Q Q N T P I G D
| 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191
|
5' GGCCCCGTGCTGCTCCCGACAACCCTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCG 900
|
| eGFP
| G P V L L P D N H Y L S T Q S A L S K D P N E K R D H M V L L E F
| 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224
|
|
5' TGACCGCCCGGGATCACTCTCCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGACTCTAGAGTCCGCAAAAATCACCAGTCTCTCTTACAATCT 1000
|
| eGFP pRT100mod
| V T A A G I T L G M D E L Y K .
| 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240

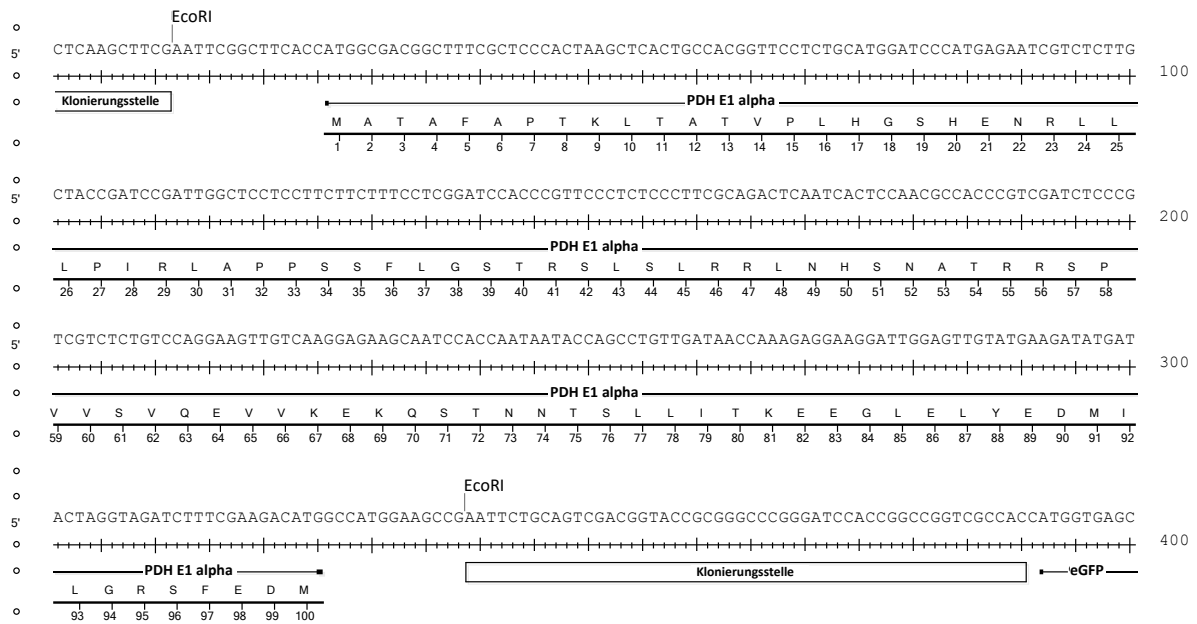
ANHANG

Anhang 1 (Fortsetzung): Sequenzen zu den verwendeten eGFP-Konstrukten im Plasmid pRT100mod

pRT100mod_FNR₁₋₅₅:eGFP



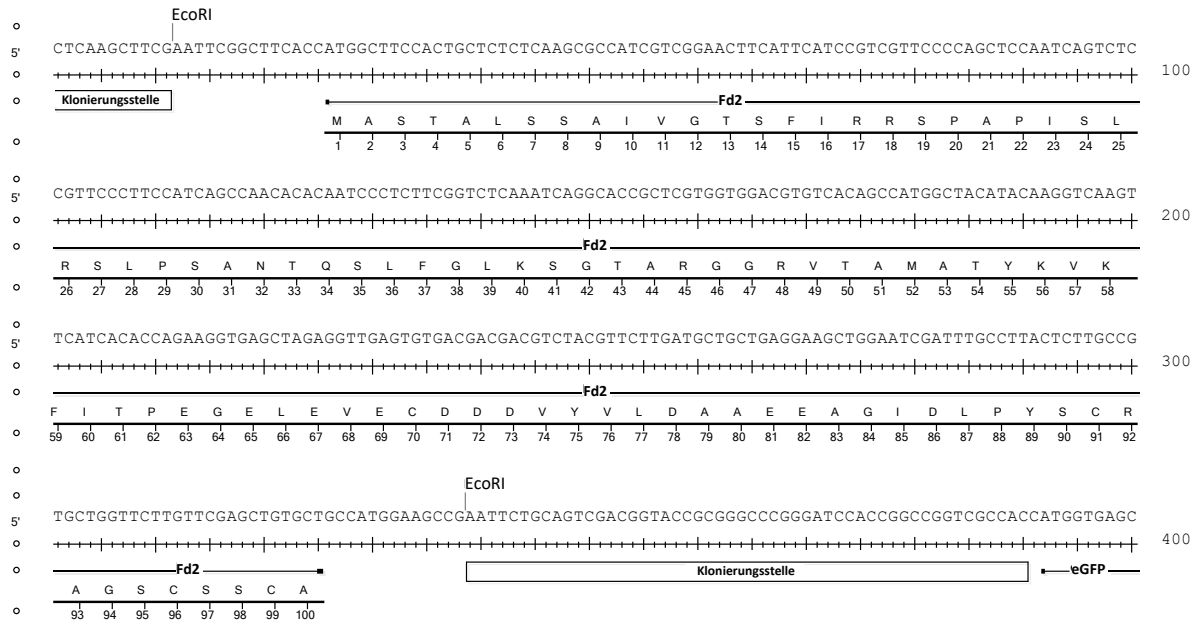
pRT100mod_PDHE1α₁₋₁₀₀:eGFP



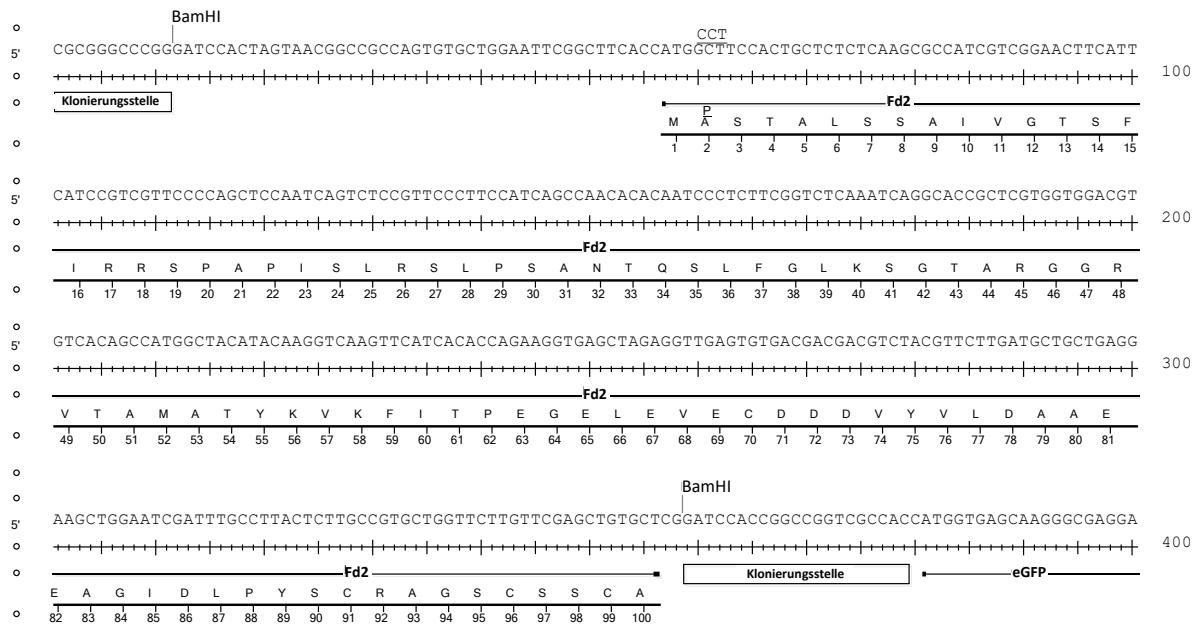
ANHANG

Anhang 1 (Fortsetzung): Sequenzen zu den verwendeten eGFP-Konstrukten im Plasmid pRT100mod

pRT100mod_Fd2₁₋₁₀₀:eGFP [22 AS-Linker]



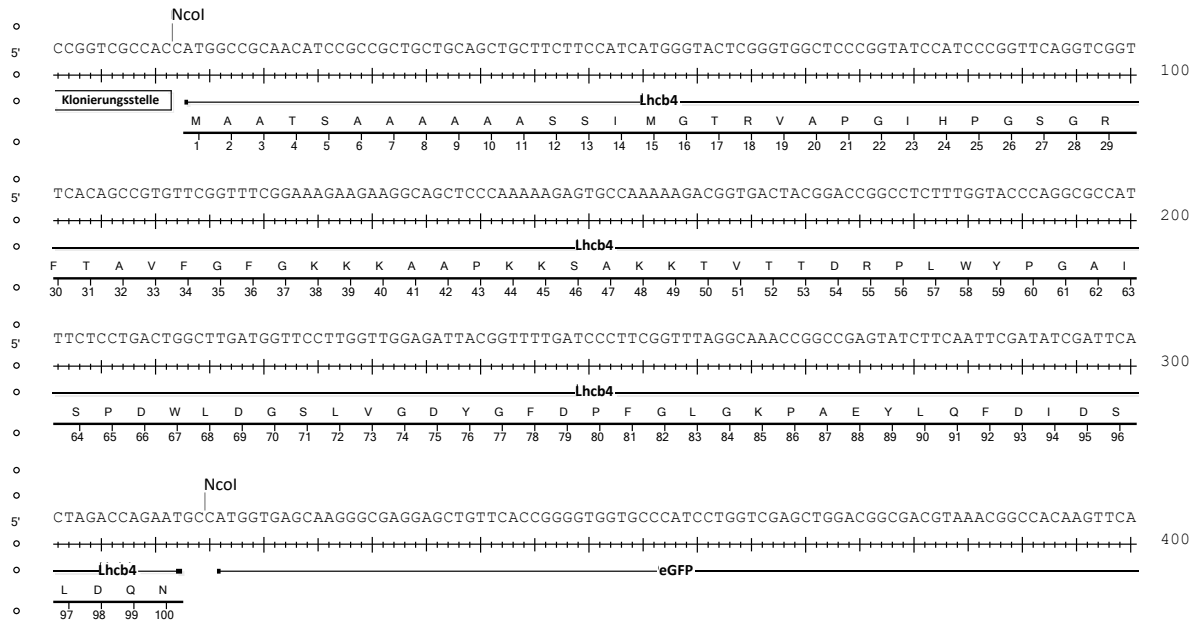
pRT100mod_Fd2₁₋₁₀₀:eGFP und pRT100mod_Fd2₁₋₁₀₀A2P:eGFP [8 AS-Linker]



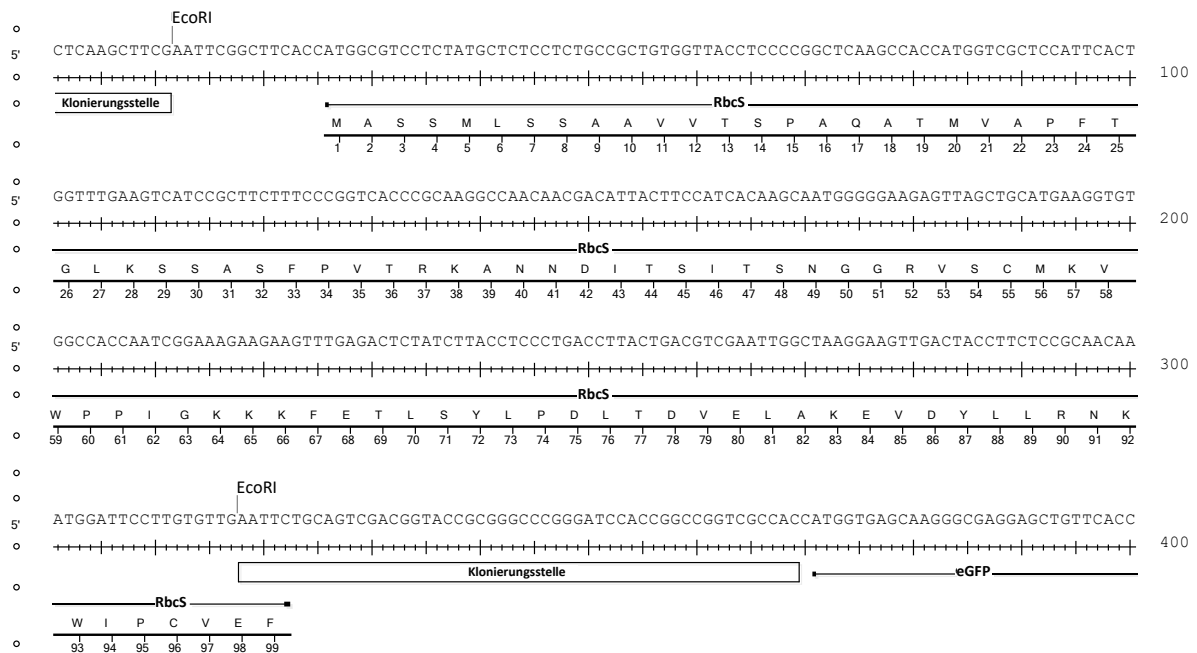
ANHANG

Anhang 1 (Fortsetzung): Sequenzen zu den verwendeten eGFP-Konstrukten im Plasmid pRT100mod

pRT100mod_Lhcb4₁₋₁₀₀:eGFP



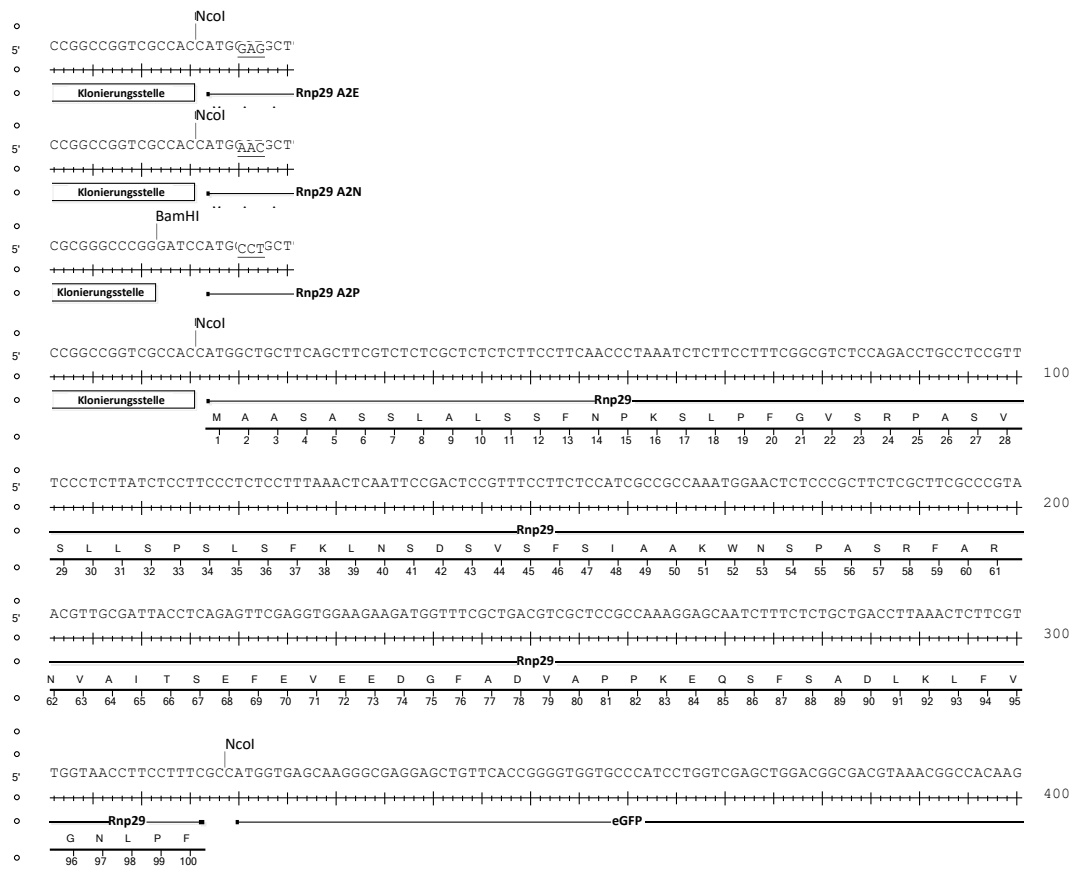
pRT100mod_RbcS₁₋₁₀₀:eGFP



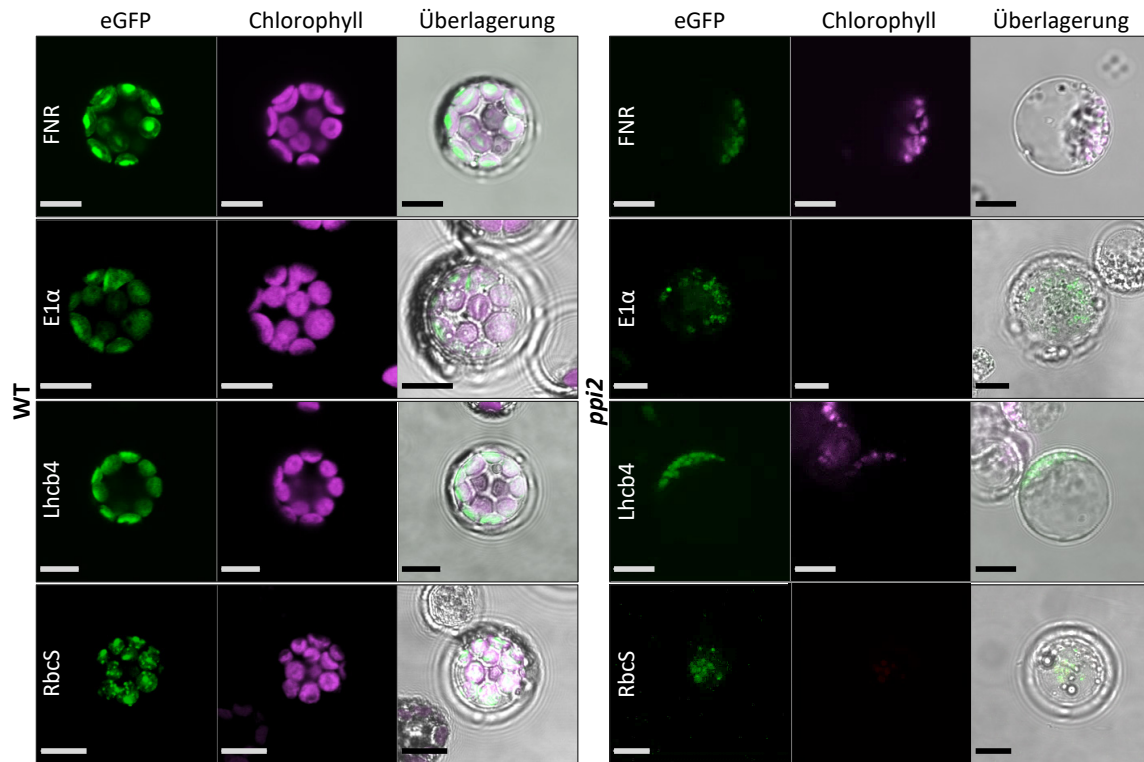
ANHANG

Anhang 1 (Fortsetzung): Sequenzen zu den verwendeten eGFP-Konstrukten im Plasmid pRT100mod

pRT100mod_Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP und andere Rnp29-Varianten



ANHANG



Anhang 2: Confocal laser scanning microscopy (CLSM) mit transient transformierten Protoplasten

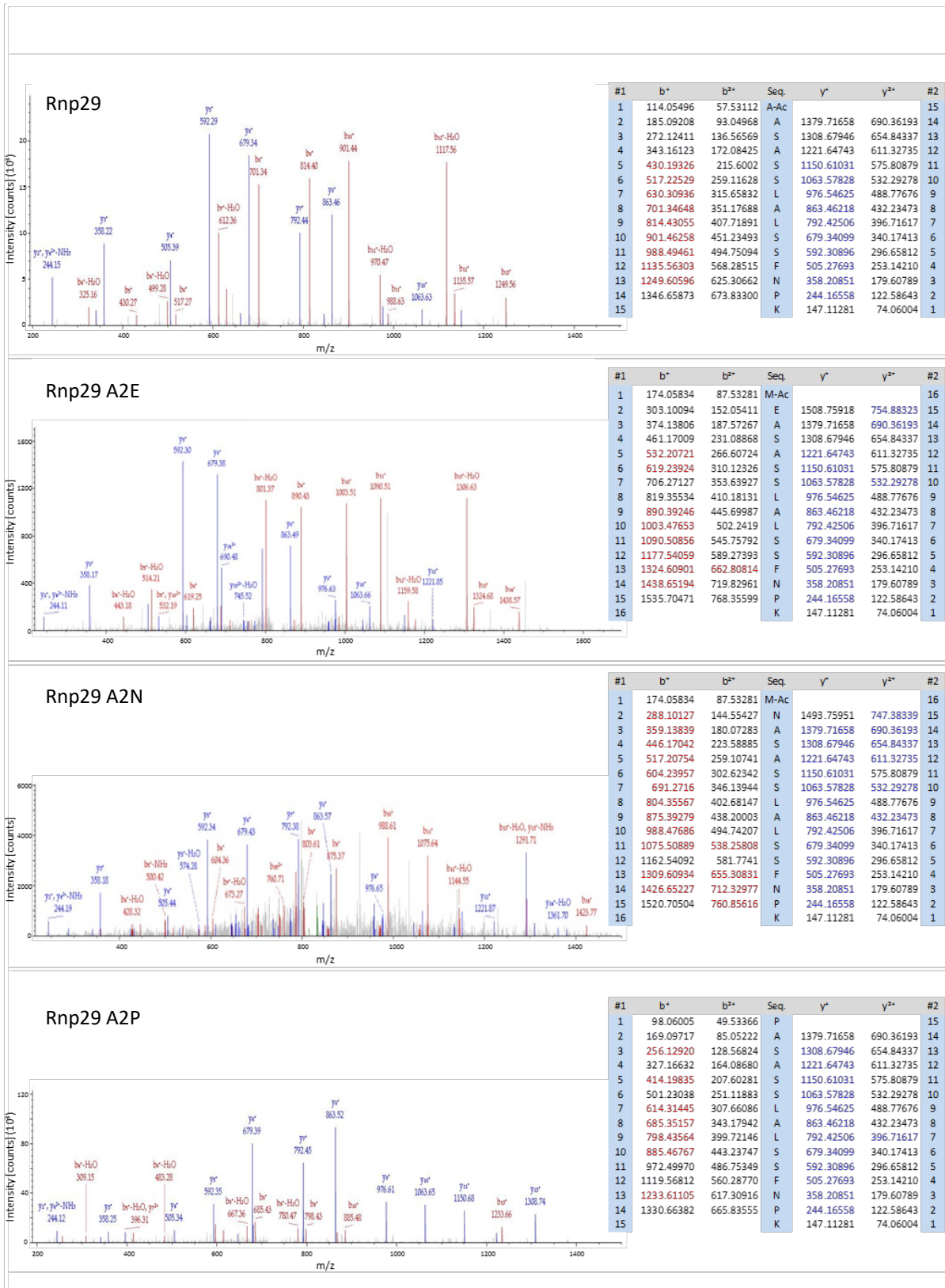
CLSM-Aufnahmen (LSM 510 Meta) mit FNR₁₋₅₅:eGFP, E1α₁₋₁₀₀:eGFP, Lhcb4₁₋₁₀₀:eGFP oder RbcS₁₋₁₀₀:eGFP transformierten WT- und *ppi2*-Protoplasten. Gezeigt sind die eGFP-Fluoreszenz, die Chlorophyll-Fluoreszenz und eine Überlagerung beider Fluoreszenz-Signale mit einer Hellfeld-Aufnahme. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 µm.

ANHANG

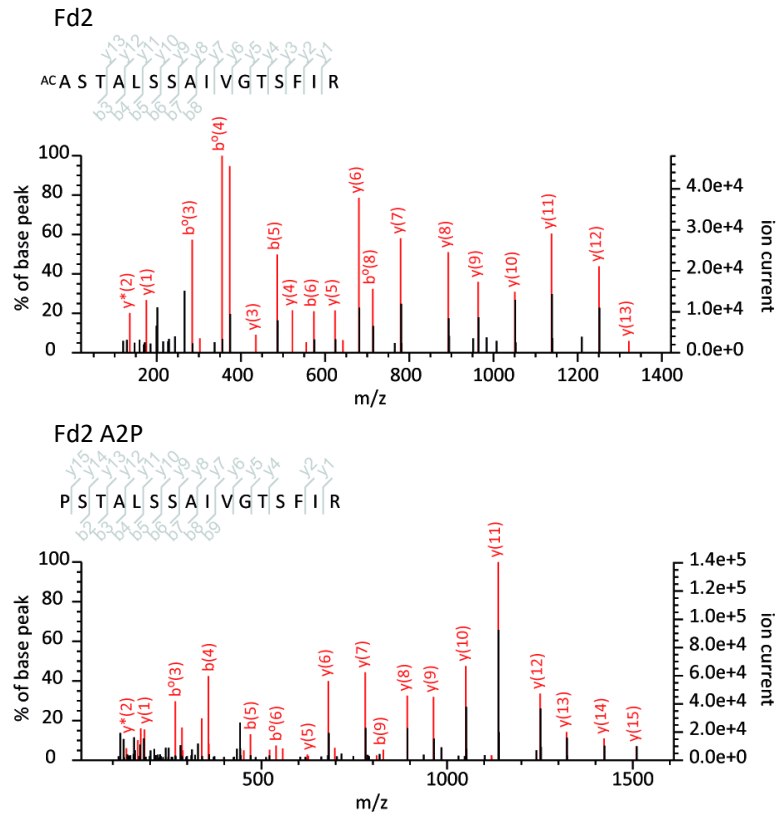
Anhang 3: *inclusion lists* (m/z-Werte) für zielgerichtete MS-Messungen zur Identifizierung N-terminaler Peptide verschiedener Rnp29- und Fd2-Varianten

Konstrukt	Peptidsequenz	z(1)	z(2)	z(3)
Rnp29	MAASASSLALSSFNPK	-	791.401	527.936
	[Ac] mAASASSLALSSFNPK	1623.805	812.406	541.940
	[Ox] mAASASSLALSSFNPK	-	799.398	533.268
	AASASSLALSSFNPK	-	725.880	484.256
	[Ac] aASASSLALSSFNPK	1492.764	746.886	498.260
Rnp29 A2E	MEASASSLALSSFNPK	-	820.403	547.271
	[Ac] mEASASSLALSSFNPK	1681.810	841.409	561.275
	[Ox] mEASASSLALSSFNPK	-	828.401	552.603
	EASASSLALSSFNPK	-	754.883	503.591
	[Ac] eASASSLALSSFNPK	1550.770	775.888	517.595
Rnp29 A2N	MNASASSLALSSFNPK	-	812.904	542.271
	[Ac] mNASASSLALSSFNPK	1666.811	833.909	556.275
	[Ox] mNASASSLALSSFNPK	-	820.901	547.603
	NASASSLALSSFNPK	-	747.383	498.591
	[Ac] nASASSLALSSFNPK	1535.770	768.389	512.595
Rnp29 A2P	MPASASSLALSSFNPK	-	740.361	493.910
	[Ac] mPASASSLALSSFNPK	1479.715	761.366	507.913
	[Ox] mPASASSLALSSFNPK	-	748.359	499.241
	PASASSLALSSFNPK	-	738.888	492.928
	[Ac] pASASSLALSSFNPK	1518.780	759.894	506.931
Fd2	MASTALSSAIVGTSFIR	-	856.456	571.306
	[Ac] mASTALSSAIVGTSFIR	1753.915	877.461	585.310
	[Ox] mASTALSSAIVGTSFIR	-	864.453	576.638
	ASTALSSAIVGTSFIR	-	790.936	527.626
	[Ac] aSTALSSAIVGTSFIR	1622.875	811.941	541.630
Fd2 A2P	MPSTALSSAIVGTSFIR	-	869.464	579.978
	[Ac] mPSTALSSAIVGTSFIR	1779.931	890.469	593.982
	[Ox] mPSTALSSAIVGTSFIR	-	877.461	585.310
	PSTALSSAIVGTSFIR	-	803.944	536.298
	[Ac] pSTALSSAIVGTSFIR	1648.890	824.949	550.302

ANHANG

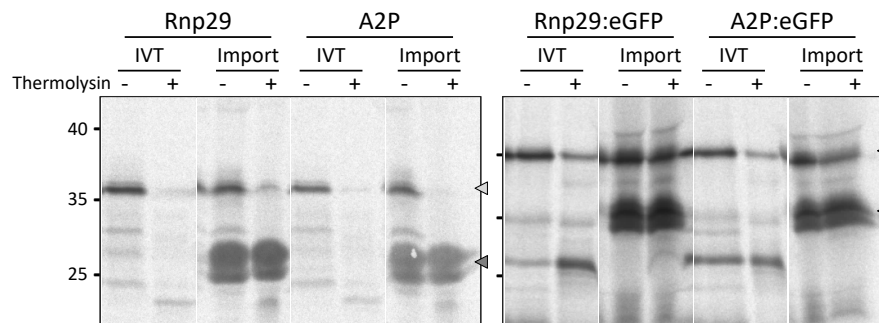


ANHANG



Anhang 5: Extrahierte Spektren N-terminaler Peptide von Fd2-Varianten

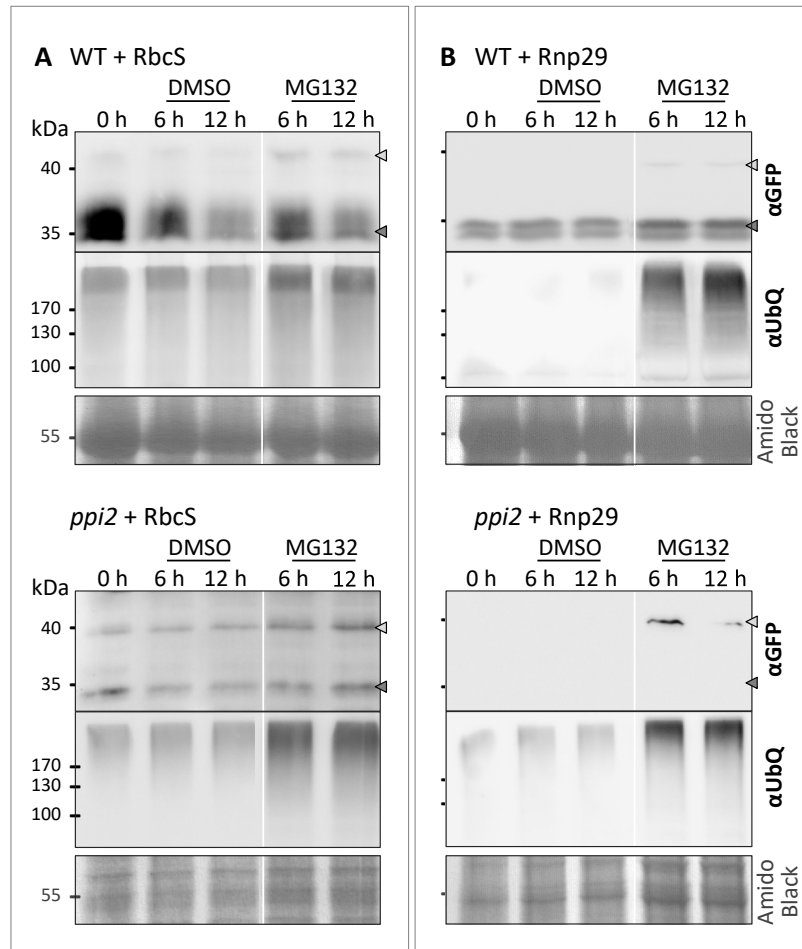
Spektren N-terminaler Peptide der Fd2-Varianten Fd2 und Fd2 A2P und zugehörige b/y-Ionenreihen.



Anhang 6: *in vitro* Import in isolierte WT-Chloroplasten

Rnp29 wurde als radioaktiv-markiertes Volllängenprotein (Rnp29) sowie als eGFP-Fusionsprotein (Rnp29₁₋₁₀₀:eGFP) jeweils in einer authentischen Variante und einer A2P-Variante *in vitro* translatiert. Das *in vitro*-Translat (IVT) wurde für 15 min mit isolierten WT-Chloroplasten inkubiert (Import). Die Chloroplasten und auch das IVT wurden mit 50 µg/ml Thermolysin behandelt. Nach Auftrennung der Proteine auf einem SDS-Gel wurden diese autoradiografisch dargestellt. Pfeile markieren die Position von Vorläuferproteinen (helle Pfeile) und prozessierten Proteinen (dunkle Pfeile).

