

**Untersuchungen zur Funktion der kurzkettigen
Dehydrogenasen/Reduktasen HCF173 und
HCF244 bei der Translationsinitiation der
psbA mRNA in *Arabidopsis thaliana***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sabine Link

aus Saalfeld / Saale

Düsseldorf, Oktober 2013

aus dem Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. P. Westhoff
Korreferent: Prof. Dr. P. Jahns

Tag der mündlichen Prüfung: 02.12.2014

Die hier vorliegende Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation habe ich in der vorgelegten oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, 01.10. 2013

(Sabine Link)

Inhaltsverzeichnis

1. Allgemeine Einleitung	1
1.1. Die Struktur und Funktion des Chloroplasten	1
1.2. Die Evolution des Chloroplasten	3
1.3. Der Proteinimport in den Chloroplasten	4
1.4. Die plastidäre Genexpression	5
1.4.1. Verschiedene Polymerasen steuern die Transkription im Chloroplasten	6
1.4.2. Plastidäre Transkripte durchlaufen verschiedene Reifungsprozesse	8
1.4.2.1. Endo- und Exonukleasen schaffen kleinere Transkripteinheiten	8
1.4.2.2. Kernkodierte Spleißfaktoren kompensieren den Verlust von Maturasen	9
1.4.2.3. Durch die Edierung bleiben essentielle Sequenzinformation erhalten	11
1.4.3. Kernkodierte Proteine beeinflussen die plastidäre Translation	12
1.4.3.1. Die plastidäre Translationsinitiation zeigt Parallelen zu Pro- und Eukar- yoten	12
1.4.3.2. PPR- und PPR-ähnliche Proteine definieren die reifen Transkripttermini und sind maßgeblich an der plastidären Translationsinitiation beteiligt	14
1.4.3.3. Die Translationsinitiation ist ein wichtiges Regulativ der plastidären Expression	16
1.4.3.4. Die Regulation der plastidären Elongation und Termination ist noch weitestgehend unbekannt	17
1.4.4. Die posttranslationalen Prozesse der plastidären Genexpression	18
1.4.4.1. Proteinmodifikationen erfüllen vielseitige Aufgaben im Chloroplasten	19
1.4.4.2. Die Assemblierung der Proteinkomplexe wird durch diverse Chaperone reguliert	20
2. Die Ziele dieser Arbeit ..	23
3. Thesen	24
4. Zusammenfassung / Summary	25
5. Literaturverzeichnis	27
6. Manuskript	41
The Atypical Short-Chain Dehydrogenases HCF173 and HCF244 Are Jointly Involved in Translational Initiation of the <i>psbA</i> mRNA of Arabidopsis	
7. Addendum	60
Analyse der Komplexbildung und Proteinfunktion der D1-Biogenesefaktoren HCF244 und HCF173	

1. Allgemeine Einleitung

1.1. Die Struktur und Funktion des Chloroplasten

Pflanzen, Algen und sogar einige marine Mollusken und parasitäre Protisten beherbergen semiautonome Organellen, die Plastiden (Wise, 2007). Sie unterscheiden sich in höheren Pflanzen zum Teil erheblich in ihrer Funktion. Leukoplasten sind nichtpigmentierte Plastiden, in denen Lipide und Öle (Elaioplast) bzw. Stärke (Amyloplast) synthetisiert und verstärkt gespeichert werden. Chromoplasten hingegen enthalten einen hohen Anteil an Carotinoiden und kommen hauptsächlich in Früchten und Blüten, aber auch in Blättern und einigen Wurzeln vor. Sie dienen primär als visuelles Signal für Pollen und Früchte sammelnde Organismen.

In photoautotrophen Eukaryoten liefert der Chloroplast einen essentiellen Beitrag zum Energiehaushalt der Zelle. Als Ort der Photosynthese macht er Licht und atmosphärisches Kohlenstoffdioxid in Form von chemischer Energie und Kohlenhydraten für die Zelle nutzbar. Neben der Photosynthese erfüllt der Chloroplast mit der Synthese von Fettsäuren und Lipiden, Aminosäuren, Purinen und Pyrimidinen, Chlorophyll und Antioxidantien eine Vielzahl von weiteren Funktionen (Neuhaus and Emes, 2000; Finkemeier and Leister, 2010).

Chloroplasten entwickeln sich durch Lichteinwirkung aus Proplastiden, den undifferenzierten Vorläufern der Plastiden (Possingham, 1980). In Abwesenheit von Licht bilden sich zunächst nichtpigmentierte Etioplasten, die sich nach Lichtzufuhr in Chloroplasten umwandeln (Waters and Langdale, 2009).

Im ausdifferenzierten Zustand beherbergt der Chloroplast höherer Pflanzen ein komplexes Membransystem. Eine äußere und innere Hüllmembran grenzen ihn zum Zytoplasma ab. Über verschiedene Translokationsmaschinerien werden selektiv Metaboliten und Proteine zwischen Zytosol und Stroma transportiert (Soll and Schleiff, 2004; Weber et al., 2005; Li and Chiu, 2010). Zwischen äußerer und innerer Hüllmembran liegt der Intermembranraum. Er bildet zusammen mit dem Lumen und dem Stroma die drei Kompartimente des Chloroplasten.

Neben der kompletten Transkriptions- und Translationsmaschinerie der plastidären Genexpression und einer Vielzahl von metabolischen Proteinen sind im Stroma alle Enzyme der photosynthetischen „Dunkelreaktion“ (Calvin-Benson Zyklus) lokalisiert.

Das Lumen wird von einem in sich geschlossenem System aus Thylakoidmembranen umhüllt. Man unterscheidet zwei Formen von Thylakoiden, den stapelartig angeordneten Grana und den ungestapelten Stromathylakoiden (zusammengefasst in Nevo et al., 2012). Die an der photosynthetischen Lichtreaktion beteiligten Komponenten sind differentiell innerhalb der Thylakoidmembran verteilt. Das Photosystem II (PSII) ist in den Grana lokalisiert, während das Photosystem I (PSI) und die ATP-Synthase hauptsächlich in den

Stromathylakoiden angesiedelt sind. Der Cytochrom b_6f -Komplex (Cyt b_6f -Komplex) ist hingegen in Stroma- und Granathylakoiden in etwa gleich verteilt (zusammengefasst in Nevo et al., 2012). Diese laterale Heterogenität ergibt sich aus der Konzeption der einzelnen photosynthetischen Komponenten und ist eng an die Redoxreaktionen der Photosynthese gekoppelt (Ryrie et al., 1980; Albertsson et al., 2001).

In der lichtabhängigen Reaktion der Photosynthese wird Lichtenergie in Form des Reduktionsäquivalents NADPH und ATP chemisch gebunden (Abb. 1).

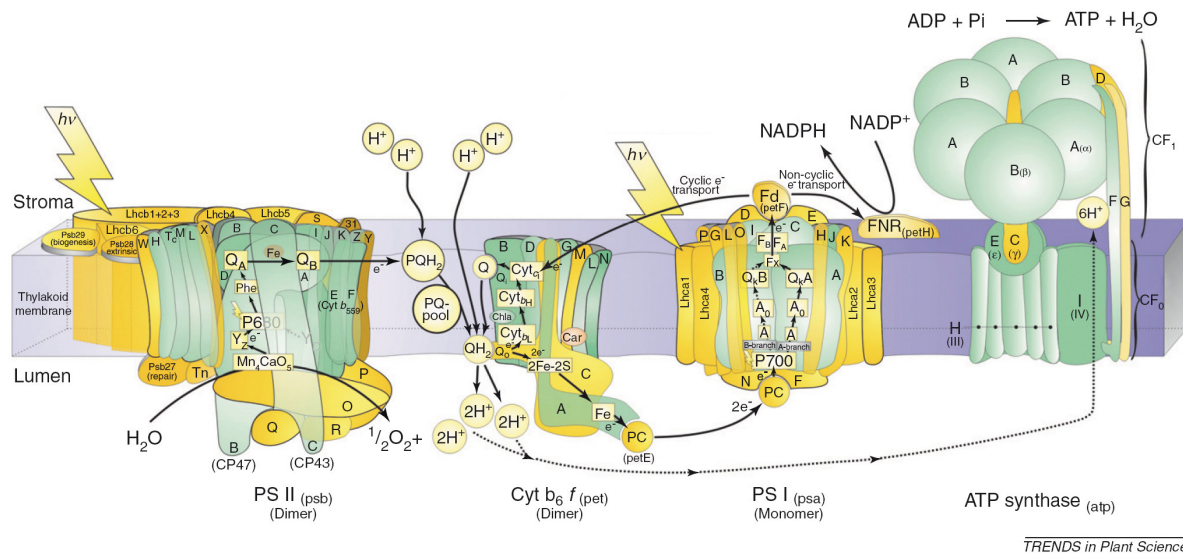


Abb. 1: Schematische Darstellung der photosynthetischen Elektronentransportkette und ATP-Synthase aus höheren Pflanzen (modifiziert von Allen et al., 2011). Die Wege der Protonen und Elektronen über die Thylakoidmembran sind durch Pfeile gekennzeichnet. Plastidär kodierte Proteine sind in grün, nukleär kodierte Proteine in orange dargestellt.

Im PSII wird ein Elektron des Chlorophyllpaar P680 durch die Einwirkung von Photonen auf ein höheres Energieniveau angehoben und eine primäre Ladungstrennung initiiert. Über verschiedene Zwischenakzeptoren werden zwei Elektronen auf das stromal lokalisierte Plastochinon übertragen und reduzieren es dadurch zu Plastochinol. Die durch die Ladungstrennung entstandene Elektronenlücke am $P680^+$ wird mit einem Elektron aus der Oxidation von Wasser durch den Wasserspaltungsapparat wieder aufgefüllt. Diese Reaktion findet an der luminalen Seite der Thylakoidmembran statt und setzt Sauerstoff frei.

Vom Plastochinol werden die Elektronen über den Cyt b_6f -Komplex auf Plastocyanin übertragen. Der luminal Elektronenakzeptor transferiert Elektronen zum oxidierten PSI, wodurch die dort entstandene Elektronenlücke wieder aufgefüllt wird. Verursacht wurde sie durch eine weitere Ladungstrennung am Chlorophyllpaar P700 im Reaktionszentrum des PSI. Die von PSI abgegebenen Elektronen werden über Ferredoxin auf den Endakzeptor NADP $^+$ übertragen. Diese Reaktion wird durch die Ferredoxin-NADPH-Oxidoreduktase (FNR) katalysiert.

Durch die Elektronentransportkette wird ein elektrochemisches Potential zwischen Stroma und Lumen aufgebaut, das als protonenmotorische Kraft bezeichnet wird (zusammengefasst in Nelson and Ben-Shem, 2004). Der Rückfluss der Protonen in das Stroma treibt die ATP-Synthase an (Abb. 1). Sie katalysiert die ATP-Synthese aus ADP und anorganischem Phosphat.

Neben dem linearen Elektronentransport existieren mit dem zyklischen Elektronentransport und der Photoreduktion von Sauerstoff um PSI, sowie dem Q-Zyklus im Cyt b_6f -Komplex alternative Elektronentransportwege (Mehler, 1951; Mehler and Brown, 1952; Osyczka et al., 2005; Forquer et al., 2006). Mit Hilfe dieser Mechanismen kann je nach Umweltbedingung das Verhältnis zwischen ATP und NADPH ausbalanciert bzw. der photosynthetische Apparat vor Schädigung durch Licht geschützt werden (Kramer et al., 2004).

Im Calvin-Benson-Zyklus wird Kohlenstoffdioxid fixiert und unter Verbrauch von ATP und NADPH zu Kohlenhydraten umgesetzt (Bassham et al., 1950; Calvin, 1962).

1.2. Die Evolution des Chloroplasten

Chloroplasten entwickelten sich aus einem cyanobakterienähnlichen Prokaryoten, der vor etwa 1.5-1.6 Milliarden Jahren durch einen eukaryotischen Organismus phagocytiert wurde (Hedges et al., 2004; Yoon et al., 2004). Infolge dieses primären endosymbiotischen Ereignisses bildeten sich drei distinkte Linien phototropher Eukaryoten: die Glaukophyten, Rhodophyten (Rotalgen) und Chlorophyten (Grünalgen), aus denen später die Landpflanzen hervorgingen.

Sowohl in der Linie der Rotalgen als auch bei den Grünalgen kam es zu weiteren endosymbiotischen Ereignissen (sekundäre Endosymbiose), bei denen ein nichtphotosynthetischer eukaryotischer Organismus eine Rot- bzw. Grünalge aufgenommen hat. Während der Plastid nahezu in seiner ursprünglichen Größe erhalten blieb, weist meist nur noch eine dritte bzw. vierte den Plastiden umschließende Membran auf den Primärwirt hin. Bei den Kryptomonaden sind außerdem noch die Reste des primären Wirtzellkerns in Form des ‚Nukleomorph‘ erhalten (Nisbet et al., 2004). Sekundäre Endosymbiose wird als Ursache der hohen Artendiversität der Algen angesehen (Yoon et al., 2002). Diese Vielfalt wird von den zahlreichen Vertretern innerhalb der Dinoflagellaten ergänzt, welche durch tertiäre Endosymbiose entstanden sind.

Plastiden besitzen wie ihr cyanobakterieller Vorläufer ein zirkuläres Genom, das Plastom. Vergleicht man die Größe des Genoms, offenbaren sich jedoch große Unterschiede. Das Plastom von Landpflanzen umfasst mit durchschnittlich 75 bis 80 proteinkodierenden Genen (Timmis et al., 2004) nur einen geringen Teil des Genoms heute lebender Cyanobakterien

(3168 ORFs in *Synechocystis* sp. PCC6803 (Kaneko et al., 1996) bzw. 7120 ORFs in *Anabena* sp. PCC (Kaneko et al., 2001)). Im Laufe der Evolution wurde das Genom des Endosymbionten durch Genverlust und horizontalen Gentransfer in den Wirtskern massiv reduziert (Martin et al., 1998; Timmis et al., 2004). Etwa 18% des Genoms von *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana*) sind prokaryotischen Ursprungs, wobei der überwiegende Anteil cyanobakteriellen Ursprungs ist (Martin et al., 2002). Im Plastom sind lediglich Gene für die Komponenten des Photosyntheseapparates, sowie der Transkriptions- und Translationsmaschinerie verblieben (Martin et al., 2002; Timmis et al., 2004).

In Anbetracht des massiven Transfers von endosymbiotischem Genmaterial stellt sich die Frage nach der Notwendigkeit für die Erhaltung des Plastoms. Die Regulation der plastidären und nukleären Genexpression erfordert schließlich ein hohes Maß an Koordination und Kosten für die Zelle. Eine mögliche Antwort gibt die CORR-Hypothese (Collocation for Redox Regulation) (Allen, 1993; Allen, 2003). Sie besagt, dass bestimmte Gene im Plastom erhalten wurden, um schnell und direkt auf Änderungen des Redoxpotentials, in Folge von sich stetig verändernden Umweltbedingungen, reagieren zu können und damit das Redoxgleichgewicht zu erhalten. Die Expression dieser Gene ist redoxgesteuert und die Genprodukte selbst sind in Redoxreaktionen involviert. Eines dieser Genprodukte ist das D1 Protein im Reaktionszentrum von PSII. Es wird in Abhängigkeit von Licht sehr schnell geschädigt und muss in Folge dessen ständig ausgetauscht werden. Die Synthese ist redoxreguliert und stellt somit sicher, dass die benötigte Menge für den Austausch bereitgestellt wird (zusammengefasst in Allen, 2003; 2011).

1.3. Der Proteinimport in den Chloroplasten

Die geringe Anzahl der proteinkodierenden Gene steht in starkem Kontrast zu den 3500 bis 4000 im Chloroplasten lokalisierten Proteinen (Soll and Schleiff, 2004). Der Hauptanteil dieser Proteine ist im Zellkern kodiert und muss nach der Translation im Zytoplasma in den Chloroplasten transportiert werden. Ein chloroplastidäres Transitpeptid (cTP) am Amino-terminus des Proteins ermöglicht den energieabhängigen Transport über den TOC (Translocon at the Outer envelope membrane of Chloroplasts)/ TIC (Translocon at the Inner envelope membrane of Chloroplast)-Apparat durch die äußere und innere Hüllmembran in den Chloroplasten (Soll and Schleiff 2004; Li and Chiu, 2010). Darüber hinaus werden einige wenige Proteine über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat in den Chloroplasten transportiert (Villarejo et al., 2005; Nanjo et al., 2006; Radhamony and Theg, 2006; Kitajima et al., 2009). Im Stroma wird das Transitpeptid durch eine Peptidase (SPP, Stromal Processing Protease; Richter et al., 2005) abgespalten.

Einige Proteine müssen danach zur Thylakoidmembran bzw. ins Lumen transportiert werden. Man unterscheidet mindestens vier Typen des intraplastidären Proteintransports: Durch die spontane Insertion und den GTP-abhängigen SRP(Signal Recognition Particle-dependent)-Weg inserieren Proteine in die Thylakoidmembran, während sie über den TAT (Twin-Arginin Translocase)- bzw. sekretorischen(Sec) Weg ins Lumen transportiert werden.

Die Mitglieder der LHCP-Familie (Light-Harvesting Chlorophyll a/b-binding Protein) inserieren über den SRP-Weg in die Thylakoidmembran (Cline, 1986; Schünemann, 2004; Lührink and Sinning, 2004). Im Stroma binden die löslichen Proteine cpSRP54 und cpSRP43 das Zielprotein und transportieren es zur Membran (Schünemann et al., 1998). Dort wird das LHC-Protein vom peripheren Rezeptor cpFtsY übernommen und inseriert über Alb3 in die Membran (Kogata et al., 1999; Moore et al., 2000; Bals et al., 2010).

Die spontane Insertion scheint hingegen keine stromalen oder membranassoziierten Komponenten zu erfordern (Tissier et al., 2002; Mant et al., 2001). Ein geringer Anteil der auf diesem Weg inserierten Proteine besitzt ein zweiteiliges Signalpeptid, das neben dem Import in den Chloroplasten auch den Transport zur Membran dirigiert (Tissier et al., 2002).

Der Transport ins Lumen erfordert ebenfalls ein zweiteiliges Transitpeptid. Über den TAT-Weg werden Proteine im gefalteten Zustand im Beisein ihrer Co-Faktoren in Abhängigkeit des Protonengradienten der Thylakoidmembran transportiert (zusammengefasst in Albiniak et al., 2012).

Im Sec-Weg interagiert das lösliche Stromaprotein SecA mit dem ungefalteten Zielprotein und transportiert es in einem ATP-abhängigen Schritt mit durch die Thylakoidmembran (zusammengefasst in Albiniak et al., 2012). Der Translokationskanal wird vermutlich durch die Proteine SecY und SecE gebildet.

1.4. Die plastidäre Genexpression

Die Aufrechterhaltung der Organellenfunktion erfordert ein hohes Maß an Koordination zwischen Nukleom und Plastom. Im Laufe der Evolution entwickelte sich daher ein komplexes Netzwerk aus retrograden (Plastid zu Zellkern) und anterograden (Zellkern zu Plastid) Signalwegen, worüber Plastiden und Zellkern miteinander kommunizieren (Woodson and Chory, 2008; Abb. 2).

Die duale Konzeption der photosynthetischen Elektronentransportkette verdeutlicht die Notwendigkeit dieses Austausches. Sie besteht aus kern- und plastomkodierten Einheiten (Abb. 1), die zur richtigen Zeit und im richtigen stöchiometrischen Verhältnis bereitgestellt werden müssen. Eine essentielle Rolle innerhalb der Thylakoidmembranbiogenese nehmen kernkodierte Hilfs- und Assemblierungsfaktoren ein (zusammengefasst in Meierhoff and

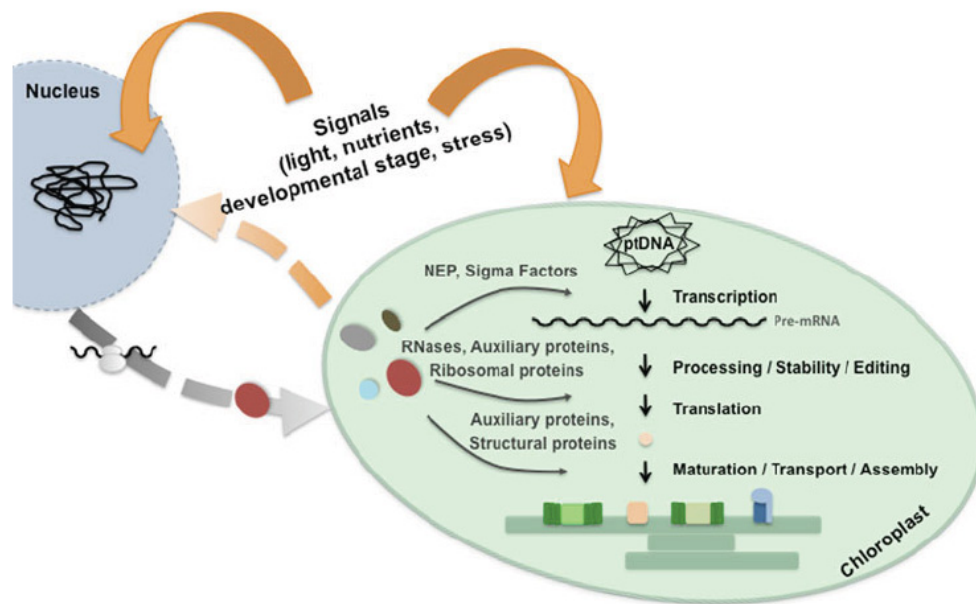


Abb. 2: Regulationsebenen der plastidären Genexpression. Exogene und endogene Signale steuern die plastidäre und nukleäre Genexpression höherer Pflanzen. Untereinander nehmen Zellkern und Chloroplast über retrograde und anterograde Signale gegenseitig Einfluss. Zahlreiche kernkodierte Faktoren werden im Zytosol translatiert, anschließend in den Chloroplasten transportiert und regulieren dort die Genexpression (Lyska et al., 2012).

Westhoff, 2011; Lyska et al., 2012). Sie regulieren die plastidäre Genexpression auf Ebene der Transkription, der Transkriptreifung sowie bei der Translation und Assemblierung von Proteinkomplexen (Abb. 2).

1.4.1. Verschiedene Polymerasen steuern die Transkription im Chloroplasten

Die plastidäre Transkription wird in höheren Pflanzen durch zwei kern(NEP; Nuclear Encoded RNA-Polymerase)- und eine plastidär(PEP; Plastid Encoded RNA-Polymerase)-kodierte RNA-Polymerase ausgeführt (Lerbs-Mache, 1993; Mullet, 1993; Hajdukiewicz et al., 1997).

Die kernkodierte Polymerase ist monomere, bakterienähnliche RNA-Polymerase (Lerbs-Mache, 1993; Courtois et al., 2007; Swiatecka-Hagenbruch et al., 2007), die vermutlich durch Genduplikation der mitochondrialen RNA-Polymerase entstanden ist (Hedtkke et al., 1997, 2000). Sie transkribiert hauptsächlich Hauswirtschaftsgene in der frühen Phase der Plastidenentwicklung (Lerbs-Mache, 1993; Mullet, 1993; Hajdukiewicz et al., 1997; Hess und Börner, 1999). Ein weiteres Ziel ist das *rpoB*-Operon, das für drei der vier PEP Untereinheiten kodiert (Hajdukiewicz et al., 1997; Hübschmann und Börner, 1998). In *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlamydomonas) konnten bisher keine kernkodierte

plastidär lokalisierten RNA-Polymerasen identifiziert werden, jedoch in Moosen und höheren Pflanzen (Weihe et al., 1997; Hedtke et al., 1997; Young et al., 1998; Chang et al., 1999; Ikeda and Gray, 1999). Im Zellkern von *A.thaliana* sind drei RNA-Polymerasen (RpoTp, RpoTm, RpoTmp) mit Organellenlokalisierung kodiert. Während RpoTp ausschließlich in den Chloroplasten bzw. RpoTm ins Mitochondrium transportiert werden, konnte für RpoTmp eine Lokalisation in beiden Organellen nachgewiesen werden (Hedtke et al., 1997, 2000; Kobayashi et al., 2001).

RpoTp und RpoTmp haben in Plastiden sowohl eine überlappende als auch genspezifische Funktion (Swiatecka-Hagenbruch et al., 2008). Zwar kann eine veränderte RpoTp Aktivität durch RpoTmp kompensiert werden, jedoch scheinen beide Polymerasen im Wildtyp unterschiedliche Typen von NEP-Promotoren anzusteuern (Swiatecka-Hagenbruch et al., 2008). RpoTp bindet präferentiell an Typ I Promotoren, welche die größte Gruppe der NEP-Promotoren darstellt. Das Kernsequenzmotiv (YRTA) dieser Gruppe liegt stromaufwärts in der Nähe des Transkriptionsstarts und zeigt Ähnlichkeit zu Promotoren aus pflanzlichen Mitochondrien (Liere and Maliga, 1999; Weihe and Börner, 1999; Kühn et al., 2005). RpoTmp erkennt hingegen vorwiegend Promotoren des Typ II. Ihnen fehlt das YRTA-Konsensusmotiv. Stattdessen sind wichtige Promotorsequenzen stromabwärts des Transkriptionsstarts positioniert (zusammengefasst in Courtois et al., 2007). Beide NEPs unterscheiden sich neben ihren Zielpromotoren auch hinsichtlich ihrer Expression. Während RpoTmp überwiegend in meristematischem Gewebe und nichtgrünen Plastiden aktiv zu sein scheint, wird RpoTp als überwiegend aktive NEP in grünem Gewebe diskutiert (Emanuel et al., 2006; Courtois et al., 2007).