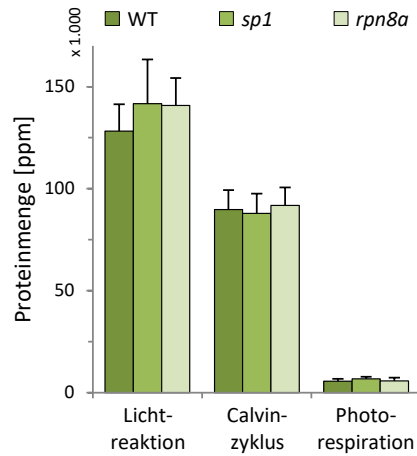
ANHANG



Anhang 7: Stabilisierung von Vorläuferproteinen in transient transformierten Protoplasten mit MG132

Transient mit RbcS₁₋₁₀₀:eGFP (A) bzw. RNP29₁₋₁₀₀:eGFP (B) transformierte WT- bzw. *ppi2* Protoplasten wurden 17 h nach der Transformation mit DMSO oder MG132 (50 µM) versetzt. Zum Induktionszeitpunkt (0 h) bzw. 6 h und 12 h nach der Induktion wurden die Protoplasten geerntet und das heterolog exprimierte eGFP-Fusionsprotein in einer Western-Blot-Analyse immunologisch mit αGFP-Antikörpern nachgewiesen. Pfeile markieren die Position von Vorläuferproteinen (helle Pfeile) und prozessierten Proteinen (dunkle Pfeile). Polyubiquitinierte Proteine wurden mit Ubiquitin (αUbQ)-Antikörpern detektiert, ein Ausschnitt der entsprechenden Membranen mit *Amido Black*-gefärbten Proteinen ist als Ladekontrolle gezeigt.

ANHANG



Anhang 8: Abundanz photosynthetischer Proteine in *sp1* und *rpn8a*

Gemittelte Abundanzen mit SD der Gesamtheit aller plastidären Proteine, die Funktionen in der Photosynthese haben, aus massenspektrometrischen Analysen (n = 9) mit WT, *sp1* und *rpn8a*.

Anhang 9: Analog im Vergleich zu *ppi2* regulierte Proteine in *sp1 ppi2* und *rpn8a ppi2*

AGI-Locus	Beschreibung	Lokalisierung ^a	<i>sp1 ppi2</i> ^b	p-Wert ^c	<i>rpn8a ppi2</i> ^b	p-Wert ^c
AT5G51830	pfkB-like carbohydrate kinase family protein	Cytosol	3,14	0,02	2,85	0,04
AT3G22850	Aluminium induced protein mit YGL und LRDR Motiven	Cytosol	2,80	0,02	2,15	1,12 x 10 ⁻⁴
AT1G70830	MLP28 / MLP-like protein 28	Cytosol	0,47	1,23 x 10 ⁻³	0,63	0,03
AT4G22710	CYP706A2 / Cytochrome P450	ER	0,63	9,41 x 10 ⁻⁴	0,45	3,05 x 10 ⁻³
AT5G25130	CYP71B12 / Cytochrome P450	-	0,22	0,04	0,31	0,03

^a aus SUBA3 MS; ^b Verhältnis der Proteinkonzentrationen ppm_{Mut}/ppm_{ppi2}; ^c errechnet mit t-Test

Anhang 10: In *rpn8a ppi2* gegenüber *ppi2* $\geq 1,5$ -fach, signifikant höher abundante Proteine

AGI-Locus	Proteinbezeichnung ^a	Lokalisierung ^b	BIN ^c	BIN-Bezeichnung ^d	<i>rpn8a ppi2</i> ^e	p-Wert ^e		
AT1G74050	Ribosomal protein L6 family protein	cytosol	29.2	protein. synthesis	1.86	2.81E-02		
AT1G13060	PBE1 / 20S proteasome beta subunit E1	cytosol,nucleus	29.2	protein. synthesis	1.54	1.21E-05		
AT1G51710	UBP6, ATUBP6 / ubiquitin-specific protease 6	cytosol			1.71	6.10E-04		
AT1G56450	PBG1 / 20S proteasome beta subunit G1	cytosol,nucleus			2.28	3.11E-02		
AT1G79210	N-terminal nucleophile aminohydrolases (Ntn hydrolases) supe...	cytosol,nucleus			1.89	2.65E-08		
AT2G05840	PAA2 / 20S proteasome subunit PAA2	cytosol,nucleus			2.80	2.02E-06		
AT2G27020	PAG1 / 20S proteasome alpha subunit G1	cytosol,nucleus			1.82	1.36E-07		
AT3G14290	PAE2 / 20S proteasome alpha subunit E2	cytosol,nucleus			1.63	9.22E-04		
AT3G22110	PAC1 / 20S proteasome alpha subunit C1	cytosol,nucleus			1.86	2.44E-08		
AT3G51260	PAD1 / 20S proteasome alpha subunit PAD1	cytosol			1.70	2.49E-05		
AT3G60820	PBF1 / N-terminal nucleophile aminohydrolases (Ntn hydrolase...	cytosol			1.87	2.33E-09		
AT4G14800	PBD2 / 20S proteasome beta subunit D2	cytosol,vacuole			2.20	5.73E-07		
AT4G31300	PBA1 / N-terminal nucleophile aminohydrolases (Ntn hydrolase...	cytosol,nucleus			1.83	1.39E-08		
AT1G74470	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein...	plastid			16.1	secondary metabolism. isoprenoids	1.56	2.57E-02
AT4G37980	ELI3-1, ELI3, ATCAD7, CAD7 / elicitor-activated gene 3-1	cytosol			16.2	secondary metabolism. phenylpropanoids	1.67	8.72E-04
AT5G25980	TGG2, BGLU37 / glucoside glucohydrolase 2	plastid	16.5	secondary metabolism.sulfur-containing	1.67	4.77E-05		
AT1G06000	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	cytosol,mitochondrion	16.8	secondary metabolism. flavonoids	1.61	3.93E-03		
AT3G51240	F3H, TT6, F3'H / flavanone 3-hydroxylase	no annotation			1.68	1.75E-06		
AT5G08640	FLS, ATFLS1, FLS1 / flavonol synthase 1	no annotation			2.00	1.48E-05		
AT5G17050	UGT78D2 / UDP-glucosyl transferase 78D2	no annotation			1.74	2.64E-04		
AT3G28300	AT14A / Protein of unknown function (DUF677)	plasma membrane	35.1	not assigned. no ontology	2.25	4.11E-04		
AT4G11220	BT12, RTNLB2 / VIRB2-interacting protein 2	plasma membrane			1.94	1.16E-02		
AT3G62530	ARM repeat superfamily protein	plastid			1.52	7.50E-03		
AT1G56580	SVB / Protein of unknown function, DUF538	no annotation	35.2	not assigned. unknown	3.87	1.80E-04		
AT3G08030	Protein of unknown function, DUF642	extracellular			1.57	9.72E-03		
AT5G41970	Metal-dependent protein hydrolase	mitochondrion			3.01	4.40E-02		

^a aus TAIR10; ^b aus SUBAcon-Liste; ^c MapMan-Funktionsgruppe; ^d Verhältnis der Proteinkonzentrationen ppm_{rpn8a ppi2}/ppm_{ppi2}; ^e errechnet mit t-Test
 ■ funktionell zusammengehörig; ■ Proteinmetabolismus; ■ Sekundärmetabolismus; ■ Photosynthese

Anhang 10 (Fortsetzung): In *rpn8a ppi2* gegenüber *ppi2* $\geq 1,5$ -fach, signifikant höher abundante Proteine

AGI-Locus	Proteinbezeichnung ^a	Lokalisierung ^b	BIN ^c	BIN-Bezeichnung ^d	$\frac{rpn8a}{ppi2}$	p-Wert ^e
AT1G29910	CAB3, AB180, LHCB1.2 / chlorophyll A/B binding protein 3	plastid	1.1	PS. lightreaction	2.73	6.29E-05
AT1G44575	NPQ4, PSBS / Chlorophyll A-B binding family protein	plastid			1.51	1.63E-03
AT4G10340	LHCB5 / light harvesting complex of photosystem II 5	plastid			1.77	1.88E-07
AT1G667090	RBCS1A / ribulose biphosphate carboxylase small chain 1A	plastid	1.3	PS. calvin cycle	2.17	3.37E-06
ATCG00490	RBCL / ribulose-bisphosphate carboxylases	plastid			1.56	6.59E-03
AT5G17330	GAD, GAD1 / glutamate decarboxylase	cytosol	13.1	amino acid metabolism. synthesis	1.71	3.11E-02
AT5G49810	MIMT / methionine S-methyltransferase	cytosol			2.32	3.88E-02
AT4G02080	ASAR1, ATSARA1C, ATSAR2, SAR2 / secretion-associated RAS sup...	plasma membrane	30.5	signalling. G-proteins	2.48	6.94E-03
AT4G18430	ATRABA1e, RABA1e / RAB GTPase homolog A1E	cytosol			3.34	4.94E-02
AT1G78570	RHM1, ROL1, ATRHM1 / rhamnose biosynthesis 1	cytosol	10.1	cell wall. precursor synthesis	1.68	6.08E-04
AT1G16030	Hsp70b / heat shock protein 70B	cytosol	20.2	stress. abiotic	2.62	4.27E-02
AT4G30170	Peroxidase family protein	extracellular	26.12	misc. peroxidases	1.63	6.26E-07
AT1G56110	NOP56 / homolog of nucleolar protein NOP56	nucleus	27.3	RNA. regulation of transcription	1.52	2.57E-02
AT5G51830	pfkB-like carbohydrate kinase family protein	cytosol	2.2	major CHO metabolism. degradation	2.85	3.97E-02
AT3G04120	GAPC, GAPC-1, GAPC1 / glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogena...	cytosol	4.1	glycolysis. cytosolic branch	1.65	9.51E-03
AT3G18860	transducin family protein / WD-40 repeat family protein	cytosol			2.03	lipid metabolism. lipid degradation
AT3G22890	APS1 / ATP sulfurylase 1	plastid	14.1	S-assimilation. ATPS	1.73	3.95E-02
AT3G22850	Aluminium induced protein with YGL and LRDR motifs	cytosol	17.2	hormone metabolism. auxin	2.15	1.12E-04
AT2G38230	ATPDX1.1, PDX1.1 / pyridoxine biosynthesis 1.1	cytosol	18	Co-factor and vitamine metabolism	1.58	1.77E-04
AT3G09840	CDC48, ATCDC48, CDC48A / cell division cycle 48	cytosol	31.2	cell.division	1.69	3.08E-05

^a aus TAIR10; ^b aus SUBAcon-Liste; ^c MapMan-Funktionsgruppe; ^d Verhältnis der Proteinkonzentrationen $\frac{ppm_{rpn8a ppi2}}{ppm_{ppi2}}$; ^e errechnet mit t-Test
 ■ funktionell zusammengehörig; ■ Proteinmetabolismus; ■ Sekundärmetabolismus; ■ Photosynthese

ANHANG

Anhang 11: In *rpn8a ppi2* gegenüber *ppi2* $\geq 1,5$ -fach, signifikant geringer abundante Proteine

AGI Locus	Proteinbezeichnung	Lokalisierung ^a	BIN ^b	BIN-Bezeichnung ^b	<i>rpn8a ppi2</i> ^c	p-Wert ^d
AT3G01340	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	cytosol	29.3	protein. targeting	0.57	4.47E-02
AT4G30910	Cytosol aminopeptidase family protein	plastid	29.5	protein. degradation	0.57	3.18E-02
AT4G26780	AR192 / Co-chaperone GrpE family protein	mitochondrion	29.6	protein. folding	0.60	2.38E-03
AT1G74100	SOT16, ATSOT16, COR1-7, ATST5A / sulfotransferase 16	cytosol	16.5	secondary metabolism. sulfur-containing	0.48	1.22E-06
AT4G31500	CYP83B1, SUR2, RNT1, RED1, ATR4 / cytochrome P450, family 83...	endoplasmic reticulum			0.47	9.24E-08
AT2G37970	SOUL-1 / SOUL heme-binding family protein	plasma membrane	35.1	not assigned. no ontology	0.50	3.74E-03
AT1G27020	unknown protein; BEST Arabidopsis thaliana protein match is:...	no annotation	35.2	not assigned. unknown	0.49	1.48E-02
AT2G30930	unknown protein; FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; l...	plastid			0.65	2.95E-02
AT5G04830	Nuclear transport factor 2 (NTF2) family protein	cytosol			0.53	1.97E-04
AT1G79870	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family protein...	cytosol, peroxisome	1.2	PS. photorespiration	0.54	1.02E-02
AT1G18500	MAML-4, IPMS1 / methylthioalkylmalate synthase-like 4	plastid	13.1	amino acid metabolism. synthesis	0.66	2.98E-02
AT2G04400	Aldolase-type TIM barrel family protein	plastid			0.53	7.00E-06
AT3G54640	TSA1, TRP3 / tryptophan synthase alpha chain	plastid			0.55	2.25E-09
AT5G54810	TSB1, TRPB, TRP2, ATTSB1 / tryptophan synthase beta-subunit ...	plastid			0.64	2.70E-04
AT1G06400	ARA2, ATRABA1A, ATRAB1E, ARA-2 / Ras-related small GTP-bind...	cytosol	30.5	signalling. G-proteins	0.44	3.53E-02
AT4G30270	MER15B, MER1-5, XTH24, SEN4 / xyloglucan endotransglucosylas...	extracellular	10.6	cell wall. degradation	0.46	2.60E-04
AT2G45220	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily/	extracellular	10.8	cell wall. pectin*esterases	0.32	3.82E-03
AT1G70830	MLP28 / MLP-like protein 28	cytosol	20.1	stress. biotic	0.63	2.67E-02
AT1G73260	ATKT11, KT11 / kunitz trypsin inhibitor 1	extracellular			0.50	1.17E-02
AT3G04720	PR4, HEL, PR-4 / pathogenesis-related 4	no annotation			0.59	8.53E-03
AT5G52310	COR78, LTI78, RD29A, LTI140 / low-temperature-responsive pro...	nucleus	20.2	stress. abiotic	0.50	4.58E-04

^a aus TAIR10; ^b aus SUBAcomp-Liste; ^c MapMan-Funktionsgruppe; ^d Verhältnis der Proteinkonzentrationen ppm_{rpn8a ppi2}/ppm_{ppi2}; ^e errechnet mit t-Test
 ■ funktionell zusammengehörig; ■ Proteinmetabolismus; ■ Sekundärmetabolismus; ■ Photosynthese

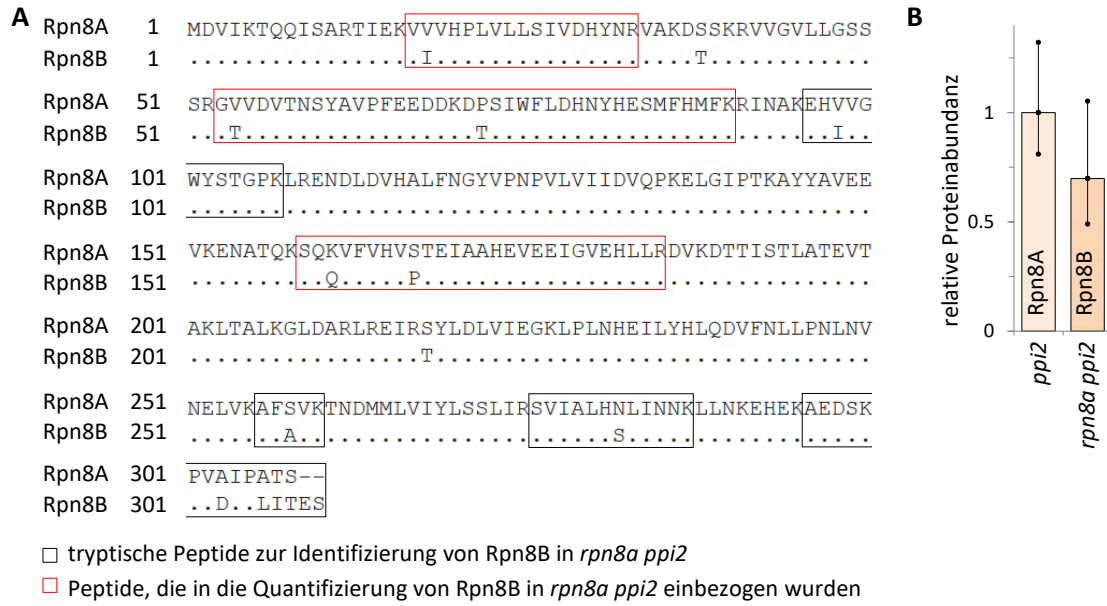
ANHANG

Anhang 11 (Fortsetzung): In *rpn8a ppi2* gegenüber *ppi2* ≥ 1,5-fach, signifikant geringer abundante Proteine

AGI Locus	Proteinbezeichnung	Lokalisierung ^a	BIN ^b	BIN-Bezeichnung ^b	<i>rpn8a ppi2</i> ^c	p-Wert ^d
AT4G37550	Acetamidase/Formamidase family protein	no annotation	26.1	misc. misc2	0.28	1.19E-03
AT4G20830	FAD-binding Berberine family protein	extracellular	26.8	misc. nitrilases	0.53	2.05E-02
AT1G02920	ATGSTF7, GST11, ATGSTF8, GSTF7, ATGST11 / glutathione S-transferase	cytosol	26.9	misc. glutathione S transferases	0.64	8.33E-06
AT4G22710	CYP706A2 / cytochrome P450, family 706, subfamily A, po ypep...	endoplasmic reticulum	26.10	misc. cytochrome P450	0.45	3.05E-03
AT5G25130	CYP71B12 / cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypept...	no annotation			0.31	2.65E-02
AT5G64120	Peroxidase superfamily protein	extracellular	26.12	misc. peroxidases	0.50	4.47E-04
AT1G04040	HAD superfamily, subfamily IIIB acid phosphatase	extracellular	26.13	misc. acid and other phosphatases	0.61	3.79E-02
AT3G16530	Legume lectin family protein	extracellular	26.16	misc. myrosinases-lectin-jacalin	0.58	2.07E-05
AT3G52380	CP33, PDE322 / chloroplast RNA-binding protein 33	plastid	27.4	RNA. RNA binding	0.65	2.39E-02
AT4G16830	Hyaluronan / mRNA binding family	cytosol			0.58	4.89E-02
AT1G13440	GAPC-2, GAPC2 / glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2	cytosol	4.1	glycolysis. cytosolic branch	0.65	1.28E-02
AT5G56720	Lactate/malate dehydrogenase family protein	no annotation	8.2	TCA / org transformation. other organic acid transformats	0.29	3.51E-02
AT5G04140	GLU1, GLS1, GLUS, FD-GOGAT / glutamate synthase 1	plastid	12.2	N-metabolism. ammonia metabolism	0.28	4.18E-02
AT5G14780	FDH / formate dehydrogenase	mitochondrion	25.10	C1-metabolism. formate dehydrogenase	0.66	1.15E-04
AT2G38860	YLS5 / Class I glutamine amidotransferase-like superfamily p...	no annotation	33.99	development. unspecified	0.47	3.57E-05

^a aus TAIR10; ^b aus SUBAcon-Liste; ^c MapMan-Funktionsgruppe; ^d Verhältnis der Proteinkonzentrationen ppm_{rpn8a ppi2}/ppm_{ppi2}; ^e errechnet mit t-Test
 ■ funktionell zusammengehörig; ■ Proteinmetabolismus; ■ Sekundärmetabolismus; ■ Photosynthese

ANHANG



Anhang 12: Das Rpn8A-Homologe Rpn8B

(A) Vergleich der Aminosäuresequenzen von Rpn8A und Rpn8B, markiert sind die tryptischen Peptide, die zur Identifizierung/Quantifizierung von Rpn8B in massenspektrometrischen Analysen herangezogen wurden. (B) Relative Proteinabundanz von Rpn8B in *rpn8a pip2* in Bezug auf die Abundanz von Rpn8A in *pip2*, maximale und minimale Abweichung zum Mittelwert der relativen Proteinabundanz sind angegeben.

LEBENS LAUF

Persönliche Angaben

Name Julia Grimmer
Anschrift Viktor-Scheffel-Straße 06
06114 Halle/Saale
Geburtsdatum/-ort 26.06.1985 in Halle (Saale)

Ausbildung

seit Jan 2011 **Promotion**
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Institut für Biochemie und Biotechnologie
Abt.: Pflanzenbiochemie
Betreuende Lehrperson: Prof. Dr. Sacha Baginsky

Dez 2010 **Diplomarbeit (1,1)**
Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle (Saale)
Abt. Stress- und Entwicklungsbiologie
Betreuende Lehrperson: Prof. Dr. Dierk Scheel
Thema: „Charakterisierung von Calcium-Signaltransduktionsmutanten in *Arabidopsis thaliana*“

2004-2010 **Diplomstudiengang Biologie (Note 1,2)**
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

1995-2004 **Abitur (Note 1,1)**
Georg-Cantor-Gymnasium in Halle (Saale)

Publikation im Rahmen der Promotion

“The RNA-binding protein RNP29 is an unusual Toc159 transport substrate.”

Grimmer J, Rödiger A, Hoehenwarter W, Helm S, Baginsky S., Front Plant Sci. 2014 Jun 16;5:258. doi: 10.3389/fpls.2014.00258. eCollection 2014.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

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

Halle (Saale), den

Julia Grimmer

DANKSAGUNG

Die Erstellung dieser Arbeit hat nicht nur mich Mühe, Schweiß und Nerven gekostet, sondern auch vielen Menschen in meinem beruflichen und privaten Umfeld. An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich und das Gelingen meiner Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Sacha Baginsky für sein Vertrauen, die Unterstützung, Motivation und sein stetiges Interesse an neuen Daten bedanken. Außerdem danke ich ihm sowie Prof. Dr. Ingo Heilmann und Prof. Dr. Felix Kessler für die Übernahme der Gutachten.

Dr. Anja Rödiger, Dr. Birgit Agne und Dr. Daniel Köhler danke ich für den regen wissenschaftlichen Austausch, Diskussionen, Hinweise und Vorschläge, die mir in vielen Situationen wichtig und nützlich waren. Ebenso möchte ich mich bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanken, die mir sehr ans Herz gewachsen sind und ohne die ich sicher nicht so weit gekommen wäre. Besonders möchte ich Kristin Peter für ihren unschätzbaren Beitrag in allen Laborangelegenheiten und Stefan Helm sowie Dr. Dirk Dobritzsch für ihre Geduld und Kompetenz in MS-Fragen danken.

Dr. Wolfgang Höhenwarter und Dr. Gerd Hause sowie ihren lieben Mitarbeiterinnen danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit, ihre Zeit und Expertise. Bei Prof. Dr. Felix Kessler, Prof. Dr. Ralf-Bernd Klösigen und Prof. Dr. Christian Schmitz-Linneweber möchte ich dafür danken, dass Sie mir Antikörper und Plasmide zur Verfügung stellten. Mein Dank gilt ebenso den AG's um Dr. Margret Köck, Prof. Dr. Humbeck und Prof. Dr. Behrens, die mir freundlicher Weise gestatteten Versuche an ihren Geräten durchzuführen.

Zuletzt möchte ich einen ganz lieben Dank an meine Familie richten, die stets an mich geglaubt hat und mir eine enorme Stütze während meines Studiums und der Promotionszeit war. Danke vor allem an Micha, du bist einfach der Beste.

AT1G12900	GAPA-2 / glyceraldehyde 3-phosphate	plastid	1.3.4	P5 Calvin cycle.GAP	14884.02	1899.33	3105.78	1913.17	2321.19	1263.74	1256.71	1473.18	1447.56	643.61	1536.75	1256.1	1635.4	1721.91	1422.29	2025.28	1153.75	1196.93	610.367	1395.42	382.26	0.96	0.275	not regulated				
AT2G26550	GAP, GAPA-1 / glyceraldehyde 3-phosphate	plastid	1.3.4	P5 Calvin cycle.GAP	3040.44	3698.04	3039	5150.04	5394.51	5523.46	4132.47	5793.34	461.2	4602.12	852.65	3902.24	3447.27	4351.09	4584.89	5390.56	5507.65	5110.36	4269.59	4261.95	4536.18	647.55	0.99	0.864	not regulated			
AT2G21170	TIM, PDTP1 / triosephosphate isomerase	plastid	1.3.5	P5 Calvin cycle.TPI	1580.15	1532.93	2096	1806.48	1445.34	1617.57	1611.37	1401.3	1498.52	1613.29	201.40	1533.88	1391.13	1703.0	1299.19	1540.41	1913.22	1617.27	3225.79	1791.12	542.32	1.11	0.398	not regulated				
AT2G21330	FBA1 / fructose-bisphosphate aldolase 1	plastid	1.3.6	P5 Calvin cycle.aldolase	1955.05	2004.38	2997.72	2177.17	2109.29	2207.1	2550.4	2140.94	2297.84	2035.54	316.38	3865.62	1708.02	7149.19	1915.08	1860.89	2687.03	2631.36	2295.58	2664.43	2038.80	596.43	0.88	0.261	not regulated			
AT2G01140	Aldolase superfamily protein	plastid	1.3.6	P5 Calvin cycle.aldolase	966.204	813.578	1226.58	1258.02	913.474	980.958	1497.53	1128.47	1142.13	1717.44	199.58	994.733	918.981	514.691	784.754	785.284	1063.09	1393.29	1183.36	1264.74	988.99	252.92	0.92	0.453	not regulated			
AT4G38970	FBA2 / Fructose-bisphosphate aldolase 2	plastid	1.3.6	P5 Calvin cycle.aldolase	3454.69	3377.49	5134.95	4921.64	4059.43	4330.28	5434.12	4632.15	4737.36	4453.57	673.59	3719.97	3434.91	3276.09	3803.32	4058.5	5015.89	6206.33	4978.56	5647.39	4488.88	960.43	1.01	0.933	not regulated			
AT4G35460	PF1B1 / phosphofruktotransferase	plastid	1.3.6	P5 Calvin cycle.PF1B1	82.1154	49.7414	176.883	113.133	25.444	205.969	366.388	225.644	126.99	126.99	309.546	110.93	126.286	126.286	126.286	126.286	126.286	126.286	126.286	126.286	126.286	126.286	126.286	1.07	0.486	not regulated		
AT4G54050	HCB1 / high cetyl electron flow 1	plastid	1.3.7	P5 Calvin cycle.FBPase	1814.4	948.531	1201.85	1101.86	861.166	1085.39	1255.99	884.951	912.537	1118.45	279.98	35.95	830.611	161	873.382	873.382	873.382	873.382	873.382	873.382	873.382	873.382	873.382	1.06	0.208	not regulated		
AT4G60750	Transketolase	plastid	1.3.8	P5 Calvin cycle.transketolase	5938.49	5882.15	7921.79	5947.43	4887.17	5597.62	8720.11	5468.93	5175.47	6171.02	1211.59	4530.43	4288.4	4230.36	4613.25	5926.88	5985.27	7187.59	5321.34	6425.44	5387.66	994.31	0.87	0.177	not regulated			
AT2G42590	Transketolase	plastid	1.3.8	P5 Calvin cycle.transketolase	80.0977	124.206	79.1348	51.2166	149.815	132.953				68.60	56.27	105.61	183.46	62.036	69.947			70.1404	164.869		158.44	200.37	2.31	0.299	not regulated			
AT3G55800	SBPase / sedoheptulose-bisphosphatase	plastid	1.3.9	P5 Calvin cycle.sedoheptulose	1069.21	1068.53	1749.81	1644.75	1305.48	1556.41	4289.17	1359.92	1271.75	1701.67	941.70	3126.63	1090.28	973.084	1165.93	994.502	1339.16	3323.7	1335.6	1714.97	1455.98	693.73	0.86	0.561	not regulated			
AT4G78570	HM1, ROL1, ATRM1 / rhamnose biosynthesis 1	cytosol	10.1.10	cell wall.precursor synthesis.UDP-glucose	138.98	109.69	79.4564	474.172	317.806	485.254	315.5	195.21		62.60	58.17	111.21	134.652	130.208			80.0774			63.58	79.43	1.02	0.337	not regulated				
AT4G30000	NR5F6, UR1 / nucleotide-rhamnose	cytosol/mitochondrion	10.1.11	cell wall.precursor synthesis.UER	132.769	134.9		288.275	260.257	232.333			123.17	117.33	106.073	103.414					220.367	133.7		62.68	76.84	0.51	0.077	not regulated				
AT1G12780	UGE1, ATGGE1 / UDP-D-glucose/UDP-D-galactose	golgi	10.1.2	cell wall.precursor synthesis.UER																	85.2594	71.7912		135.09	130.60							
AT2G45790	ATPMM, PMM1 / phosphomannomutase	cytosol/mitochondrion	10.1.21	cell wall.precursor	276.065	277.001	638.142	398.847	474.172	317.806	485.254	315.5	195.21		267.365	277.001	638.142	398.847	474.172	317.806	485.254	315.5	195.21	216.31	158.13	0.97	0.186	not regulated				
AT2G27860	AXS1 / UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthase 1	cytosol	10.1.3	cell wall.precursor synthesis.AXS	429.479	229.363	299.168	263.184	544.738	525.247	380.309	149.864		313.48	167.03	525.606	677.87	439.468	464.81	349.52	658.026		606.712	438.04	462.23	193.56	1.47	0.022	not regulated			
AT1G02800	AXS2 / UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthase 2	cytosol	10.1.3	cell wall.precursor synthesis.AXS										104.19	157.53																	
AT1G26570	UGD1, ATUGD1 / UDP-glucose dehydrogenase 1	extracellular	10.1.4	cell wall.precursor synthesis.UDP-Glc		195.542		63.1956	196.694		81.0298			59.61	76.53			273.182	179.409	212.522		150.575			90.63	105.79	1.52	0.168	not regulated			
AT1G54590	UDP-glucose 6-dehydrogenase family protein	extracellular	10.1.4	cell wall.precursor synthesis.UDP-Glc	267.747	64.2597		557.819	172.725	62.0028		203.967	136.293	162.76	16.42		106.572	103.488	124.431		139.356	264.493		82.04	85.87	1.20	0.466	not regulated				
AT2G29360	UDP-glucose 6-dehydrogenase family protein	extracellular	10.1.4	cell wall.precursor synthesis.UDP-Glc				26.564	154.141	215.252		104.276	117.903	68.58185	76.82493			181.78	124.206		79.5821	779.445	40.5805	97.2944	141.76	232.10	1.11	0.488	not regulated			
AT3G44400	UXS5 / UDP-XYL synthase 5	cytosol/plastid	10.1.5	cell wall.precursor synthesis.UXS	208.593	500.363		155.226	214.895	190.203	187.585	206.586		184.82801	173.75758	363.792		24.1208							236.711	219.199	1.08	0.921	not regulated			
AT3G51160	MUR1, MUR_1, GMD2 / NAD(P)-binding Rossmann	cytosol	10.1.7	cell wall.precursor synthesis.AMG	121.045	1288.29				1130.31	58.9616			288.73834	494.982174																	
AT5G44130	FLA3 / FASCIIN-like arabinogalactan protein 3	extracellular	10.1.8	cell wall.cell wall proteins.GDP										129.759																		
AT3G02330	RGPI, ATRGP1 / reversibly glycosylated	golgi	10.5.5	cell wall.cell wall proteins.RGP	115.613	1229.06		697.68	690.761	950.342	598.854	954.783	1052.16	814.14	352.82											796.25	231.32	0.98	0.319	not regulated		
AT5G15650	RGPI, ATRGP2 / reversibly glycosylated	golgi	10.5.5	cell wall.cell wall proteins.RGP	673.64	710.878	1725.69	522.615	741.822	783.835	605.005	711.558	719.908	799.55	35.86	532.91	701.643	1200.9	724.069	615.256	507.723	897.677	553.961	688.831	688.831	688.831	0.84	0.385	not regulated			
AT5G40950	cell wall degradation, cellulase and beta-	extracellular	10.6.1	cell wall.degradation, cellulase and beta-	46.02899																											
AT4G30270	MER18B, MER1-5, XTH24, SEN4 / xyloglucan	extracellular	10.6.2	cell wall.degradation, mannan-xylose-				513.872	379.363		388.034	609.434	608.119	310.59	29.10																	
AT5G64570	XYL4, ATXK4 / beta-D-xylosidase 4	extracellular	10.6.2	cell wall.degradation, mannan-xylose-	305.699			76.8551						89.60	151.17																	
AT5G49360	BX1L, ATXB1L / beta-xylosidase 1	extracellular	10.6.2	cell wall.degradation, mannan-xylose-	307.662			550.451	233.48					110.18	178.93																	
AT2G18800	ATXHT1, XTH21 / xyloglucan	extracellular	10.7	cell wall modification		182.344		76.4408			191.195			50.00	76.85	243.238				172.814	413.295				92.15	142.76	1.84	0.191	not regulated			
AT4G37800	XTH7 / xyloglucan endtransglucosylase/hydrolase	extracellular	10.7	cell wall modification		274.048	218.821		173.331	138.959	194.956		111.12993	104.99174							220.611				55.89	82.14	0.50	0.407	not regulated			
AT4G31580	ATPME1, PME3 / pectin methyl-esterase	extracellular	10.8.1	cell wall.pectin/esterases.PME	1040.43	941.375	1095.91	1796.53	1432.61	1521.31	2846.67	1930.41	1998.3	1484.84	534.59																	
AT3G14310	ATPME2, PME3 / pectin methyl-esterase 3	extracellular	10.8.1	cell wall.pectin/esterases.PME	1675.08	1776.42	2652.89	2762.89	1810.06	1829.97	3514	2451.72	2186.27	2261.91	201.92																	
AT1G53830	ATPME2, PME2 / pectin methyl-esterase 2	extracellular	10.8.1	cell wall.pectin/esterases.PME	234.42	124.23	458.106	73.9408		275.241	598.994	107.041	440.213	250.51	191.92																	
AT1G41830	SKS6 / SKUS-similar 6	extracellular	10.8.1	cell wall.pectin/esterases.PME		205.239	78.4488	245.525	121.412	171.016	117.379			98.34	84.16																	
AT4G19410	Pectinacetyltransferase family protein	extracellular	10.8.2	cell wall.pectin/esterases.acetyl esterase	446.142	399.787	566.389	485.271	617.725	695.817	676.942	404.02	463.987	528.45	107.75	375.312	448.204	420.477	490.373		325.794	532.977	526.502	358.298	386.42	153.04	0.73	0.700	not regulated			
AT2G24520	Pectinacetyltransferase family protein	extracellular	10.8.2	cell wall.pectin/esterases.acetyl esterase	188.066	154.442		196.239		88.9325	131.237	107.941	355.773	135.85	102.74											129.60	115.04	0.95	0.704	not regulated		
AT2G25420	Plant invertase/pectin methyl-esterase inhibitor	extracellular	10.8.99	cell wall.pectin/esterases.misc	201.967		372.817	534.169			364.29	279.22	238.877	221.26	180.20											205.19	163.46	0.93	0.714	not regulated		
AT2G51310	biofilm/lipid attachment domain-containing protein	plastid	11.1.1.1	lipid metabolism.FA synthesis and FA				95.0899			102.413	76.8483		304.084	433.546																	
AT2G38040	CAC3 / acetyl-Coenzyme A carboxylase	plastid	11.1.1.2.1	lipid metabolism.FA synthesis and FA	196.581	177.498		224.628	240.123		488.092	192.605	211.405	192.11	135.51																	
AT5G35360	CAC2 / acetyl-Coenzyme A carboxylase biotin	plastid	11.1.1.2.4	lipid metabolism.FA synthesis and FA	556.303	321.958		379.969	343.529	355.516	368.367	279.231	286.763	321.29	136.93																	
AT4G25500	ACPA / acyl carrier protein 4	plastid	11.1.1.2	lipid metabolism.FA synthesis and FA		1893.58		1640.83	1715.4	2416.02		1189.07		983.88	928.53																	
AT1G54630	ACP3 / acyl carrier protein 3	plastid	11.1.1.2	lipid metabolism.FA synthesis and FA	531.153			1326.32	1001.9					317.17	487.21																	
AT1G31812	ACBP6, ACPBP / acyl-CoA-binding protein 6	cytosol	11.1.1.3	lipid metabolism.FA synthesis and FA	1110.97	1039.62																										