Die plastidär kodierte RNA-Polymerase weist Ähnlichkeiten zu eubakteriellen RNA-Polymerasen auf. Sie transkribiert hauptsächlich Gene, die im Zusammenhang mit der Photosynthese stehen (Hajdukiewicz et al., 1997). In höheren Pflanzen setzt sie sich aus den Untereinheiten α , β , β' und β'' sowie verschiedenen Sigmafaktoren zusammen (Shiina et al., 2005; Schweer et al., 2010). Sigmafaktoren binden in Abhängigkeit der herrschenden Umweltbedingungen und/oder des Entwicklungsstatus der Pflanze differentiell an PEP und vermitteln dadurch zum einen die Promotorspezifität der Polymerase und ermöglichen zum anderen die Initiation der Transkription. Im Gegensatz zu den Kernuntereinheiten sind Sigmafaktoren im Zellkern kodiert (Allison, 2000).

In *A.thaliana* wurden sechs Sigmafaktoren (SIG1-SIG6) identifiziert (Schweer et al., 2010; Lerbs-Mache 2010). SIG2 und SIG6 sind hauptsächlich während der frühen lichtabhängigen Chloroplastenentwicklung aktiv und regulieren die Transkription von tRNAs und Photosynthesegenen (Kanamaru et al., 2001; Hanaoka et al., 2003; Ishizaki et al., 2005; Loschelder et al., 2006).

Im Gegensatz zu SIG2 und SIG6 vermittelt SIG1 durch die gesamte Entwicklung hinweg die

Transkription seiner Zielgene wie beispielsweise *rbcL*, *clpP* und *psaAB* (Hanaoka et al., 2012). Das verminderte Bindevverhalten bei Starktlichtstress lässt auf eine Lichtregulation des Sigmafaktors schließen (Hanaoka et al., 2012).

Toleranz gegen abiotischen Stress wie intensives Licht, Salz und Kälte wird über SIG5 vermittelt (Tsunoyama et al., 2004; Nagashima et al., 2004). Außerdem scheint der Sigmafaktor in die Blaulichtwahrnehmung involviert zu sein, da seine eigene Transkription durch Blaulicht induziert wird und er an den BLRP (Blue-Light Responsive Promoter) von *psbD* bindet (Tsunoyama et al., 2002).

Neben Licht wird die Aktivität von Sigmafaktoren durch Phosphorylierung, Redoxreaktionen, Proteininteraktionen und eventuell durch proteolytische Prozessierung reguliert (Lerbs-Mache, 2011).

PEP-Promotoren ähneln in den konservierten -35 (TTGACA)- und -10 (TATAAT)-Konsensusmotiven eubakteriellen σ^{70} -Promotoren und werden auch von der RNA-Polymerase aus *Escherichia coli* (*E.coli*) erkannt (Gruissem and Zurawski 1985a,b; Ishihama, 1988; Weihe and Börner, 1999).

Eine strikte Trennung der RNA-Polymeraseaktivitäten in eine frühe und späte Phase lässt sich nicht treffen. Zwar nimmt die plastidärkodierte RNA-Polymerase durch die Transkription von überwiegend photosynthetischen Genen eine essentielle Rolle in der späteren Entwicklung der Pflanze ein, jedoch wird sie auch schon für eine effektive Keimung benötigt (Mullet et al., 1993, Demarsy et al., 2006). Im Gegensatz dazu sind die kernkodierte RNA-Polymerasen zwar hauptsächlich in frühen Phasen der Entwicklung aktiv, sind aber auch in die Transkription von reifen Chloroplasten involviert (Emanuel et al., 2006; Courtois et al., 2007).

Während die Genexpression bei Cyanobakterien hauptsächlich auf transkriptionaler Ebene reguliert wird, kommt der Transkription in Grünalgen und Pflanzen eine weitaus geringere Bedeutung zu. Vielmehr bilden posttranskriptionale Prozesse wie RNA-Prozessierung, -Stabilisierung und -Edierung oder die Translation die Hauptregulationsebenen der plastidären Genexpression. So ist beispielsweise auch die durch Licht induzierte Veränderung der RNA-Pegel in der Regel auf eine Erhöhung der RNA-Stabilität und nicht auf gesteigerte Transkriptionsraten zurückzuführen (Deng and Gruissem, 1987; Klein and Mullet, 1987; Kim et al., 1993; Staub and Maliga, 1993).

1.4.2. Plastidäre Transkripte durchlaufen verschiedene Reifungsprozesse

1.4.2.1. Endo- und Exonukleasen schaffen kleinere Transkripteinheiten

In höheren Pflanzen ist der überwiegende Teil der plastidären Gene in Folge des prokaryo-

tischen Erbes in polycistronischen Transkriptionseinheiten angeordnet (Herrmann et al., 1992; Sugiura, 1992). Sie sind in der Regel heterogen konzipiert. So kodiert beispielsweise das *psbB* Operon für Untereinheiten des PSII und des Cyt b_6f -Komplexes (Westhoff and Herrmann, 1988). Die gebildeten polycistronischen Vorläufertranskripte werden durch eine Reihe von intercistronischen Prozessierungsschritten in verschiedene Mono-, Di- und kleinere polycistronische Transkripte überführt. Meist werden monocistronische Transkripte im Vergleich zu ihren prozessierten Vorläufern weitaus effektiver translatiert, da durch die Prozessierung die Translationsinitiation beeinträchtigende Faktoren, wie die Ausbildung von Sekundärstrukturen, umgangen werden (Barkan et al., 1994; Sturm et al., 1994; Hirose and Sugiura, 1997).

Die intercistronische Prozessierung wird durch einen endonukleolytischen Schnitt eingeleitet. Im Anschluss werden beide Enden durch 5'→3' bzw. 3'→5' Exonukleasen getrimmt bis Sekundärstrukturen in der RNA oder gebundene Proteine das Transkript vor weiterem Abbau schützen. Auf diesem Weg entstehen die distinkten Enden der 5' und 3' untranslatierten Region (UTR) eines Transkriptes.

Eine Funktion als allgemeine Endoribonuklease wird für RNaseE und RNaseJ diskutiert (Schein et al., 2008; de la Sierra-Gallay et al., 2008). Sequenzspezifität erhalten die Endonukleasen vermutlich durch RNA-bindende Proteine, die sie zur entsprechenden Schnittstelle rekrutieren. Es sind nur sehr wenige sequenzspezifische Endonukleasen bekannt (Nickelsen and Link, 1993; Yang and Stern, 1997; Okuda et al., 2009). CRR2 schneidet beispielsweise spezifisch in der intergenetischen Region zwischen *rps7* und *ndhB* in *A.thaliana* (Okuda et al., 2009; Hashimoto et al., 2003).

RNaseJ besitzt in Bakterien zusätzlich eine exonukleolytische Funktion. Sie katalysiert die 5'→3' Degradation verschiedener mRNAs (Mathy et al., 2007). Lange Zeit wurde über eine vergleichbare Funktion in Chloroplasten spekuliert. Kürzlich wurde anhand des rekombinanten Proteins aus *A.thaliana* bewiesen, dass RNaseJ auch in höheren Pflanzen neben der endonukleolytischen Aktivität ebenfalls eine 5'→3' Exoribonukleaseaktivität besitzt (Sharwood et al., 2011). Die Reifung von 3'Enden wird hingegen durch die 3'→5' Exoribonuklease PNPase (Polynucleotide Phosphorylase) realisiert (Yehudai-Resheff et al., 2001). Sie ist sensitiv für Sekundärstrukturen und arretiert somit an Haarnadelstrukturen (Yehudai-Resheff et al., 2001).

1.4.2.2. Kernkodierte Spleißfaktoren kompensieren den Verlust von Maturasen

Eine Reihe von plastidären Transkripten enthalten Introns, die aus der prä-mRNA vor der Translation entfernt werden müssen. Das Ausschneiden der Introns und die im Anschluss

stattfindende Verknüpfung der Exone wird unter dem Begriff Spleißen zusammengefasst. Man unterscheidet zwischen selbstspleißenden und spleißosomalen Introns. Selbstspleißende Introns werden hinsichtlich ihrer Primär- bzw. Sekundärstruktur und anhand der Spleißmechanismen in zwei Typen, den Gruppe I und Gruppe II Introns, eingeteilt (zusammengefasst in de Longevialle et al., 2010).

Gruppe I Introns besitzen eine charakteristische Sekundärstruktur. Sie besteht aus 10 Domänen, die jeweils spezifische Aufgaben im Falten der RNA erfüllen. Von den etwa 20 ‚selbstspleißenden‘ Introns in plastidären Transkripten höherer Pflanzen (21 in Arabidopsis; 18 in Mais und Reis) gehört lediglich eins der Gruppe I an (de Longevialle et al., 2010).

Gruppe II Introns werden in vier Unterklassen unterteilt, wobei jeweils zwei entweder in blühenden Pflanzen (Unterklasse IIA und IIB; Michel et al., 1989) oder in Bakterien (Unterklasse IIC und IID; Michel et al., 1989; Toor et al., 2001) vorkommen. Sie bestehen aus sechs Domänen, die unterschiedliche Aufgaben erfüllen. In Landpflanzen enthalten sie nur in seltenen Fällen die kodierende Sequenz einer Maturase. Diese Introns sind *trnK* in Chloroplasten und das vierte Intron von *nad1* in Mitochondrien.

Ursprünglich waren Introns mobile Elemente, deren Spleißen aus der Wirtssequenz durch Maturasen vermittelt wurde (Eickbush et al., 1999; Wank et al., 1999). Im Laufe der Evolution degenerierten die meisten selbstspleißenden Introns in Landpflanzen, was zum weitgehenden Verlust der Maturasen führte. An ihre Stelle sind kernkodierte Faktoren getreten, die je nach Transkript in unterschiedlichen Zusammensetzungen das Spleißen vermitteln (Barkan et al., 2011). Meist gehören sie zu den Familien der PPR(Pentatricopeptide Repeat)- oder CRM(Chloroplast RNA splicing and ribosome Maturation)-Domäne Proteinen (zusammengefasst in Schmitz-Linneweber and Small, 2008; Barkan et al., 2007). PPRs sind RNA-bindende Proteine, die maßgeblich auf die plastidäre und mitochondrielle Genexpression Einfluss nehmen (Small and Peeters, 2000). Mitglieder dieser Familie sind in ihrer Funktion nicht auf das Spleißen beschränkt, sondern beziehen ebenfalls die Prozesse der Transkriptprozessierung, -edierung und -stabilisierung sowie die Translation mit ein (siehe auch Abschnitt 1.4.2.3. und 1.4.3.2.). Die RNA-bindende Eigenschaft wird durch das PPR-Motiv vermittelt (Schmitz-Linneweber and Small, 2008). Es besteht aus 2 bis 30 Sequenzwiederholungen von je 35 Aminosäuren, die tandemartig angeordnet sind (Small and Peeters, 2000; Schmitz-Linneweber and Small, 2008). Im Gegensatz zu CRM-Domänen Proteinen, die in das Spleißen einer Vielzahl von Transkripten involviert sind, scheint sich die Aktivität von PPR-Proteinen meist spezifisch auf ein bestimmtes Transkript zu beziehen.

PPR4 ist in das *trans*-Spleißen des ersten Introns von *rps12* involviert (Schmitz-Linneweber et al., 2006). Die Assoziation mit diesem Intron konnte über RNA-Immunopräzipitation gezeigt werden. Neben dem PPR-Motiv verfügt PPR4 zusätzlich über ein aminoterminals RNA-Bindemotiv. Das PPR-Protein OTP51 ist in das Spleißen des zweiten Introns von *ycf3*

involviert (de Longevialle et al., 2008). Darüber hinaus beeinflusst es das Spleißen verschiedener tRNA-Introns und des Introns von *atpF* (de Longevialle et al., 2008).

Mit CRS1, CRS2, CFM2, CFM3, CAF1 und CAF2 wurden in den letzten Jahren eine Reihe von plastidären Spleißfaktoren aus der Familie der CRM-Domänen Proteine beschrieben. Die CRM-Domäne entwickelte sich aus einem prokaryotischen ribosomenassoziierten Vorläuferprotein (Barkan et al., 2007). In *E.coli* ist das CRM-Domänen-Protein YhbY in die Ribosomenbiogenese involviert. Eine erste Studie weist auf die Existenz von Faktoren mit einer vergleichbaren Funktion in höheren Pflanzen hin (Barkan et al., 2007). Der überwiegende Anteil der identifizierten CRM-Domänen Proteine ist jedoch in das Spleißen plastidärer RNAs involviert (de Longevialle et al., 2010).

CAF1 und CAF2 sind Paraloge, die mit CRS2 ein Heterodimer bilden. Beide Komplexe steuern eine Vielzahl von Gruppe IIB Introns an, wobei die CAF Proteine CRS2 zum jeweiligen Intron rekrutieren (Ostheimer et al., 2003; Asakura and Barkan, 2006).

Auch CRS1 und CFM2 sind Paraloge. Während CRS1 für das Spleißen des *atpF* Introns benötigt wird (Jenkins et al., 1997; Asakura and Barkan, 2006), ist CFM2 in das Spleißen von *ndhA* und *ycf3* (Intron 1) und dem Gruppe I Intron in *trnL-UAA* involviert (Asakura and Barkan, 2007).

1.4.2.3. Durch die Edierung bleiben essentielle Sequenzinformation erhalten

Neben der Prozessierung und dem Spleißen nimmt die Edierung eine weitere Ebene in der posttranskriptionalen Transkriptreifung ein. Bei der Edierung werden einzelne Cytidine in Uridine umgewandelt. In einigen Hornmoosen und Farnen ist die Edierung zusätzlich revers gerichtet, folglich wird ein Uridin in ein Cytidin editiert (Kugita et al., 2003; Wolf et al., 2004). Mit Ausnahme einer Klasse der Lebermoose, den Marchantiopsida, ist die Edierung in allen Pflanzen zu finden, jedoch kommt sie nicht in Bakterien oder den Organellen der Algen vor (Freyer et al., 1997). Die Anzahl der Edierungsstellen unterscheidet sich stark zwischen Chloroplasten und Mitochondrien. In *A.thaliana* beläuft sich das Verhältnis von mitochondrialen (508) zu plastidären (34) Edierungsstellen auf etwa das 15-Fache (Chateigner-Boutin and Small, 2007; Bentolila et al., 2008).

Evolutionär gesehen ist die Edierung ein sich schnell entwickelnder Prozess. Über die Hälfte der Edierungsstellen unterscheiden sich in Mono- und Dikotylen Pflanzen (Tsudzuki et al., 2001; Chateigner-Boutin and Small, 2007). Indem sie ein neues Startkodon erschaffen (Wintz and Hanson, 1991; Hoch et al., 1991; Kudla et al., 1992; Neckermann et al., 1994) oder konservierte Aminosäuren wieder herstellen, die für die Funktion und/oder die dreidimensionale Struktur des Proteins wichtig sind (Gualberto et al., 1989; Zito et al., 1997;

Sugita et al., 2006; Yura and Go, 2008), erfüllen die meisten Edierungen eine wichtige Funktion in der Genexpression. Einige Edierungsstellen liegen innerhalb von Introns oder in der Nähe von Intron-Exon-Grenzen und legen daher eine Rolle beim Spleißen nahe (zusammengefasst in de Longevialle et al., 2010).

Auch wenn der genaue Mechanismus der Edierung weiterhin Gegenstand der Forschung bleibt, konnten in den letzten Jahren tiefere Einblicke in die Edierungsmaschinerie gewonnen werden. Sie beinhaltet *cis*- und *trans*-Elemente. Fast alle der bisher identifizierten *trans*-Faktoren sind PPR-Proteine, die neben der PPR-Domäne weitere Motive (DYW und/oder E bzw. E+) aufweisen (Lurin et al., 2004; Schmitz-Linneweber and Small, 2008). Diese Motive werden als putative Bindestelle für einen allgemeinen, bisher noch unbekannten Edierungsfaktor diskutiert.

Die PPR-Proteine CCR4 und CRR21 werden für die Edierung innerhalb des *ndhD* Transkriptes benötigt (Kotera et al., 2005; Okuda et al., 2007). CRR4 bindet spezifisch an eine kurze Sequenz, welche die Edierungsstelle beinhaltet (Okuda et al., 2006; 2007). CLB19 ist in die Edierung der *rpoA* und *clpP* Transkripte involviert (Chateigner-Boutin et al., 2008). Allen drei Edierungsfaktoren fehlt die DYW-Domäne. Andere Faktoren wie das kürzlich beschriebene RARE1, das für die *accD* Edierung benötigt wird (Robbins et al., 2009) oder OTP82 für *ndhB* und *ndhG* (Okuda et al., 2010) bzw. YS1 für *rpoB* (Zhou et al., 2009) haben sowohl eine E- als auch DYW Domäne.

1.4.3. Kernkodierte Proteine beeinflussen die plastidäre Translation

1.4.3.1. Die plastidäre Translationsinitiation zeigt Parallelen zu Pro- und Eukaryoten

Die plastidäre Translation weist in ihren Grundzügen deutlich auf ihr prokaryotisches Erbe hin. Zugleich zeugt sie jedoch auch von zahlreichen Anpassungen an das eukaryotische System, die sich im Laufe der Evolution entwickelt haben. Diese Entwicklung wird bereits an der Translationsmaschinerie verdeutlicht. Plastidäre Transkripte werden durch bakterien-ähnliche 70S Ribosomen translatiert. Genetische und Proteomanalysen von Ribosomen aus Spinatchloroplasten konnten belegen, dass die Mehrheit der ribosomalen Proteine Ähnlichkeiten zu Bakterien zeigen, jedoch einige Proteine (PSRP-1 bis PSRP-6) keine Homologie zu bakteriellen ribosomalen Proteinen aufweisen (zusammengefasst in Marin-Navarro et al., 2007). Ein Teil dieser kernkodierten Proteine übernimmt wahrscheinlich strukturelle und regulatorische Aufgaben während der Translation (Sharma et al., 2007). Die Ergebnisse der dreidimensionalen Kryoelektronenmikroskopie der 70S Ribosomen aus

Spinat lassen vermuten, dass PSRP2 und PSRP3 fehlende Nukleotide der 16S rRNA strukturell kompensieren können (Sharma et al., 2007). Für PSRP2 wird außerdem eine Rolle in der Translationsinitiation der lichtsynchronisierten Proteinsynthese diskutiert (Yamaguchi and Subramanian, 2003). Insgesamt sind die meisten plastidären ribosomalen Proteine in Folge von amino- oder carboxyterminalen Erweiterungen insgesamt größer als ihre bakteriellen Vorläufer.

Bei der Rekrutierung der Ribosomen zeigt sich ebenfalls ein gewisser Grad der Konservierung. Im eubakteriellen System wird die Bindung des Ribosoms an ein Transkript durch die Interaktion der Shine-Dalgarno (SD) Sequenz mit dem 3' Terminus der 16S rRNA (Anti-SD-Sequenz) vermittelt und dadurch die Translation initiiert (zusammengefasst in Marin-Navarro et al., 2007). Innerhalb der 5' UTR ist das bakterielle SD-Konsensusmotiv (GGAGG) etwa 4 bis 12 nt vom Startkodon entfernt positioniert. SD-ähnliche Sequenzen sind auch in plastidären Transkripten vorhanden, variieren jedoch in ihrer Lokalisation und Basenkomposition (Sugiura et al., 1998). Im Gegensatz dazu ist die Anti-SD-Sequenz zwischen *E. coli*, Cyanobakterien, Grünalgen und vaskulären Pflanzen hoch konserviert.

Auch wenn SD-ähnliche Sequenzen für einige Transkripte, wie *psbA*, *psbD* und *psbC* in *Chlamydomonas* oder *rbcL*, *atpE* und *rps14* in Tabak, essentielle Elemente der Translationsinitiation darstellen, sind sie bei anderen Transkripten teilweise (*rps12*, *petB* aus Tabak) oder ganz (*atpB*, *atpE*, *rps4*, *rps7*, *petD* aus *Chlamydomonas*) entbehrlich geworden (Mayfield et al., 1994; Sakamoto et al., 1994; Fargo et al., 1998; Hirose et al., 1998; Nickelsen et al., 1999; Zerges et al., 2003; Hirose and Sugiura, 2004a,b).

Neben SD-ähnlichen Sequenzen üben offensichtlich weitere regulatorische *cis*-Elemente eine regulatorische Funktion innerhalb des Translationsinitiationsprozesses aus. Am Beispiel der *psbD* 5' UTR aus *Chlamydomonas* ist dies gut ersichtlich. Mutagenesestudien zeigten, dass ein polyU-Element und das Startkodon ebenfalls essentielle Translationselemente sind (Nickelsen et al., 1999; Ossenbühl and Nickelsen, 2000). Die U-reiche Sequenz wird von einem SD-ähnlichen Motiv (RPB1; Putative Ribosome Binding site 1) und einer PRB2-Sequenz eingeschlossen. PRB2 ist teilweise komplementär zu einer Region innerhalb der 16S RNA, die sich stromaufwärts der Anti-SD Region befindet. Außerdem werden PRB2 und die poly-U Region als Bindestellen für *trans*-Faktoren diskutiert (siehe Kapitel 1.4.3.2.; zusammengefasst in Schwarz et al., 2012).

SD-ähnliche Sequenzen können auch reprimierend auf die Translation wirken. Die Mutagenese der SD-ähnlichen Sequenz in der *rps2* mRNA bewirkt einen Anstieg der Translationseffizienz, die nicht auf Änderungen in der Sekundärstruktur zurückzuführen ist. Infolgedessen könnte diese Sequenz als Binderegion für einen oder mehrere unbekannte *trans*-Faktoren dienen (Plader and Sugiura, 2003).

1.4.3.2. PPR- und PPR-ähnliche Proteine definieren die reifen Transkripttermini und sind maßgeblich an der plastidären Translationsinitiation beteiligt

In Pro- und Eukaryoten ist der Mechanismus der translationalen Initiation basierend auf der Interaktion zwischen SD-Sequenz und Ribosomen hoch konserviert. In einer genomweiten Studie wurden prokaryotische und plastidäre Gensequenzen nach der Präsenz von SD-Elementen überprüft (Scharff et al., 2011). Lediglich 60% der untersuchten plastidären Gene bzw. 50% der cyanobakteriellen Gene besitzen SD-Sequenzen. Zudem belegen viele Beispiele, dass die Rekrutierung des Ribosoms mit Hilfe eines SD-Elements nicht zwingend für die Initiation erforderlich ist (siehe Kapitel 1.4.3.1.). Oftmals werden mRNAs, denen SD-Sequenzen fehlen, ebenfalls effizient translatiert. Der zugrunde liegende Mechanismus ist noch weitestgehend unbekannt, jedoch sind diese Transkripte meist nur wenig strukturiert (Scharff et al., 2011). Diese Eigenschaft soll es der ribosomalen 30S Untereinheit ermöglichen, an die RNA zu binden und das Transkript bidirektional nach dem Startkodon abzusuchen.

Kernkodierte *trans*-Faktoren nehmen ebenfalls eine essentielle Rolle innerhalb der Translationsinitiation in Pflanzen und *Chlamydomonas* ein (zusammengefasst in Meierhoff and Westhoff, 2011; Lyska et al., 2012). Ein Großteil dieser Initiationsfaktoren sind PPR- oder PPR-ähnliche Proteine, wie TPR (Tetratricopeptide Repeat)- oder HAT (Half-A-Tetratricopeptide repeat)-Proteine. Vergleichbar zu PPR-Domänen (siehe auch Kapitel 1.4.2.2.) bilden TPR- und HAT-Domänen ebenfalls eine helikale Struktur aus, die auf Sequenzwiederholungen basiert. Über diesen Bereich können TPRs und HATs im Gegensatz zu PPRs neben RNA auch Proteine binden (zusammengefasst in Stern et al., 2010; Allan and Ratajczak, 2011; Hammani et al., 2012). Zusätzlich zu ihrer essentiellen Rolle innerhalb der Translationsinitiation besitzen viele dieser *trans*-Faktoren eine transkriptstabilisierende Funktion (Monod et al., 1992; Vaistij et al., 2000a,b; Felder et al., 2001; Sane et al., 2005; Prikryl et al., 2011, Hammani et al., 2012). Aus dieser Beobachtung kristallisierte sich in den letzten Jahren, gestützt durch RNA-Bindestudien, ein Translationsinitiationsmechanismus heraus, der die Stabilisierung und die Translation eines Transkriptes eng miteinander verknüpft. Dabei schützen die PPR- und PPR-ähnlichen Proteine einerseits das Transkript vor Degradation, indem sie das Voranschreiten der Exoribonukleasen verhindern. Zum anderen führt die Interaktion mit der 5'UTR zu einer Remodulierung der Sekundärstruktur des Transkriptes. Dies hat zur Folge, dass doppelsträngige Bereiche der RNA einzelsträngig werden und damit zuvor maskierte ribosomale Bindestellen und andere *cis*-Elemente nun für die Translationsmaschinerie zugänglich sind.

In höheren Pflanzen ist dieser Mechanismus an den gut untersuchten Beispielen PPR10 (Mais) und HCF107 (*A.thaliana*) erkennbar. PPR10 beeinflusst zum einem die Prozessierung zweier intergenischer Regionen (*psaJ-rpl33* und *atpl-atpH*) und die Stabilisierung des *atpH* 5'Terminus sowie die Translation der *atpH* mRNA (Pfalz et al., 2009; Prikryl et al., 2011). Die *atpH* 5'UTR bildet eine Haarnadelstruktur aus, in deren doppelsträngigen Bereich eine putative Shine-Dalgarno Sequenz liegt (Prikryl et al., 2011). RNase-Schutzexperimente mit dem rekombinanten Protein zeigten, dass das SD-Element durch die Bindung von PPR10 an diesen Bereich aus dem RNA-Doppelstrang entlassen wird und somit für Ribosomen zugänglich ist (Prikryl et al., 2011).