AT5G43830	Aluminum induced protein with YGL and LRDR	cytosol	17.2.3	hormone metabolism,auxin,induced-	124,567	244,276	400,648	394,546	115,49673	168,58924	447,924	189,902	300,235	42,797	257,133	269,844	210.33	166.92	1.82	0.669	not regulated	only in DMSO										
AT1G06080	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein	not denoted	17.2.3	hormone metabolism,auxin,induced-	124,567		81,281	68,686	30.50	45.30											only in DMSO											
AT1G06090	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein	cytosol	17.2.3	hormone metabolism,auxin,induced-	67,6962				28.30	40.64											only in DMSO											
AT3G19820	DWF1, DM1, EVE1, DIM1, CB1 / cell elongation	plasma membrane,golgi	17.3.1.2.8	hormone	212,596	322,022	322,121	177,314	219,681	200,96	160,858	179,51	109,861	147,081	140,528	225,296	169,206	263,975	105.12	100.55	0.59	0.271	not regulated	only in DMSO								
AT2G48260	TRIP-1, TRIP1 / TGT-beta receptor interacting	cytosol	17.3.2.2.9	hormone	207,775	262,277	444,51	501,854	216,851	197,286	222,734	150,875	267,68	140,916	171,882	589,837	325,49	435,867	194.22	206.68	0.73	0.552	not regulated	only in DMSO								
AT4G34320	LEI1, CDCP / Cystathionine beta-synthase (CBS)	plastid	17.5.1	hormone metabolism,ethylene, synthesis-	142,05		125,381				121,049	133,974	57.74	65.00								only in DMSO										
AT1G05010	LEF1, ATLOX2 / ethylene-forming enzyme	plastid	17.5.1.2	hormone metabolism,ethylene, synthesis-	444,338	520,718	767,87	471,034	594,365	620,142	404,134	432,715	391,135	514.05	789,291	758,914	1708,85	1734,52	1094,03	736,552	572,921	570,082	462,955	829.79	354.18	1.61	0.029	sig. up regulated	only in DMSO			
AT2G38280	ACC2, ATACC2 / ACC oxidase 2	cytosol	17.5.1.2	hormone metabolism,ethylene, synthesis-	1583,25	1559,93	2222,58	1189,55	648,394	915,698	460,559	1064,18	1046,81	1194.65	1870,45	1769,47	1856,66	1702,41	1159,39	1594,82	2068,97	1903,74	906,145	1615.45	381.10	1.66	0.074	not regulated	only in DMSO			
AT1G12010	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent	not denoted	17.5.1.2	hormone metabolism,ethylene, synthesis-	349,713	400,406				123,034	43,9039		101.90	150.90	268,485	734,337	209,184							144.61	241.38	1.42	0.610	not regulated	only in DMSO			
AT3G19130	Adenine nucleotide alpha hydrolase-like	cytosol,nucleus	17.5.1.2	hormone metabolism,ethylene,induced-	456,941	281,992	617,794	483,348	346,135	398,761	440,357	268,085	391.61	105.99	570,188	525,636	657,523	545,027	380,487	426,386				345.03	255.17	0.88	0.645	not regulated	only in DMSO			
AT5G14250	Gibberellin-regulated family protein	extracellular	17.6.3	hormone metabolism,gibberellin,induced-	377,82	391,588	742,715	398,512		393,008	242,553	248,37	301.66197	147.21831	439,005	382,71		196,127							583.122	300.726	2.53	0.47	not regulated	only in DMSO		
AT5G17920	GAS1 / GAS1 protein homolog 1	extracellular	17.6.3	hormone metabolism,gibberellin,induced-	110,92	113,881	1569,38	695,745	494,577				166.54	173.76	100,58	1201,71	1903,77	384,529	684,417	471,928	538,23			731.69	609.23	0.70	0.364	not regulated	only in DMSO			
AT3G45140	LOX2, ATLOX2 / lipoxygenase 2	plastid	17.7.1.2	hormone metabolism,jasmonate, synthesis-	1423,38	1532,21	2142,86	1723,08	2225,76	2024,82	3028,37	2476,25	2000,95	2664.1856	465.14829	1707,81	1718,96	4607,88	1945,71	1451,76	1187,41	2686,47	237,71	4082,6	2418.04	1120.74	1.17	0.422	not regulated	only in MG132		
AT5G5020	LOX1, ATLOX1 / lipoxygenase 1	plastid	17.7.1.2	hormone metabolism,jasmonate, synthesis-	255,008	245,222	305,901	179,314	240,098	228,767			161.57661	116.26481	143,214	152,286	277,634															
AT5G4250	AOS, CYP74A, DDE1 / allene oxide synthase	plastid	17.7.1.3	hormone metabolism,jasmonate, synthesis-	257,247	362,159	501,309	213,822	164,31				166.54	173.76	259,906	231,384	457,608	331,082	410,119	197,207	122,381				223.30	153.99	1.34	0.866	not regulated	only in DMSO		
AT3G25770	AOX2 / allene oxide cyclase 2	plastid	17.7.1.4	hormone metabolism,jasmonate, synthesis-	600,655	360,667	628,561	891,03	589,514	804,864	1080,65	918,962	927,563	755.813	212.510	844,466	708,893	486,92	540,181	562,252	677,981	1223,57	1360,07	678,522	786.98	299.66	1.04	0.809	not regulated	only in DMSO		
AT3G16430	JAL11 / jacalin-related lectin 31	cytosol,extracellular	17.7.3	hormone metabolism,jasmonate,induced-	134,043			64,405	59,119					88.414125	72.39230	260,992	155,838	95,992,44							183.50	296.35	2.08	0.269	not regulated	only in DMSO		
AT3G16450	Mannose-binding lectin superfamily protein	cytosol	17.7.3	hormone metabolism,jasmonate,induced-	659,81	636,74	171,337	285,009	375,008	715,345	336,237	447,223	485.87	259.15	872,839	815,402	755,926	409,959	617,094							514.59	262.97	1.06	0.971	not regulated	only in DMSO	
AT3G16460	Mannose-binding lectin superfamily protein	cytosol	17.7.3	hormone metabolism,jasmonate,induced-	138,216	964,782	1534,77	769,119	594,128	694,645			763.4987	335.42987	1223,91	1125,68	1272,95	407,74	682,023	596,657	517,486	382,323	490,21	752.11	333.03	0.99	0.927	not regulated	only in DMSO			
AT2G5980	Mannose-binding lectin superfamily protein	not denoted	17.7.3	hormone metabolism,jasmonate,induced-	383,35	30,5419							50.30	118.27																only in DMSO		
AT2G38230	ATPDX1.1, PDX1.1 / pyridoxine biosynthesis 1.1	cytosol	18	Co-factor and vitamine metabolism	153,639			39,356	195,648	168,286	156,675	354,067	118.63	113.210	287,583	226,382	296,941	546,196	451,900	148,449						217.50	188.85	1.83	0.070	not regulated	only in DMSO	
AT5G01410	PDX1, ATPDX1.3, RSRA, PDX1.3, ATPDX1 / Aldolase	cytosol	18	Co-factor and vitamine metabolism	435,541	582,441	671,348	399,54		126,914	154,757	271,651	325.79843	228.92922	567,862	579,256										197.16	236.92	0.61	0.824	not regulated	only in DMSO	
AT3G14990	Class I glutamine amidotransferase-like superfamily	cytosol	18.2	Co-factor and vitamine metabolism	70,247	607,58	1143,45	629,354	930,772	1094,11	1321,07	920,74	1026.24	383.999	1057,82	1158,03	1521,37	930,276	1333,79	1013,58	1165,99	910,068	1059,54			1127.83	285.11	1.10	0.409	not regulated	only in DMSO	
AT5G54770	THI1, TZ, TH1 / thiazole biosynthetic enzyme,	plastid	18.2	Co-factor and vitamine metabolism	355,69	325,753		249,47	270,854			281,54	164.81	150.19																only in DMSO		
AT4G18480	CHL1, CH2, CH-42, CHL11, CHU1 / P-opsin	plastid	18.10	Tetrapyrrole synthesis,magnesium	202,333	277,001		259,657	350,276	340,501		168,351	200.66	121.51	213,695	236,878	771,843	418,028	272,73	224,494	394,298	281.32	226.156	1.13	0.341	not regulated	only in DMSO					
AT5G4930	CHL2, CH1, CH2 / magnesium chelatase 2	plastid	18.10	Tetrapyrrole synthesis,magnesium	348,821					90,986			34.91	56.44	578,248	294,745	270,44													only in DMSO		
AT4G27440	POR8 / protochlorophyllide oxidoreductase B	plastid	19.14	tetrapyrrole synthesis,prothochlorophyllide									188.24	265.44															only in DMSO			
AT4G3700	POR C, PORC / protochlorophyllide oxidoreductase	plastid	19.14	tetrapyrrole synthesis,prothochlorophyllide									463.08	1086.19															only in DMSO			
AT5G35730	GSA1 / glutamate-1-semialdehyde-2,1-	plastid	19.3	tetrapyrrole synthesis,GSA	622,141	581,162		555,962	369,795	581,712	240,979	357,302	400.454	190.3781	344,27	305,013											313.75	183.81	0.76	0.348	not regulated	only in DMSO
AT4G48370	GSA2 / glutamate-1-semialdehyde-2,1-	plastid	19.3	tetrapyrrole synthesis,GSA	181,75	220,661	113,29	363,282	343,79	229,339	374,062	294,745	240.161	375.62312	190.3781	285,805	284,022	1021,06	288,074	256,715	313,878	277,311	244,796			332.18	259.84	0.88	0.989	not regulated	only in DMSO	
AT1G06740	HEMB1 / Aldolase superfamily protein	plastid	19.4	tetrapyrrole synthesis,ALA dehydratase	350,869	322,453	375,433	248,799	453,432	139,146	175,659	181,487	249.70	132.31	213,695	236,878	771,843	418,028	272,73	224,494	394,298	281.32	226.156	1.13	0.341	not regulated	only in DMSO					
AT2G48280	HEMC / hydrosymmettalite synthase	plastid	19.5	tetrapyrrole synthesis,porphobilinogen	146,611	95.5		467,398	348,754	335,958	321,019	355,166	303.769	275.41	578,248	294,745	270,44										347.394	298.057	1.20	0.380	not regulated	only in DMSO
AT2G4940	HEME2 / Uroporphyrinogen decarboxylase	plastid	19.7	tetrapyrrole synthesis,uroporphyrinogen	143,988			156,324		40,4063			37.86	61.37															only in DMSO			
AT1G03475	UM2, HEMF1, ATPCO-1 / Coproporphyrinogen III	plastid	19.8	tetrapyrrole synthesis,coproporphyrinogen									293.21	145.15	263,936	240,618	478,807	278,418	336,487	291,199	713,218	289.20	207.74	0.99	0.582	not regulated	only in DMSO					
AT4G03205	hemf2 / Coproporphyrinogen III oxidase	plastid	19.8	tetrapyrrole synthesis,coproporphyrinogen									82.6153	46.9766	82,6153	46,9766											170.203	43.1771	0.88	0.989	not regulated	only in MG132
AT1G1700	SOUL heme-binding family protein	extracellular	19.9	tetrapyrrole synthesis,unspecified									117.50	107.70															only in DMSO			
AT4G3670	Inositol monophosphatase family protein	cytosol	2.11.3	major CHO	414,253	211,442		313,946	281,568	555,167	398,527	432,566	380.82	270.35	200,301	196,382	306,697									451.504	397.837	4.33	0.380	not regulated	only in DMSO	
AT5G48300	ADCL1, APS1 / ADP-glucose pyrophosphorylase 1	plastid	2.11.2.1	major CHO	206,252	171,93		236,622	307,684	555,167	653,233	754,795	606.948	388.07	209,222	151,237	171,37															

ATG56340	Ribosomal protein S26e family protein	cytosol	29.2.1.2.1.26	protein.synthesis.ribosomal	488.908	701.206	1547.05	799.577	648.731	766.863	722.78	829.951	643.954	816.56	265.19	600.363	697.272	793.783	973.027	1051.41	944.543	564.368	634.97	369.24	0.78	0.999	not regulated				
ATG45710	Zinc-binding ribosomal protein family protein	cytosol	29.2.1.2.1.27	protein.synthesis.ribosomal		797.905								362.29	339.53								315.44	470.85	0.87	0.121	not regulated				
ATG31090	Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein	cytosol/nucleus	29.2.1.2.1.28	protein.synthesis.ribosomal	621.238	599.063			1315.75	479.094				335.02	434.03														only in DMSO		
ATG34390	Ribosomal protein S14p/S29e family protein	cytosol/nucleus	29.2.1.2.1.29	protein.synthesis.ribosomal		220.599	440.13			466.914				125.29	188.30														only in DMSO		
ATG353870	Ribosomal protein S3 family protein	cytosol	29.2.1.2.1.3	protein.synthesis.ribosomal	517.28	482.772		1008.69	938.979	385.389				476.46	327.36	961.47	931.17		861.063	622.973		983.697	1595.05	661.71	526.21	1.39	0.036	not regulated			
ATG353870	Ribosomal protein S3 family protein	cytosol	29.2.1.2.1.3	protein.synthesis.ribosomal	210.136	381.351	208.902	379.143	337.18	527.781				392.20	279.97	434.738	232.47	558.61	319.351		801.815	1008.6	378.331	1595.05	592.11	453.29	1.51	0.249	not regulated		
ATG55530	Ribosomal protein S16 family protein	cytosol	29.2.1.2.2.28	protein.synthesis.ribosomal	313.921	312.328	1535.58	181.254		501.079	1768.97	254.88		542.91	613.89						1354.03		760.705		327.76	456.94	0.57	0.989	not regulated		
ATG32370	P40, AP40, RPA40, RPSA4 / 40s ribosomal protein	cytosol	29.2.1.2.1.31	protein.synthesis.ribosomal	2114.35	2192.6	2858.47	2138.92	1573.72	1861.38	1415.68	1459.22	1596.4	1912.30	430.96	1900.18	1744.87	1041.3	1606.56	840.934	1392.53	2173.93	1905.46	1758.9	1656.07	412.27	0.87	0.246	not regulated		
ATG304770	RPSAB / 40s ribosomal protein SA B	cytosol	29.2.1.2.1.31	protein.synthesis.ribosomal	79.9351			121.086	92.7791		118.186			45.78	52.40	80.0966	148.142				24.316	25.305		53.10	77.42	1.16	0.722	not regulated			
ATG213670	Ribosomal protein S4 (RPS4A) family protein	cytosol	29.2.1.2.1.4	protein.synthesis.ribosomal	1715.09	1807.02	2398.51	1914.85	1675.3	1509.6	1696.2	1476.39	1419.14	1729.18	284.50	1708.88	1578.3	1728.67	1490.14	1620.03	2015.77	2228.07	1833.57	1735.39	1770.44	215.74	1.02	0.748	not regulated		
ATG237270	ATRPS5B, RPS5B / ribosomal protein S8	cytosol	29.2.1.2.1.5	protein.synthesis.ribosomal	1233.74	1469.13	1881.97	1145.99	1590.44	1051.82	1165.33	719.977	655.584	1141.1094	506.56271	1306.58		3291.05	1550.33		818.319	926.964	621.684	1363.23	1097.57	935.32	0.96	0.462	not regulated		
ATG10770	RPS15A / ribosomal protein S15A	cytosol	29.2.1.2.1.515	protein.synthesis.ribosomal					2124.23		1717.79	1516.23		1081.167	910.52	1716.46	1906.7		1475.4	1251.3		1634.05		887.30	852.10	0.82	0.094	not regulated			
ATG346040	RPS15AD / ribosomal protein S15A D	cytosol	29.2.1.2.1.515	protein.synthesis.ribosomal										567.684	658.01013													only in DMSO			
ATG39590	Ribosomal protein S8 family protein	cytosol	29.2.1.2.1.5	protein.synthesis.ribosomal										165.89	404.87														only in DMSO		
ATG308440	Ribosomal protein S3Ae	cytosol	29.2.1.2.1.53	protein.synthesis.ribosomal	706.643	644.535	785.724	684.527	741.722	1080.99	838.673	661.61	678.567	758.118	128.40	782.771	838.67	904.33	693.244	972.808	408.202	1123.68	839.954	915.844	831.06	138.12	1.00	0.378	not regulated		
ATG43670	Ribosomal protein S3Ae	cytosol	29.2.1.2.1.53	protein.synthesis.ribosomal	537.807	546.95	652.316	980.161	717.938	752.062	850.712	45.8	47.032	662.86	168.47	522.939	673.440	1124.53	915.569	458.056	546.914	785.062	591.688	679.275	663.72	486.29	1.02	0.932	not regulated		
ATG510360	EMB830D, RPS6B / Ribosomal protein S6e	cytosol	29.2.1.2.1.6	protein.synthesis.ribosomal	112.164	661.755	1230.6	1739.76	1209.66	883.968	590.664	910.07	768.483	101.446	335.66	1034.54	623.138	1728.67	708.346	1556.61	1090.33	1528	729.722	684.675	1031.56	163.20	1.00	0.994	not regulated		
ATG431700	RPS6, RPS6A / ribosomal protein S6	cytosol	29.2.1.2.1.6	protein.synthesis.ribosomal	1082.18	1389.05	1933.47	862.016	1064.61	1592.67	445.542	707.59	919.406	1110.73	433.72	966.522	1318.06	1115.14		1186.71	934.694	1192.57	1050.65		862.71	474.30	0.78	0.993	not regulated		
ATG302560	Ribosomal protein S7e family protein	cytosol	29.2.1.2.1.7	protein.synthesis.ribosomal										257.28	399.57	305.111	85.8817		395.638		148.487	203.093		126.47	139.98	0.49	0.326	not regulated			
ATG516130	Ribosomal protein S7e family protein	cytosol	29.2.1.2.1.7	protein.synthesis.ribosomal	289.74	375.465		395.337	436.691	85.7338	393.351	246.699		246.97	165.28	305.303	347.72		323.372		74.394	175.219	237.907		184.88	138.91	0.75	0.483	not regulated		
ATG48830	Ribosomal protein S7e family protein	cytosol	29.2.1.2.1.7	protein.synthesis.ribosomal										74.40	81.02	67.4731					159.154			60.52	104.40	0.81	0.507	not regulated			
ATG59240	Ribosomal protein S8e family protein	cytosol/nucleus	29.2.1.2.1.8	protein.synthesis.ribosomal										20.85	39.53	35.9738				2200.68	379.498		290.68	685.39	1.94	0.295	not regulated				
ATG520290	Ribosomal protein S8e family protein	cytosol/nucleus	29.2.1.2.1.8	protein.synthesis.ribosomal	1163.3	1096.46	1391.93	1965.51	1593.16	1716.88	1556.11	1234.4	1318.67	1448.49	267.29	1527.76	1408.57	751.682	1479.58	1745.57	1334.3	1845.48	1657.18	1764.03	1501.57	311.10	1.04	0.719	not regulated		
ATG515200	Ribosomal protein S4	cytosol	29.2.1.2.1.9	protein.synthesis.ribosomal	1120.39	994.375	1069.63	1357.78	1184.56					995.95	346.28	1180.31	976.34		1124.41		882.851	1006.18	886.639	715.077	752.50	622.45	0.78	0.186	not regulated		
ATG39850	Ribosomal protein S4	cytosol	29.2.1.2.1.9	protein.synthesis.ribosomal										207.72	452.44	169.136	1791.66		871.924	492.414	186.856	453.904	209.347	463.92	536.36	2.23	0.745	not regulated			
ATG66860	SAC2B, RPL10, RPL10A / Ribosomal protein	cytosol	29.2.1.2.1.10	protein.synthesis.ribosomal	850.781			1696.25		1473.20	111.914	137.181	1687.52	722.63	754.48	101.491	282.832			324.997		195.017		100.48	126.09	0.14	0.057	not regulated			
ATG14320	Ribosomal protein L10	cytosol	29.2.1.2.1.10	protein.synthesis.ribosomal	844.222	837.52	572.868	562.048	1047.42	887.569	700.012	477.451	27	651.01	204.87	733.67	632.586	756.319	915.928	1010.79	625.787	691.907	625.78	632.172	749.28	125.77	1.15	0.298	not regulated		
ATG545775	Ribosomal L5P family protein	cytosol	29.2.1.2.1.11	protein.synthesis.ribosomal	1457.5	1366.05	1888.18	2332.68	1751.94	1973.46	1287.92	1483.65	1523.5	1673.8753	320.61291	2228.85	1994.06		1456.81	1881.55	1992.19	1890.7	1810.87	1011.61	1585.52	652.69	0.95	0.538	not regulated		
ATG237190	Ribosomal protein L11 family protein	cytosol	29.2.1.2.1.12	protein.synthesis.ribosomal	1385.29	1544.01								616.45547	161.6219	1402.19				1133.94					529.56	795.87	0.86	0.216	not regulated		
ATG366070	Ribosomal protein L11 family protein	cytosol	29.2.1.2.1.12	protein.synthesis.ribosomal	705.741	764.022	2859.2	2240.53	751.363	1927.31		1599.94	605.437	1272.62	875.99	519.107	365.657			554.31	2306.1	2256.01	2170.47		907.96	966.64	0.71	0.889	not regulated		
ATG349010	ATBBC1, BBC1, RSU2 / breast basic conserved 1	cytosol	29.2.1.2.1.13	protein.synthesis.ribosomal	937.229	1156.63	3411.08	1296.58	1146.91	947.785	997.705	909.193	935.036	1284.22	759.98	879.477	1000.47			983.005	1211.31	942.163	1351.12	1231.91	1297.9	788.60	384.17	0.77	0.563	not regulated	
ATG348960	Ribosomal protein L13e family protein	cytosol	29.2.1.2.1.13	protein.synthesis.ribosomal										97.703871	83.825017														only in MG132		
ATG32980	Ribosomal protein L13e family protein	cytosol	29.2.1.2.1.13	protein.synthesis.ribosomal	127.671	161.99	251.12				145.35	53.2332	139.971		101.816	993.016	341.198		301.456			193.851	190.703		158.02	153.89	1.41	0.056	not regulated		
ATG23450	Ribosomal protein L14	cytosol	29.2.1.2.1.14	protein.synthesis.ribosomal	161.506	125.529			328.138		71.937	61.868	160.066		112.12	101.86														only in MG132	
ATG427090	Ribosomal protein L14	cytosol	29.2.1.2.1.14	protein.synthesis.ribosomal	944.554	984.394	903.224	1234.81	1050.47	1592.36	1315.64	889.19	726.844	1071.203	249.93348	1137.72	1064.65	950.953	998.678		926.445	1257.61	976.958	1110.53	935.95	425.21	0.87	0.859	not regulated		
ATG309630	Ribosomal protein L4/L1 family	cytosol	29.2.1.2.1.14	protein.synthesis.ribosomal	1780.85	2012.49	3016.73	2141.76	1669.45	1636.09	828.678	1364.42	1311.63	1751.0315	581.39878	1962.62	1792.75	1413.5	1476.91	1429.5	2261.37	738.044	1629.21	1087.25	1532.35	348.25	0.88	0.404	not regulated	</	

AT3G60820	PBF1 / N-terminal nucleophile aminohydrolases	cytosol	29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	415.589	499.91	893.977	606.924	437.293	440.834	320.175	417.366	395.08	503.02	157.91	924.8	866.219	428.079	623.149	748.255	854.805	719.098	626.185	643.40	269.01	1.28	0.015	not regulated		
AT2G27020	PAC1 / 20S proteasome alpha subunit G1	cytosol/nucleus	29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom										175.96	168.23	673.6	627.193	509.927	737.59	674.895	632.202	635.365	670.76	265.61	2.71	0.001	sig. up regulated			
AT2G22110	PAC1 / 20S proteasome alpha subunit C1	cytosol/nucleus	29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	267.691	402.504	802.819	502.997	350.801	664.833	270.579	377.389	359.86	181.03	628.46	648.666	752.685	479.743	626.862	699.983	733.899	468.915	637.021	636.69	94.09	1.75	0.000	sig. up regulated		
AT1G79210	N-terminal nucleophile aminohydrolases (Ntn)	cytosol/nucleus	29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	345.878	353.614	352.408	408.493	271.44	350.106	335.597	304.698	302.58	112.58	784.846	723.015	414.647	647.633	762.09	505.721	559.126	648.68	556.158	733.97	258.42	2.43	0.001	sig. up regulated		
AT5G42970	PAF1, ATPM30, ARS5 / proteasome alpha subunit	cytosol/nucleus	29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	276.15	203.173				79.8109	200.192		88.81	110.58	648.24	429.194	811.402	462.75		506.251	503.14	469.125	425.57	253.09	4.79	0.001	sig. up regulated			
AT4G13300	PBA1 / N-terminal nucleophile aminohydrolases	cytosol/nucleus	29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	128.287					344.377	594.671	383.344	378.457	212.1275	143.975	684.688	628.734	554.286	571.091	582.333	945.368	727.119	798.73	610.26	246.13	2.88	0.002	sig. up regulated		
AT6G54650	PAE1 / 20S proteasome alpha subunit G1	cytosol/nucleus	29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	107.202	105.67				150.113	77.2448	141.637	165.522	85.25	64.86	893.337	359.96	370.416	284.597		151.168	140.2	285.97	165.9	175.64	2.18	0.003	sig. up regulated		
AT2G65140	PAZ2 / 20S proteasome subunit PAH2	cytosol/nucleus	29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	284.32	349.33					89.6708	308.554	114.65	144.15	810.567	862.72	360.045	504.242		605.28	463.339	287.154	432.59	291.45	3.77	0.033	sig. up regulated			
AT1G20200	EMB2719, HAP15 / PAM domain PC/PINT	cytosol/nucleus	29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	172.631					247.731	291.313	145.473	140.141	203.39	133.292	239.192	320.449	256.566	252.565	329.81	261.543	117.923	297.049	256.23	129.02	1.92	0.056	not regulated		
AT5G07820	RPN8A, AE3, ATHM0V34 / RPN non-ATPase subunit	cytosol/nucleus	29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	197.826					197.756	175.616	178.489		79.97	89.70	350.598	377.746	252.232	112.256	307.045	213.741	402.99	226.269	248.98	113.19	1.02	0.074	not regulated		
AT5G58290	RPT3 / regulatory particle triple-A ATPase 3	cytosol/nucleus	29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	267.888	251.017	191.23	329.007	207.862	197.866	312.835	291.807	160.683	323.01	215.07	760.873	533.532	414.059	317.797	414.003	595.153	546.724	302.087	409.815	483.00	131.77	1.50	0.092	not regulated	
AT4G28470	RPN18, ATBR418 / 26S proteasome regulatory	cytosol/nucleus	29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	106.556					191.493	66.9372	60.613	421.85	111.80	127.77	270.307	312.782	472.018	208.013	805.764		116.657	218.257	283.287	293.54	213.88	2.63	0.127	not regulated	
AT3G23730	26S proteasome regulatory complex, non-ATPase	cytosol/nucleus	29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	352.25					131.202	139.198		69.18	114.31	321.127	268.117	317.127	222.529		206.316		192.208	169.71	127.10	1.45	0.044	not regulated			
AT5G35590	PAK1 / proteasome alpha subunit A1	cytosol/nucleus	29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	452.092	127.426				195.62	367.588	174.245	397.846	140.12	125.46	451.199	281.178		279.356		200.385	84.57	121.55	166.0	0.519	0.060	not regulated			
AT2G26250	PBD1, PRGCB / 20S proteasome subunit D1	cytosol/nucleus	29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	293.512					130.447	315.566	382.888	376.915	197.08	174.33	321.127	268.117		222.529		191.208	169.71	127.10	1.45	0.044	not regulated				
AT2G20580	RPN1A, ATPRN1A / 26S proteasome regulatory	cytosol/nucleus	29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	1293.516	353.737	947.541	288.387	300.712	379.274	163.26	300.892	188.33	634.92	793.44	524.865	578.222	358.975	453.016		717.4	669.928	526.361	425.04	248.23	0.67	0.788	not regulated		
AT1G09100	RPT5B / 26S proteasome AAA-ATPase subunit	cytosol/nucleus	29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	279.512	948.593	111.203	177.592	138.974	139.754	100.785	86.279		191.07	272.95	164.416	323.594	210.002		461.099	285.1	106.36		171.17	146.97	0.87	0.799	not regulated		
AT1G21950	AT59, RPN6 / non-ATPase subunit 9	cytosol/nucleus	29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	200.811					1001.82	229.946	286.553	413.463	236.96	306.34	349.841	437.417	749.109	390.638	517.643		116.337	347.011	323.11	233.28	1.36	0.943	not regulated		
AT1G36160	PBE1 / 20S proteasome beta subunit E1	cytosol/nucleus	29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom											505.345	542.132				447.855	308.311	114.221	218.09	230.30				only in MG132		
AT1G15990	PAM domain [PC/PINT associated module] protein	cytosol/nucleus	29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom																404.032		101.497	66.20	125.72					only in MG132	
AT4G24820	26S proteasome, regulatory subunit	cytosol	29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom																	723.449	308.8	205.652	314.86	226.07				only in MG132	
AT3G02200	Proteasome component (PC) domain protein	cytosol	29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom																	144.408	185.883	48.68	71.26					only in MG132	
AT5G64760	RPN5B / regulatory particle non-ATPase subunit 5B	cytosol/nucleus	29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom																			50.31	91.25					only in MG132	
AT1G53780	peptidyl-prolyl cis-trans	not denoted	29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom																	192.7	51.745		72.39	95.79				only in MG132	
AT1G39990	EF2, Atef3f, eH3F / eukaryotic translation	cytosol/nucleus	29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	265.576	270.01		160.003		343.587	249.104		132.03	130.14																only in DMSO
AT1G18890	UBC3L, UBR8 / ubiquitin-conjugating enzyme 3E	cytosol	29.5.11.3	protein.degradation.ubiquitin.E2		159.68			215.824	262.052	179.238	142.673		117.17	110.95	241.031	203.191						118.37	107.39		1.01	0.942	not regulated		
AT1G19110	UBC3L1A / ubiquitin-conjugating enzyme 3E	not denoted	29.5.11.3	protein.degradation.ubiquitin.E2																									only in MG132	
AT1G75950	SKP1, ASKL, ATSKP1, SKP1A, UPY1 / 5 phase kinase-	cytosol	29.5.11.4.3.1	protein.degradation.ubiquitin.E3.SCF SKP	345.737	212.865	650.096	265.816		263.51			193.11376	208.6096	408.75	310.205	568.764	278.925	687.611		391.555	306.395	378.999	370.13	181.12	1.92	0.453	not regulated		
AT1G51710	UBP6, ATUBP6 / ubiquitin-specific protease 6	cytosol	29.5.11.5	protein.degradation.ubiquitin.ubiquitin											365.68						149.702		316.378	126.54	154.44				only in MG132	
AT4G16500	Cystatin/molluscan superfamily protein	extracellular	29.5.3	protein.degradation.cysteine protease	174.166	179.168	323.256		324.85				138.48	133.26							447.311	306.805	324.404	148.85	172.64	1.07	0.138	not regulated		
AT5G03630	SAG2, AALP, ALP / alaurin-like protease	vacuole	29.5.3	protein.degradation.cysteine protease	194.128	134.747	150.744		196.197	191.987	120.933		109.86	81.160	212.598	159.448	469.332	380.438					78.4124	231.854	170.23	161.49	1.55	0.166	not regulated	
AT5G43060	Grannin repeat cysteine protease family protein	extracellular	29.5.3	protein.degradation.cysteine protease	259.176	266.464	305.615	237.367		284.075	233.435	235.476	202.62	110.62	326.668	200.487	249.099				798.281	259.459		203.77	244.90	1.01	0.274	not regulated		
AT1G13910	ATCY1, CY1 / cystatin-1	extracellular	29.5.3	protein.degradation.cysteine protease	624.932	564.013	635.163	539.838	663.029	279.733	716.567	750.668	553.50	330.55	515.664	426.067	333.657		293.221				397.403	437.556	658.61	485.25	0.60	0.588	not regulated	
AT4G24260	ATCY8, ATCY56, CY5B / cystatin 8	extracellular	29.5.3	protein.degradation.cysteine protease	462.693	491.269	407.036	391.558		359.333	323.151	333.807	202.67	110.44	393.637	377.771	411.084	289.411				578.859	342.602	696.28	347.35	23.68	1.04	0.470	not regulated	
AT1G47128	RD21, RD21A / Grannin repeat cysteine protease	extracellular	29.5.3	protein.degradation.cysteine protease	1342.97	1540.42	2202.44	1560.03	1099.74	1241.17	1010.09	1785.35	1712.27	1499.3864	25329649	1700.4	1622.40	605.336	1411.08	1318.94	1675.06	1331.32	1850.48	1039.85	1395.00	363.73	0.93	0.568	not regulated	
AT4G39090	RD19, RD19A / Papain family cysteine protease	vacuole/nucleus	29.5.3	protein.degradation.cysteine protease											382.136	274.23	102.641						114.09	74.79	95.21				only in MG132	
AT3G19390	Grannin repeat cysteine protease family protein	not denoted	29.5.3	protein.degradation.cysteine protease											44.50	73.82													only in DMSO	
AT1G02320	Eukaryotic aspartyl protease family protein	extracellular	29.5.4	protein.degradation.aspartate protease	105.199	84.5109	359.921	261.952	198.03	236.182	79.2319	149.186		163.80145	104.57571	171.763	139.653	193.34			316.291	262.339		120.38	117.77	0.73	0.540	not regulated		
AT1G02220	Eukaryotic aspartyl protease family protein	extracellular	29.5.4	protein.degradation.aspartate protease	931.199	906.255	890.053	541.855	917.477	1487.74	464.4	769.182	1001.78	878.88	276.55	925.585	1366.87	2194.69	1088.85	823.134	982.538	407.43	74							