HCF107 ist in die Prozessierung, Stabilisierung und Translation der *psbH* Transkripte involviert. *psbH* wird durch das pentacistronische *psbB* Operon kodiert. In der Mutante *hcf107* sind Transkripte mit *psbH* als führendem Cistron instabil, was zum Fehlen des PsbH Proteins führt. Die 5'UTR der *psbH* Transkripte tritt in einer längeren (-75) und in einer kürzeren, prozessierten (-45) Form auf, wobei scheinbar nur Letztere effektiv translatiert wird (Felder et al., 2001; Sane et al., 2005). Die unprozessierte *psbH* 5'UTR bildet eine stabile Haarnadelstruktur aus, welche das Startkodon vor dem Zugriff der Translationsmaschinerie verbirgt (Felder et al., 2001; Hammani et al., 2012). Es wird angenommen, dass sich durch die Bindung des HAT-Proteins lokal die Konformation der *psbH*-5'UTR ändert, wodurch die Haarnadelstruktur aufgelöst und die Translationsinitiationsregion für die Ribosomen zugänglich wird (Hammani et al., 2012). Darüber hinaus blockiert HCF107 den Transkriptabbau durch 5'→3' Exoribonukleasen. Neben PsbH ist auch die Akkumulation von CP47 in der Mutante betroffen. In Anbetracht des wildtypischen Transkriptpegels scheint HCF107 vornehmlich translational oder posttranslational auf die CP47-Akkumulation Einfluss zu nehmen (Felder et al., 2001; Sane et al., 2005).

Mbb1 aus *Chlamydomonas* besitzt eine ähnliche Funktion wie sein Ortholog HCF107 aus *Arabidopsis* (Felder et al., 2001; Monod et al., 1992; Vaistij et al., 2000a,b). Im Gegensatz zu HCF107 ist Mbb1 jedoch neben der *psbH*-Prozessierung und -Stabilisierung auch in die *psbB*-Prozessierung involviert (Vaistij et al., 2000a). Außerdem wird eine Rolle in der Translation von CP47 spekuliert.

Weitere Vertreter dieses translationalen Initiationsmechanismus in *Chlamydomonas* ist das TPR-Protein Nac2 und RBP40. Nac2 bildet einen hochmolekularen Komplex, der die *psbD* mRNA vor Nukleaseangriffen schützt (Kuchka et al., 1989; Nickelsen et al., 1999, Boudreau et al., 2000). Zugleich rekrutiert Nac2 den *trans*-Faktor RBP40, der an ein uridinreiches Element in der Nachbarschaft von PRB2 binden soll. Es wird vermutet, dass infolgedessen eine Sekundärstruktur destabilisiert wird, in der das Startkodon eingebettet war. Der Strukturverlust ermöglicht der kleinen ribosomalen Untereinheit den Zugang zum Startkodon (Nickelsen et al., 1999; Ossenbühl and Nickelsen, 2000; Schwarz et al., 2007, 2012).

Vergleichbar zu Mbb1 verknüpfen auch PGR3 und CRP1 Prozesse wie Prozessierung, Stabilisierung und Translation eines Transkriptes miteinander. Der genaue Wirkmechanismus dieser Proteine ist noch unbekannt. Jedoch stellen diese Proteine in Anbetracht ihrer Funktion und ihrer Zugehörigkeit zur Familie der PPR- bzw. HAT-Proteine und der Parallelen zu HCF107 und PPR10 gute Kandidaten für den beschriebenen Mechanismus dar.

PGR3 wird in höheren Pflanzen für die Prozessierung und Stabilisierung des *petL*-Operons benötigt und ist darüber hinaus in die Translation von *petL* und *ndhA* involviert (Yamazaki et al., 2004; Cai et al., 2011). In Mais ist das PPR-Protein CRP1 an der Prozessierung des *psbB* Operons in der intergenischen Region zwischen *petB* und *petD* beteiligt. In der Mutante akkumulieren keine monocistronischen *petB*- und *petD*-Transkripte (Barkan et al., 1994; Fisk et al., 1999). Darüber hinaus scheint CRP1 als translationaler Regulator für *petA* und *psaC* zu fungieren, indem es die Translation beider mRNAs aktiviert (Barkan et al., 1994; Schmitz-Linneweber et al., 2005).

1.4.3.3. Die Translationsinitiation ist ein wichtiges Regulativ der plastidären Expression

Neben *cis*-Elementen und *trans*-Faktoren spielt bei der Translationsinitiation von einigen Transkripten auch der Basenkontext in direkter Umgebung des Startkodons (-1 Position) eine Rolle. Dieser Mechanismus der erweiterten Kodon-Antikodon-Interaktion unterliegt im Fall des *petA*-Transkriptes einer Wechselwirkung zwischen dem Uridin an Position -1 der mRNA und einem konservierten Adenin an Position -37 innerhalb der tRNA (Met) (Esposito et al., 2003). Alles in allem nimmt die erweiterte Kodon-Antikodon-Interaktion keine essentielle Funktion für die Translationsinitiation ein, jedoch verleiht sie Transkripten mit abgewandelter Startkodonsequenz zusätzliche Spezifität und/oder sichert den Translationsablauf unter Stressbedingungen (Esposito et al., 2003). Interessant ist, dass etwa 75% der plastidären Transkripte in *Chlamydomonas* an Position -1 ein Uridin besitzen (Maul et al., 2002).

Äußere Faktoren, wie Entwicklungs- und Umgebungssignale, wirken sich z.T. in erheblichem Maße auf die Translation einiger Gene aus. Die Biogenese der Chloroplasten erfordert beispielsweise Licht, zum einen für die Synthese von Chlorophyll, zum anderen für die Akkumulation einer Reihe von Untereinheiten der photosynthetischen Thylakoidmembran. In *Chlamydomonas* ist der Mechanismus der lichtregulierten D1-Translation relativ gut untersucht. Dort soll ein Komplex von vier Proteinen (RB47, RB38, RB60 und RB55) lichtabhängig an eine Haarnadelstruktur in der *psbA* 5'UTR binden und dadurch dessen Translation aktivieren (Danon and Mayfield, 1991, 1994; Mayfield et al., 1994; Yohn et al.,

1996). RB38 und RB47 haben beide RNA-bindende Eigenschaften, wobei diese bei RB47 im Gegensatz zu RB38 redoxabhängig vermittelt wird (Kim and Mayfield 1997; Barnes et al., 2004). RB60 ist homolog zu Disulfidisomerasen und modifiziert den Redoxstatus von RB47 über zwei redoxaktive Cysteine (Kim and Mayfield, 1997, 2002). Seine Aktivität wird wiederum über das Ferredoxin-Thioredoxinsystem von PSI und einer Serin/Threonin Protein Phosphatase reguliert, die RB60 in einem ADP-abhängigen Prozess phosphoryliert und auf diesem Weg die Bindeeigenschaften des Komplexes inaktiviert (Danon and Mayfield, 1994; Trebitsh et al., 2001). Aufgrund eines hohen ADP/ATP Verhältnisses, das meist nur während der Nacht erreicht wird, soll dieser Mechanismus dazu vermutlich dienen, die D1-Translation in der Nacht zu minimieren (Danon and Mayfield, 1994). RB47 wird neben RB60 wahrscheinlich auch über den pH-Wert reguliert. Aufgrund der pH-Sensitivität seiner Cysteine wird eine Abhängigkeit von stromalen pH-Änderungen und damit von Änderungen der Lichtbedingungen angenommen (Alegand et al., 2006). Die Identifikation erster redox-regulierter Faktoren lässt auch in höheren Pflanzen einen ähnlichen Mechanismus vermuten (Staub and Maliga, 1993; Shen et al., 2001).

Die Translationsinitiation unterliegt in *Chlamydomonas* auch der Kontrolle eines assemblierungsabhängigen Regulationsprozesses, dem CES (Control by Epistasy of Synthesis)-Prozess. Dabei wirkt ein Protein, welches in Folge eines fehlenden Bindepartners nicht assembliert werden kann, reprimierend auf seine eigene Translation. Dieser Regulationsmechanismus ist bei allen drei Komplexen der photosynthetischen Elektronentransportkette und der ATP-Synthase zu finden (Choquet et al., 1998; Wostrikoff et al., 2004; Minai et al., 2006; Drapier et al., 2007). In den letzten Jahren wurde der CES-Mechanismus für Cytochrom *f* (Cyt *f*) intensiv erforscht (Choquet et al., 1998; Raynaud et al., 2007; Loiselay et al., 2008; Boulouis et al., 2011). Die Faktoren MCA1 und TCA1 sind in die Expression von Cyt *f* involviert, wobei MCA1 für die stabile Akkumulation und TCA1 für die Translation der *petA* mRNA benötigt werden (Raynaud et al., 2007). Beide Faktoren bilden einen hochmolekularen Komplex, der auch *petA* mRNA enthält (Boulouis et al., 2011). Wird Cyt *f* nicht assembliert, bindet es an MCA1 und bewirkt dessen Degradation (Boulouis et al., 2011). Da MCA1 die *petA* mRNA nicht länger vor 5'→3' Abbau schützen kann (Loiselay et al., 2008), inhibiert Cyt *f* auf diesem Weg seine eigene Translation (Choquet et al., 1998; Raynaud et al., 2007).

1.4.3.4. Die Regulation der plastidären Elongation und Termination ist noch weitestgehend unbekannt

Wenn auch ein Großteil der translationalen Regulationsmechanismen auf die Initiation

ausgelegt ist, greifen einige von ihnen auch auf Ebene der Elongation und Termination ein. Beispielsweise pausieren die Ribosomen während der D1 Elongation an definierten Punkten, um die Proteinfaltung, das Binden von Co-Faktoren wie Chlorophyll und die co-translationale Assemblierung zu ermöglichen (de Vitry et al., 1989; Mullet et al., 1990; Zhang et al., 2000).

Die Lichtregulation nimmt nach der Translationsinitiation weiterhin eine wichtige Funktion ein (Klein and Mullet, 1987; van Wijk and Eichacker, 1996; Mühlbauer and Eichacker, 1998). In Untersuchungen von Spinat und Gerste hat man festgestellt, dass die Elongation von D1 durch Licht stimuliert wird und die involvierten Mechanismen über einen Redoxweg ausgehend von PSI bzw. die Ausbildung eines Protonengradienten über die Thylakoidmembran reguliert werden (Mühlbauer and Eichacker, 1998; Zhang et al., 2000).

Die Regulation der Elongation der großen Untereinheit der Rubisco (RbcL) erfolgt bei der Gerste ebenfalls lichtabhängig. Im Dunklen wird die Elongation inhibiert. Dieser Arrest hebt sich nach dem Transfer ins Licht auf (Kim and Mullet, 2003). Eine zu starke Lichteinstrahlung, die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) generiert, hat wiederum einen reprimierenden Effekt auf die Translation der RbcL (Shapira et al., 1997; Cohen et al., 2005). Bisher wurden nur wenige Hilfsfaktoren identifiziert, die in die Elongation und Termination eingreifen. Vir-115 (Gerste) und Ac115 (Chlamydomonas) sollen D1- bzw. D2- Elongationsintermediate stabilisieren und das Falten bzw. Binden von Co-Faktoren ermöglichen und/oder die Insertion in die Membran fördern (Kim et al., 1994; Rattanachaikunsopon et al., 1999).

Die translationale Termination wird in Eubakterien durch drei Terminationsfaktoren (RF1, RF2 und RF3) vermittelt. Mit HCF109 wurde in Arabidopsis ein Homolog zu RF2 identifiziert (Meurer et al., 2002). Dieser kernkodierte Faktor wird für die Termination und Stabilisierung verschiedener Transkripte mit UGA-Stopkodon benötigt.

Der Vergleich der eubakteriellen und plastidären Genexpression offenbart die Entwicklung zahlreicher Veränderungen. Der Zugewinn von umfangreichen Regulationsmechanismen macht die Transkriptreifung und Translation zum Angelpunkt der plastidären Genexpression in Grünalgen und Pflanzen. Darüber hinaus sind sie Spiegelbild für die enge Vernetzung zwischen Nukleom und Plastom, welche sich im Laufe der Evolution entwickelt hat.

1.4.4. Die posttranslationalen Prozesse der plastidären Genexpression

Die letzte Regulationsebene innerhalb der plastidären Genexpression beinhaltet posttranslationale Prozesse, wie die Proteinreifung und -assemblierung in aktive Komplexe. Diese Abläufe werden durch eine Reihe von allgemeinen und komplexspezifischen Hilfsfaktoren reguliert.