AT3G7280	ATPH84, PH84 / prohibitin 4	cytosol	31.2	cell.division	491.989			433.878	376.752	144.74	206.48	40.5472	156.071	381.694		466.444	116.08	172.56	0.80	0.208	not regulated												
AT3G09840	CDC48, ATCDC48, CDC48A / cell division cycle 48	cytosol	31.2	cell.division	530.871	3945.82	818.27	812.24	2700.02	4533.49	795.42	5317.92	572.725	2225.20	1816.61	2159.41	1925.37	1898.36	1770.68	2574.60	9889.5	1758.23	1912.9	2144.69	2892.65	2485.16	1.30	0.548	not regulated				
AT5G03340	ATPase, AAA-type, CDC48 protein	cytosol	31.2	cell.division												39.6334	106.307	462.798			85.0519	250.933				104.97	148.36	not regulated					
AT1G75010	ARC3 / GTP binding	plastid	31.2,5	cell.division.plastid																									only in DM50				
AT1G03860	ATPH82, PH82 / prohibitin 2	cytosol	31.3	cell.cycle	218.348	129.035			171.415	134.485			48.33	69.20	252.824	301.097											138.03	157.99	0.68	0.347	not regulated		
AT2G16600	ROC3 / rotamase CYP 3	cytosol	31.3,1	cell.cycle.peptidylprolyl isomerase	2936.65	2540.15	2472.33	2692.77	2283.28	2301.37	3072.81	3234.04	3173.99	2739.60	344.05	2449.95	2547.42	2801.69	2116.52	663.145	2492.03	2389.05	2973.32	1964.15		2266.36	636.76	0.83	0.083	not regulated			
AT2G16670	Cyclin dependent prolyl cis-trans isomerase	cytosol	31.3,1	cell.cycle.peptidylprolyl isomerase	11071.1	568.603	1556.42	325.963	95.0851	1371.46	361.472		583.31	567.14								68.1404	97.4275			68.1404	97.4275	0.19	0.163	not regulated			
AT4G18740	ROC1 / rotamase CYP 1	cytosol	31.3,1	cell.cycle.peptidylprolyl isomerase	10465.23	1277.19	2206.32	1554.74	1275.7	1508.08	2074.34	1736.88	1886.37	1696.09	367.43	1483	1345.17		1114.08	1812.52	1384.77	1875.9	1516.69	1344.47		1319.62	517.16	0.78	0.211	not regulated			
AT3G52220	FKBP15-1 / FK506-binding protein 15 kD-1	endoplasmic reticulum	31.3,1	cell.cycle.peptidylprolyl isomerase										175.53	145.45	693.074	998.954				301.837					203.54	227.03	1.16	0.302	not regulated			
AT5G58710	ROC7 / rotamase CYP 7	endoplasmic reticulum	31.3,1	cell.cycle.peptidylprolyl isomerase	357.851								84.83	99.25	59.5947	115.717		202.84	83.6381			232.065	165.137	219.831		124.31	82.87	1.47	0.411	not regulated			
AT3G56070	ROC2 / rotamase cyclophilin 2	cytosol	31.3,1	cell.cycle.peptidylprolyl isomerase	130.941	141.986	668.802	157.321	205.551	244.082	325.395	207.729	202.22	253.78	156.87	179.262	140.336	237.195	136.747	386.662	109.088	188.712	233.348	270.981		209.15	80.28	1.02	0.484	not regulated			
AT3G62030	ROC4 / rotamase CYP 4	plastid	31.3,1	cell.cycle.peptidylprolyl isomerase	4002.93	2606.46	4120.09	2627.13	2455.6	3683.91	5667.48	2720.32	2673.51	3395.27	101.74	2197.41	4249.28	2773.68	4707.48	2547.15	7044.61	3060.82	2603.49	2947.25		3570.13	1451.96	1.05	0.783	not regulated			
AT4G34870	ROC5, ATROC5 / rotamase cyclophilin 5	cytosol	31.3,1,2	cell.cycle.peptidylprolyl isomerase	2260.71	2544.24	3681.52	2045.56	1757.13	2367.75	2413.15	2074.1	2085.06	2352.154	521.75967	2371.59	2790.71	4134.6	1795.03	1770.14	1764.94	2237.75	1682.81	1989.99		2279.73	733.18	0.97	0.823	not regulated			
AT5G13220	ATCYP20-2, CYP20-2 / cyclophilin 20-2	plastid	31.3,1	cell.cycle.peptidylprolyl isomerase					281.094				204.291	187.313	74.74256	108.29722						206.576	104.999				70.16	111.40	0.94	0.850	not regulated		
AT5G48580	FKBP15-2 / FK506- and rapamycin-binding protein	endoplasmic reticulum	31.3,1	cell.cycle.peptidylprolyl isomerase	367.222	251.904			193.40					105.485	130.93874														only in DM50				
AT3G11330	Clathrin, heavy chain	plasma membrane	31.4	cell.vesicle transport	253.142	342.808	330.417	696.403	393.965	388.774	328.541	240.254	247.106	357.94	131.59	415.921	349.325	660.333	438.583	343.317		685.921	403.215	560.823		417.49	182.00	1.17	0.100	not regulated			
AT1G04750	VAMP7B, VAMP721, ATVAMP721, AT VAMP7 / vesicle transport	plasma membrane	31.4	cell.vesicle transport	152.032	353.381	228.966	257.073		406.295	422.787			202.28	164.00	236.008	184.003					767.186		526.996		190.47	264.44	0.94	0.330	not regulated			
AT3G18120	SVY121, AT-SYR1, ATSPY121, SYR1, ATSYR1, PEN1	plasma membrane	31.4	cell.vesicle transport	88.704		105.276							55.44	150.681							13.727	26.8184			187.71	421.98	3.39	0.385	not regulated			
AT5G05010	clathrin adaptor complex medium subunit family	cytosol	31.4	cell.vesicle transport	269.044				176.25	351.108				99.740888	128.12937							235.46	248.677			444.734	226.582	1.29	0.426	not regulated			
AT4G34450	Coatomer gamma-2 subunit, putative / gamma-2	cytosol	31.4	cell.vesicle transport					354.797	337.143				149.57	142.71	382.264	254.285	858.208	289.676			273.706	206.457	303.038		274.28	235.14	1.83	0.449	not regulated			
AT4G31490	Coatomer, beta subunit	cytosol	31.4	cell.vesicle transport					447.875	337.779	307.457	216.321	252.726	173.57299	166.2437	350.256						319.476	262.445	211.738		127.10	146.46	1.73	0.631	not regulated			
AT1G52360	Coatomer, beta' subunit	cytosol	31.4	cell.vesicle transport					328.6	103.397	92.86	72.2765		66.35	10.829	302.829	265.35					146.213	135.093			101.077	84.7023	1.15	0.104	1.73	0.734	not regulated	
AT2G13190	Coatomer, alpha subunit	cytosol	31.4	cell.vesicle transport	332.193	223.671		510.236	310.415	1043.36	78.8969	218.506	213.788	314.56	290.28	190.079						264.324				173.829	224.389	711.914	173.84	216.39	0.55	0.801	not regulated
AT2G30630	Coatomer epsilon subunit	golgi	31.4	cell.vesicle transport	173.291		284.639	161.318						85.07	101.85	209.25	210.732									64.71	92.43	0.76	0.948	not regulated			
AT3G08350	Clathrin, heavy chain	plasma membrane	31.4	cell.vesicle transport	697.508	576.605	712.542	175.684	416.003	374.688	387.577	239.398	251.802	425.76	185.75	481.765	448.684	660.942	377.461	342.558	635.56	187.032	417.909	254.977		422.94	148.52	0.99	0.974	not regulated			
AT3G16880	Target of Myb protein 1	cytosol	31.4	cell.vesicle transport																									only in MG132				
AT3G15980	Coatomer, beta' subunit	cytosol	31.4	cell.vesicle transport												127.894	53.6208		175.184	131.638			437.307			201.98	150.98			415.63	not regulated		
AT1G62020	Coatomer, alpha subunit	cytosol	31.4	cell.vesicle transport																			120.024	285.284			66.43	91.10	1.03	0.113	only in MG132		
AT1G79990	structural molecules	cytosol	31.4	cell.vesicle transport													43.5156						37.4091				39.79	85.56	1.03	0.113	only in MG132		
AT3G13850	NACA3 / nascent polypeptide-associated complex	nucleus	31.9,9	cell.unspecified	479.357	399.54		486.431	473.524	602.655	181.169	397.525	395.009	379.47	171.39	406.306	481.45	423.255		608.493			504.369	109.556		281.49	235.59	0.74	0.953	not regulated			
AT2G62560	PLP2, PLA II, PLA2A / phospholipase A 2A	plastid	33.1	development.storage proteins	224.084					340.984	401.016	341.03		145.23496	167.91559	281.701	250.192	617.517	249.518							384.769	446.835	474.894	300.60	199.37	0.70	0.448	not regulated
AT5G44020	HAD superfamily, subclass IIIb acid phosphatase	extracellular	33.1	development.storage proteins					139.429		519.366		284.883	104.85	137.65															only in DM50			
AT2G40660	Late embryogenesis abundant protein, group 2	cytosol	33.2	development.late embryogenesis	415.747	388.363	274.207	629.361	499.391	1170.52				522.22825	267.25932	583.878	1008.11	1148.95	891.987	386.199	586.536					762.982	434.713	64.82	332.52	1.23	0.155	not regulated	
AT3G03270	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like	cytosol.plasma membrane	33.9,9	development.storage proteins	244.886	171.847				347.644				109.85	129.97	637.409	379.666	783.981	204.609	629.668								221.93	289.37	2.02	0.109	not regulated	
AT3G16640	TCTP / transcriptionally controlled tumor protein	cytosol	33.9,9	development.unspecified	453.144	4690.34	3064.7	2718.87	3354.55	3829.67	2579.06	3057.07	3161.9	3441.07	707.17	373.13	3865.86	4272.37	2971.32	2831.67	3614.58	2298.45	1750.58	1193.65		2945.78	976.09	0.86	0.262	not regulated			
AT4G12420	SKUS / Cupredoxin superfamily protein	plasma membrane	33.9,9	development.unspecified	331.657				294.626		84.2399	234.866	254.473	122.2068	121.59746	175.409	407.89	279.62									95.86	146.20	0.78	0.361	not regulated		
AT1G18060	ATARCA, RACK1A, AT_RACK1 / Transducin/W40	cytosol	33.9,9	development.unspecified	813.506	716.714	761.026	1437.99	1268.01	1280.47	496.986	903.144	866.763	949.40	292.80	986.747	1220	1394.52	1007.35	733.733	917.186	1032.75	1021.24	1014.16		1036.85	173.02	1.09	0.578	not regulated			
AT2G11510	transducin family protein / WD-40 repeat family	cytosol	33.9,9	development.unspecified										151.68	178.64	271.685	347.556		186.082			481.046	349.301	77.8363		190.39	170.77	1.26	0.414	not regulated			
AT4G21150	HAP6 / fibronectin II (RPN2) family protein	plasma membrane	33.9,9	development.unspecified						341.792				112.04	117.02	113.581	170.058	192.65	185.003			387.346	162.269	182.844		154.86	109.10	1.38	0.962	not regulated			
AT4G11430	plastid developmental protein DAK, putative	plastid	33.9,9	development.unspecified												48.138	56.7408										20.14	29.8	0.97	0.11	only in MG132		
AT2G38560	YL55 / Class I glutamine amidotransferase-like	not denoted	33.9,9	development.unspecified																									only in MG132				
AT3G13870	RHD3 / Root hair defective 3 GTP-binding protein	endoplasmic reticulum.golgi	33.9,9	development.unspecified																									only in MG132				
AT5G60400	STR16 / sulfotransferase protein 16	plastid	33.9,9	development.unspecified																									only in DM50				
AT2G03440	NRP1, ATNRP1 / nodulin-related protein 1	nucleus	33.9,9	development.unspecified	1739.51	1150.98				105.085				332.84	611.43	168.026	147.998					169.188	111.963	300.962		81.12	102.42	0.75	0.113	only in DM50			
AT2G24520	AHA5, HA5 / H(+)-ATPase 5	plasma membrane	34.1	transport.p- and vATPases	752.18	325.815		60.9941	292.007	248.297	131.167	61.885	34.3454	211.85434	221.31993	135.346	76.8501		68.0913			192.281		113.017		65.07	67.09	0.31</					

AT4G01870	tolB protein-related	cytosol,extracellular	35.1	not assigned,no ontology	197.85	705.516	186.361	161.3	398.075	254.811	309.241	280.137	277.03	183.91	179.034	257.595	303.640	355.571	873.538	366.334	399.145	307.416	349.14	215.21	1.26	0.404	not regulated			
AT4G02530	chloroplast thylakoid lumen protein	plastid	35.1	not assigned,no ontology	330.064	657.96	884.273	663.784	683.93	604.654	565.79	542.479	925.55	230.02	629.068	563.328	848.265	719.449	768.15	309.906	620.111	447.254	545.06	246.55	0.92	0.473	not regulated			
AT1G71610	SKP1 / SKS1 similar 5	extracellular	35.1	not assigned,no ontology	401.091	348.642	452.934	411.832	292.609	312.571			246.630	180.448	304.903	536.157	864.087	690.387	345.001	437.281	465.797	404.85	269.94	1.07	0.560	not regulated				
AT1G16880	uridylyltransferase-related	plastid	35.1	not assigned,no ontology	754.633	783.469	535.516	325.654	717.776	842.495	403.747	327.867	584.281	189.50	304.903	536.157	864.087	690.387	345.001	437.281	465.797	404.85	269.94	1.07	0.560	not regulated				
AT5G14030	transloc-associated protein beta (TRAPB) family	endoplasmic reticulum	35.1	not assigned,no ontology				822.737	423.79	607.976	356.009		223.39	239.30	578.322	698.194	540.36		590.736	336.895		305.61	287.19	0.37	0.735	not regulated				
AT5G14910	Heavy metal transport/ detoxification superfamily	plastid	35.1	not assigned,no ontology	375.822	461.181	1211.41		382.267				289.59	371.73	460.659	481.845						148.16	210.73	0.51	0.759	not regulated				
AT4G02530	SMG20 domain-containing protein	plastid	35.1	not assigned,no ontology	165.238	257.637			180.507	315.828	199.287	243.962	184.26	183.03	193.663	162.239	369.514	235.389			157.42		124.25	125.44	0.68	0.773	not regulated			
AT4G39730	Lipase/ lipooxygenase, PLAT/H2 family protein	plastid	35.1	not assigned,no ontology	845.508	896.585	1438.5	1130.08	570.456	595.212	1815.24	1191.99	1083.63	1063.02	300.799	984.084	1618.97	767.641	1013.78	1405.55	1428.013	1112.07	1357.09	1109.78	380.90	1.04	0.808	not regulated		
AT4G26910	Dihydrolypoamide succinyltransferase	mitochondrion	35.1	not assigned,no ontology	118.563	103.463			136.095	241.246	852.466	235.056	180.95	170.69	226.530	231.79921	198.789	279.775	605.946	186.646	301.606	216.318	240.034	194.382	247.06	150.42	1.09	0.821	not regulated	
AT5G28280	TRAF-like family protein	extracellular	35.1	not assigned,no ontology	806.034	839.147			784.799	685.61	761.162	188.516	328.94	590.92	1072.78	1112.99	639.949	597.233			211.037	413.918	167.511	470.56	412.24	0.89	0.948	not regulated		
AT2G22170	Lipase/ lipooxygenase, PLAT/H2 family protein	extracellular	35.1	not assigned,no ontology	826.165	862.123	1354.39	973.842	867.789	1020.6	770.902	912.608	1330.48	990.99	920.906	800.99	1130.43	2095.78	768.885	926.068	723.432	602.96	885.96	520.57	0.89	0.974	not regulated			
AT2G21770	Oxidoreductase family protein	cytosol	35.1	not assigned,no ontology										84.3192	114.214	144.369						86.6977	88.2034	57.53	54.27	0.97	0.91	only in MG132		
AT5G25100	Endoplasmic protein-70 protein family	plasma membrane	35.1	not assigned,no ontology										301.985	275.695		334.771					263.727	130.69	147.24	0.97	0.91	only in MG132			
AT6G32520	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	plastid	35.1	not assigned,no ontology												86.1179						218.323	169.066	53.72	61.32	0.97	0.91	only in MG132		
AT2G25320	TRAF-like family protein	not denoted	35.1	not assigned,no ontology														346.996	451.132			2839.81	404.22	876.73	0.97	0.91	only in MG132			
AT2G26400	ARD, ATARD3, ARD3 / acireductone dioxygenase 3	not denoted	35.1	not assigned,no ontology																						0.97	0.91	only in MG132		
AT4G32190	Myosin heavy chain-related protein	not denoted	35.1	not assigned,no ontology	384.591	865.361			690.761	127.072			229.75383	318.84795					178.958			176.289	378.714	81.55	127.66	0.97	0.91	only in MG132		
AT4G32190	Myosin heavy chain-related protein	nucleus	35.1	not assigned,no ontology																						0.97	0.91	only in DMSO		
AT1G67230	LINC1 / little nuclein1	not denoted	35.1	not assigned,no ontology																						0.97	0.91	only in DMSO		
AT1G64880	SWI1/MIM2 domain superfamily protein	plastid	35.1	not assigned,no ontology																						0.97	0.91	only in DMSO		
AT1G64100	MD-2-related lipid recognition domain-containing	extracellular	35.1	not assigned,no ontology																						0.97	0.91	only in DMSO		
AT2G34460	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	plastid	35.1	not assigned,no ontology																						0.97	0.91	only in DMSO		
AT4G15300	HXXXD-type acyl-transferase family protein	not denoted	35.1	not assigned,no ontology																						0.97	0.91	only in DMSO		
AT2G29200	APUM1, PUM1 / pumilio 1	not denoted	35.1,12.0	not assigned,no ontology,pumilio/Puf RNA																						0.97	0.91	only in DMSO		
AT2G43800	Actin-binding FH2 (formin homology 2) family	plasma membrane	35.1,20.2	not assigned,no ontology,formin homology																						0.97	0.91	only in DMSO		
AT2G43900	Acetyl-S-isopropylmalate dehydratase protein	plastid	35.1,23	not assigned,no ontology,aconitase	553.829	510.675			425.128	380.159	365.431	183.63	423.806	440.368	342.66033	147.54321										1.12	0.585	not regulated		
AT3G62530	ARM repeat superfamily protein	plastid	35.1,3	not assigned,no ontology,armadillo beta-																						0.97	0.91	only in DMSO		
AT4G02450	HSP20-like chaperones superfamily protein	cytosol	35.1,40	not assigned,no ontology,glycine rich																						0.97	0.91	only in DMSO		
AT1G27090	glycine-rich protein	nucleus	35.1,140	not assigned,no ontology,glycine rich																						0.97	0.91	only in MG132		
AT4G01050	TRIO1 / thylakoid rhodanese-like	plastid	35.1,40	not assigned,no ontology,hydroxyproline	722.158	731.974	695.782	705.391	531.781	657.615	875.547	543.911	527.007	662.24	107.55											0.38	0.004	sig. down regulated		
AT3G26590	CHUP1 / Hydroxyproline-rich glycoprotein family	plastid	35.1,141	not assigned,no ontology,hydroxyproline																						0.97	0.91	only in MG132		
AT4G25670	TRAF-like family protein	cytosol	35.1,15	not assigned,no ontology	266.789	258.565	357.153	269.535	247.744	374.345	458.759	295.949	206.884	303.97	73.80	250.528	295.464	414.837	256.438			469.187	382.403	294.357	262.58	156.49	0.86	0.424	not regulated	
AT5G06400	Pentatricarbonyl phosphate (PPH) superfamily protein	not denoted	35.1,5	not assigned,no ontology	93.4601	261.267	1061.15	83.1996	934.738					364.11	369.19	501.87	57.9408		883.05	2208.25	130.566	265.233	124.906	352.42	405.52	0.97	0.843	not regulated		
AT1G54800	ZK1 / protein containing POZ domain, a K box	plastid	35.2	not assigned,no ontology	340.577	402.159	341.123		393.092	379.417	532.104	347.599	342.119	342.59	462.62	249.831	248.007	342.412	306.266			245.196	150.905	419.631	214.18	135.88	0.66	0.015	sig. down regulated	
ATMG00280	ORF110A / Ribulose biphosphate carboxylase	not denoted	35.2	not assigned,no ontology										22.70	34.94	20.835	22.1809		8.9399							0.25	0.403	sig. down regulated		
AT2G28500	unknown protein; FUNCTIONS IN:	plastid	35.2	not assigned,unknown										578.87	848.04	3410.8		1740.05			5291.17	4187.02	3534.96	2018.22	2000.72	3.49	0.055	not regulated		
AT2G27730	copper ion binding	mitochondrion	35.2	not assigned,unknown	960.716	853.317	1520.47	772.265	641.584	700.703	1188.22	697.073	537.435	874.64	291.28	1149.87	817.449	1453.99		695.79	1706.66	1270.37	1081.11	1174.09	950.59	1144.43	291.28	1.31	0.084	not regulated
AT2G37660	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	plastid	35.2	not assigned,unknown	497.318	567.283	553.28	865.007	564.844	772.791	737.121	802.748	776.569	681.88	127.30	381.133	567.471		631.19	610.174	502.104	665.149	767.765	531.628	517.40	209.57	0.67	0.125	not regulated	
AT4G30620	Uncharacterised BCR, Ybab family COG0718	plastid	35.2	not assigned,unknown										67.60	122.01	167.586	42.7956	54.1387			60.2208	80.976	45.08	52.43	0.76	0.152	not regulated			
AT1G30580	GTP binding	cytosol	35.2	not assigned,unknown	391.471	396.9			574.381	401.785	424.633	291.79	430.625	408.087	361.078	137.7400		436.872	667.664		487.799	484.803	675.631	510.566	208.227	385.73	242.91	1.07	0.156	not regulated
AT2G23450	unknown protein; FUNCTIONS IN:	not denoted	35.2	not assigned,unknown										21.41	26.85	95.4746	368.932					205.211				0.30	0.196	not regulated		
AT2G20760	Clathrin light chain protein	not denoted	35.2	not assigned,unknown	321.63	345.798			206.549	92.6235				107.48	170.3762							108.007	79.0071	157.93	65.74	84.86	0.61	0.222	not regulated	
AT5G14220	Protein of unknown function, DUF642	extracellular	35.2	not assigned,unknown	447.468	500.066			1085.77	115.793				303.30436	356.97815	334.388	339.661		84.5058			722.441	181.628	341.878	227.22	226.00	1.73	0.248	not regulated	
AT2G32																														

AT3G2960	PKP1, PKP-ALPHA / Pyruvate kinase family protein	plastid	4.2.1.4	glycolysis,plastid branch,pyruvate kinase	187.615	194.449	521.677	191.983	366.415	229.696	767.425	172.84	245.85	422.722	368.967	336.02	376.944	321.393	319.037	238.34	171.15	1.38	0.775	not regulated						
AT5G51820	PGM, ATPGM, PGM1, STP1 /	plastid	4.2.2	glycolysis,plastid	360.961	345.911	438.062	297.836	259.813	281.051	320.60	129.94	253.047	204.77	218.77	530.04	601.071	260.119	410.835	275.41	197.16	0.86	0.627	not regulated						
AT4G24620	PGI1, PGI / phosphoglucose isomerase 1	plastid	4.2.3	glycolysis,plastid branch,glucose-6-	181.512	446.061	1115.65	302.968	278.244	174.666	330.83	209.36	151.941	161.528	453.124	221.648	258.871	178.245	217.239	182.73	128.98	0.55	0.289	not regulated						
AT1G79530	GAPCP-1 / glyceraldehyde-3-phosphate	plastid	4.2.8	glycolysis,plastid branch,glyceraldehyde-3-	237.757	244.626	225.967	283.02	318.012	45.143	150.50	127.73	342.028	77.807	91.0871					34.55	51.41	0.23	0.074	not regulated						
AT1G16300	GAPCP-2 / glyceraldehyde-3-phosphate	plastid	4.2.8	glycolysis,plastid branch,glyceraldehyde-3-	110.979	246.968	78.0497	26.8689	673.392	574.523	100.08876	244.582	35.5577	167.478	285.486					73.28	90.77	0.39	0.267	not regulated						
AT3G52930	Aldolase superfamily protein	plastid	4.3.1.0	glycolysis,unclear/dually targeted,aldolase	4631.56	5229.99	6103.11	4970.59	4118.97	4458.73	8056.26	5574.35	5710.98	5428.28	1105.58	5119.71	4800.8	6156.44	4586.96	6831.03	6658.28	6019.47	7366.74	7111.6	6074.56	969.36	1.12	0.232	not regulated	
AT5G51840	Aldolase superfamily protein, fructose biphosphate dependent, fructose biphosphate dependent, fructose biphosphate dependent	cytosol	4.3.1.0	glycolysis,unclear/dually targeted,aldolase	411.339	450.913	442.201	354.042	430.748	457.616	319.234	289.465	361.74	141.89	687.164	938.762	635.439	339.201	327.477	498.808	375.454	455.81	333.62	0.64	0.194	not regulated				
AT4G48000	ALDH2B4, ALDH2, ALDH3A / aldehyde	mitochondrion	5.0	fermentation,aldehyde dehydrogenase	374.807	368.4	481.866	533.103	381.994	543.619	705.885	426.63042	264.76624	675.532	680.094	885.906	462.278	790.054	687.773	680.392	732.734	445.715	637.83	162.06	1.50	0.317	not regulated			
AT4G24503	ALDH2C4, ALDH1A, RE1 / aldehyde	cytosol	5.1.0	fermentation,aldehyde dehydrogenase	352.448	427.669	264.459	433.24	701.445	518.358	3719.17	342.838	643.61	728.56	563.565	318.87	481.978	592.817			383.889	246.601	318.887	322.96	203.90	0.50	0.325	not regulated		
AT4G36250	ALDH3F1 / aldehyde dehydrogenase 3F1	cytosol	5.1.0	fermentation,aldehyde dehydrogenase	472.463	472.669									167.355	186.625					142.792	55.20	78.74	only in MG132						
AT4G33070	Thiamine pyrophosphate dependent pyruvate	cytosol	5.2	fermentation,PDC	516.632	516.387	331.044	632.604	651.286	698.314	626.84	482.573	495.0765	204.14183	792.521	668.864	1488	694.422	684.366	467.717	1087.7	758.661	773.481	843.97	259.51	1.70	0.016	sig. up regulated		
AT5G54960	PDC2 / pyruvate decarboxylase-2	cytosol	5.2	fermentation,PDC	214.73	210.568	218.186	389.132	106.614	122.024	268.959	171.02	119.38	248.587	184.319	195.625	43.9458	1196.28	243.054			94.715	408.729	290.56	340.30	1.70	0.469	not regulated		
AT5G17380	Thiamine pyrophosphate dependent pyruvate	peroxisome	5.2	fermentation,PDC	350.418	379.742	337.96	269.07	181.517	249.433	254.002	279.048	255.69	281.138	313.527	318.312	264.754			290.43	299.431	247.404	223.89	121.49	0.88	0.994	not regulated			
AT5G01320	Thiamine pyrophosphate dependent pyruvate	not denoted	5.2	fermentation,PDC			106.617	62.6738																			only in DMSO			
AT5G01330	PDC3 / pyruvate decarboxylase-3	not denoted	5.2	fermentation,PDC			94.6366	76.4888																			only in DMSO			
AT1G71720	ADH1, ADH, ATADH1 / alcohol	cytosol	5.3	fermentation,ADH	4983.09	5224.01	7868.31	5991.71	4882.4	5225.77	6411.32	5364.26	5572.48	5713.71	894.88	6793.85	6535.33	6874.03	4703.97	5545.51	7067.63	8643.81	6778.74	8478.22	6824.57	1170.25	1.19	0.049	not regulated	
AT4G27280	PMDH1 / peroxisomal malate dehydrogenase	peroxisome	6.3	gluconeogenesis / glyoxylate cycle,Malate	376.132	162.959	115.371	194.077			115.718	288.316	110.372	154.14	116.00	117.106	186.896	479.121	161.323			299.135	222.856	256.149	197.18	139.03	1.30	0.322	not regulated	
AT5G09660	PMDH2 / peroxisomal NAD-malate dehydrogenase	peroxisome	6.3	gluconeogenesis / glyoxylate cycle,Malate	1049.67	1117	1050.35	1065.35	872.902	947.999	608.503	540.388	584.15	870.70	218.28	947.228	813.343	1160.156	810.564	539.556	1017.59	457.921	606.17	481.014	758.79	237.26	0.87	0.341	not regulated	
AT4G39870	PKK1, PEPCK / phosphoenolpyruvate carboxykinase	cytosol	6.4	gluconeogenesis / glyoxylate cycle,PEPCK	234.841	261.679		137.042	166.236		160.274			106.45247	101.54602	352.804	350.585	358.146	67.91	171.191			207.836	165.599	119.472	187.65	203.64	1.76	0.374	not regulated
AT4G35530	PPDK / pyruvate orthophosphate dikinase	plastid	6.5	gluconeogenesis / glyoxylate cycle,PPDK	240.738			307.727	237.964	230.648				111.79096	127.07021	230.585	358.146					204.203	215.839	245.983	140.53	133.28	1.26	0.971	not regulated	
AT4G02360	6-phosphogluconate dehydrogenase family protein	peroxisome	7.1.3	OPP,oxidative PP-6-phosphogluconate	393.416	694.153	591.789	532.596	636.234	642.886	547.726	451.778	464.578	546.10613	93.402454	622.608	636.944	853.694	607.9	993.221	581.735	609.569	548.768	426.938	640.42	167.03	1.17	0.182	not regulated	
AT5G41670	6-phosphogluconate dehydrogenase family protein	cytosol	7.1.3	OPP,oxidative PP-6-phosphogluconate	767.823	1188.808	793.541	714.933	602.809	367.61	574.266	625.767	578.307	1017.26	943.58	522.605	481.526	410.244	435.049	733.047	577.488	674.527	724.568	554.352	568.27	113.45	0.56	0.201	not regulated	
AT3G25530	GHDH, ATGHDH, GLYR1, GR / glyoxylate	cytosol	7.1.3	OPP,oxidative PP-6-phosphogluconate				329.211	615.542	109.074	362.29	197.915	179.33682	205.51758	312.104	203.986	802.322	391.971			217.447	751.151	171.308	322.02	283.45	1.80	0.541	not regulated		
AT1G61490	6-phosphogluconate dehydrogenase family protein	plastid	7.1.3	OPP,oxidative PP-6-phosphogluconate	240.144	311.4	336.135	321.812	348.043	1740.61	352.444	238.747	284.781	603.47906	453.11908	531.651	344.019	500.293	342.862			365.361	356.684	292.098	189.499	324.95	150.02	0.70	0.582	not regulated
AT3G14220	Aldolase-type TIM barrel family protein	plastid	7.2.2	OPP-non-reductive PP-transaldolase	1388.42	1386.47	2021.01	1271.85	1227.63	1269.53	1667.21	1152.19	1303.99	1398.6538	205.15076	1130.75	1247.84	1803.49	910.433	1249.83	1082.26	1304.45	1028.57	1200.99	1217.62	237.81	0.87	0.170	not regulated	
AT3G30510	ATRNFR1, RNF2 / root FRN 2	plastid	7.2.3	OPP,electron transfer	391.894								87.98	136.91	190.774	185.986	340.182							123.14	150.22	1.40	0.888	not regulated		
AT4G05390	ATRNFR2 / root FRN 1	plastid	7.2.3	OPP,electron transfer	164.759	263.452	383.159	228.064	167.586	941.823	233.144	331.021	186.552	233.51	218.21	334.289	309.624	1011.99	251.964			153.268	301.296	341.796	195.586	311.09	265.98	0.93	0.896	not regulated
AT2G27510	ATFD3, FD3 / ferredoxin-3	plastid	7.3	OPP,electron transfer	223.847	339.817			127.015		258.035	452.388	155.68	161.53	170.713	226.18												only in DMSO		
AT1G24180	IRA / Thiamin diphosphate-binding fold (THDP-	mitochondrion	8.1.1.1	TCA / org transformation,TCA,pyruvate	129.864	686.657	274.847				162.311	308.362	282.048	210.48	205.96	170.713	226.18					135.238	252.758	259.736	249.728	202.86	107.96	0.76	0.278	not regulated
AT5G05800	MAB1 / Transketolase family protein	mitochondrion	8.1.1.1	TCA / org transformation,TCA,pyruvate	583.202	414.182	451.549	389.151	560.439	187.303	550.167	668.457	422.76	199.31	530.095	448.874	2699.42					293.384	467.462	324.003	529.25	792.88	1.23	0.548	not regulated	
AT5G09950	AT-E1 ALPHA, E1 ALPHA / pyruvate dehydrogenase	mitochondrion	8.1.1.1	TCA / org transformation,TCA,pyruvate	81.7115	173.167			575.526	23.715	223.71	141.574	141.00	171.31	112.114	245.014	895.376	141.205					236.268	661.0317	187.89	265.84	1.35	0.644	not regulated	
AT3G52200	IT3 / Dihydrolipoamide acetyltransferase, long	mitochondrion	8.1.1.2	TCA / org transformation,TCA,pyruvate	187.747			165.72			149.947	55.93	79.61	603.376	164.728	301.022						155.153	168.678	154.77	188.19	2.77	0.730	not regulated		
AT1G34430	EMB303 / 2-oxoacid dehydrogenases	mitochondrion	8.1.1.2	TCA / org transformation,TCA,pyruvate	71.0353	107.423		96.0842			91.0169	38.7016	45.14	68.94	50.1724	133.389						129.819		42.46	58.49	0.94	0.554	not regulated		
AT3G13900	Dihydrolipoamide acetyltransferase, long form	mitochondrion	8.1.1.2	TCA / org transformation,TCA,pyruvate	568.85	510.097	686.848	551.511	411.747	305.306	591.474	467.028	1195.11848	688.488	594.881	540.343						337.079	598.453	291.849	330.12	256.52	0.71	0.672	not regulated	
AT1G54220	Dihydrolipoamide acetyltransferase, long form	mitochondrion	8.1.1.2	TCA / org transformation,TCA,pyruvate	154.401			135.62			154.706	49.42	70.09	807.218	706.557	623.527	719.258	630.359	824.978	628.629	779.499	512.834		692.54	96.71	0.85	0.180	not regulated		
AT4G48030	mLPD1 / mitochondrial liponamide dehydrogenase	mitochondrion	8.1.1.3	TCA / org transformation,TCA,pyruvate	674.81	680.831	347.207	893.402	850.939	801.593	1159.97																			

Zusammenfassung zu vergleichenden massenspektrometrischen Analysen des Gesamtproteoms von *ppa2* mit DMSO- und MG132-Behandlung
A. thaliana wurde für 28d unter Kurztagbedingungen angezogen und für 30h mit DMSO oder MG132 [50 µM] inkubiert. Proteinextrakte wurden nach einem in-solution-Verdau einer quantitativen MS-Analyse unterzogen.
Die Tabelle enthält identifizierte Proteine, die in mindestens zwei aus drei biologischen und drei aus neun technischen Replikaten quantifiziert wurden. *D.protein* Accession und *protein.description* stammen aus den verschiedenen Datenbank (*TAIR10* (<http://ftp.arabidopsis.org>) kombiniert mit häufigen Kontaminationen (<http://ftp.thegm.org/fasta/crap/crap.fasta>). Für die Angabe der Lokalisierung erfolgte ein Abgleich der *protein*-Accession mit SUBA3 MS. Die funktionelle Kategorisierung erfolgte durch Abgleich *deproteins*-Accession mit MapMan. Die für jede Messung ermittelten Konzentrationen [ppm] einzelner Proteine und die Mittelwerte mit SD sind für jede Pflanzenlinie angegeben. Die Regulation dieser Proteine ist in der Spalte *regulation* notiert.

protein.Accession	protein.Description	localization (SUBA3 MS)	BinCode (MapMan)	BinCode Description (MapMan)	DMSO#1			DMSO#2			DMSO#3			DMSO#4			DMSO#5			ppm	SD	DMSO	MG132	SD	ppm (MG132)	SD (MG132)	ppm (MG132)/ppm (DMSO)	regulation (MG132 vs. DMSO)						
					1.001	1.002	1.003	1.001	1.002	1.003	1.001	1.002	1.003	1.001	1.002	1.003	1.001	1.002	1.003										1.001	1.002	1.003			
AT1G29910	CAN3, AB180, LHCB1.2 / chlorophyll A/B binding	plastid	L1.11.1	PS.lightreaction.photystem II(LHC-M)	2411.82	2530.12	2389.54	2443.29	2288.82	50.5676											958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated	
AT4G34420	LHCB1, LHCB1.5 / photosystem II light harvesting	plastid	L1.11.1	PS.lightreaction.photystem II(LHC-II)	3411.82	3710.45	4471.28	2567.79	366.45												958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated	
AT4G34430	LHCB1, LHCB1.5 / photosystem II light harvesting	plastid	L1.11.1	PS.lightreaction.photystem II(LHC-II)	128.4	1087.5	1328.66	888.379	836.744	1266.45	709.625	681.937	513.257									958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated
AT2G05070	LHCB2.2, LHCB2 / photosystem II light harvesting	plastid	L1.11.1	PS.lightreaction.photystem II(LHC-II)	362.656	501.065	480.457	1951.42	262.833	513.231	1084.26	968.157	943.858									958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated
AT1G06800	PSBQ-1, OEE2, PSBQ-9, OEC3 / photosystem II	plastid	L1.11.2	PS.lightreaction.photystem II(PSII)	390.177	1355.21	394.107	627.388	702.377	1205.2	656.581	610.867										958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated
AT5G6570	PSBQ-1, OEE2, PSBQ-9, OEC3, PSBQ1, MSP-1 / PS II	plastid	L1.11.2	PS.lightreaction.photystem II(PSII)	1364.078	1364.51	1378.077	942.843	682.428	1140.02	555.592	891.708	906.706									958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated
AT4G21280	PSBQ, PSBQa, PSBQ-1 / photosystem II subunit QA	plastid	L1.11.2	PS.lightreaction.photystem II(PSII)	734.717	764.292	595.728	566.699	769.442	615.471	556.521	517.76	487.078									958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated
AT3G50820	PSBQ2, PSBQ-2, OEC33 / photosystem II subunit Q-2	plastid	L1.11.2	PS.lightreaction.photystem II(PSII)	269.687	268.507	403.584	494.587	190.947	100.919												958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated
AT4G05180	PSBQ, PSBQ-2, PSII-Q / photosystem II subunit Q-2	plastid	L1.11.2	PS.lightreaction.photystem II(PSII)	181.154	324.545	450.216	322.191	361.515	351.266	255.763											958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated
AT1G44570	NPQ4, PSB5 / Chlorophyll A-B binding family	plastid	L1.11.2	PS.lightreaction.photystem II(PSII)																	958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated	
AT4G6820	PTFAC, TMP1A, PS49, PS1-H / photosystem I P	plastid	L1.11.2	PS.lightreaction.photystem I(PSI)																	958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated	
AT4G28750	PS4E1 / Photosystem I reaction centre subunit IV	plastid	L1.11.2	PS.lightreaction.photystem I(PSI)																	958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated	
ATCC00120	ATPA / ATP synthase subunit alpha	plastid	L1.11.2	PS.lightreaction.ATP synthase.alpha	844.608	908.29	677.922	918.526	1025.19	784.628	634.419	614.467	747.979									958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated
ATCG00480	ATPB, PB / ATP synthase subunit beta	plastid	L1.11.2	PS.lightreaction.ATP synthase.beta subunit	1676	1799.79	1609.84	2019.74	2058.27	1590.59	2105.62	1477.54	2028.88									958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated
ATCG20340	DRT112, PETE2 / Cupredoxin superfamily protein	plastid	L1.5.1	PS.lightreaction.other electron carrier	1745.04	1589.05	1620.23	1102.64	796.561													958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated
AT1G60950	FED A, ATFD2 / 2Fe-2S ferredoxin-like superfamily	plastid	L1.5.2	PS.lightreaction.other electron carrier	546.003		473.407		407.666													958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated
AT1G06900	ATFD1, FDI / ferredoxin 1	plastid	L1.5.2	PS.lightreaction.other electron carrier																	958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated	
AT5G61900	ATFNK1, FNK1 / ferredoxin-NADP(+)	plastid	L1.5.3	PS.lightreaction.other electron carrier																	958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated	
AT3G14850	Aldolase-type TIM barrel family protein	peroxisome	L2.2	PS.photerespiration.glycolate oxidase	991.784	1057.8	798.789	777.96	801.793	636.287	834.969	662.099	752.969									958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated
AT3G14420	Aldolase-type TIM barrel family protein	plastid	L2.2	PS.photerespiration.glycolate oxidase	190.751		268.543	156.542	178.843	213.275	124.93											958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated
AT4G18360	Aldolase-type TIM barrel family protein	peroxisome	L2.2	PS.photerespiration.glycolate oxidase	26.5741	49.945				30.1047	68.3172											958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated
AT1G70580	AOAT2, GGT2 / alanine-2-oxoglutarate	peroxisome	L2.3	PS.photerespiration.aminoacyltransferase				297.638	114.436												958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated	
AT4G33100	ATGLP1, GLDP1 / glycine decarboxylase P-protein	mitochondrion	L2.4.1	PS.photerespiration.glycine cleavage.P	145.128	130.176	127.333		205.194	139.259	162.156	205.257									958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated	
AT4G26080	ATGLDP2, GLDP2 / glycine decarboxylase P-protein	mitochondrion	L2.4.1	PS.photerespiration.glycine cleavage.P	1135.626	123.072	159.725	190.83	1132.329	144.697	93.4994											958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated
AT1G11860	Glycine cleavage T-protein family	plastid	L2.4.2	PS.photerespiration.glycine cleavage.T	943.536	775.801	597.904	542.558	615.22	575.806	421.619	329.841	806.066									958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated
AT1G32470	Single hybrid motif superfamily protein	plastid	L2.4.4	PS.photerespiration.glycine cleavage.H	995.478		400.19	395.551			269.301											958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated
AT2G35120	Single hybrid motif superfamily protein	mitochondrion	L2.4.4	PS.photerespiration.glycine cleavage.H	522.029	404.57	354.164	803.81	480.025	402.158	803.81	476.937										958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated
AT2G35370	GDCH / glycine decarboxylase complex H	mitochondrion	L2.4.4	PS.photerespiration.glycine cleavage.H	36.2668	492.796	289.533	420.753	233.787	515.054												958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated
AT4G32520	SHM3, ATSHM3 / serine	plastid	L2.5	PS.photerespiration.serine	86.2639			244.861	218.29													958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated
AT4G68010	HRP, ATPRH1 / hydroxypyruvate reductase	peroxisome	L2.6	PS.photerespiration.hydroxypyruvate	311.931	387.183	359.814	377.596	281.844	347.261	416.111											958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated
AT2G47400	CP1.23, CP1.2 / CP1.2 domain-containing protein 1	plastid	L3	PS.c Calvin cycle	4930.06	4230.2	4523.49	4190.81	4666.67	3610.28	1488.2	1657.63	1919.24									958.04	2099.91	252.22	2196.81	80.4988	65.9855	41.6581	536.334	898.91	1051.50	0.84	0.236	not regulated
ATCG09500	RBCL / ribulose-bisphosphate carboxylase	plastid	L3.1	PS.c Calvin cycle.ribulose large subunit	2992.634	314.71	772.116		856.659	908.01		670.804	939.365									958.04	2099.91	252.22	2196									

AT4G19410	Pectinacetyltransferase family protein	extracellular	10.8.2	cell wall.pectin*esterases.acetyl esterase	340,923	472,357	560,898	614,529	763,942	741,087	708,044	586,63	696,172	631.62	94.52	176,357	599,634	667,905	558,822	555,259	625,319	902,477	552,309	629.76	109.65	1.00	0.972	not regulated	
AT5G45280	Pectinacetyltransferase family protein	extracellular	10.8.2	cell wall.pectin*esterases.acetyl esterase	415,541	301,693	298,299	324,938	497,462	321,187	363,352	290,294	335,392	349.77	63.65	367,129	290,52	305,295	280,496	136,985	333,407	350,926	533,317	290,845	321.06	97.65	0.92	0.496	not regulated
AT2G45200	Plant invertase/pectin methyltransferase inhibitor	extracellular	10.8.99	cell wall.pectin*esterases.misc										179.36	144.78	183,666	143,205	146,908		190,454	267,437			179.36	43.73	0.99	0.409	not regulated	
AT2G38040	CAC3 / acetyl Co-enzyme a carboxylase	plastid	11.1.1.2.1	lipid metabolism.FA synthesis and FA	379,609		142,727	506,798					255,367	321.13	136.06	220,817	215,873	116,643	275,237	305,265	388,281			252.69	85.84	0.79	0.409	not regulated	
AT5G35360	CAC2 / acetyl Co-enzyme a carboxylase biotin	plastid	11.1.1.2.4	lipid metabolism.FA synthesis and FA	248,32		168,368	317,402		236,501	208,652	201,222	423,674	257.73	83.08	320,319	309,502	304,527	280,603	183,792		167,963	159,646	248.05	68.27	0.96	0.826	not regulated	
AT4G25050	AC94 / acyl carrier protein 4	plastid	11.1.1.12	lipid metabolism.FA synthesis and FA	5,629,047	834,501	1,501,03		607,54			992,999	612,023	1754.29	324.87			682,179		389,356				389.90	238.43	0.46	0.094	not regulated	
AT4G34630	AC93 / acyl carrier protein 3	plastid	11.1.1.12	lipid metabolism.FA synthesis and FA	17,073		11,807	11,313,04				1,349,24		176.47	79.28	115,637	115,761	631,742	102,828		720,228			93.92	235.79	0.73	0.092	not regulated	
AT4G21810	AC89A, ACBP / acyl-CoA-binding protein 6	cytosol	11.1.1.13	lipid metabolism.FA synthesis and FA	3,629,349	1,737,31	1,093,76	1,167,21	1,761,11	1,876,68	1,154,01	214,73	15,128,25	873.29	320.80	1,753,67	1,665,05	1,534,29	1,625,28	1,731,41	801,17	1,959,39	2,251,44	20,701,31	1822.59	216.81	0.05	0.476	not regulated
AT2G43710	SS2, FAB2 / Plant stearoyl-acyl-carrier-protein	plastid	11.1.1.15	lipid metabolism.FA synthesis and FA	104,111	301,09	377,783	142,077	312,729	386,787	209,041	300,432	196,803	292.32	86.97	223,891	358,265	311,993	313,907	397,982	197,369	225,801	247,648		284.61	67.97	0.97	0.851	not regulated
AT1G43800	Plant stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase	plastid	11.1.1.15	lipid metabolism.FA synthesis and FA	4,047,26	1,276,24	3,300,36	1,121,82	1,094,29	1,144,19	974,478	1,241,98	947,907	1143.17	146.98	395,999	861,287	895,063	725,203	760,6	187,671	313,656	229,526		608.05	290.32	0.53	0.000	sig. down regulated
AT3G02630	Plant stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase	plastid	11.1.1.15	lipid metabolism.FA synthesis and FA	127,743		161,529		119,066	31,113	31,275	120,791	153,396	118.94	42.42	320,279	118,305		58,0132	138,08		147,766		116.49	31.25	0.98	0.925	not regulated	
AT3G02620	Plant stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase	not denoted	11.1.1.15	lipid metabolism.FA synthesis and FA			97,5264			31,131	26,2341	49,7601		51.16	28.17			92,316	15,8668	156,078				70.50	40.97	1.04	0.030	not regulated	
AT5G16240	Plant stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase	plastid	11.1.1.15	lipid metabolism.FA synthesis and FA	692,145	50,317	66,0586	422,129	345,344	333,961	27,7463	133,453	65,2694	67.97	38.95	381,813	269,794	462,802	254,581	152,402		236,289	203,115		265.83	90.13	0.72	0.105	not regulated
AT5G46290	KAS1, KAS1.3 / 3-ketoacyl-acyl carrier protein	plastid	11.1.1.3	lipid metabolism.FA synthesis and FA	47,645	766,335	277,562	942,882	509,087	333,076	600,485	556,922	334,188	684.89	123.34	319,906	680,194	667,997	676,257	663,256	340,116	492,975	315,765		562.57	150.62	0.88	0.168	not regulated
AT1G62640	KAS III / 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III	plastid	11.1.1.3	lipid metabolism.FA synthesis and FA										266.42	38.00	191,796		141,79		57,1751				130.25	55.56	0.99	0.031	not regulated	
AT3G25860	LT2A, PLE2 / 2-oxoacid dehydrogenases	plastid	11.1.3.1	lipid metabolism.FA synthesis and FA	275,553	314,36	291,958	193,832	279,314			244,063		266.42	38.00	314,054	236,998	195,375	232,262	204,54	167,921	141,045	85,5721	84,8004	184.73	70.10	0.69	0.031	not regulated
AT4G16155	thylidropyl dehydrogenases	plastid	11.1.3.1	lipid metabolism.FA synthesis and FA	127,671		114,027					94,6865		112.13	13.63			104,207	424,53		161,527	195,364		221.41	121.72	0.99	0.031	only in DMSO	
AT2G34590	Transketolase family protein	plastid	11.1.1.5	lipid metabolism.FA synthesis and FA	85,3838		105,584		116,946				102.97	12.51	55,1769	185,136		92,6994		383,412				179.11	127.08	1.74	0.422	not regulated	
AT2G22330	Thioesterase superfamily protein	plastid	11.1.1.5	lipid metabolism.FA synthesis and FA	465,622		442,742		468,096		423,597		450.21	18.17	469,035	427,944		474,418	528,531					472.98	36.26	1.05	0.365	not regulated	
AT2G05990	MODL, ENR1 / NAD(P)-binding Rossmann-fold	plastid	11.1.1.6	lipid metabolism.FA synthesis and FA	4,965,03	503,069	496,486	684,675	490,761	530,986	351,601	464,61		502.28	85.46	473,293	437,188	506,56	512,225	518,405	499,467	432,6	429,623	702,288	501.97	78.88	1.00	0.994	not regulated
AT4G38950	AMP-dependent synthetase and ligase family	peroxisome	11.1.1.8	lipid metabolism.FA synthesis and FA	348,281	2,689,41	2,644,21	2,323,1	2,608,26	1,964,31	2,457,56	1,963,4	2,458,84	2374.15	203.33	2,635,46	2,336,4	2,451,38	1,858,02	1,744,98	2,348,97	2,439,2	2,392,75	2,724,82	2325.77	306.42	0.98	0.730	not regulated
AT2G28590	LACS4 / AMP-dependent synthetase and ligase	plasma membrane	11.1.1.9	lipid metabolism.FA synthesis and FA	5,379,109	299,436	393,836	309,315	429,526	107,939	398,412		465.72	254.11	272,556	362,226	295,429	339,232	319,632	269,009	411,607	453,812	332,545		339.56	58.33	0.73	0.195	not regulated
AT3G01800	NMT1, XPL1, PEAM7 / S-adenosyl-L-methionine	cytosol	11.3	lipid metabolism.Phospholipid synthesis	213,808	139,979	81,3327		121,226	62,7482	97,0713		119.41	49.16	50,4027	201,316		216,46							156.06	74.97	1.31	0.464	not regulated
AT4G48600	PMEAMT, APMPEAMT / S-adenosyl-L-methionine	cytosol	11.3	lipid metabolism.Phospholipid synthesis	232,445	235,395	260,92	376,517	377,07	338,756	428,248	310,089	506,491	338.10	84.53	304,737	255,066	278,448	209,144	242,124	310,153	349,019	308,285		280.87	42.95	0.83	0.126	not regulated
AT4G22410	S-adenosyl-L-methionine dependent	not denoted	11.3	lipid metabolism.Phospholipid synthesis										31.403	90.28	97,4752	72,4405								84.40	38.13	0.91	0.012	only in MG132
AT1G04600	NH01, GLU1 / Actin-like ATPase superfamily protein	cytosol	11.5.1	lipid metabolism.glycerol	287,796		302,167	221,526	214,309	343,263	203,533	182,208		250.40	55.18	351,133	299,008		220,313	240,654		174,807	163,997		225.02	45.97	0.90	0.429	not regulated
AT2G29500	LTGP1 / glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid	extracellular,plasma membrane	11.6	lipid metabolism.lipid transfer proteins etc	340,743	341,336		445,446		370,65		180,625		337.76	85.45	354,028	288,288	307,119	336,91	3120,52	4812,6	7069,31	6629,07	7247,85	4638.68	1743.36	0.84	0.720	sig. down regulated
AT2G38530	LTP2, LTP3, CD3 / lipid transfer protein 2	extracellular	11.6	lipid metabolism.lipid transfer proteins etc	3,002,45	2102,02	1927,13	876,33	2110,19	1583,87	2749,14	2346,01	2853,45	2169.18	395.31	3534,24	1596,01	1665,29	1263,05	1140,52	1710,79	2532,38	2353,74	2477,25	1808.14	490.20	0.84	0.129	not regulated
AT3G45540	LP1, LTP1, ATLTP1 / lipid transfer protein 1	extracellular	11.6	lipid metabolism.lipid transfer proteins etc	3,002,45		2990,78	1300,49	5367,57	2987,35	3621,96	4814,74	5675,62	4364.85	1258.48	3540,8	2882,88	3077,19	3367,91	3120,52	4812,6	7069,31	6629,07	7247,85	4638.68	1743.36	0.84	0.720	not regulated
AT3G51600	LTP5 / lipid transfer protein 5	extracellular	11.6	lipid metabolism.lipid transfer proteins etc		2590,86	2358,65	3028,86		2130,49		4446,85		2911.24	823.35			2388,66	2308,25		1589,93		3423,99	3727,42	2683.65	784.08	0.92	0.700	not regulated
AT5G45050	FQJ1 / flavonoid-like quinone reductase 1	plasma membrane	11.6	lipid metabolism.'wocxics'(steroids)	1541,24	1863,81	1828,97	1045,43	1248,61	1590,96	1578,65	1433,5	1304,61	1492.86	215.38	1649,28	1654,01	1837,93	1827,33	1684,32	1463,43	1472,4	874,017	1518,37	1566.79	281.68	0.90	0.587	not regulated
AT5G2890	ATSCP2, SC2P / sterol carrier protein 2	peroxisome	11.8	lipid metabolism.'wocxics'(steroids)										219.14	84.56	314,004		360,978	380,102	285,059		275,228			323.48	41.16	0.99	0.031	only in MG132
AT5G52760	LysoPL2 / lyso phospholipase 2	cytosol	11.9.2	lipid metabolism.lipid degradation lipolysis	337,342		261,753	251,378				222,044		243.07	14.96			462,635	179,658		261,078				273.66	98.84	0.91	0.586	not regulated
AT1G45201	ATTL1, TL11 / triacylglycerol lipase-like 1	plasma membrane	11.9.2.1	lipid metabolism.lipid	403,823	334,507	362,475	261,073	286,722		345,733	195,511		312.83	64.83			244,725	189,002	198,733	184,048	311,503	263,292		231.88	46.04	0.91	0.064	only in MG132
AT3G18860	transducin family protein / WD-40 repeat family	cytosol	11.9.3	lipid metabolism.lipid										1627.41	242.37	1675,3	1639,32	1773,56	1694,16	1701,82	2246,97	1727,64	2089,92	2267,38	1868.50	242.24	1.15	0.064	not regulated
AT3G15730	PLDALPHAL, PLD / phospholipase a alpha 1	cytosol	11.9.3.1	lipid metabolism.lipid	1,469,24	1774,21	1569,92	1883,66	1181,67	1579,06	1387,74	1848,36	1952,79	1627.41	242.37	1675,3	1639,32	1773,56	1694,16	1701,82	2246,97	1727,64	2089,92	2267,38	1868.50	242.24	1.15	0.064	not regulated
AT1G52570	PLD3LPHAX / phospholipase D alpha 2	vacuole,endoplasmic reticulum	11.9.3.1	lipid metabolism.lipid	525,911	1018,12	432,521	360,737	128,869	554,501		652,207	100,275	471.64	276.27	561,84	297,495	502,279	494,777	467,148		280,914	417,759		431.74	98.63	0.92	0.741	not regulated
AT4G35790	ATPLDELTA, PLDELTA / phospholipase D delta	cytosol	11.9.3.1	lipid metabolism.lipid	191,254			237,129			188,633			205.67	12.20			332,828		331,965		64,4839			101.69	31.05	0.91	0.031	only in MG132
AT2G42690	SHV3, MRN5, GPDL2 / PLC-like phosphodiester																												

AT3G58610	ketol-acid reductoisomerase	plastid	13.1.4.1.2	amino acid metabolism.synthesis.branched	2747.09	2854.05	2570.23	3439.98	2953.4	2869.15	2290.89	2717.98	2979.5	2824.70	296.10	1799.93	2757.68	2623.02	2893.01	2604.33	2620.55	1825.07	1446.94	2142.16	2412.52	468.45	0.85	0.052	not regulated	
AT1G18500	MAML-4, IPMS1 / methylthiolylmalate synthase	plastid	13.1.4.4.1	amino acid metabolism.synthesis.branched	226.856	153.395	899.284		116.983	209.859	94.1475			401.31	374.92	103.502	134.661	128.942	127.1			100.311			118.90	14.14	0.30	0.142	not regulated	
AT1G74040	IMS1, MAML-3, IPMS2 / 2-isopropylmalate	plastid	13.1.4.4.1	amino acid metabolism.synthesis.branched			28.5753		35.2343	31.3019			31.70	25.92															only in DMSO	
AT1G08560	ATIMD2, IMD2 / isopropylmalate dehydrogenase 2	plastid	13.1.4.4.3	amino acid metabolism.synthesis.branched	241.335	104.015	130.792	58.2518	129.192	122.171				129.29	55.32	94.537	87.7759	98.4433	68.956	81.066		88.842	114.763			92.16	11.23	0.71	0.139	not regulated
AT1G31180	ATIMD3, IMD3, IPMDH1 / isopropylmalate	plastid	13.1.4.4.3	amino acid metabolism.synthesis.branched	138.347	145.798	130.802	197.483	84.5673	163.486	181.752	153.045	118.231	152.61	35.30	144.101	119.04	150.991	143.102	106.336		114.177	138.936	116.531		140.23	22.95	0.92	0.442	not regulated
AT5G14200	ATIMD1, IMD1 / isopropylmalate dehydrogenase 1	plastid	13.1.4.4.3	amino acid metabolism.synthesis.branched	519.501	178.991	122.806	134.666	203.664	170.168	149.184	302.14	222.64	123.78	70.9695	118.693	81.8264	85.0125	126.88			101.22	133.027	278.346		124.50	61.81	0.56	0.082	not regulated
AT2G24260	OAS1, OUD3, CTFAC1 / O-acetylserine (thio) lyase	not denoted	13.1.5.1.1	amino acid metabolism.synthesis.serine	698.858	790.461	1086.12	754.408	821.395	1018.4	985.043	618.665	896.72	142.99	719.013	874.785	938.804	713.543	1245.16	1103.8	1098.2	1184.36	799.574		961.70	192.28	1.08	0.389	not regulated	
AT5G13500	PSAT7 / phosphoserine aminotransferase	plastid	13.1.5.1.2	amino acid metabolism.synthesis.serine	465.442	471.033	514.653	403.965	314.47	393.148	233.996	326.601	361.59	115.22	663.521	363.213	341.338	220.294	45.058	138.73	2228.53	400.273	456.772		549.75	601.19	1.52	0.388	not regulated	
AT2G17630	Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferase	plastid	13.1.5.1.3	amino acid metabolism.synthesis.serine					121.685	141.075	132.78	37.526	276.32	122.24	68.86	91.6821	82.0633	63.6475	206.747	92.1546	317.476	106.158			136.69	85.62	1.12	0.742	not regulated	
AT5G65720	ATNF51, NF51, NF51, ATNF51 / nitrogen fixation 5	mitochondrion	13.1.5.1.3	amino acid metabolism.synthesis.serine												96.2973	231.665	177.274			118.791				156.00	52.74	0.60	0.051	only in MG132	
AT3G04940	ATCYS01, CYS01 / cysteine synthase D1	plastid	13.1.5.3.1	amino acid metabolism.synthesis.serine	102.45	98.4794		160.073	30.7798				88.10	45.50	232.622				100.719	298.319					140.87	115.71	1.60	0.461	not regulated	
AT3G61440	ATCYS1, ARBH3AS53.1, CYS1 / cysteine	plastid	13.1.5.3.1	amino acid metabolism.synthesis.serine	2924.73	3033.6	2718.62	3181.69	213.26	2688.07	3646.85	2820.95	3603.58	3103.26	338.62	2700.58	2336.96	2503.2	2022.3	1821.87	2383.46	3278.72	3303.32	4186.03		2748.49	691.26	1.89	0.211	not regulated
AT1G48800	OAS1, OUD3, CTFAC1 / O-acetylserine (thio) lyase	not denoted	13.1.5.3.1	amino acid metabolism.synthesis.serine	2039.48	2241.52	2185.14	1949.53	2161.46	2197.95	2387.78	2000.01	2024.38	2131.92	131.79	2081.26	1962.59	1939.49	1797.06	1864.63	1991.79	1547.86	1626.62	1817.7		1847.67	163.12	0.87	0.051	not regulated
AT3G24600	OAS2 / O-acetylserine (thio) lyase (OAS1F)	not denoted	13.1.5.3.1	amino acid metabolism.synthesis.serine					315.565				167.60	114.74	48.5076														only in DMSO	
AT3G59760	OAS5, ATCS-C / O-acetylserine (thio) lyase isoform 5	plastid	13.1.5.3.1	amino acid metabolism.synthesis.serine	228.276	196.356	174.697		144.639	176.217	93.8951		160.01	91.49	157.513	167.509	199.949	141.523	86.5191		88.8084	104.821			122.28	30.55	0.72	0.057	not regulated	
AT2G43570	OASB, ACS1, CPAC51, ATCS-B / O-acetylserine	plastid	13.1.5.3.1	amino acid metabolism.synthesis.serine	687.188	637.645	674.889	557.023	508.448	636.312	541.219	456.097	554.604	583.68	54.32	516.673	641.59	459.883	469.624	520.229	541.68	352.152	474.569	526.076		500.28	73.17	0.86	0.308	not regulated
AT5G28020	CYS02, ATCYS02 / cysteine synthase D2	cytosol	13.1.5.3.1	amino acid metabolism.synthesis.serine	37.2133	124.785	175.541	209.769		164.562			138.13	57.37	130.488	188.865	206.418		90.0854	78.2522	44.6125				123.18	58.58	0.89	0.079	not regulated	
AT4G39980	DHS1 / 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-	plastid	13.1.6.1.1	amino acid metabolism.synthesis.aromatic	263.105	262.07	558.56	315.616	330.712	289.277	315.262	281.397	363.644	330.77	86.27	205.802	226.063	200.995	171.89	196.573		229.666	304.934	227.565		107.10	16.35	1.08	0.625	not regulated
AT1G22410	DHS2 / 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-	plastid	13.1.6.1.1	amino acid metabolism.synthesis.aromatic				261.799	300.154	305.7	316.571	78.8377	99.57	15.19	102.218	121.476	121.476	121.476	121.476	121.476	121.476	121.476	121.476	121.476		107.10	16.35	1.08	0.625	not regulated
AT2G06350	EMB3004, MEE32 / dehydroquinolate dehydratase,	plastid	13.1.6.1.10	amino acid metabolism.synthesis.aromatic	186.372	281.093	255.275	361.29	288.318	312.568	247.785	359.896	205.14	32.30	179.311	224.97	238.336	238.336	246.796	580.528	263.65	304.664	259.145		281.70	110.30	0.99	0.934	only in DMSO	
AT5G61210	3-dehydroquinolate synthase, putative	plastid	13.1.6.1.2	amino acid metabolism.synthesis.aromatic					296.806	206.183	210.12		247.33	34.94	349.345	259.777	233.347	191.485		196.175						246.03	57.42	0.99	0.707	not regulated
AT2G45300	RNA 3'-terminal phosphate cyclase/enolpyruvate	plastid	13.1.6.1.6	amino acid metabolism.synthesis.aromatic	253.951	289.358	220.88	272.712	177.803	283.734	209.596	333.132	255.15	45.29	205.717	164.83	231.84	169.131	140.128		225.103	231.782				196.79	32.50	0.77	0.023	not regulated
AT1G48860	RNA 3'-terminal phosphate cyclase/enolpyruvate	plastid	13.1.6.1.6	amino acid metabolism.synthesis.aromatic	145.974	83.527	49.9134	150.575	866.725	145.366	130.976	99.6165	209.06	26.07	171.6377	411.903	115.672	105.048	90.139		79.9548	68.4354				134.72	114.27	0.64	0.514	not regulated
AT1G48850	EMB144 / chorismate synthase, putative / 5-	plastid	13.1.6.1.7	amino acid metabolism.synthesis.aromatic	309.556		289.552	261.289	420.577	372.984	140.604	316.629	297.31	83.43	370.735	212.265	231.787				248.701	127.183				238.11	78.38	0.80	0.283	not regulated
AT2G04400	Aldolase-type TIM barrel family protein 1	plastid	13.1.6.5.4	amino acid metabolism.synthesis.aromatic	144.523	239.51	380.033			217.808	181.469		232.75	80.38	170.706	154.011				171.528	157.491	194.166	142.033		164.99	16.48	0.71	0.102	not regulated	
AT2G54640	TSB1 / tryptophan synthase alpha chain	plastid	13.1.6.5.5	amino acid metabolism.synthesis.aromatic	679.969	365.919	660.563		222.583	657.914	704.671	371.565	626.87	147.87	815.184	472.473	346.267	359.077	635.82	229.132	355.365	666.948	233.815		401.32	146.82	0.82	0.042	not regulated	
AT5G54110	TSB1, TRP8, TRP2, ATSB51 / tryptophan synthase	plastid	13.1.6.5.5	amino acid metabolism.synthesis.aromatic	1185.3	930.228	1070.43	879.155	794.25	952.869	1228.19	818.083	1157.89	1004.04	151.43	909.362	803.889	818.657	686.284	661.725	814.073	1168.61	1163.35	1045.78		896.86	179.02	0.89	0.214	not regulated
AT4G27070	TSB2 / tryptophan synthase beta-subunit 2	plastid	13.1.6.5.5	amino acid metabolism.synthesis.aromatic											51.8936					597.261					235.42	255.87	0.89	0.051	only in MG132	
AT1G58080	ATATP-PR11, HSN1A, ATP-PR1 / ATP	plastid	13.1.7.1	amino acid				212.835		150.536	264.381	202.046	207.45	40.43	169.967	137.308			113.146		103.74				131.04	25.59	0.63	0.033	sig. down regulated	
AT4G26900	AT-HF, HSN4 / HIF HF	plastid	13.1.7.1	amino acid				174.136					109.93	47.13	45.0865				72.2682		85.3497				67.57	16.77	0.61	0.297	not regulated	
AT5G62530	ALDH12A1, ATPSC0H, PSCDH / aldehyde	mitochondrion	13.2.2.2	amino acid	141.964	233.449	205.747	190.449	188.519	203.551	953.598	191.287	244.52	287.10	238.26	217.561	167.488	171.43	285.785	197.992	176.153	228.644	259.781	229.086		214.88	38.53	0.76	0.429	not regulated
AT4G13940	HOG1, EMB1305, SAH1, ME5, ATSAH1 / 5-	cytosol	13.2.3.4	amino acid	3681.17	4087.99	3982.707	4502.45	6181.89	4859.48	5035.93	4537.97	5952.57	4644.15	59.83	3198.43	3596.96	3593.88	4065.82	4364.213	5682.86	4288.69	4064.8	4885.76		4145.02	724.35	0.89	0.186	not regulated
AT3G23810	SAH2, ATSAH2 / S-adenosyl-L-homocysteine	cytosol	13.2.3.4	amino acid	111.029	497.66	508.548	1460.120	43.713	286.742	418.56	1274.88	882.25	466.00	1125.93	1049.58	1106.752	389.501	554.195	502	1239.26	1352.84	1320.68		960.41	352.81	1.09	0.710	not regulated	
AT2G31350	PK73, PED1, KAT2 / peroxisomal 3-ketoacyl-CoA																													