1.4.4.1. Proteinmodifikationen erfüllen vielseitige Aufgaben im Chloroplasten

Posttranslationale Proteinmodifikationen zielen darauf, Proteine in der Membran zu verankern, ihre Aktivität oder Interaktion mit anderen Proteinen zu regulieren (z.B. Phosphorylierung, Co-Faktorbindung, Prozessierung), sie zu stabilisieren (z.B. Glykosylierung und N-terminale Formylierung, Co-Faktorbindung) oder sie zum Abbau zu markieren (Ubiquitinierung). Proteinmodifikationen können stabil oder reversibel sein.

Einige Proteine müssen nach der Translation N- oder C-terminal prozessiert werden. Ein Großteil der in den Chloroplasten transportierten Proteine besitzt aminoterminal Transitpeptide, die nach Erreichen des Stromas bzw. Lumens (bei zweiteiligen Transitpeptiden) durch eine stromal bzw. luminal lokalisierte Protease abgespalten werden (Halpin et al., 1989; Richter et al., 2005). Das plastidär kodierte D1 Protein wird ebenfalls prozessiert, jedoch am Carboxyterminus. Es wird zunächst als Vorläuferprotein (pD1) mit einer 9 bis 16 AS langen Erweiterung synthetisiert (Marder et al., 1984; Takahashi et al., 1988; Inagaki et al., 2001; Komenda et al., 2007), die anschließend von einer luminalen Protease (CtpA; Carboxyterminal processing Protease A; Anbudurai et al., 1994; Fujita et al., 1995; Oelmüller et al., 1996) abgespalten wird. Dieser Prozessierungsschritt ist für die Bindung des Wasserspaltungsapparates notwendig (Nixon et al., 1992; Roose and Pakrasi, 2004).

Eine weitere Möglichkeit der posttranslationalen Reifung ist die Bindung von Co-Faktoren. Die photosynthetischen Komplexe sind mit einer Reihe von Co-Faktoren, wie Chlorophylle und Xanthophylle (PSII, PSI und Cyt b_6f -Komplex), Häm-Gruppen (PSII und Cyt b_6f -Komplex), Eisen-Schwefel-Cluster (PSI und Cyt b_6f -Komplex) und Mangan-Cluster (PSII) assoziiert (Robertson et al., 1994; Stroebel et al., 2003; Kurisu et al., 2003; Amunts et al., 2007; Guskov et al., 2009; Rochaix, 2011). Sie übernehmen wichtige Aufgaben bei der Lichtsammlung, Ladungstrennung und den verschiedenen Redoxreaktionen der Photosynthese.

Viele Komponenten der Thylakoidmembran durchlaufen reversible Phosphorylierungen in Abhängigkeit von Licht und dem plastidären Redoxstatus. Je nach Lichtqualität und -quantität variiert die PSI- bzw. PSII-Aktivität. Um die Anregungsenergie optimal zu nutzen, wird die Verteilung des mobilen Anteils des LHC zwischen beiden Photosystemen an die jeweilige Umweltbedingung angepasst. Dieser Mechanismus wird 'state transition' genannt und dient der Kurzzeitakklimatisierung. Dabei wird die Phosphorylierung der LHCII-Proteine über den Redoxstatus des Plastochinonpools gesteuert (zusammengefasst in Dietzel et al., 2008 bzw. Kargul and Barber, 2008). Unter reduzierenden Bedingungen phosphoryliert die Serin-Threonin Protein Kinase STN7 einen Teil der LHCII-Proteine an PSII, die sich infolgedessen lösen und an PSI binden. Unter oxidierenden Bedingungen ist STN7 inaktiv. Dies führt dazu, dass konstitutiv aktive Phosphatasen die PSI-assoziierten LHCII-Proteine dephosphorylieren

und diese zurück zu PSII migrieren. Neben LHCII-Proteinen werden u.a. auch D1, D2, CP43 und PsbH phosphoryliert (Ikeuchi et al., 1987).

Einige Proteine werden mit einem Lipidanhang versehen. Proteinlipidmodifikationen dienen u.a. dazu, lösliche Proteine über einen meist C-terminal lokalisierten Lipidanhang in der Membran zu verankern. Das integrale Protein D1 wird ebenfalls mit einem Lipidanhang versehen, wobei diese Modifikation ausschließlich bei der prozessierten D1-Form auftritt und nach Erreichen der Grana schnell entfernt wird (Mattoo and Edelman, 1987). Es wurde vermutet, dass diese Modifikation die funktionale Integration in das PSII unterstützen könnte (Mattoo and Edelman, 1987).

1.4.4.2. Die Assemblierung der Proteinkomplexe wird durch diverse Chaperone reguliert

Die Assemblierung der einzelnen Proteinkomplexe erfolgt in einer schrittweisen Addition der Untereinheiten und Co-Faktoren. Ein Akzeptorkomplex bestehend aus D2, PsbE/F und PsbI dient als Ausgangspunkt der PSII-Assemblierung (Rokka et al., 2005). Mit der Assemblierung von D1 entsteht das PSII-Reaktionszentrum (RC). Im nächsten Schritt wird der CP47-RC-Komplex durch den Einbau von CP47 gebildet. Im Anschluss werden mehrere Untereinheiten (PsbH, PsbM, PsbT und PsbR) hinzugefügt und formen dadurch das CP43-freie PSII Monomer. Durch den Einbau von CP43 und PsbK, der Prozessierung des D1-Vorläufers und der Addition des Wasserspaltungsapparates mit Mangancluster (OEC; Oxygen Evolving Complex) wird das PSII Monomer (RCC1) gebildet. Mit der Dimerisierung zweier PSII Monomere und der anschließenden Assemblierung der äußeren Antenne entstehen die PSII Superkomplexe.

Viele der in den letzten Jahren beschriebenen PSII Biogenese- und Assemblierungsfaktoren agieren in den frühen Schritten der Assemblierung (Abb. 3). HCF243 ist ein intrinsisches Protein, das PSII-Assemblierung unterstützt, indem es direkt an D1 bindet und es stabilisiert (Zhang et al., 2011). PAM68 ist in die Stabilisierung und Reifung von D1 involviert. Es wird vermutet, dass der kernkodierte Faktor den Einbau von D1 in frühe PSII Assemblierungsintermediate direkt oder indirekt unterstützt (Armbruster et al., 2010). Eine ähnliche Funktion wird auch LPA1 zugesprochen. Der Assemblierungsfaktor wirkt ebenfalls auf die Synthese und/oder Stabilisierung von D1 und D2 (Peng et al., 2006). Darüber hinaus könnte LPA1 als Chaperon fungieren, indem es die Faltung und Integration von D1 in die Thylakoidmembran unterstützt (Peng et al., 2006). HCF136 ist ein weiterer PSII Assemblierungsfaktor, der die initialen Assemblierungsschritte im PSII-Reaktionszentrum vermittelt (Plücker et al., 2002). In Abwesenheit des chaperonähnlichen Faktors kann pD1 nicht stabil an den Akzeptor-

zurück in die Granathylakoide.

Auch in diesen Reparaturprozessen sind eine Reihe von auxilliären Proteinen involviert (Mulo et al., 2012; Lyska et al., 2012). D1 wird durch eine luminal (DegP) und eine stromale (FtsH) Protease mit Hilfe des luminalen Hilfsfaktors TLP18.3 abgebaut. Darüber hinaus wird für TLP18.3 eine Rolle in der Dimerisierung des PSII Komplexes in den Granathylakoiden vermutet (Sirpio et al., 2007). Bei der Reassemblierung von PSII werden allgemeine Assemblierungsfaktoren von spezifischen Hilfsproteinen wie PPL1, Psb27, Psb28, FKBP20-2, LPA19 und Hsp70 unterstützt (zusammengefasst in Mulo et al., 2008, 2012). LPA19 fördert beispielsweise die C-terminale D1-Prozessierung und ermöglicht dadurch die Assemblierung des Wasserspaltungsapparates (Wei et al., 2010). Auch Psb27 ist in diesen Prozess involviert, indem es wahrscheinlich die luminal Seite des PSII-Komplex bis zur Assemblierung des OEC blockiert (Nowaczyk et al., 2006; Roose and Pakrasi, 2008).

Cytochrom b_6 ist der Ausgangspunkt für die Assemblierung des Cyt b_6f -Komplex. Es interagiert zunächst mit der Untereinheit IV. Dieses Dimer bindet im Anschluss Cytochrom f und PetG (Wollman, 2004). In nachfolgenden Schritten werden weitere Untereinheiten assembliert (Schwenkert et al., 2007). Aktiv ist der Cyt b_6f -Komplex als Dimer (Huang et al., 1994). Im Gegensatz zu PSII sind weitaus weniger Hilfsfaktoren für die Biogenese dieses Komplexes bekannt. Meist agieren sie in posttranskriptionalen oder translationalen Prozessen (Lyska et al., 2007; Heinnickel et al., 2013). Einer dieser Hilfsfaktoren ist HCF153, der für die Akkumulation der Hauptuntereinheiten benötigt wird. Die Autoren ziehen für HCF153 aufgrund der unveränderten Transkriptakkumulation und Translation in der *hcf153*-Mutante eine Rolle in der Assemblierung des Cyt b_6f -Komplexes in Betracht (Lennartz et al., 2006). Kürzlich wurde mit DAC ein neuer Cyt b_6f -Komplex Biogenesefaktor in *A.thaliana* identifiziert (Xiao et al., 2012). DAC interagiert spezifisch mit PetD und soll in dessen Stabilisierung bzw. Assemblierung involviert sein.

Die PSI-Assemblierung wird durch die co-translationale Insertion der Kernuntereinheiten PsaA/B und der Formierung des PsaA/B Kernkomplexes initiiert (Schöttler et al., 2011). Nach der Assemblierung ihrer Co-Faktoren werden in nachfolgenden Schritten zunächst PsaC und im Anschluss PsaD und PsaE sowie weitere Untereinheiten hinzugefügt. Auch für PSI sind nur sehr wenige Assemblierungsfaktoren identifiziert worden (Boudreau et al., 1997; Bartsevich and Pakrasi, 1997). In *Chlamydomonas* interagiert der essentielle Assemblierungsfaktor Ycf3 mit PsaA und PsaD (Naver et al., 2001). Es wird vermutet, dass das TPR-Protein als Chaperon wirkt, indem es bei der Assemblierung von PsaA und PsaB hilft. Experimentelle Belege für diese Hypothese fehlen jedoch bislang.

In *Arabidopsis* wird der kernkodierte Faktor Pyg7-1 für die PSI Assemblierung benötigt, jedoch ist seine genaue Funktion bisher unbekannt (Stöckel et al., 2006).

2. Die Ziele dieser Arbeit

Die D1-Biogenese ist in höheren Pflanzen noch wenig erforscht. Um tiefere Einblicke in die Regulation der D1-Synthese zu erlangen, wurde mit Hilfe einer Co-Expressionsanalyse auf der Basis des Transkriptstabilisierungs- und Translationsinitiationsfaktors HCF173 nach weiteren Faktoren gesucht, die in diesen Prozess involviert sind. Im Rahmen dieser Analyse wurde der kernkodierte Faktor HCF244 identifiziert.

Um die Funktion des Proteins zu ergründen, wurde eine T-DNA Insertionsmutante für das Gen *HCF244* isoliert und anschließend auf RNA- und Proteinebene charakterisiert. Die Verifizierung des *HCF244*-Lokus erfolgte durch die Komplementation des mutanten Phänotyps mit der *HCF244* cDNA.

Um HCF173 und HCF244 nachweisen zu können, wurde ein Antikörper gegen beide Proteine hergestellt. Durch Einsatz des Antikörpers wurde die Lokalisation von HCF244 innerhalb des Chloroplasten untersucht und dessen Assoziation mit Membranen analysiert.

Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Charakterisierung der funktionellen Beziehung zwischen HCF173 und HCF244. Es stellte sich einerseits die Frage, ob HCF244 einen hochmolekularen Komplex bildet und dieser mit dem HCF173-Komplex co-segregiert. Darüber hinaus wurde geprüft, ob die HCF-Komplexe an RNA binden und die Akkumulation bzw. Größe der Komplexe durch den Verlust des jeweiligen anderen HCF-Proteins beeinträchtigt wird. Außerdem wurde eine *hcf173hcf244* Doppelmutante hergestellt und phänotypisch untersucht. Anhand der Analyse von konservierten Motiven und den erarbeiteten Daten wurde ein Funktionsmodell der HCF-Proteine entworfen.

Um Einblicke in die Regulationsebenen der D1-Expression zu erhalten, wurde die Frage geklärt, ob Licht Einfluss auf die Expression der HCF-Faktoren bzw. das Akkumulationsverhalten der beiden HCF-Komplexe nimmt.