AT1G60750	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein	not denoted	17.2.3	hormone metabolism,auxin.induced-				11.0836	16.6168	21.2338	218.298	58.0096	65.85	77.88	0.60	0.80	only in MG132														
AT3G19820	DWF1, DIM, EVI1, DMI1, CB1 / cell elongation	plasma membrane,golgi	17.3.1.2.8	hormone				198.282	122.15	141.001	139.468	134.036		120.56	142.58	26.11	not regulated														
AT2G42680	TRIP-1, TF191 / TGF-beta receptor interacting	cytosol	17.3.2.99	hormone	254.862	256.807	226.118	305.703	58.756	213.531	208.951		232.05	42.92	263.967	264.473	223.167	287.300	260.892	310.493	239.251	264.22	26.11	1.14	0.145	not regulated					
AT1G05100	E,ACO, EAT1 / ethylene forming enzyme	not denoted	17.5.1.2	hormone metabolism,ethylene.synthesis-	417.517	527.875	649.447	473.59	490.465	580.625	406.893	409.498		499.48	42.98	374.681	929.641	808.156	724.114	1005.41	767.843	964.974	1016.67	1093.23	898.35	124.51	1.80	0.000	sig. up regulated		
AT1G12010	Zooxanthellae (2006) and Fe(II)-dependent	not denoted	17.5.1.2	hormone metabolism,ethylene.synthesis-	547.417	1111.49	480.01	618.749	823.514	877.139	81.0608	408.091	166.095		598.18	31.68	799.662	546.868	631.271	618.854	421.751	60.7493		382.724	396.27	206.19	0.70	0.236	not regulated		
AT2G19590	ACD1, ATACD1 / ACC oxidase 1	not denoted	17.5.1.2	hormone metabolism,ethylene.synthesis-	391.253	287.976	375.855		470.606		297.32			350.66	67.30	262.126	210.515	413.953	436.741	426.639		412.518		360.08	89.17	1.03	0.864	not regulated			
AT1G26800	ACO2 / ACC oxidase 2	not denoted	17.5.1.2	hormone metabolism,ethylene.synthesis-	2794.29	2396.31	3546.77	2715.01	3581.35	2809.7	4691.4	3456.47	4150.55		3246.43	73.48	3529.93	2875.18	3409.46	3083.38	2854.73	3840.03	3871.46	4201.72	3772.77	3291.58	1.01	0.892	not regulated		
AT1G21980	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like	cytosol,nucleus	17.5.3	hormone metabolism,ethylene.induced-	890.076	1014.76	897.944	1286.37	1384.96	1161.94		1438.53	1725.24		1224.98	67.15	1014.32	1074.58	1140.48	1240.03	1157.30	1186.14	1156.26	1086.17	1242.11	1184.72	163.32	0.97	0.730	not regulated	
AT1G75520	GSA1 / GAST1 protein homolog 1	extracellular	17.6.3	hormone metabolism,gibberellin.induced-	371.482	684.9	667.191		457.835	378.982				584.08	139.14	1009.71	706.373	917.669	421.009	445.309		474.927		704.84	231.93	1.21	0.398	not regulated			
AT2G14290	Gibberellin-regulated family protein	extracellular	17.6.3	hormone metabolism,gibberellin.induced-	406.507	443.347	413.272	462.325	458.1	386.26	227.400	422.613	50.0	413.36	73.27	407.823	443.522	479.698	417.332	359.608	397.983	461.715	447.681	499.571	431.66	57.20	1.04	0.586	not regulated		
AT3G14640	Mannose-binding lectin superfamily protein	not denoted	17.7.3	hormone metabolism,jasmonate.induced-	2406.46	2496.07	2387.59	1885.22	2087.77	1753.88	2439.73	1706.72	2000.28		2129.30	292.86	2484.87	2400.97	2552.92	1606.88	1560.5	1974.4	1415.83	1564.64	1517.87	1897.65	437.03	0.89	0.921	not regulated	
AT1G52100	Mannose-binding lectin superfamily protein	not denoted	17.7.3	hormone metabolism,jasmonate.induced-	335.159	311.684	353.087	312.004		369.383	455.053	335.039		353.06	45.84	419.561	385.305	367.521	260.823	260.551		300.801	336.73	286.478		329.95	52.80	0.438	not regulated		
AT3G16450	Mannose-binding lectin superfamily protein	cytosol	17.7.3	hormone metabolism,jasmonate.induced-	1847.46	1579.62	1811.13	998.484	1687.12	1285.86	255.765	1640.97	1875.67		1442.57	496.48	1899.08	1907.96	2101.55	1260.8	858.461	1519.54	1499.95	1500.94	700.42	1462.30	432.71	1.01	0.934	not regulated	
AT3G16430	JAL1 / jacalin-related lectin 31	cytosol,extracellular	17.7.3	hormone metabolism,jasmonate.induced-	172.208	206.937	192.188		180.276	132.204	160.639	164.9	152.97		170.30	21.63	223.04	211.472	198.456	207.767	147.141	130.545	127.968	119.131	245.32	172.53	44.52	1.01	0.905	not regulated	
AT3G16470	JR1 / Mannose-binding lectin superfamily protein	cytosol	17.7.3	hormone metabolism,jasmonate.induced-												478.297	381.197	201.55											only in MG132		
AT2G38230	ATPDX1.1, PDX1.1 / pyridoxine biosynthesis 1.1	cytosol	18	Co-factor and vitamin metabolism	217.517	221.367	731.156		272.978	115.105	348.342	299.653		315.16	183.04	754.765	318.914	359.12	204.293	764.026	650.21	246.573	400.4		461.66	212.57	1.46	0.209	not regulated		
AT5G01410	PDX1, ATPDX1.3, RSRA, PDX1.3 / ATPDX1 / Aldolase	cytosol	18	Co-factor and vitamin metabolism	677.34	787.582	532.275	952.911	1027.83	938.527	1399.619	622.364	1001.21		945.97	206.05	809.992	879.522	798.266	948.41	633.202	393.269	661.973		706.63	161.80	0.75	0.038	not regulated		
AT3G12990	B73, S1R4, CNX, CNX1 / myoglobin	cytosol	18.1.1	Co-factor and vitamin	1463.56	319.525					510.948				764.68	500.33					137.15					101.36	25.32	1.13	0.201	not regulated	
AT3G14990	Class I glutamine amidotransferase-like superfamily	cytosol	18.2	Co-factor and vitamin	984.811	1065.63	1237.7	1294.55	1295.05	1297.87	703.84	1230.49	1860.31		1218.92	259.11	1559.9	1124.49	1152.83	1319.06	1423.35	152.29	1388.35	1466.95	1396.96	1372.75	142.48	1.13	0.134	not regulated	
AT3G54770	TH11, TH14 / thiazole biosynthetic enzyme	plastid	18.2	Co-factor and vitamin			210.248	214.638			211.91				212.60	1.81														only in DMSO	
AT2G40500	CSO1 / 6,7-dimethyl-8-ribitylsuccinate synthase	plastid	18.3.2	Co-factor and vitamin							281.724	236.842	142.543		220.37	58.00					180.699	264.027			233.386		226.04	34.41	1.03	0.911	not regulated
AT2G56490	CRD1, CHL27, ACSF / dicarboxylate diiron protein	plastid	19.12	tetrapyrrole synthesis,magnesium-	300.031	178.757	165.172	184.176							198.86	51.19	418.868	365.629	420.920	399.477	300.354		360.58	276.267	341.189		355.41	47.38	0.86	0.228	not regulated
AT2G56370	GSA1 / glutamate 1-semialdehyde,2,1-	plastid	19.3	tetrapyrrole synthesis,GSA	477.123	420.631	402.18	380.03		314.536	625.374	268.114		412.57	107.68	418.868	365.629	420.920	399.477	300.354		360.58	276.267	341.189		355.41	47.38	0.86	0.228	not regulated	
AT3G48730	GSA2 / glutamate 1-semialdehyde,2,1-	plastid	19.3	tetrapyrrole synthesis,GSA	348.482	488.875	373.132	353.966	724.923	366.196	253.559	459.819	733.202		455.79	150.21	321.683	410.621	373.51	266.977	262.831	654.504	184.274	357.837	258.528		343.42	128.13	0.75	0.139	not regulated
AT1G69740	HEMB1 / Aldehyde superfamily protein	plastid	19.4	tetrapyrrole synthesis,ALA dehydratase	370.815	451.529	583.885	401.18	336.418	535.491	284.219	384.638	330.996		379.47	111.08	413.244	401.398	406.162	328.501	319.885	268.851	309.178	344.067	282.231		341.49	50.96	0.902	not regulated	
AT3G28200	HEMC / Hydroxymethylase synthase	plastid	19.5	tetrapyrrole synthesis,porphobilinogen	1848.498	375.458	668.538	664.538	312.745	331.409	563.791	387.207	415.025		421.28	110.82	378.694	371.327	367.509	395.875	257.937		335.704	287.861		342.65	49.39	0.81	0.124	not regulated	
AT1G03475	LM2, HEMF1, ATCP1 / Coproporphyrinogen III	plastid	19.5	tetrapyrrole synthesis,coproporphyrinogen	259.846	286.917	237.244	212.755		178.813	134.015				197.12	45.76	302.100	292.425	249.885	166.619	449.228	287.157	112.904	230.89		242.16	2.34	0.424	not regulated		
AT1G74910	ADP-glucose pyrophosphorylase family protein	cytosol	21.1.21	major CHO	187.109	311.811	221.265	252.653		205.822		286.519		24.20	44.14	183.862	267.987					301.149	203.837	200.351		231.44	45.14	0.95	0.679	not regulated	
AT2G13900	ADP-glucose pyrophosphorylase family protein	not denoted	21.1.21	major CHO			113.232	77.808				81.6716		90.93	15.84														only in DMSO		
AT3G13900	pH8-like carbohydrate kinase family protein	cytosol	22.1.11	major CHO	2843.19	2901.59	2893.45	3423.77	3715.66	3644.13	2317.2	3176.84	3733.16		3193.22	452.18	2894.16	2820.52	2852.48	3041.77	3508.12	3758.35	2388.14	2747.11	3136.3	3016.33	387.97	0.94	0.413	not regulated	
AT1G06030	pH8-like carbohydrate kinase family protein	not denoted	22.1.11	major CHO	115.558	36.8021	532.895								305.98	23.19														only in DMSO	
AT1G06020	pH8-like carbohydrate kinase family protein	cytosol	22.1.11	major CHO			69.5567		32.5616	1012.91				371.67	453.67														only in DMSO		
AT3G59480	pH8-like carbohydrate kinase family protein	not denoted	22.1.11	major CHO	122.818	1401.95	386.4			140.036	840.032		473.083		753.81	458.67													only in DMSO		
AT3G59390	pH8-like carbohydrate kinase family protein	not denoted	22.1.11	major CHO											367.63	334.11													only in DMSO		
AT1G64430	pH8-like carbohydrate kinase family protein	plastid	22.1.11	major CHO		229.354	118.131							171.16	40.11	217.938	132.612	152.31	131.857								138.25	49.80	0.81	0.353	not regulated
AT5G51830	pH8-like carbohydrate kinase family protein	cytosol	22.1.11	major CHO	115.354		47.0286	99.978		78.0725				85.11	25.67	73.254	61.0748	154.087	71.9029	101.966		119.474	142.543	95.6571	149.587		107.73	33.46	1.27	0.292	not regulated
AT3G55880	CNV1 / cytosolic invertase 1	cytosol	22.1.3.1	major CHO	232.517	194.361	231.221	305.795	328.703	299.091	167.525			251.32	56.39	235.31	277.694	206.66	208.193	339.174		150.545	263.275	130.295		226.39	63.74	0.90	0.471	not regulated	
AT3G13790	ATCW1N1, ATBFUCT1 / glycosyl hydrolases	extracellular	22.1.3.3	major CHO					147.625	282.749	97.1568			175.84	78.35												362.35	196.93	2.06	0.247	not regulated
AT1G62660	Glycosyl hydrolases family 32 protein	extracellular	22.1.3.3	major CHO	382.113	666.504	195.625			236.79	291.845			354.58	168.01	422.622		294.349	440.836	196.796		258.167				322.55	94.62	0.91	0.748	not regulated	
AT1G19860	ATHX2, HK2 / heokinase 2	mitochondrion	22.1.4	major CHO						156.509	128.409			139.78	40.87		198.341									109.33	68.33	0.78	0.363	not regulated	
AT2G12910	ATHX1, GIN2, HKX1 / hexokinase 1	mitochondrion	22.1.4	major CHO						366.474	98.3969			255.95	13.81				283.029	193.885	253.597		164.887	345.898		248.28	64.34	0.97	0.233	not regulated	
AT3G43190	SUS4, ATUS4 / sucrose synthase 4	cytosol	22.1.5	major CHO	2065.31	205.345	2046.91	2399.1	2455.19	1828.71	1875.29	1585.91	1792.22		2121.20	503.37	1651.53	1864.84	1959.96	1571.13	1853.63	2081.11	1377.99	1405.7	1507.82	1692.63	239.16	0.80	0.045	not regulated	
AT2G20830	SUS1, ASUS1, atsus1 / sucrose synthase 1	cytosol	22.1.5	major CHO	1327.67	1424.8	2092.91	1655.52	2150.71	1591.45	1998.58	2070.27	2570.03																		

AT1G24020	MLP423 / MLP-like protein 423	not denoted	20.2.99	stress.abiotic.unspecified	1642.96	1563.26	1557.31	1868.53	2144.58	1681.09	2571.61	2557.43	3224.47	2090.14	549.52	1229	1453.23	1333.72	1218.7	1355.75	1536.12	2844.29	2847.86	2867.87	1854.06	712.68	0.89	0.469	not regulated					
AT1G27050	MLP34 / MLP-like protein 34	not denoted	20.2.99	stress.abiotic.unspecified	260.23	308.61	348.51	270.16	158.383	360.19	86.4852	113.444	197.14	233.76	94.37	431.065	486.613	547.668	405.122	479.534	311.922	58.326	56.2222			324.61	193.00	1.39	0.257	not regulated				
AT1G24040	COR47, RD17, ACCOR47 / cold-regulated 47	nucleus	20.2.99	stress.abiotic.unspecified	1763.67	1693.35	1485.51	1471.9	1632.86	1266.19	1820.66	1469.67	1314.32	1548.13	1743.55	1816.5	1706.01	1669.66	1539.51	1717.77	1144.07	1529.91	1154.69			1532.61	240.56	0.99	0.885	not regulated				
AT3G35450	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport	cytosol	20.2.99	stress.abiotic.unspecified	2141.79	2418.06	2129.78	2425.79	2159.78	951.853	2208.16	1867.7	2173.16	2048.91	4253.33	1972.87	1938.59	1956.66	865.347	1554.31	1755.22	2229.54	1280.48	2452.42			1778.38	459.20	1.87	0.398	not regulated			
AT1G76180	ERD14 / Dehydrin family protein	nucleus	20.2.99	stress.abiotic.unspecified	1474.32	1440.01	1579.82	1677.82	1226.05	1857.96	914.476	702.705	1588.44	1379.05	348.75	1304.1	1001.86	916.66	212.57	2399.04	3053.42	891.693	992.115	1878.29			1632.76	737.20	1.08	0.238	not regulated			
AT4G23680	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport	not denoted	20.2.99	stress.abiotic.unspecified	908.431	1113.06	989.03	792.209	624.461	679.402		156.905		751.93	289.90	808.521	795.999	935.351	317.588	342.985			284.626	248.585			476.24	222.84	0.63	0.090	not regulated			
AT1G19140	YTHP534, PHOS34 / Adenine nucleotide alpha	cytosol	20.2.99	stress.abiotic.unspecified	1843.91	1978.98	1828.68	1405.54	1302.59	992.771	1831.49	1403.26	1381.67	1550.96	309.85	1307.76	1694.79	1847.01	1307.55	1218.76	1408.3	1929.57	2030.65	1872.78			1676.96	276.66	1.06	0.404	not regulated			
AT1G24540	LT29, LT45, ERD10 / dehydrin family protein	cytosol	20.2.99	stress.abiotic.unspecified	4003.408	461.344	390.902	455.661	577.245	467.557	544.022	537.319	562.205	488.52	65.01	412.879	324.451	308.470	410.887	373.524	428.084	403.741	483.765	448.112			399.32	52.92	0.82	0.008	not regulated			
AT2G21620	RD2 / Adenine nucleotide alpha hydrolases-like	cytosol	20.2.99	stress.abiotic.unspecified	17.47			21.875			166.242	126.384		170.37	219.687			107.578		143.391			196.431	236.498			179.32	50.36	1.05	0.623	not regulated			
AT1G21330	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport	not denoted	20.2.99	stress.abiotic.unspecified	329.325	498.214	361.151	667.128	678.112	532.831	435.894	332.782	422.786	470.83	124.44	666.181	423.342	417.413	480.697	473.149	339.403	359.694	306.808	548.74			450.60	105.21	0.95	0.891	not regulated			
AT5G54430	ATPHO332 / PHOS32 / Adenine nucleotide alpha	plastid	20.2.99	stress.abiotic.unspecified	412.366	465.187	418.818	520.969	260.948	434.757	522.601	482.073		439.71	78.33	363.169	447.63	561.707	511.749	435.281	342.332	424.206	652.626	331.084			431.09	72.57	0.98	0.828	not regulated			
AT1G28290	AGP31 / arabinogalactan protein 31	extracellular	20.2.99	stress.abiotic.unspecified	343.75			343.75						495.94	153.92	240.862	285.457	324.248	378.419	438.188	441.778	509.877	382.833	253.048			376.19	114.41	0.76	0.133	not regulated			
AT4G27320	ATPHO34, PHOS34 / Adenine nucleotide alpha	not denoted	20.2.99	stress.abiotic.unspecified	247.865	186.121	163.443			120.647	195.098			182.64	41.55	288.264	157.992			88.3131		140.108					168.67	73.64	0.92	0.761	not regulated			
AT4G23670	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport	not denoted	20.2.99	stress.abiotic.unspecified	2570.32	2967.34	2677.84	2825.51	3105.21	2982.54	2233.94	2072.1	1693.48	2569.59	450.19	2703.75	2654.94	2375.15	2554.77	2313.2	2873.89	2377.14	2732.6	2569.49			2617.21	135.20	1.02	0.778	not regulated			
AT1G70840	MLP31 / MLP-like protein 31	not denoted	20.2.99	stress.abiotic.unspecified	30.7076			446.622			57.1302			178.15	190.14	84.3689	28.531	27.135		436.204		76.6644	111.845				127.54	141.30	0.72	0.704	not regulated			
AT1G54410	dehydrin family protein	cytosol	20.2.99	stress.abiotic.unspecified											1298.48					5552.2	3630.02	5237.94				3929.66	1685.02			only in MG132				
AT3G26460	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport	not denoted	20.2.99	stress.abiotic.unspecified																53.9021		42.2302				44.58	6.85			only in MG132				
AT5G20630	GLP3, GLP3A, GLP3B, ATGER3, GER3 / germin 3	extracellular	20.2.99	stress.abiotic.unspecified																		277.052					213.34	67.78			only in MG132			
AT1G14940	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport	not denoted	20.2.99	stress.abiotic.unspecified																							150.39	47.54			only in MG132			
AT4G35220	AHM4 / Thioesterin superfamily protein	plastid	21.1	redox.thioesterin	502.032	369.159	518.16			247.581	514.777	286.776	312.174	392.95	108.18	366.401	333.737	564.834	237	394.262	124.58	325.71	361.124				336.46	118.26	0.86	0.404	not regulated			
AT2G17420	NTRA, ATNTRA, NTR3 / NADPH-dependent	cytosol	21.1	redox.thioesterin	454.299	567.655	400.936	334.316	610.156	460.204	436.949	426.262	468.785	495.49	80.55	505.23	474.889	430.192	478.89	369.044	1621.56	451.516	284.271	309.308			547.21	386.75	1.10	0.716	not regulated			
AT3G15360	AHM4, TRX-M4, ATM4 / thioesterin M-type 4	plastid	21.1	redox.thioesterin	151.705	126.069	251.283	228.591						189.41	51.95																only in DMSO			
AT5G42980	ATTRX3, ATH3, ATTRX43, TRX43, TRX3 /	cytosol	21.1	redox.thioesterin	58584.71	7173.15	8465.43	5651.9	4536.25	8852.75	3324.03	5393.39	4338.49	6257.79	1950.17	4882.33	8660.26	6998.25	7945.24	9093	4736.59	6385.01	6199	7092.93			6888.07	1435.81	1.10	0.472	not regulated			
AT1G45145	ATTRX5, ATH5, LV1, TRX5 / thioesterin H-type 5	cytosol	21.1	redox.thioesterin											382.793	357.666	239.625					197.175					235.23	71.07			only in MG132			
AT4G04950	thioesterin family protein	cytosol	21.1	redox.thioesterin											68.9894						66.4232		85.7711				73.73	8.58			only in MG132			
AT4G24470	ATPD1L-1, UNES, MEE30, PDH1, ATPD11 /	endoplasmic reticulum	21.1.1	redox.thioesterin.PDIL	1045.3	893.212	794.163	1185.53	901.334	1044.29	839.617	807.915	1907.73	1046.57	328.13	935.651	1017.2	854.141	1059.59	1004.79	1784.69	1425.55	1022.91	2971.94			1341.83	638.02	1.28	0.261	not regulated			
AT4G24470	ATPD1L-1, UNES, MEE30, PDH1, ATPD11 /	endoplasmic reticulum	21.1.1	redox.thioesterin.PDIL	1185.71	1516.21	1311.65	1480.63	1512.87	1030.71	1281.24	1328.67	1251.33	1322.47	181.60	1385.01	1180.56	1385.92	1172.52	1084.98			1258.46	1054.63	1178.12			1245.31	135.14			not regulated		
AT1G77510	ATPD1L-2, PD16, ATPD16, PD1L2 / PD1-like 1-2	endoplasmic reticulum	21.1.1.1	redox.thioesterin.PDIL	136.669	321.16	374.977	269.846	305.842	345.868	385.771	270.2	357.08	329.72	39.47	371.67	365.545	334.477	355.465	345.772	405.285	278.377	474.458	304.455			367.72	51.85	1.12	0.118	not regulated			
AT5G06640	ATPD1L-4, PD12, ATPD12, PD1L4 / PD1-like 1-4	endoplasmic reticulum	21.1.1.1	redox.thioesterin.PDIL	371.858	307.297	387.867	358.048		347.926	498.185	419.534	216.055	363.75	76.34	250.179	390.357	304.477	565.501	461.401			396.006	346.815	408.837			391.08	89.57	1.08	0.544	not regulated		
AT2G32920	ATPD1L-3, PD19, ATPD19, PD1L3 / PD1-like 2-3	endoplasmic reticulum	21.1.1.1	redox.thioesterin.PDIL	246.655	194.974				375.381	371.648	260.864	294.361	290.65	65.49	275.909	263.166	260.146	268.833	316.916			328.707	332.235			292.27	29.83	1.01	0.958	not regulated			
AT3G54260	ATPD1L-3, PD11, ATPD11, PD1L3 / PD1-like 1-3	plastid	21.1.1.1	redox.thioesterin.PDIL											220.805	309.565						623.817	213.835				414.70	210.44			only in MG132			
AT5G48810	ATBS-8, BS #3, ATCB5-D, CBS-D / cytochrome B5	endoplasmic reticulum	21.2	redox.ascorbate and glutathione	249.722	246.904	486.105	203.528		182.019	173.123	247.678		490.42	83.57	425.374	436.642	465.583	388.949	443.17			594.468				478.68	76.62	0.98	0.804	not regulated			
AT3G48890	ATMP2, ATMAP3, MSP2, MAP3 / membrane	peroxisome	21.2	redox.ascorbate and glutathione	1019.51	1049.46	985.784	993.567	1177.4	1008.2	946.384	1108.14	1382.11	1082.20	126.15	1410.83	1176.16	1308.55	1164.43	1018.14	994.858	1415.67	1528.05	1434.09			1273.31	181.86	1.18	0.207	not regulated			
AT5G24440	MSP1, ATMP1, ATMAP5 / membrane steroid	plasma membrane	21.2	redox.ascorbate and glutathione	103.241	120.621			195.859	92.9542	93.4566			121.23	38.64	119.829	126.688	141.589	117.801								126.50	9.31	1.04	0.812	not regulated			
AT3G29200	ATMAP2, MAP2 / membrane-associated	cytosol	21.2	redox.ascorbate and glutathione	700.164	750.559	759.776	725.007	676.149	592.019	832.666	672.141	609.211	697.84	38.33	676.409	684.586																	