3. Thesen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde folgendes gezeigt:

- (i) HCF244 ist ein ancestraler Faktor, dessen hoher Konservierungsgrad zwischen Cyanobakterien, Grünalgen und höheren Pflanzen die funktionale Relevanz für die Photosynthese unterstreicht.
- (ii) Der kernkodierte Faktor HCF244 ist im Chloroplasten lokalisiert und wirkt dort als essentieller D1-Biogenesefaktor. Er greift auf Ebene der Transkriptstabilisierung und Translationsinitiation in die D1-Synthese ein.
- (iii) HCF244 ist ein überwiegend membrangebundenes Protein, das an der stroma- zugewandten Seite der Thylakoidmembran lokalisiert ist.
- (iv) HCF244 ist Teil eines niedermolekularen Komplexes (≈ 300 kDa), der nicht stabil an RNA oder HCF173 bindet. Die stabile Formation des Komplexes wird in seiner Zusammensetzung nicht in Abhängigkeit von Licht reguliert.
- (v) HCF173 ist Teil eines hochmolekularen Komplexes, der lichtunabhängig an RNA bindet.

4. Zusammenfassung

Die plastidäre Genexpression wird durch eine Reihe von kernkodierten Faktoren reguliert. Diese Proteine werden im Zytosol translatiert und anschließend in den Chloroplasten transportiert, um dort auf Ebene der Transkription, RNA-Reifung, Translation und Proteinreifung bzw. Assemblierung in die Akkumulation der photosynthetischen Komplexe einzugreifen.

HCF173 ist einer dieser Hilfsfaktoren. Er nimmt eine essentielle Rolle innerhalb der Transkriptstabilisierung und Initiierung der D1-Translation ein. D1 bildet zusammen mit D2 das PSII Reaktionszentrum und dient damit zugleich als Ausgangspunkt für die PSII Biogenese. Um neue Faktoren zu identifizieren, die in diese Prozesse involviert sind, wurde eine Co-Expressionsanalyse mit HCF173 durchgeführt. Dabei wurde der kernkodierte Faktor HCF244 identifiziert, der im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert wurde.

Immunologische und spektroskopische Untersuchungen von *hcf244*-Mutanten offenbarten einen massiven PSII Defekt, der durch eine gestörte D1-Synthese hervorgerufen wird. Infolge der beeinträchtigten *psbA*-Transkriptstabilität und der dramatisch reduzierten ribosomalen Beladung dieser mRNA akkumuliert D1 nicht.

Der mutante Phänotyp ließ sich nur mit dem unetikettierten HCF244-Protein komplementieren. Um den Faktor dennoch genauer charakterisieren zu können, wurde ein Antikörper gegen HCF244 hergestellt. Dafür wurde HCF244 heterolog in *E.coli* exprimiert und affinitätschromatographisch aufgereinigt. Gegen HCF173 wurde ebenfalls ein Antikörper hergestellt.

Lokalisationsstudien zeigten HCF244 als ein peripheres Membranprotein, welches an der stromalen Seite der Thylakoidmembran liegt und vermutlich größtenteils durch andere Proteine vor dem Zugriff von Proteasen geschützt wird.

HCF244 gehört wie HCF173 zur Superfamilie der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR). Die für diese Familie typische Rossmannfaltung, mit dem darin lokalisierten NAD(P)(H)-Bindemotiv, ist bei beiden HCF-Proteinen konserviert. Bei einigen Vertretern der SDR-Proteine dient die Co-Enzymbindestelle auch als RNA-bindende Domäne. Sowohl eine RNA-bindende als auch redoxregulierende Funktion wäre daher für beide HCF-Proteine denkbar. Gestützt wird diese Vermutung durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugations- und Blue Native-Analysen, die HCF173 als Teil eines hochmolekularen Komplexes zeigen, der mit RNA assoziiert ist. HCF244 bildet einen kleineren Komplex, der nicht stabil an RNA zu binden scheint. Weder die Expression beider HCF-Proteine noch die Formation der HCF-Komplexe scheinen von Licht oder dem jeweilig anderen HCF-Protein beeinflusst zu werden. Dennoch weisen die vielen Parallelen beider mutanter Phänotypen und der dramatisch minierte Habitus der Doppelmutante auf eine synergistische Funktion beider Proteine innerhalb der D1-Biogenese hin. Ein Arbeitsmodell für die Funktionsweise von HCF173 und HCF244 wurde aufgestellt.

Summary

Gene expression of the chloroplast is regulated by a number of nuclear encoded factors. These proteins are translated in the cytosol and subsequently transported into the chloroplast. There, they regulate the accumulation of photosynthetic complexes at the level of transcription, RNA-maturation, translation, protein maturation and assembly.

HCF173 is one of these auxiliary factors, which is essential for the stabilization of the *psbA* mRNA and initiation of D1-translation. D1 and D2 together form the reaction centre of photosystem II and therefore serve as the starting point for the PSII biogenesis. To identify new factors, which are involved in these processes, a co-expression analysis based on the HCF173 expression profile was accomplished. The nuclear encoded factor HCF244 was recognized in the context of this study and characterized within this thesis.

Immunological analysis and spectroscopic measurements of *hcf244*-mutants revealed a massive PSII-defect, resulting from an impaired D1-synthesis. In consequence of the affected *psbA* transcript stabilisation and the dramatically reduced ribosomal loading of the mRNA, the D1 accumulation failed in *hcf244*.

The mutant phenotype was rescued exclusively by the epitope-free version of HCF244. To further characterize HCF244, the protein was expressed in *E.coli* to provide the recombinant protein for antibody production. An HCF173 antibody was also produced.

Subsequent immuno localisation studies characterized HCF244 as peripheral membrane protein, which is located at the stromal part of the thylakoid membrane. Probably, further proteins protect major parts of HCF244 against the access by proteases.

HCF244 and HCF173 belong to the short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) super-family. The typical structure of the Rossmannfold and the included NAD(P)(H)-binding motif is also conserved in both HCF-proteins. In consideration of the additional RNA-binding property of this motif, a function as RNA-binding and/or redox-sensory proteins is conceivable for HCF244 and HCF173. This presumption is supported by sucrose density centrifugation- and BN-studies, revealing HCF173 as component of a HMW complex, which contains RNA. HCF244 forms a smaller complex, which does not stably bind to RNA. Neither the expression of both HCF-proteins, nor the formation of both complexes appears to be influenced by the presence of light. Nevertheless, the numerous parallels between both mutant phenotypes and the dramatic minimized appearance of the double mutant point out the synergistic function of both proteins within the D1 biogenesis. A working model of the HCF244 and HCF173 function during D1 translation was developed.

5. Literaturverzeichnis

- Albertsson P** (2001) A quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane. *Trends Plant Sci* **6**: 349-358.
- Albiniak AM, Baglieri J and Robinson C** (2012) Targeting of lumenal proteins across the thylakoid membrane. *J Exp Bot* **63**:1689-1698
- Alergand T, Peled-Zehavi H, Katz Y and Danon A** (2006) The chloroplast protein disulfide isomerase RB60 reacts with a regulatory disulfide of the RNA-binding protein RB47. *Plant Cell Physiol* **47**: 540-548
- Allan RK and Ratajczak T** (2011) Versatile TPR domains accommodate different modes of target protein recognition and function. *Cell Stress Chaperones* **16**: 353–367
- Allen JF** (1993) Control of gene expression by redox potential and the requirement for chloroplast and mitochondrial genomes. *J Theor Biol* **165**: 609-631
- Allen JF** (2003) The function of genomes in bioenergetic organelles. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**: 19-38
- Allen JF, de Paula WBM, Puthiyaveetil S and Nield J** (2011) A structural phylogenetic map for chloroplast photosynthesis. *Trends Plant Sci* **16**: 645-655
- Allison LA** (2000) The role of sigma factors in plastid transcription. *Biochimie* **82**: 537-548
- Amunts A, Drory O and Nelson N** (2007) The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 Å resolution. *Nature* **447**: 58-63
- Anbudurai PR, Mor TS, Ohad I, Shestakov SV and Pakrasi HB** (1994) The *ctpA* gene encodes the C-terminal processing protease for the D1 protein of the photosystem II reaction center complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 8082-8086
- Armbruster U, Zühlke J, Rengstl B, Kreller R, Makarenko E, Rühle T, Schünemann D, Jahns P, Weisshaar B, Nickelsen J and Leister D** (2010) The Arabidopsis thylakoid protein PAM68 is required for efficient D1 biogenesis and photosystem II assembly. *Plant Cell* **22**: 3439-3460
- Asakura Y and Barkan A** (2006) Arabidopsis orthologs of maize chloroplast splicing factors promote splicing of orthologous and species-specific group II introns. *Plant Physiol* **142**: 1656-1663
- Asakura Y and Barkan A** (2007) A CRM domain protein functions dually in group I and group II intron splicing in land plant chloroplasts. *Plant Cell* **19**: 3864-3875
- Bals T, Dünschede B, Funke S and Schünemann D** (2010) Interplay between the cpSRP pathway components, the substrate LHCP and the translocase Alb3: an in vivo and in vitro study. *FEBS Letters* **584**: 4138–4144
- Barkan A** (2011) Expression of Plastid Genes: Organelle-Specific Elaborations on a Prokaryotic Scaffold. *Plant Physiol* **155**: 1520–1532
- Barkan A, Klipcan L, Ostersetzer O, Kawamura T, Asakura Y and Watkins KP** (2007) The CRM domain: an RNA binding module derived from an ancient ribosome associated protein. *RNA* **13**: 55-64
- Barkan A, Walker M, Nolasco M and Johnson D** (1994) A nuclear mutation in maize blocks the processing and translation of several chloroplast mRNAs and provides evidence for the differential translation of alternative mRNA forms. *Embo J* **13**: 3170-3181
- Barnes D, Cohen A, Bruick RK, Kantardjieff K, Fowler S, Efuet E and Mayfield SP** (2004) Identification and characterization of a novel RNA binding protein that associates with the 5'- untranslated region of the chloroplast *psbA* mRNA. *Biochemistry* **43**: 8541-8550
- Bartsevich VV and Pakrasi HB** (1997) Molecular identification of a novel protein that regulates biogenesis of photosystem I, a membrane protein complex. *J Biol Chem* **272**: 6382–6387
- Bassham JA, Benson AA and Calvin M** (1950) The path of carbon in photosynthesis. *J Biol Chem* **185**: 781-787
- Bentolila S, Elliott LE and Hanson MR** (2008) Genetic architecture of mitochondrial editing in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **178**: 1693–1708

- Boudreau E, Nickelsen J, Lemaire SD, Ossenhuhl F and Rochaix JD** (2000) The Nac2 gene of *Chlamydomonas* encodes a chloroplast TPR-like protein involved in psbD mRNA stability. *EMBO J* **19**: 3366-3376
- Boudreau E, Takahashi Y, Lemieux C, Turmel M and Rochaix JD** (1997) The chloroplast *ycf3* and *ycf4* open reading frames of *Chlamydomonas reinhardtii* are required for the accumulation of the photosystem I complex. *EMBO J* **16**: 6095-6104
- Boulouis A, Raynaud C, Bujaldon S, Aznar A, Wollman FA and Choquet Y** (2011) The nucleus-encoded trans-acting factor MCA1 plays a critical role in the regulation of cytochrome f synthesis in *Chlamydomonas* chloroplasts. *Plant Cell* **23**: 333-349
- Bruick RK and Mayfield SP** (1998) Processing of the *psbA* 5' untranslated region in *Chlamydomonas reinhardtii* depends upon factors mediating ribosome association. *J Cell Biol* **143**: 1145-1153
- Cai W, Ma J, Chi W, Zou M, Guo J, Lu C and Zhang L** (2010) Cooperation of LPA3 and LPA2 is essential for photosystem II assembly in Arabidopsis. *Plant Physiol* **154**: 109-120
- Cai W, Okuda K, Peng L and Shikanai T** (2011) PROTON GRADIENT REGULATION 3 recognizes multiple targets with limited similarity and mediates translation and RNA stabilization in plastids. *Plant J* **67**: 318-327
- Calvin M** (1962) The path of carbon in photosynthesis. *Science* **135**: 879-889
- Chang CC, Sheen J, Bligny M, Niwa Y, Lerbs-Mache S and Stern DB** (1999) Functional analysis of two maize cDNAs encoding T7-like RNA polymerases. *Plant Cell* **11**: 911-926
- Chateigner-Boutin AL, Ramos-Vega M, Guevara-Garcia A, Andres C, de la Luz Gutierrez-Nava M, Cantero A, Delannoy E, Jimenez LF, Lurin C, Small I and Léon P** (2008) CLB19, a pentatricopeptide repeat protein required for editing of *rpoA* and *clpP* chloroplast transcripts. *Plant J* **56**: 590-602
- Chateigner-Boutin AL and Small I** (2007) A rapid high-throughput method for the detection and quantification of RNA editing based on high-resolution melting of amplicons. *Nucleic Acids Res* **35**: e114
- Choquet Y, Stern DB, Wostrikoff K, Kuras R, Girard-Bascou J and Wollman FA** (1998) Translation of cytochrome f is autoregulated through the 5' untranslated region of *petA* mRNA in *Chlamydomonas* chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 4380-4385
- Cline K** (1986) Import of proteins into chloroplasts. Membrane integration of a thylakoid precursor protein reconstituted in chloroplast lysates. *J Biol Chem* **261**: 14804-14810
- Cohen I, Knopf JA, Irihimovitch V and Shapira M** (2005) A proposed mechanism for the inhibitory effects of oxidative stress on Rubisco assembly and its subunit expression. *Plant Physiol* **137**: 738-746
- Courtois F, Merendino L, Demarsy E, Mache R and Lerbs-Mache S** (2007) Phagetype RNA polymerase RPOTmp transcribes the *rrn* operon from the PC promoter at early developmental stages in Arabidopsis. *Plant Physiol* **145**: 712-721
- Danon A and Mayfield SP** (1991) Light regulated translational activators: identification of chloroplast gene specific mRNA binding proteins. *Embo J* **10**: 3993-4001
- Danon A and Mayfield SP** (1994) Light-regulated translation of chloroplast messenger RNAs through redox potential. *Science* **266**: 1717-1719
- de la Sierra-Gallay IL, Zig L, Jamalli A and Putzer H** (2008) Structural insights into the dual activity of RNase J. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 206-212
- de Longevialle AF, Hendrickson L, Taylor NL, Delannoy E, Lurin C, Badger M, Millar AH and Small I** (2008) The pentatricopeptide repeat gene OTP51 with two LAGLIDADG motifs is required for the cis-splicing of plastid *ycf3* intron 2 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **56**: 157-168
- de Longevialle AF, Small ID and Lurin C** (2010) Nuclearly encoded splicing factors implicated in RNA splicing in higher plant organelles. *Mol Plant* **3**: 691-705
- Demarsy E, Courtois F, Azevedo J, Buhot L and Lerbs-Mache S** (2006) Building up of the plastid transcriptional machinery during germination and early plant