AT4G09320	NDPK1 / Nucleoside diphosphate kinase family	cytosol	23.4.10	nucleotide metabolism.phosphotransfer	1902.65	2205.78	1947	2474.25	2869.96	2015.68	2534.49	2266.87	2795.01	2334.73	336.42	3069.07	1982.13	1122.86	2244.71	1984.7	2921.78	2430.74	2423.89	2575.79	2306.18	294.96	0.99	0.859	not regulated				
AT4G11010	NDPK3 / nucleoside diphosphate kinase 3	plastid	23.4.10	nucleotide metabolism.phosphotransfer	934.921	974.803	904.609	1153.38	4225.26	2938.01	978.209	1647.45	1425.2	1686.87	1082.19	976.299	1930.7	959.207	1140.02	1118.55	1235.86	1167.91	1369.49	1186.45	1231.61	273.74	0.73	0.266	not regulated				
AT4G23900	Nucleoside diphosphate kinase family protein	mitochondrion	23.4.10	nucleotide metabolism.phosphotransfer				35.426	70.2		263.201			122.94	100.19	19.6544		119.604	49.2903	74.7083				68.88	33.76	0.56	0.374	not regulated					
AT5G63310	NDPK2, NDPK1A, NDPK1A IA, NDPK1A, ATNDPK2	plastid	23.4.10	nucleotide metabolism.phosphotransfer	202.109			139.094		99.4164		156.766		149.35	36.87	133.337	203.002	152.078	96.2495			107.248	72.263		127.38	42.39	0.85	0.471	not regulated				
AT5G62667	PYR6 / P-loop containing nucleoside triphosphate	cytosol	23.4.3	nucleotide metabolism.phosphotransfer		224.422	647.581				192.809	80.2386		286.26	21.38	167.523		320.314		127.311			94.323		177.30	86.39	0.62	0.447	not regulated				
AT4G01050	ATP9A1, PPK1 / pyrophosphorylase 1	cytosol	23.4.9.99	nucleotide metabolism.phosphotransfer	283.173	254.618		1069.42			577.359	345.519		506.02	303.89	393.127		397.408	246.913		245.313			320.69	74.59	0.63	0.328	not regulated					
AT5G64500	ATP9B, PPK2 / pyrophosphorylase 2	cytosol	23.4.9.99	nucleotide metabolism.phosphotransfer	609.437	471.685	511.237			420.979	410.284	460.075		39.79	30.79	335.995	487.327	402.462	358.202	510.631		429.978	454.209	455.362	465.61	62.46	1.00	0.975	not regulated				
AT4G86900	ATXCE12, CKE12 / alpha/beta-Hydrolase	cytosol	24.1	Biodegradation of Xenobiotics	414.366	324.526	311.112		119.815	333.212		238.438		290.25	191.83	374.358	279.711	110.422	210.705	137.735		241.822	209.706		237.78	68.35	0.82	0.302	not regulated				
AT4G53580	GLX2-3, ETHE1, GLY3 / glyoxalase II 3	not denoted	24.1	Biodegradation of Xenobiotics						234.657		140.982		206.55	39.98	286.624	329.875	177.112	280.458	240.401		212.401	197.365		259.75	42.60	1.26	0.099	not regulated				
AT3G10850	GLX2-2, GLY2 / Metallo-hydroxalase/oxidoreductase	cytosol	24.1	Biodegradation of Xenobiotics											97.9141	101.97	172.039	120.079				158.888	161.059		136.16	30.82	1.36	0.202	only in MG132				
AT1G67280	Glyoxalase/Blotomycin resistance	plastid	24.2	Biodegradation of Xenobiotics	195.723	144.786	105.453		155.011		109.141	347.134	153.194	114.128	171.70	70.91	89.1918	133.64	200.106	312.689	106.537	322.958	25.369	217.583	216.526	313.95	372.73	1.83	0.334	not regulated			
AT4G11840	ATGLX1, GLX1 / glyoxalase I homolog	cytosol	24.2	Biodegradation of Xenobiotics	1676.716	1334.89	1655.75	1381.13	1216.24		1558.56	637.624	1445.27	1666.31	1396.95	30.09	5305.85	1798.76	1387.48	1863.31	1767.26	837.822	1583.33	2142.59	1743.88	1625.59	3406.15	1.16	0.183	not regulated			
AT4G41530	ATSGFN, SFGH / S-formylglutathione hydrolase	plastid	25	Biodegradation of Xenobiotics	808.018		606.883	835.623		580.224	794.432	632.305	1654.65	844.56	344.99	794.817	729.735	413.868	676.099	644.778		779.627	650.827	762.195	731.44	62.36	0.87	0.412	not regulated				
AT4G13930	SHM4 / serine hydroxymethyltransferase 4	cytosol	25.1	C1-metabolism.glycine	1514.57	1540.32	1546.18	2024.07	2089.42	1756.04	2186.34	1879.79	1897.73	1803.39	241.15	1489.78	1432.04	1518.76	1697.97	1553.25	1888.77	1455.97	1552.92	1702.86	1588.03	139.20	0.88	0.044	not regulated				
AT4G13890	SHM5, EDA36, EDA37 / Pyridoxal phosphate (PLP)-	not denoted	25.1	C1-metabolism.glycine		25.6396	32.057	36.832		151.074		43.1177	126.512	69.21	49.99					443.443		128.224	134.377		235.35	147.17	0.84	0.204	not regulated				
AT4G37930	SHM1, STM1, SHMT1 / serine	mitochondrion	25.1	C1-metabolism.glycine	542.037	275.018	737.15	595.315	1044.96	857.104	364.184	251.089	352.792	557.74	261.25	870.914	511.835	371.537	435.737	477.923		203.105	127.691	211.376	401.26	221.05	0.72	0.233	not regulated				
AT5G26780	SHM2 / serine hydroxymethyltransferase 2	mitochondrion	25.1	C1-metabolism.glycine	53.6035	410.368		157.17	66.8965	163.222	764.868	517.642		304.82	247.75	93.6744	139.482	43.4346	169.854	204.631		119.407	100.723		124.41	49.02	0.41	0.106	not regulated				
AT5G14780	FDH / formate dehydrogenase	mitochondrion	25.10	C1-metabolism.formate dehydrogenase	3932.39	4179.08	3857.09	3309.83	2347.75	2922.49	2527.96	2591.27	2027.47	3080.59	738.12	2099.21	3713.28	3655.65	2759.39	2563.51	2348.85	2458.44	2993.77	3733.39	3025.05	520.32	0.98	0.863	not regulated				
AT5G10480	THFS / 10-formyltetrahydrofolate synthetase	cytosol	25.2	C1-metabolism.formate dehydrogenase	623.353	880.993	807.209	830.677	515.32	885.234	622.222	765.32	611.756	760.91	133.03	623.857	825.623	814.156	679.502	752.309	614.587	878.719	758.38	948.873	791.18	96.67	1.04	0.610	not regulated				
AT3G12280	Amino acid dehydrogenase family protein	cytosol	25.5	C1-metabolism.Methylenetetrahydrofolate	486.613	254.979	363.991	284.154	288.371	377.654	1072.78	413.427	91.2173	403.80	259.06	328.717	470.425	195.017	258.843	358.847	326.342	1058.72	404.355	284.697	405.57	241.63	1.01	0.964	not regulated				
AT5G59970	MTHFR1 / methyltetrahydrofolate reductase 1	cytosol	25.6	C1-metabolism.Methylenetetrahydrofolate	157.505	585.313	663.734	582.361	790.931	704.042	812.249	463.059	525.405	632.34	113.81	546.955	531.279	486.01	333.598	619.337	458.233	373.673	358.71	607.006	477.44	100.08	1.76	0.401	not regulated				
AT2G44160	MTHFR2 / methyltetrahydrofolate reductase 2	cytosol	25.6	C1-metabolism.Methylenetetrahydrofolate	551.592	557.615	682.684	632.584	555.404	452.621	584.725		482.24	143.96	590.521	484.27	289.988	596.21	682.515	1393.41	500.16	253.238			591.23	301.13	1.23	0.402	not regulated				
AT4G21580	oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family	cytosol	26.1	misc.msc2	187.492		226.501			337.187	310.848	224.935		257.39	56.78	239.246		181.099	161.26		233.207	305.426	1373.66	415.65	430.90	1.61	0.480	not regulated					
AT4G21520	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	cytosol	26.1	misc.msc2	305.915		437.654	264.563	575.819	184.319	264.297		338.76	130.36	571.036	592.806	428.934	580.627	482.828	528.816	413.803	549.23			518.51	64.66	1.53	0.009	sig. up regulated				
AT3G26300	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	cytosol	26.1	misc.msc2	1081.15	886.172	1020.79	903.8	461.404	879.05		1029.91	1135.42	925.52	196.06	1171.62	864.659	913.765	678.407	842.923	809.343	114.157	1263.59	1067.53	972.60	184.68	1.05	0.639	not regulated				
AT4G22710	CYP70A1 / cytochrome P450, family 70B,	endoplasmic reticulum	26.10	misc.cytochrome P450	551.092	452.452	572.024	933.697	745.601				702.88	165.11	545.574	490.279	569.762	492.285				1890.334	872.385	582.011	981.989	326.57	1.07	0.738	not regulated	only in DMSO			
AT3G20100	CYP70A2 / cytochrome P450, family 70B,	not denoted	26.10	misc.cytochrome P450	72.306	196.661	126.413	84.964		215.7		124.241		44.87	54.46																		
AT4G15380	CYP70A4 / cytochrome P450, family 70B,	not denoted	26.10	misc.cytochrome P450																													
AT4G13110	CYP71B7 / cytochrome P450, family 71, subfamily	endoplasmic reticulum	26.10	misc.cytochrome P450																													
AT5G25130	CYP71B12 / cytochrome P450, family 71, subfamily	not denoted	26.10	misc.cytochrome P450																													
AT5G43940	HOT5, ADH2, GSNOR, ATGSOR1, PAR2 / GroES-	not denoted	26.11	misc.alcohol dehydrogenases	1348.26	1510.48	1402.35	1478.73	1567.93	1314.36	1706.47	1288.47	1647.12	1473.80	139.46	3551.89	1365.66	1510.62	1163.23	1146.87	1485.24	1322.1	1427.31	1656.27	1403.24	162.03	0.95	0.364	not regulated	only in MG132			
AT5G19440	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	cytosol.golgi	26.11.1	misc.alcohol dehydrogenases.cinnamyl	214.953	111.564	263.519			160.179	257.302	378.58		231.02	82.72	182.842	250.865	207.78	192.477	273.21		380.006	279.745	433.565	275.06	84.11	1.19	0.388	not regulated				
AT3G28200	Peroxidase superfamily protein	extracellular	26.12	misc.peroxidases	413.623		262.126			259.803		241.39		244.24	19.41	307.758	127.668	195.19				149.779	127.31		249.00	46.03	1.70	0.033	not regulated				
AT4G08770	Prx37 / Peroxidase superfamily protein	extracellular	26.12	misc.peroxidases	151.249	156.363				183.913		94.633		145.54	32.44					183.916	280.553	282.538			249.00	46.03	1.70	0.033	not regulated				
AT4G91220	Prx37 / Peroxidase superfamily protein	extracellular	26.12	misc.peroxidases	177.28	853.9	977.378	1077.168	668.918	1036.99	951.254	1231.41	980.267	913.72	161.91	827.812	856.675	985.864	1022.12	1296.24													

AT3G1710	ATRS-1 / Yxyf-RNA synthetase 1	cytosol	29.1.6	protein.aa activation,lysine-tRNA ligase	273.373	420.485	255.61	331.866	278.683	432.172	367.291	322.78	69.25	163.538	272.089	238.313	212.973	205.829	195.189	214.66	33.99	0.67	0.008	sig. down regulated								
AT1G5020	ALATS_ACD / Alanyl-RNA synthetase	plastid	29.1.7	protein.aa activation,alanine-tRNA ligase	344.373	508.565	1439.37	518.339	583.151	539.569	757.268	609.281	453.138	639.23	302.10	537.556	450.046	507.275	482.467	425.5	405.444	656.751	495.07	74.07	0.77	0.269	not regulated					
AT1G14610	TWN2_VALRS / valyl-RNA synthetase / valine--	cytosol	29.1.9	protein.aa activation,alanine-tRNA ligase			295.825	220.603		294.209	196.014	232.984	247.93	40.10	527.607	242.482	128.474	475.256	507.023	367.901	472.298	388.71	140.57	1.77	0.674	not regulated						
AT3G27850	RLP12-C / ribosomal protein L12-C	plastid	29.2.1.1.1.2.10	protein.synthesis.ribosomal	859.824	2381.82	1073.85	2059.23	1289.81	791.554	253.031	1638.51	749.28	1743.59	6378.659	63.583	2135.78		877.679	634.735	469.614	916.88	558.83	1.06	0.192	not regulated						
AT1G08360	Ribosomal protein L1p/L10 family	cytosol	29.2.1.1.3.2.10	protein.synthesis.ribosomal	832.878	865.379	681.74	1056.25	1891.4	1555.39	263.503	1320.74	2955.17	1720.49	749.97	1715.14	902.276	259.635	2050.61	1474.2	3487.15	746	1560.09	3041.22	1733.02	396.21	1.36	0.202	not regulated			
AT5G2650	RNA binding Plectin/S10 domain-containing protein	cytosol	29.2.1.2.1.10	protein.synthesis.ribosomal			492.679		1314.34	1171.58		1045.67	854.292	975.71	284.93																	only in DMSO
AT5G15210	RNA binding Plectin/S10 domain-containing protein	cytosol	29.2.1.2.1.10	protein.synthesis.ribosomal	347.56	330.868	3055.09			134.782		422.849	359.026	360.30	38.24	370.867	428.532	350.766	477.196	460.226	820.161	465.866	408.235	416.43	65.80	1.10	0.285	not regulated				
AT5G24740	Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gad64s family	cytosol	29.2.1.2.1.10	protein.synthesis.ribosomal	969.619	634.614	1015.09		995.049		850.84		893.04	141.95	87.9	928.297	989.764	1284.172	115.4	946.886	824.184	461.228	933.57	227.40	1.05	1.00	0.748	not regulated				
AT5G23740	RP511-BETA / ribosomal protein S11-beta	cytosol	29.2.1.2.1.11	protein.synthesis.ribosomal	905.962	532.361	450.154	676.49	257.785	812.622	611.101	392.777	206.447	438.36	212.45	1526.42	956.113	585.529	740.279	463.479	399.042	363.523	1280.45	785.35	403.13	1.79	0.051	not regulated				
AT3G4890	EMB1080 / Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein	cytosol	29.2.1.2.1.11	protein.synthesis.ribosomal	1021.75	1118.15	932.625	1645.79	1811.1	807.051	1672.641	1013.47	1417.94	1248.95	330.38	131.547	797.754	120.24	1259.59	881.935	1927.83	938.26	1008.12	990.93	488.65	0.79	0.245	not regulated				
AT4G3080	Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein	cytosol	29.2.1.2.1.11	protein.synthesis.ribosomal			104.227	472.619	837.15	809.848	448.755	615.986	345.657	562.66	181.76	601.407	767.983	730.622	631.962	1961.87	562.408	807.614	311.417	796.91	453.49	1.42	0.264	not regulated				
AT1G5930	Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gad64s family	cytosol	29.2.1.2.1.12	protein.synthesis.ribosomal	1287.61	1311.65	111.28	1349.84	1239.21	1299.55	1245.5	1253.05	1798.4	1321.90	178.80	1202.85	1075.71	1233.51	1329.49	1101.69	1292.4	1194.03	459.338	1627.95	1168.55	293.34	0.88	0.226	not regulated			
AT3G2060	Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gad64s family	cytosol	29.2.1.2.1.12	protein.synthesis.ribosomal	872.116	1367.83	1255.37	1492.66	1759.54	1161.29	1874.66	848.906	701.66	1237.12	415.27	1252.1	1413.87	1403.99	1502.79	1464.22	3819.62	1095.77	1188.4	1445.22	216.36	1.17	0.247	not regulated				
AT4G0210	ATRP513A_RP513_P12 / RP513A / ribosomal	cytosol	29.2.1.2.1.13	protein.synthesis.ribosomal	1405.96	1484.17	1308.11	2595.49	1775.41	1485.88	627.066	1483.61	1593.4	1412.12	302.87	271.89	1133.52	1300.55	1475.29	1353.62	1630.42	1153.28	1163.47	2293.50	182.71	0.82	0.82	0.357	not regulated			
AT2G36160	Ribosomal protein S11 family protein	cytosol	29.2.1.2.1.14	protein.synthesis.ribosomal	2369.6	2513.94	3311.07		3562.36	2469.12	3384.65	2663.52	2862.07	504.24	2027.08	585.416	2329.06	2552.63	3648.49	2528.43	2054.35	2841.53	2340.75	693.73	0.82	0.141	not regulated					
AT1G04270	RP515 / cytosolic ribosomal protein S15	cytosol	29.2.1.2.1.15	protein.synthesis.ribosomal	409.227	472.619	837.15		809.848				562.66	181.76	601.407	767.983	730.622	631.962	1961.87	562.408	807.614	311.417	796.91	453.49	1.42	0.264	not regulated					
AT5G0950	Ribosomal protein S19 family protein	not denoted	29.2.1.2.1.15	protein.synthesis.ribosomal											47.7423	78.3551	21.73	1389.39		54.4911			356.74	618.84						only in MG132		
AT5G1830	Ribosomal protein S5 domain 2-like superfamily	cytosol	29.2.1.2.1.15	protein.synthesis.ribosomal	2593.61	1009.5	2446.72	916.779	1376.14	3062.71	167.685	812.364	869.122	1473.69	929.06	1335.75	893.19	1395.95	1537.74	2829.87	1225.41	1608.34	2597.5	1093.88	1617.07	624.79	1.10	0.720	not regulated			
AT1G0160	Ribosomal S17 family protein	cytosol	29.2.1.2.1.17	protein.synthesis.ribosomal			1141.18	1136.99	9476.55	1930.77	1184.61	1438.44	1092.01	1342.31	218.19	1045.98	1015.24	1083.66	1332.53	1700.24	1125.51	1155.54	1573.6	1249.93	228.60	0.93	0.476	not regulated				
AT1G2780	PF1_RP518A_P11 / Ribosomal protein S13/S18	cytosol	29.2.1.2.1.18	protein.synthesis.ribosomal	2839.51	3265.49	3476.59	3514.18	2330.27	3883.74	2777.2	3934.25	621.23	3181.27	524.47	2397.51	2885.57	3007.91	3349.47	3936.9	2394.29	2556.63	3335.34	3441.58	3138.89	425.03	0.99	0.863	not regulated			
AT3G0280	Ribosomal protein S19e family protein	cytosol	29.2.1.2.1.19	protein.synthesis.ribosomal	987.854	600.838	844.238		743.684	1011.99		347.294	755.98	238.34	591.7	809.918	617.42	738.077	1139.46	847.895	484.246	913.944	536.919	735.50	178.33	0.97	0.867	not regulated				
AT5G61170	Ribosomal protein S19e family protein	cytosol	29.2.1.2.1.19	protein.synthesis.ribosomal	160.403	434.368	609.076	362.859	664.507	827.325	342.256	612.981	520.54	218.86	130.58	387.133	63.472	470.044	112.47	607.646	695.091	163.11	516.44	295.39	0.97	0.975	not regulated					
AT5G15520	Ribosomal protein S19e family protein	cytosol	29.2.1.2.1.19	protein.synthesis.ribosomal											139.366		110.414		751.891				330.56	298.03						only in MG132		
AT2G41840	Ribosomal protein S5 family protein	cytosol	29.2.1.2.1.2	protein.synthesis.ribosomal	1825.91	2137.38	1862.39	2000.23	2973.82	1905.21	2229.21	2107.89	2617.86	2184.43	359.82	2089.88	2000.21	1873.4	1931.01	2125.37	2768.62	1425.51	2071.6	1747.15	2003.64	3391.02	0.92	0.316	not regulated			
AT5G9830	XW6 / Ribosomal protein S5 family protein	cytosol	29.2.1.2.1.2	protein.synthesis.ribosomal	1707.67	1153.72	73.45	2768.25	1210.95	1823.97	1131.5		1337.96	846.65	1026.68	874.439	1152.94	1054.45	420.979	1783.69	1663.964	667.009	959.48	362.65	0.97	0.847	not regulated					
AT3G4730	Ribosomal protein S10e/S20e family protein	cytosol	29.2.1.2.1.2	protein.synthesis.ribosomal	2579.63	2674.79	2316.46	2788.23	1033.66	2065.79	361.118	3068.08	1803.39	2030.64	655.50	1786.24	2419.63	975.974	2102.99	2794.63	1783.84	2989.57	1319.2	2746.61	2148.86	664.05	1.04	0.184	not regulated			
AT3G260	Ribosomal protein S10e/S20e family protein	cytosol	29.2.1.2.1.2	protein.synthesis.ribosomal	403.919	470.323	386.405		315.693	1148.29		240.50	321.69	99.50	415.18	347.754	464.467	1177.87	556.126				713.461	250.32	670.08	214.92	1.10	0.606	not regulated			
AT3G0420	Ribosomal protein S24e family protein	cytosol	29.2.1.2.1.24	protein.synthesis.ribosomal	1378.61	1154.1	996.826	960.834	855.443	1351.41		858.819	369.434	994.1	301.84	731.404	974.402	1049.09	1330.92	1161.57	503.94	492.579	906.586	893.81	281.27	1.00	0.529	not regulated				
AT3G28060	Ribosomal protein S24e family protein	cytosol	29.2.1.2.1.24	protein.synthesis.ribosomal	995.33	880.458	1075.82	968.888	1099.55	878.573	958.371	564.768	940.619	925.36	92.54	787.577	689.807	685.826	802.729	811.36	1248.17	659.167	54.5863	975.845	747.00	295.77	0.81	0.127	not regulated			
AT2G1580	Ribosomal protein S25 family protein	cytosol/nucleus	29.2.1.2.1.25	protein.synthesis.ribosomal	1108.78	1683.58	1675.82		2532.39	688.787	1727.07	1487.01	2420.37	1665.47	572.42	1315.78	1095.56	1243.94	1452.12	1261.86	2530.72	1160.59	264.149	2157.91	1386.96	609.63	0.83	0.378	not regulated			
AT3G4550	Ribosomal protein S25 family protein	cytosol/nucleus	29.2.1.2.1.25	protein.synthesis.ribosomal	76.1279	1994.85	405.512	2284.83		656.765		149.783		927.98	881.01					212.349	461.297	21.129	189.91	270.22	1110.19	0.29	0.221	not regulated				
AT3G3920	Ribosomal protein S25 family protein	cytosol/nucleus	29.2.1.2.1.25	protein.synthesis.ribosomal	1106.24				220.706	573.225		1146.09		828.56	377.61	1141.27	925.103	1109.11	1178.19	1160.03		1217.56	665.374	2334.19	1216.35	455.48	1.47	0.171	not regulated			
AT3G5460	Ribosomal protein S26 family protein	cytosol	29.2.1.2.1.26	protein.synthesis.ribosomal	957.745	1073.91	834.029	1127.04	1255.14	1020.44		1033.59	1160.21	1057.76	120.74	1048.06	974.034	986.775	1041.8	889.568	1259.08	905.229	932.574	1008.49	1005.06	104.13	0.95	0.378	not regulated			
AT1G23410	Ribosomal protein S27a / Ubiquitin family protein	cytosol	29.2.1.2.1.27	protein.synthesis.ribosomal			1825.64		204.722	2595.8		130.44	2095.74	427.82																	only in DMSO	
AT2G45710	Zinc-binding ribosomal protein family protein	cytosol	29.2.1.2.1.27	protein.synthesis.ribosomal	789.087	944.83	811.386	781.728	706.693	730.936		892.592	900.504	819.73	79.54	607.967	906.94	1098.5	1206.52	1069.45	1103.68			1034.50	201.30	1.26	0.023	not regulated				
AT3G47930	Zinc-binding ribosomal protein family protein	cytosol	29.2.1.2.1.27	protein.synthesis.ribosomal			755.897	702.307		664.507	196.68	723.121	608.50	208.04	618.57	708.206	620.703	610.523					737.99	132.10	1.21	0.372	not regulated					
AT3G1090	Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein	cytosol	29.2.1.2.1.28	protein.synthesis.ribosomal										1234.96	697.90			1894.47		1498.78	1099.11			1497.45	324.70	1.21	0.631	not regulated				
AT3G43880	Ribosomal protein S14p/S29e family protein	cytosol/nucleus	29.2.1.2.1.29	protein.synthesis.ribosomal	384.309	321.988	369.41																									

AT1G69620	RPL34 / ribosomal protein L34	cytosol	29.2.1.2.2.34	protein.synthesis.ribosomal	796.396	800.151	962.22	1058.74	1112.64	829.009	967.611	1171.761	932.30	117.87	757.462	727.508	744.862	825.98	965.525	1380.95	781.057	903.668	937.789	891.64	191.54	0.96	0.651	not regulated	
AT2G39390	Ribosomal L29 family protein	cytosol	29.2.1.2.2.35	protein.synthesis.ribosomal	557.205	503.04		436.066					417.02	141.96	123.612		274.826	462.851						287.11	138.76	0.69	0.364	not regulated	
AT3G09500	Ribosomal L29 family protein	cytosol	29.2.1.2.2.35	protein.synthesis.ribosomal			791.267			900.343	650.592	780.924	783.03	197.61	550.336		558.67		809.68	583.009	670.791			634.50	97.46	0.81	0.079	not regulated only in MG132	
AT5G02610	Ribosomal L29 family protein	cytosol	29.2.1.2.2.35	protein.synthesis.ribosomal												508.736	403.686					106.092	429.122	361.91	152.70				
AT5G53740	Ribosomal protein L36e family protein	plastid	29.2.1.2.2.36	protein.synthesis.ribosomal	930.956	977.595	865.378	1544.63	1226.79	939.129	700.136	1064.5	1031.14	240.18	1089.99	810.107	1068.05	1363.3	937.074	1511.62	1086.44	1148.89	1135.54	1127.89	196.44	1.09	0.405	not regulated	
AT1G52300	Zinc-binding ribosomal protein family protein	cytosol	29.2.1.2.2.37	protein.synthesis.ribosomal	692.148	744.447	805.005	496.371	450.166	522.324	635.203	653.706	624.96	117.14	508.364	754.348	263.123	666.217	617.168	597.449	521.613	636.645		569.87	136.87	0.91	0.432	not regulated	
AT3G43660	Ribosomal protein L40e family protein	cytosol	29.2.1.2.2.38	protein.synthesis.ribosomal	787.925	845.455	716.732	1268.8	1082.3	873.755	602.279		911.03	180.38	816.453	1080.15	837.766	1060.61	706.76	771.227	453.375	543.434	814.045		686.27	206.87	0.87	0.288	not regulated
UBIQUITIN SUPERGROUP:Ribosomal protein L40e		cytosol/nucleus	29.2.1.2.2.40	protein.synthesis.ribosomal		357.31	405.898	404.642					389.28	22.14	389.28	973.373	838.031		339.204					1831.87	194.62	4.71	0.337	not regulated	
AT3G59740	OL17, RPL59 / ribosomal protein L5 B	cytosol	29.2.1.2.2.25	protein.synthesis.ribosomal	636.005		839.998	833.523					745.52	92.27	389.178	995.635	654.452	730.79	549.655	472.711				598.74	142.31	0.80	0.142	not regulated	
AT3G52520	OUT5, PGY5, OLU5, RPL5A / ribosomal protein L5	cytosol	29.2.1.2.2.25	protein.synthesis.ribosomal	1311.32	2035.95	1103.41	1515.45	1565.19	2202.02	715.979	1125.16	1098.85	1422.15	1311.31	1839.53	1005.03	1289.78	1287.54	1488.09	1079.01	948.36	1529.55	1318.69	256.24	0.93	0.575	not regulated	
AT2G27530	PGY1 / Ribosomal protein L1p/L10e family	cytosol	29.2.1.2.2.510	protein.synthesis.ribosomal	1334.46	1852.1	1811.01	1696.25	1584.42	812.873	413.475	1615.77	3086.7	1656.56	598.015	1899.16	1395.35	2147.57	1140.22		1312.99	1309.58	3205.97	1624.61	742.61	0.98	0.928	not regulated	
AT4G13170	Ribosomal protein L13 family protein	cytosol	29.2.1.2.2.513	protein.synthesis.ribosomal	34.841	38.5921		83.8193	115.227	119.347			64.37	30.74		510.417	543.308	596.477				120.687		320.47	236.12	0.98	0.072	not regulated	
AT3G24830	Ribosomal protein L13 family protein	cytosol	29.2.1.2.2.513	protein.synthesis.ribosomal	1051.61	1172.15	1101.329	1008.79	1100.23	867.117	1055.82	764.518	978.82	137.40	885.674	643.081	1190.91	760.508	918.992	1186.7	619.888	669.044		859.35	215.48	0.86	0.236	not regulated	
AT3G07110	Ribosomal protein L13 family protein	cytosol	29.2.1.2.2.513	protein.synthesis.ribosomal	59.8217	37.5512	61.1425	116.425	144.726	397.201	620.185	433.96	956.361	65.58	25.970	431.563	114.755	54.3372						385.59	85.30	0.87	0.071	not regulated	
AT3G14600	Ribosomal protein L18Ae/LX family protein	cytosol	29.2.1.2.2.518	protein.synthesis.ribosomal	1389.23	1632.85	1360.32	1749.32	1517.65	1603.65	1495.54	1175.43	1585.22	1494.36	1390.84	1001.16	1374.21	1399.81	1197.21		991.586	570.226		1126.43	276.19	0.75	0.008	not regulated	
AT2G34480	ATRPL23A, RPL23A, RPL23AA / ribosomal protein	cytosol	29.2.1.2.2.518	protein.synthesis.ribosomal	1947.55	2185.5	1807.32	2494.02	3038.1	2121.38	2423.57	2436.33	3862.24	2943.59	1947.54	1863.62	2046.06	2399.11	1961.94	2372.46	2322.81	2132.03	2318.78		2152.70	129.05	0.86	0.141	not regulated
AT2G3290	RPL27A, RPL27AB / Ribosomal protein L18e/L15	cytosol	29.2.1.2.2.527	protein.synthesis.ribosomal	1814.87	1919.4	1785.32	2208.86	2591.46	224.59	977.502	1841.99	1221.91	1845.10	1471.1	1393.98	1766.4	2183.81	1915.08	2175.67	1565.69		664.645	869.238	1521.21	488.50	0.82	0.231	not regulated
AT3G55750	Ribosomal protein L35Ae family protein	cytosol	29.2.1.2.2.535	protein.synthesis.ribosomal	363.758	80.9879		444.405		387.59			319.19	140.61	232.572	253.995	260.034		211.179					263.48	34.42	0.83	0.500	not regulated	
AT3G10950	Zinc-binding ribosomal protein family protein	cytosol	29.2.1.2.2.537	protein.synthesis.ribosomal	645.834	700.594	693.516		919.722	782.081		806.428	936.647	784.35	103.93	539.261	693.116	773.26		771.85	906.375	778.265	874.303	774.00	117.18	0.99	0.880	not regulated	
AT2G6245	Zinc-binding ribosomal protein family protein	cytosol	29.2.1.2.2.537	protein.synthesis.ribosomal																				727.74	26.65	0.99	0.589	only in MG132	
AT2G62870	Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gad45f5 family	cytosol	29.2.1.2.2.57	protein.synthesis.ribosomal	1068.71	1445.01	1343.25	1351.41	1580.3	1277.77	1860.42	1457.22	1938.02	235.23	1043.63	1300.14	1266.21	1157.93	1948.06	1369.12	1265.09	1355.2		1332.26	234.87	0.95	0.897	not regulated only in DMSO	
AT2G47610	Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gad45f5 family	cytosol	29.2.1.2.2.57	protein.synthesis.ribosomal	410.149		306.755	613.392		511.361			672.42	436.15															
AT1G74050	Ribosomal protein L6 family protein	cytosol	29.2.1.2.2.6	protein.synthesis.ribosomal	691.441	601.023	1539.37	554.982	464.166	782.005	254.725	615.858	442.570	660.68	442.57	558.354	1600.94	538.317	615.884	981.499	1810.61	748.01	678.399	473.94	889.55	460.46	1.35	0.276	not regulated
AT1G8540	Ribosomal protein L6 family protein	cytosol	29.2.1.2.2.6	protein.synthesis.ribosomal	1609.7	1658.77	2054.19	1954.4	2288.8	1725.55	436.865	1817.37	1779.02	1648.68	1579.5	1805.5	1707.67	1802.86	1902.56	2088.75	1757.59	1796.66	1837.72	1810.24	126.79	1.10	0.365	not regulated	
AT2G02150	Ribosomal protein L30/L7 family protein	cytosol	29.2.1.2.2.7	protein.synthesis.ribosomal	1787.76	1954.84	1652.39	2096.73	1053.87	2486.76	1085.39	2195.06	1167.32	779.86	528.45	941.859	1702.79	1631.62	1942.34	2368.94	993.631	1110.89	1325.141	1492.45	443.34	0.83	0.228	not regulated	
AT2G44120	Ribosomal protein L30/L7 family protein	cytosol	29.2.1.2.2.7	protein.synthesis.ribosomal	758.062	670.989	728.122	841.57	1530.28	605.734	1207.46	680.6	878.304	880.90	283.30	1126.79	873.56	836.945	819.992	834.419	1341.35	881.529	200.002	941.9	845.94	296.48	0.96	0.832	not regulated
AT3G13580	Ribosomal protein L30/L7 family protein	cytosol	29.2.1.2.2.7	protein.synthesis.ribosomal		144.017				35.9871			415.22	196.41	159.53		131.016				170.434	104.268			135.24	27.18	0.68	0.610	not regulated
AT2G18020	EM8296 / Ribosomal protein L2 family	cytosol	29.2.1.2.2.8	protein.synthesis.ribosomal	768.882	1860.15	2229.96	2210.92	1701.27	1253.54	1911.94	1867.72	1799.09	271.97	1126.73	1571.45	1669.49	1856.73	2317.15	1618.33	1752.42	1899.55		1744.84	218.57	0.68	0.683	not regulated	
AT4G36130	Ribosomal protein L2 family	cytosol	29.2.1.2.2.8	protein.synthesis.ribosomal			298.896		403.903	324.273		287.225	328.57	45.19	277.184	265.151		301.56	382.032		251.443	321.492		299.81	43.37	0.91	0.374	not regulated	
AT2G40010	Ribosomal protein L10 family protein	cytosol	29.2.1.2.2.80	protein.synthesis.ribosomal	205.716				144.808			151.922	167.48	27.51			212.493		134.396					150.90	45.09	0.90	0.699	not regulated	
AT3G09200	Ribosomal protein L10 family protein	cytosol	29.2.1.2.2.80	protein.synthesis.ribosomal	2029.28	1735.46	2159.78	1459.49	2055.58	3208.77	1055.33	1964.95	2294.52	1995.91	561.04	1812.74	2313.75	1707.38	2380.69	2810.85	2168.12	1702.78	1819.23	1993.28	2078.76	351.98	1.04	0.728	not regulated
AT3G11810	60S acidic ribosomal protein family	cytosol	29.2.1.2.2.81	protein.synthesis.ribosomal	918.22	644.586	845.643		678.611	989.12		622.616	783.13	141.70	522.577	721.065	769.775	831.821	928.043	737.703	456.181			704.33	144.99	0.90	0.365	not regulated	
AT5G47700	60S acidic ribosomal protein family	cytosol	29.2.1.2.2.81	protein.synthesis.ribosomal	675.578	465.42	514.131		426	574.013			513.03	87.59	385.409	477.228		110.76	532.159	416.407		648.588		478.43	111.05	0.90	0.457	not regulated	
AT4G08110	60S acidic ribosomal protein family	cytosol	29.2.1.2.2.81	protein.synthesis.ribosomal											75.5372		95.1084		80.6454					83.76	8.29			only in MG132	
AT2G72710	60S acidic ribosomal protein family	cytosol	29.2.1.2.2.82	protein.synthesis.ribosomal	1802.52	1148.19	2008.86	1423.18	1730.61	2456.24	814.076	1143.89	1207.21	1526.09	879.667	1151.51	1186.77	1491.9	2350.27	1760.03	1266.37	1420.71	1181.3	1421.70	391.74	0.93	0.643	not regulated	
AT2G72720	60S acidic ribosomal protein family	cytosol	29.2.1.2.2.82	protein.synthesis.ribosomal	416.811	483.252	848.317		819.821	1158.3		717.207	601.66	256.50	448.607	463.828	527.758	539.719	1011.58	831.707	542.606	611.805	769.845	638.61	180.21	0.92	0.651	not regulated	
AT5G57290	60S acidic ribosomal protein family	cytosol	29.2.1.2.2.83	protein.synthesis.ribosomal	597.138	654.275	624.527	776.429	477.189	762.042	537.029	784.912	698.161	656.86	1025.59	698.58	429.435		695.672	763.063	926.997	678.662	283.049	483.924	604.16	191.45	0.92	0.510	not regulated
AT3G13120	Ribosomal protein L6 family	cytosol	29.2.1.2.2.9	protein.synthesis.ribosomal	2900.46	3043.05	2648.2	2938.77	4082.99	3055.01	3466.65	272.8	3404.45	3140.26	421.15	2858.58	2138.04	2842.2	2979.4	2766.7	3768.74	2426.09	1834.53	2540.76	2683.89	519.93	0.85	0.072	not regulated
AT3G10450	Ribosomal protein L6 family	cytosol	29.2.1.2.2.9	protein.synthesis.ribosomal	42.6725	87.5934																							

AT1G51980	Insulinase (Peptidase family M16) protein	mitochondrion	29.3.2	protein.targeting.mitochondrion	4113.74	712.324	650.528	900.91	769.692	778.994	836.676	638.283	817.207	747.49	94.95	806.601	701.404	799.063	802.367	725.206	615.914	888.56	911.594	869.087	824.42	73.41	1.10	0.089	not regulated		
AT3G02970	MPPBETA/Insulinase (Peptidase family M16)	mitochondrion	29.3.2	protein.targeting.mitochondrion	1290.58	1104	1332.73	1241.64	1677.52	1409.57	1172.27	1231.51	1572.45	1336.92	176.53	1261.48	1331.33	1136.49	1470.71	1325.97	1500.04	1212.16	1492.72	1478.98	1356.65	127.82	1.01	0.801	not regulated		
AT5G43090	TOM22-V, TOM9-2, ATOM22-V / translocase of mitochondrial	mitochondrion	29.3.2	protein.targeting.mitochondrion											344.813	168.885	226.973	167.788	309.03						287.56	69.73			not regulated only in MG132		
AT1G61570	TIM13 / translocase of the inner mitochondrial	mitochondrion	29.3.2	protein.targeting.mitochondrion												168.885	226.973								199.04	23.77			not regulated only in MG132		
AT1G06950	AT1C110, TIC110 / transcon at the inner	plastid	29.3.3	protein.targeting.chloroplast	320.027	320.099	378.952	278.207	317.209	272.08	377.291			323.41	29.15	305.83	950.041	892.74	216.28	260.986						218.39	336.603	1.41	0.307	not regulated	
AT5G16620	PD120, TIC40, AT1IC40 / hydroxylproline-rich	plastid	29.3.3	protein.targeting.chloroplast	129.168	187.756	191.957				321.663	341.987		194.51	68.19	223.526	241.61	212.199	178.207							188.05	42.14	0.97	0.866	not regulated	
AT1G41460	Sec13/Sec14 protein transport family protein	cytosol	29.3.4.2	protein.targeting.secretory pathway.golgi	136.417	109.667			348.528					198.20	106.85	429.474	144.855									218.35	150.66	1.14	0.879	not regulated	
AT2G03140	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	cytosol	29.3.4.4	protein.targeting.secretory	182.676	185.674	150.963		122.555					152.52	27.99											111.45	11.68	0.73	0.046	not regulated only in DMSO	
AT2G30050	transducin family protein / WD-40 repeat family	cytosol/nucleus	29.3.4.4	protein.targeting.secretory	514.337					132.322	97.2852			247.98	188.88															not regulated	
AT1G71260	Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family	cytosol	29.3.4.99	protein.targeting.secretory	269.882	197.863	163.607		109.166					208.95	55.55	115.735	106.539	270.335	266.663	232.789	409.342	204.212				229.37	95.70	1.10	0.684	not regulated only in DMSO	
AT2G34250	SecY protein transport family protein	not denoted	29.3.4.99	protein.targeting.secretory	112.994	244.519			134.45					163.99	57.63															not regulated only in DMSO	
AT5G60460	Preprotein translocase Sec, SecE1-beta subunit	endoplasmic reticulum	29.3.4.99	protein.targeting.secretory	86.4676				78.838		108.621			91.31	12.61	98.886	92.6274					94.4183			95.31	2.63	1.04	0.684	not regulated		
AT5G56190	ALPHA-SNAP2, ASNP4 / alpha-soluble NSF	vacuole.golgi	29.3.4.99	protein.targeting.secretory		290.019	130.044	368.274			701.037			372.34	208.29	324.453	80.4876	320.128				261.522	414.726		280.26	111.25	0.75	0.479	not regulated		
AT5G67560	ATAR14D, ARA14D / ADP-ribosylation factor-like	plastid	29.3.4.99	protein.targeting.secretory												222.761	261.485	188.544	136.69							158.18	53.52			not regulated only in MG132	
AT4G12660	Double Ctp-N motif protein	not denoted	29.3.4.99	protein.targeting.unknown																										not regulated	
AT2G17850	Rhodanese/Ce1 cycle control phosphatase	not denoted	29.4	protein.posttranslational modification	805.801	793.584	618.683	1217.38	535.827	786.485		1229.78	1471.82	92.42	310.83	426.613	738.85	538.482	467.963	190.273	2122.57	1678.32	1878.9	1721.02	573.37	110.12	0.61	0.028	sig. down regulated		
AT1G74900	ATARFA1D, ARFA1D / Ras-related small GTP-	cytosol	29.4	protein.posttranslational modification	2137.57	2390.36	2122.56	2496.54	2005.43	2107.9	2014.03	1860.99	1730.29	2936.19	224.49	2067.63	2159.407	2170.92	1990.27	1990.27	2122.57	1678.32	1878.9	1721.02	1989.28	177.41	0.95	0.326	sig. up regulated		
AT4G11260	ATSGT18, ETAS, RPR1, EDM1, SGT1B /	cytosol	29.4	protein.posttranslational modification	216.474		198.543		90.8211		124.523			157.59	51.71	312.839	287.82	135.221				271.562			256.36	61.34	1.63	0.077	not regulated		
AT1G12310	Calcium-binding EF-hand family protein	cytosol	29.4	protein.posttranslational modification	377.237	416.351	362.401	439.656	233.429	365.034	255.197	314.196	200.177	329.37	78.92	315.901	353.664	347.35	369.846	359.334	349.457		174.94	231.496	312.82	66.42	0.95	0.669	not regulated		
AT3G52800	PD1, PR 65, PPA2A2 / protein phosphatase 2A	cytosol	29.4	protein.posttranslational modification	217.685	100.026	106.703		144.049					142.12	46.74	180.259	255.472	274.635	152.574						205.05	52.34	1.45	0.115	not regulated		
AT2G56490	HT3, HNT13 / HT5 triad family protein	plastid	29.4	protein.posttranslational modification	297.938	244.783	394.304	294.007	266.215	295.438	345.871	322.687	132.886	287.91	68.59	272.556	281.003	233.931		286.904	252.128	237.361	316.004			277.05	24.24	0.96	0.733	not regulated	
AT4G21860	MSR82 / methionine sulfoxide reductase B 2	plastid	29.4	protein.posttranslational modification	328.875	308.947	191.281		348.491	235.483	174.455			222.83	62.39	176.792	123.368	211.507	374.755	103.618						195.70	78.75	0.88	0.532	not regulated	
AT3G58500	PP2A-4 / protein phosphatase 2A-4	cytosol	29.4	protein.posttranslational modification	390.961	263.841	299.836		324.436		110.503			257.92	76.21	324.866	330.27	281.367	279.05	463.611						333.83	67.33	1.30	0.164	not regulated	
AT1G25490	RCN1, REGA, ATB BETA BETA, EER1 / ARM repeat	plasma membrane	29.4	protein.posttranslational modification	237.406	234.49	205.088		244.381		452.076			274.69	89.71	418.796	123.316	121.834		233.204			150.672			209.56	112.20	0.76	0.391	not regulated	
AT2G45110	TPC-1/cnrg8 chaperon family protein	cytosol	29.4	protein.posttranslational modification	277.542	331.981	169.713		553.918	392.446	279.419	237.679		306.10	119.03	146.58	245.245	197.798	139.539	859.474			281.749	22.84		324.75	224.36	1.06	0.860	not regulated	
AT1G13320	PP2A-3 / protein phosphatase 2A subunit A3	cytosol	29.4	protein.posttranslational modification	174.253	91.475	100.365		239.638					173.93	55.35															not regulated only in DMSO	
AT3G16310	PRAC17 / receptor for activated C kinase 1C	cytosol	29.4	protein.posttranslational modification	128.366	153.108	172.72	171.183	159.738	145.819	194.723	115.219	206.713	161.07	27.68	144.94	182.373	119.91	183.306		149.733	211.924					165.414	28.21	1.03	0.784	not regulated
AT4G25130	PM5R4 / peptide methyl sulfide reductase 4	plastid	29.4	protein.posttranslational modification	622.346	427.869	336.163	314.222	452.475	269.866	499.974	449.263	398.01	418.10	100.30	446.87	437.114	459.883	412.771	388.14	457.551	386.238	391.57	396.504			419.64	29.02	1.00	0.985	not regulated
AT5G57020	NMT1, ATNMT1 / myristoyl-CoA-protein-N-	cytosol	29.4	protein.posttranslational modification												123.68										140.22	15.01			not regulated only in MG132	
AT2G26030	PIA1 / PP2C induced by AVRPPM1	cytosol	29.4	protein.posttranslational modification																						192.51	54.82			not regulated only in MG132	
AT2G24200	Cytosol aminopeptidase family protein	cytosol	29.5	protein.degradation	2022.09	2210.7	1988.29	2232.74	1873.44	2044.45	1988.54	1994.54	1658.32	2001.46	161.27	1627.99	1912.87	2032.54	1968.68	1870.18	1625.48	1643.3	1815.75	1976.27			1830.34	151.96	0.91	0.044	not regulated
AT1G79330	AMC6, ATMCP28, ATMC5, MCM5 / metacaspase 5	not denoted	29.5	protein.degradation	37.8625	136.472			47.0669		84.3024	331.213	127.38	107.66	442.702	735.786	3002.207	738.257	769.854	708.472	685.643	704.604	569.041			661.84	138.26	1.60	0.002	sig. up regulated	
AT3G51260	PAO1 / 20S proteasome alpha subunit PAO1	cytosol	29.5	protein.degradation	66.4712	87.8853	34.6559	166.591	133.715	110.798	60.6256	113.07	309.967	119.42	74.49	138.368	108.678	79.9209	173.228	104.135	273.581	22.052	229.574			166.16	66.00	1.39	0.220	not regulated	
AT1G79340	ATMCA, MCA / metacaspase 4	cytosol	29.5	protein.degradation	825.127	864.396	830.572	716.784	846.951	774.288	598.446	612.831	677.224	746.29	99.18	765.565	771.744	765.414	665.088	764.34	453.138	628.248	472.393	485.099			641.23	129.99	0.86	0.088	not regulated
AT5G65240	Zinc-like metalloproteases family protein	cytosol	29.5	protein.degradation	207.911	145.302	227.819		207.917		217.114	347.624		247.83	70.30	103.823	246.495	170.031	208.288	398.235							335.32	269.03	1.35	0.491	not regulated
AT4G30910	Cytosol aminopeptidase family protein	plastid	29.5	protein.degradation	115.633	90.6189	98.7422		21.6324	477.888	94.1518			149.11	152.18	103.575	93.0618	72.365				84.2113	103.535			93.03	11.52	0.62	0.430	not regulated	
AT3G51800	ATG2, EBP1, ATEBP1 / metalloprotease M24	nucleus	29.5	protein.degradation	637.287	466.47	495.342	662.045	712.565	626.839	741.242	584.641	561.69	607.57	90.86	574.948	476.602	367.356	561.143	533.69	626.066	538.004	553.534	455.717			542.68	48.25	0.89		

AT1G72150	PATL1 / PATELLIN 1	plasma membrane	34.99	transport/misc	3150.062	429.338	540.928	357.793	357.888	313.445	226.548	359.058	656.406	400.05	120.62	1801.26	470.835	1695.05	657.810	420.341	466.793	566.307	603.69	835.26	532.75	2.09	0.041	sig up regulated			
AT5G58070	ATRILL_TIL / temperature-induced lipocalin	endoplasmic reticulum	34.99	transport/misc	1464.73	900.08	692.359	933.167	935.085	784.741	1434.19	1274.36	1279.78	1077.61	271.51	1264.57	1208.04	1198.40	1006.77	1069.85	1100.72	1340.74	1025.17	1241.16	1161.72	109.16	1.08	0.428	not regulated		
AT3G05900	nucleolar protein-related	nucleus	35.1	not assigned no ontology	153.574	149.456	61.661	108.045	197.059	79.601	91.4568			120.62	43.96	116.27	168.749	105.005	199.227	115.974	799.82	127.469		233.04	233.50	1.93	0.269	not regulated			
AT3G11870	MD-2-related lipid recognition domain-containing	not denoted	35.1	not assigned no ontology	324.424			344.153		308.802	379.292			339.17	26.34	634.919	667.451	634.761	532.595	707.404	617.487			629.11	53.69	1.85	0.000	sig up regulated			
AT3G01290	SPFH/7 PHB domain-containing membrane-	plasma membrane	35.1	not assigned no ontology	316.121	351.064	297.578	259.523		287.257	364.808	263.088		305.63	37.82	521.46	485.867	462.691	531.347	712.982	577.659	442.697	246.806	331.792	479.23	127.47	1.57	0.006	sig up regulated		
AT2G31670	Stress responsive alpha-beta barrel domain protein	plastid	35.1	not assigned no ontology	315.187	345.928	207.766			172.231		306.678	162.206	268.33	72.73	83.3564	209.402	129.946	146.869	225.521				159.02	52.31	0.59	0.032	sig down regulated			
AT2G5265	SPFH/7 PHB domain-containing membrane-	extracellular	35.1	not assigned no ontology	116.217					163.662	170.304			150.06	24.08	106.6	111.744	173.871	237.948	395.489	236.236	205.767	212.024	195.95	59.78	1.21	0.273	not regulated			
AT2G52620	TRAF-like family protein	extracellular	35.1	not assigned no ontology	2181.57	2432.79	2166.96	2163.91	1993.84	1900.61	2378.02	2349.95	2374.71	2215.39	17.76	3386.57	2267.77	2344.14	2288.39	2095.02	2727.58	1137.87	938.577	1528.94	1964.98	579.23	0.89	0.258	not regulated		
AT2G22170	Lipase/lipoxygenase, PLAT/LH2 family protein	extracellular	35.1	not assigned no ontology	912.504	1188.47	1096.79	1371.25	1428.59	1086.04		1158.92	2037.19	1310.97	296.11	1064.49	1117.91	1064.96	1242.84	1016.63	1443.29	1297.05	1274.66	1463.41	1230.58	175.83	0.93	0.468	not regulated		
AT5G10860	Cystathionine beta-synthase (CBS) family protein	mitochondrion	35.1	not assigned no ontology	929.087	1066.55	902.63	1080.75	923.419	746.736	814.727	784.405		918.26	110.12	1058.12	935.335	1064.99	1151.44	995.223	1030.62	729.809	559.935	764.559	913.13	158.19	0.99	0.946	not regulated		
AT4G39730	Lipoxygenase, PLAT/LH2 family protein	plastid	35.1	not assigned no ontology	1356.33	1454	1362.85	1566.97	2047.49	1473.4	2358.16	2294.16	1285.71	1688.79	399.83	3788.97	1571.37	1890.55	1574.08	1447.24	2251.22	2834.9	2805.15	2858.98	2111.39	554.84	1.25	0.100	not regulated		
AT1G76160	sks / SKUS similar 5	extracellular	35.1	not assigned no ontology	232.841	262.323	312.948	308.894	460.292	356.207	251.977			322.50	75.80	228.045	233.384	288.418	269.669	271.345				322.237	361.521	328.524	286.64	45.84	0.98	0.314	not regulated
AT5G14030	Translocin-associated protein beta (TRAPB) family	endoplasmic reticulum	35.1	not assigned no ontology	790.528	638.905	756.175	616.394	622.264	947.247	434.132	469.208		658.16	157.14	683.917	825.654	700.839	835.284	1009.92	685.001	738.986	904.731	447.253	759.10	151.43	1.15	0.225	not regulated		
AT5G20820	Leucine-rich repeat (LRR) family protein	extracellular	35.1	not assigned no ontology	390.824	447.744	325.743	497.181	385.657	670.546	513.236			451.56	104.89	699.982	461.916	483.343	764.009	839.565				570.563	519.341	614.792	531.69	116.01	1.15	0.276	not regulated
AT5G26320	TRAF-like family protein	not denoted	35.1	not assigned no ontology	66.3034			93.6582	127.238	46.314				89.41	67.95	41.2733	44.4616	63.3785						49.87	9.99	0.56	0.129	not regulated			
AT4G26910	Dihydrolypoamide succinyltransferase	mitochondrion	35.1	not assigned no ontology	242.246	248.587	158.208	284.606	333.329	186.31	296.455	144.714	249.072	238.17	60.25	255.877	253.092	250.695	249.653	202.29	221.73	316.21	264.753	298.842	257.02	32.77	1.08	0.448	not regulated		
AT4G05150	Ocoticaseptide/Phox/Bem1p family protein	not denoted	35.1	not assigned no ontology	89.9661			96.7003		130.269	143.612			115.14	22.43	90.5767	61.3048	86.4395	78.7348					74.26	19.50	0.65	0.055	not regulated			
AT3G23940	dehydratase family	plastid	35.1	not assigned no ontology	427.45	454.077	414.839	474.611	468.899	444.042	317.487	454.343		431.97	67.49	461.472	432.828	297.845	361.95	408.493				423.304	242.168	375.44	73.72	0.87	0.119	not regulated	
AT3G34360	transducin family protein / WD-40 repeat family	cytosol	35.1	not assigned no ontology	448.824	467.706	351.023	308.687	516.784	468.435	380.624	341.412	382.026	407.28	66.00	408.591	472.999	371.225	378.656	322.916	430.459	355.949	368.144		388.62	43.98	0.95	0.536	not regulated		
AT5G19820	emr234 / ARM repeat superfamily protein	cytosol	35.1	not assigned no ontology	386.954	297.228	343.773			423.991				362.99	47.41	354.75	371.134	380.692	300.242					249.433	276.251	322.08	49.60	0.89	0.278	not regulated	
AT2G04190	TRAF-like family protein	cytosol	35.1	not assigned no ontology	34.2209		95.471		123.846		18.823			68.06	43.03															only in DMSO	
AT3G28300	AT14A / Protein of unknown function (DUF672)	plasma membrane	35.1	not assigned no ontology	137.926	249.618	191.223			598.82	139.625			263.47	172.59	225.081		233.848	198.47					170.295	198.715	205.28	22.46	0.78	0.253	not regulated	
AT4G09670	Oxidoreductase family protein	cytosol	35.1	not assigned no ontology	161.194	154.806	119.188	127.233						140.61	17.77															only in DMSO	
AT2G14880	SWIB/MDM2 domain superfamily protein	plastid	35.1	not assigned no ontology	132.93		65.9544		305.57	429.158				233.40	142.88	347.559		236.986	277.375	240.583			117.94		244.09	74.55	1.05	0.902	not regulated		
AT5G26280	MD-2-related lipid recognition domain-containing	extracellular	35.1	not assigned no ontology	606.519		525.679		585.255	704.074	875.143			659.33	122.24	534.252	598.247	518.769	599.927					679.633	754.346	471.304	593.78	90.54	0.90	0.352	not regulated
AT5G26260	TRAF-like family protein	extracellular	35.1	not assigned no ontology	277.902	184.166	271.241	525.679	288.077	359.721	534.075	316.399	298.552	322.66	96.00	334.123	247.03	351.481	468.634	523.919	607.661	133.57	202.336	167.342	337.34	157.10	1.05	0.823	not regulated		
AT5G21510	Endomembrane protein 70 protein family	plasma membrane	35.1	not assigned no ontology	124.872		428.174		199.514	77.6283				207.60	134.54	100.149	171.953	125.769	364.614	264.382				136.737	216.297	197.13	85.36	0.95	0.890	not regulated	
AT5G27440	H1RL, ATRH1 / SPFH/7 PHB domain	plasma membrane	35.1	not assigned no ontology	61.152	76.325	431.491		75.7386		100.055			148.95	141.82	77.6024	50.3389	67.1231	125.749	100.74				39.9774	193.998	70.7046	93.28	45.73	0.63	0.365	not regulated
AT3G44100	MD-2-related lipid recognition domain-containing	extracellular	35.1	not assigned no ontology	344.712				534.81	423.522				434.35	19.50	503.541	442.115	503.848					358.4	466.681	450.92	53.74	1.04	0.768	not regulated		
AT4G01870	tolB protein-related	cytosol/extracellular	35.1	not assigned no ontology	751.247			86.4921		133.325	182.896			288.49	269.34	156.773	305.138		112.051				212.316	271.693	211.59	37.10	0.73	0.606	not regulated		
AT5G26290	TRAF-like family protein	extracellular	35.1	not assigned no ontology		122.147		156.045		142.618				140.27	13.94			139.778		82.8195			132.19	37.00	132.19	37.00	0.94	0.790	not regulated		
AT2G37970	SOLU / SOLU heme-binding family protein	plasma membrane	35.1	not assigned no ontology					146.885	340.439	434.728			308.02	120.53			317.763				234.212	311.668	287.88	38.03	0.93	0.833	not regulated			
AT5G12040	Nitrite/oxanidase hydrolase and apolipoprotein N-	plastid	35.1	not assigned no ontology										442.582	116.464			94.1455		203.121		86.2374	174.479	117.83	34.58				only in MG132		
AT5G15070	Tautomerase/MIF superfamily protein	plastid	35.1	not assigned no ontology										442.582	116.464			94.1455		203.121		86.2374	174.479	117.83	34.58				only in MG132		
AT3G36000	Leucine-rich repeat (LRR) family protein	extracellular	35.1	not assigned no ontology										442.582	116.464			94.1455		203.121		86.2374	174.479	117.83	34.58				only in MG132		
AT3G12050	Aha1 domain-containing protein	cytosol	35.1	not assigned no ontology										442.582	116.464			94.1455		203.121		86.2374	174.479	117.83	34.58				only in MG132		
AT1G18270	ketose-bisphosphate aldolase class-II family protein	plasma membrane/peroxisome	35.1	not assigned no ontology																											

AT5G65750	2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 component	mitochondrion	8.1.5	TCA / org transformation.TCA.2-	326.994	148.278	290.353	110.851	283.184	207.792	301.769	224.17	68.41	396.373	296.655	259.881	254.961	300.334	362.98	271.359	291.82	33.76	1.30	0.051	not regulated				
AT5G54410	2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 component	mitochondrion	8.1.5	TCA / org transformation.TCA.2-	332.404	357.261	283.651	1350.27	323.029	342.141	382.718	253.453	451.68	321.73	319.594	307.044	349.064	1075.2	406.628	466.101	298.23	976.265	524.76	294.94	1.16	0.654	not regulated		
AT5G5070	Dihydropyrimidine succinyltransferase	mitochondrion	8.1.5	TCA / org transformation.TCA.2-	489.56	517.321	607.827	580.663	286.784	343.584	650.096	410.261	541.64	69.16	474.847	469.60	540.498	547.482	545.540	493.609	611.068	506.174	572.7	529.07	44.24	0.87	0.672	not regulated	
AT5G23250	Succinyl-CoA ligase, alpha subunit	mitochondrion	8.1.6	TCA / org transformation.TCA.succinyl-CoA	310.113		417.437				535.79	874.628	509.49	240.89	628.509	763.671	492.475	778.372	885.223	984.609			755.48	160.84	1.88	0.122	not regulated		
AT5G08300	Succinyl-CoA ligase, alpha subunit	mitochondrion	8.1.6	TCA / org transformation.TCA.succinyl-CoA	590.92	808.128	468.047	860.725	829.872	773.322	488.939		688.56	155.43	376.423	1119.78	551.744	734.358	328.756	98.5303	906.162			587.96	329.13	0.85	0.511	not regulated	
AT2G20420	ATP citrate lyase (ACL) family protein	mitochondrion	8.1.6	TCA / org transformation.TCA.succinyl-CoA	1180.8	1217.84	1079.84	1191.06	921.779	1131.94	785.498	1133.07	1068.29	137.05	1058.92	1163.07	1191.44	1146.09	1049.69	979.975	1644.79	1275.81	541.482	1116.81	272.89	1.05	0.659	not regulated	
AT2G18450	SDH1.2 / succinate dehydrogenase 2-1	mitochondrion	8.1.7	TCA / org transformation.TCA.succinate	1136.153		268.418		165.456			52.7661	118.12	47.74	303.514	372.562	296.276	89.9024	335.525	80.8012		101.803	197.21	121.08	1.67	0.356	not regulated		
AT3G27380	SDH2.1 / succinate dehydrogenase 2-1	mitochondrion	8.1.7	TCA / org transformation.TCA.succinate		187.425	268.418		437.869	235.23			282.24	94.35	341.032	235.532	1072.85	429.362		333.185	361.95			445.65	288.48	1.58	0.356	not regulated	
AT5G66760	SDH1.1 / succinate dehydrogenase 1-1	mitochondrion	8.1.7	TCA / org transformation.TCA.succinate	505.387	539.842	498.687	632.33	599.934	532.768	766.533	626.242	798.045	611.09	474.823	577.952	565.319	613.411	644.585	614.706	699.553	708.543	707.935	625.98	73.28	1.02	0.793	not regulated	
AT2G47510	FUM1 / fumarate 1	mitochondrion	8.1.8	TCA / org transformation.TCA.fumarase	116.456	1414.41	2345.57	1106	1080.3	2426.17	941.029	1314.49	1075.85	1567.78	597.96	1203.15	1613.29	1474.18	1327.09	2352.66	951.082	1823.38	2599.42	1339.02	1631.48	510.28	1.04	0.822	not regulated
AT5G50950	FUM2 / FUMARASE 2	cytosol/mitochondrion	8.1.8	TCA / org transformation.TCA.fumarase	226.503	150.625	71.2054	176.677	134.688	215.089	103.071	206.269	154.80	55.29	329.536	119.376	105.409		127.133	356.476	243.947			180.31	91.12	1.16	0.559	not regulated	
AT3G15020	mMDH2 / malate/malate dehydrogenase family	mitochondrion	8.1.9	TCA / org transformation.TCA.malate DH	109.783	157.618	104.395	573.804	173.202	123.533	128.979	105.622	196.61	143.88	277.707	171.869	225.354	158.413	158.949		385.808	164.839			219.78	79.59	1.12	0.730	not regulated
AT5G53240	mMDH1 / Lactate/malate dehydrogenase family	mitochondrion	8.1.9	TCA / org transformation.TCA.malate DH	2034.94	2180.6	2804.73	1759.55	1744.44	3183.41	1871.58	1970.71	1698.85	2138.76	1827.44	1996.88	2035.04	2198.85	2869.27	1790.47	1615.49	2627.31	2305.33	2140.68	383.92	1.00	0.993	not regulated	
AT4G00570	NAD-ME2 / NAD-dependent malic enzyme 2	mitochondrion	8.2.10	TCA / org transformation.other organic	153.872	144.853					106.032		128.28	21.34	89.8964	207.669	70.438	185.646	95.2156		183.116	252.873			169.26	54.39	1.22	0.224	not regulated
AT5G25880	NADAP-ME3, NADP-ME3 / NADP-malic enzyme 3	cytosol	8.2.10	TCA / org transformation.other organic	97.9605	80.5307	589.573	84.133			106.215		191.68	199.16					271.74	93.8821	96.6101			154.08	83.21	0.80	0.797	not regulated	
AT5G11670	ATNADP-ME2, NADP-ME2 / NADP-malic enzyme 2	cytosol	8.2.10	TCA / org transformation.other organic	2406.15	1414.41	2345.57	1106	1080.3	2426.17	941.029	1314.49	1075.85	1567.78	597.96	1203.15	1613.29	1474.18	1327.09	2352.66	951.082	1823.38	2599.42	1339.02	1631.48	510.28	1.04	0.822	not regulated
AT1G79750	ATNADP-ME4, NADP-ME4 / NADP-malic enzyme 4	plastid	8.2.10	TCA / org transformation.other organic	116.456	73.2539					71.865	86.0491	86.91	17.93				47.6889		89.6256	82.3322			73.22	18.29	0.84	0.441	not regulated	
AT2G19900	ATNADP-ME1, NADP-ME1 / NADP-malic enzyme 1	not denoted	8.2.10	TCA / org transformation.other organic	509.125			529.064	191.655		709.763	465.784	481.08	166.96	298.784	300.996	524.022	187.35		196.317	77.0297			264.08	138.81	0.55	0.062	not regulated	
AT2G13560	NAD-ME1 / NAD-dependent malic enzyme 1	mitochondrion	8.2.10	TCA / org transformation.other organic	311.650	290.914	369.276	364.682	291.586	308.497	265.467	312.423	209.44	41.15	398.361	204.475	378.149	257.644	253.486	123.135	217.645	340.78	303.947	263.07	72.11	0.91	0.406	not regulated	
AT3G06500	ACL2 / ATP-citrate lyase B-1	cytosol	8.2.11	TCA / org transformation.other organic	165.219	164.904	178.602		146.671	190.617	97.0701	322.262	180.75	64.16	151.366	79.8048	89.5111	149.695	153.018	165.801				133.20	31.74	0.74	0.157	not regulated	
AT5G9460	ACL2 / ATP-citrate lyase subunit B 2	cytosol	8.2.11	TCA / org transformation.other organic	322.112	248.684	363.458		349.469	240.748	276.596		275.43	80.64	268.948	285.761	267.739	228.723	276.596		259.273			264.51	17.96	0.96	0.774	not regulated	
AT1G09430	ACL3 / ATP-citrate lyase A-3	cytosol	8.2.11	TCA / org transformation.other organic	141.653	150.672	120.842		54.0309		702.015		233.84	236.52	125.065	133.477	181.422	210.419		205.982	203.003			176.56	34.74	0.76	0.603	not regulated	
AT1G03670	ACL4 / ATP-citrate lyase A-1	cytosol	8.2.11	TCA / org transformation.other organic	842.775	855.417	850.083	988.691	1193.15	907.27	975.365	614.885	649.871	875.27	165.22	857.964	698.189	825.119	672.508	719.033	667.051	778.571	686.276	956.975	762.41	94.37	0.87	0.619	not regulated
AT4G13430	ILL1, ATLEUC1 / isopropyl malate isomerase large	plastid	8.2.11	TCA / org transformation.other organic	695.815	739.281	680.387	834.293	719.065	571.518	681.477	728.407	703.37	69.74	790.845	688.483	696.623	660.274	776.097	426.896	793.793	802.024	689.306	702.73	110.35	1.00	0.990	not regulated	
AT5G03910	IDH-V / isocitrate dehydrogenase V	mitochondrion	8.2.4	TCA / org transformation.other organic	235.525	147.967	233.203		133.735	107.794	171.236		171.58	48.21	239.95	222.481	330.569	250.496	273.799	228.797	203.035			235.59	20.72	1.37	0.014	not regulated	
AT5G04410	IDH-V / isocitrate dehydrogenase family protein	plasma membrane	8.2.9	TCA / org transformation.other organic	6851.91	7065.41	6793.52	6255.24	9004.26	6993.52	7519.43	7018.69	9146.19	7998.46	950.46	6878.41	6979.55	6292.34	6629.65	6448.91	8773.57	8524.67	6110.77	10215.7	7250.16	1454.68	0.98	0.812	not regulated
AT3G47520	MDH / malate dehydrogenase	plastid	8.2.9	TCA / org transformation.other organic	1079.01	865.535	1219.61	1267.15	3019.08	1346.05	1237.96	1099.35	934.782	1340.95	611.46	972.982	793.489	923.147	970.566	1237.56	778.708	2736.68	926.57	844.239	1131.55	581.71	0.84	0.943	not regulated
AT5G57200	Lactate/malate dehydrogenase family protein	not denoted	8.2.9	TCA / org transformation.other organic	548.84	1261.81	774.8	298.549		181.738	166.006		536.82	387.89	80.5086	545.123	47.1922	939.742	173.973	539.286				387.64	318.46	0.72	0.416	not regulated	
AT5G43330	Lactate/malate dehydrogenase family protein	endoplasmic reticulum	8.2.9	TCA / org transformation.other organic	705.399	758.553	703.575	913.011	945.153	700.331	1196.18	876.08	569.025	818.59	175.35	988.605	816.746	969.247	695.207	771.678	456.601	775.268	769.243	176.091	713.19	239.72	0.87	0.330	not regulated
AT1G79440	ALDH5F1, SSADH1, SSADH / aldehyde	mitochondrion	8.2.99	TCA / org transformation.other organic	127.167	155.208	223.981				152.047			156.10					76.839	201.352				156.10	47.94	0.87	0.330	not regulated	
AT1G70410	ATBCA4, BC4A, CM4 / beta carbonic anhydrase 4	plasma membrane	8.3	TCA / org transformation.carbonic	408.484	347.251	322.864	338.657		525.34	458.813	274.285	416.232	386.49	76.11	654.045	314.734	330.629	535.647	217.575	217.396	352.186	345.242	311.251	364.30	134.72	0.94	0.705	not regulated
AT4G28510	ATPHB1, PHB1 / prohibitin 1	mitochondrion	9.1.11	mitochondrial electron transport / ATP	164.249	149.786	114.404	175.187	170.288	39.4629	199.607	158.499	146.06	46.59	168.24	91.4651	130.696	133.569	87.6948	147.429	123.784			126.13	26.69	0.86	0.370	not regulated	
AT2G20550	ATPH6, PH6 / prohibitin 6	mitochondrion	9.1.11	mitochondrial electron transport / ATP	75.0616	109.249		159.604	213.062	244.657	342.5	383.021	181.35	63.07	90.2255	38.0572	42.5253	80.9241	169.187		197.318			103.04	60.28	0.57	0.888	not regulated	
AT3G12260	LYR family of Fe/S cluster biogenesis protein	mitochondrion	9.1.11	mitochondrial electron transport / ATP														205.960			318.179			187.66	114.78	0.88	0.838	only in MG132	
AT1G47260	API, GAMMA C2 / gamma carbonic anhydrase 2	mitochondrion	9.1.11.5	mitochondrial electron transport / ATP	157.456																								