- development. *Plant Physiol* **142**: 993-1003
- Deng XW and Gruissem W** (1987) Control of plastid gene expression during development: the limited role of transcriptional regulation. *Cell* **49**: 379-387
- de Vitry C, Olive J, Drapier D, Recouvreur M and Wollman FA** (1989) Posttranslational events leading to the assembly of photosystem II protein complex: a study using photosynthesis mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol* **109**: 991-1006
- Dietzel L, Bräutigam K and Pfannschmidt T** (2008) Photosynthetic acclimation: State transitions and adjustment of photosystem stoichiometry – functional relationships between short-term and long-term light quality acclimation in plants. *FEBS J* **275**: 1080-1088
- Drapier D, Rimbault B, Vallon O, Wollman FA and Choquet Y** (2007) Intertwined translational regulations set uneven stoichiometry of chloroplast ATP synthase subunits. *EMBO J* **26**: 3581-3591
- Emanuel C, von Groll U, Müller M, Börner T and Weihe A** (2006) Development- and tissue-specific expression of the *RpoT* gene family of Arabidopsis encoding mitochondrial and plastid RNA polymerases. *Planta* **223**: 998-1009
- Emanuel C, Weihe A, Graner A, Hess WR and Börner T** (2004) Chloroplast development affects expression of phage-type RNA polymerases in barley leaves. *Plant J* **38**: 460-472
- Eickbush TH** (1999) Mobile introns: retrohoming by complete reverse splicing. *Curr Biol* **9**: R11-14
- Esposito D, Fey JP, Eberhard S, Hicks AJ and Stern DB** (2003) *In vivo* evidence for the prokaryotic model of extended codon-anticodon interaction in translation initiation. *EMBO J* **22**: 651-656
- Fargo DC, Zhang M, Gillham NW and Boynton JE** (1998) Shine- Dalgarno-like sequences are not required for translation of chloroplast mRNAs in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts or in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **257**: 271–282
- Felder S, Meierhoff K, Sane AP, Meurer J, Driemel C, Plücken H, Klaff P, Stein B, Bechtold N and Westhoff P** (2001) The nucleus-encoded *HCF107* gene of Arabidopsis provides a link between intercistronic RNA processing and the accumulation of translation-competent *psbH* transcripts in chloroplasts. *Plant Cell* **13**: 2127-2141
- Finkemeier I and Leister D** (2010) Plant chloroplasts and other plastids. In *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)* John Wiley & Sons, Ltd, Chichester
- Fisk DG, Walker MB and Barkan A** (1999) Molecular cloning of the maize gene *crp1* reveals similarity between regulators of mitochondrial and chloroplast gene expression. *EMBO J* **18**: 2621-2630
- Forquer I, Covian R, Bowman MK, Trumpower BL and Kramer DM** (2006) Similar transition states mediate the Q-cycle and superoxide production by the cytochrome bc1 complex. *J Biol Chem* **281**: 38459-38465
- Freyer R, Kiefer-Meyer MC and Kossel H** (1997) Occurrence of plastid RNA editing in all major lineages of land plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 6285-6290
- Fujita S, Inagaki N, Ono T, Inoue Y and Satoh K** (1989) Cleavage of a synthetic COOH-terminal oligopeptide of D1 precursor protein by a purified processing enzyme. *FEBS Lett* **255**: 1-4
- Gruissem W and Zurawski G** (1985a) Identification and mutational analysis of the promoter for a spinach chloroplast transfer RNA gene. *EMBO J* **4**: 1637-1644
- Gruissem W and Zurawski G** (1985b) Analysis of promoter regions for the spinach chloroplast *rbcL*, *atpB* and *psbA* genes. *EMBO J* **4**: 3375- 3383
- Gualberto JM, Lamattina L, Bonnard G, Weil JH and Grienemberger JM** (1989) RNA editing in wheat mitochondria results in the conservation of protein sequences. *Nature* **341**: 660– 662
- Guskov A, Kern J, Gabdulkhakov A, Broser M, Zouni A and Saenger W** (2009) Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 334-342
- Hajdukiewicz PT, Allison LA and Maliga P** (1997) The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in

- tobacco plastids. *EMBO J* **16**: 4041-4048
- Halpin C, Elderfield PD, James HE, Zimmermann R, Dunbar B and Robinson C** (1989) The reaction specificities of the thylakoidal processing peptidase and *Escherichia coli* leader peptidase are identical. *EMBO J* **8**: 3917-3921
- Hammani K, Cook WB and Barkan A** (2012) RNA binding and RNA remodeling activities of the half-a-tetratricopeptide (HAT) protein HCF107 underlie its effects on gene expression. *Proc Natl Acad U S A* **109**: 5651-5656
- Hanaoka M, Kanamaru K, Takahashi H and Tanaka K** (2003) Molecular genetic analysis of chloroplast gene promoters dependent on SIG2, a nucleus-encoded sigma factor for the plastid-encoded RNA polymerase, in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* **31**: 7090-7098
- Hanaoka M, Kato M, Anma M and Tanaka K** (2012) SIG1, a Sigma Factor for the Chloroplast RNA Polymerase, Differently Associates with Multiple DNA Regions in the Chloroplast Chromosomes *in Vivo*. *Int J Mol Sci* **13**: 12182-12194
- Hashimoto M, Endo T, Peltier G, Tasaka M and Shikanai T** (2003) A nucleus-encoded factor, CRR2, is essential for the expression of chloroplast *ndhB* in *Arabidopsis*. *Plant J* **36**: 541-549
- Hattori M, Miyake H and Sugita M** (2007) A Pentatricopeptide repeat protein is required for RNA processing of *clpP* Pre-mRNA in moss chloroplasts. *J Biol Chem* **282**: 10773-10782
- Hattori M and Sugita M** (2009) A moss pentatricopeptide repeat protein binds to the 3' end of plastid *clpP* pre-mRNA and assists with mRNA maturation. *FEBS J* **276**: 5860-5869
- Hedges SB, Blair JE, Venturi ML and Shoe JL** (2004) A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life. *BMC Evol Biol* **4**: 2
- Hedtke B, Börner T and Weihe A** (1997) Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis*. *Science* **277**: 809-811
- Hedtke B, Börner T and Weihe A** (2000) One RNA polymerase serving two genomes. *EMBO Rep* **1**: 435-440
- Heinrich ML, Alric J, Wittkopp T, Yang W, Catalanotti C, Dent R, Nivogi KK, Wollman FA and Grossman AR** (2013) Novel Thylakoid Membrane GreenCut Protein CPLD38 Impacts Accumulation of the Cytochrome b6f Complex and Associated Regulatory Processes. *J Biol Chem* **288**: 7024-7036
- Herrmann RG, Westhoff P and Link G** (1992) Biogenesis of plastids in higher plants. In *Plant Gene Research: Cell Organelles*. Springer Verlag, Vienna
- Hirose T, Kusumegi T and Sugiura M** (1998) Translation of tobacco chloroplast *rps14* mRNA depends on a Shine-Dalgarno-like sequence in the 5'-untranslated region but not on internal RNA editing in the coding region. *FEBS Lett* **430**: 257-260
- Hirose T and Sugiura M** (1996) Cis-acting elements and trans-acting factors for accurate translation of chloroplast *psbA* mRNAs: development of an in vitro translation system from tobacco chloroplasts. *EMBO J* **15**: 1687-1695
- Hirose T and Sugiura M** (1997) Both RNA editing and RNA cleavage are required for translation of tobacco chloroplast *ndhD* mRNA: a possible regulatory mechanism for the expression of a chloroplast operon consisting of functionally unrelated genes. *EMBO J* **16**: 6804-6811
- Hirose T and Sugiura M** (2004a) Functional Shine-Dalgarno-like sequences for translational initiation of chloroplast mRNAs. *Plant Cell Physiol* **45**: 114-117
- Hirose T and Sugiura M** (2004b) Multiple elements required for translation of plastid *atpB* mRNA lacking the Shine-Dalgarno sequence. *Nucleic Acids Res* **32**: 3503-3510
- Hoch B, Maier RM, Appel K, Igloi GL and Kossel H** (1991) Editing of a chloroplast mRNA by creation of an initiation codon. *Nature* **353**: 178-180
- Huang D, Everly RM, Cheng RH, Heymann JB, Schagger H, Sled V, Ohnishi T, Baker TS and Cramer WA** (1994) Characterization of the chloroplast cytochrome b6f complex as a structural and functional dimer. *Biochem* **33**: 4401-4409
- Hübschmann T and Börner T** (1998) Characterisation of transcript initiation sites in ribosome-deficient barley plastids. *Plant Molecular Biology* **36**: 493-496

- Ikeda TM and Gray MW** (1999) Identification and characterization of T3/T7 bacteriophage-like RNA polymerase sequences in wheat. *Plant Mol Biol* **40**: 567-578
- Ikeuchi M, Plumley FG, Inoue Y and Schmidt GW** (1987) Phosphorylation of Photosystem II Components, CP43 Apoprotein, D1, D2, and 10 to 11 Kilodalton Protein in Chloroplast Thylakoids of Higher Plants. *Plant Physiol* **85**: 638-642
- Inagaki N, Yamamoto Y and Satoh K** (2001) A sequential two-step proteolytic process in the carboxyl-terminal truncation of precursor D1 protein in *Synechocystis* sp. PCC6803. *FEBS Lett* **509**: 197-201
- Ishihama A** (1988) Promoter selectivity of prokaryotic RNA polymerases. *Trends Genet* **4**: 282-286
- Ishizaki Y, Tsunoyama Y, Hatano K, Ando K, Kato K, Shinmyo A, Kobori M, Takeba G, Nakahira Y and Shiina T** (2005) A nuclear-encoded sigma factor, *Arabidopsis* SIG6, recognizes sigma-70 type chloroplast promoters and regulates early chloroplast development in cotyledons. *Plant J* **42**: 133-144
- Jenkins BD, Kulhanek DJ and Barkan A** (1997) Nuclear mutations that block group II RNA splicing in maize chloroplasts reveal several intron classes with distinct requirements for splicing factors. *Plant Cell* **9**: 283-296
- Kanamaru K, Nagashima A, Fujiwara M, Shimada H, Shirano Y, Nakabayashi K, Shibata D, Tanaka K and Takahashi H** (2001) An *Arabidopsis* sigma factor (SIG2)-dependent expression of plastid-encoded tRNAs in chloroplasts. *Plant Cell Physiol* **42**: 1034-1043
- Kaneko T, Nakamura Y, Wolk CP, Kuritz T, Sasamoto S, Watanabe A, Iriguchi M, Ishikawa A, Kawashima K, Kimura T, Kishida Y, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Shimpo S, Sugimoto M, Takazawa M, Yamada M, Yasuda M and Tabata S** (2001) Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *DNA Res* **8**: 205-213
- Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirosawa M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M and Tabata S** (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res* **3**: 109-136
- Kargul J and Barber J** (2008) Photosynthetic acclimation: structural reorganisation of light harvesting antenna--role of redox-dependent phosphorylation of major and minor chlorophyll a/b binding proteins. *FEBS J* **275**: 1056-1068
- Keren N, Liberton M and Pakrasi HB** (2005) Photochemical competence of assembled photosystem II core complex in cyanobacterial plasma membrane. *J Biol Chem.* **280**: 6548-6553.
- Kim M, Christopher DA and Mullet JE** (1993) Direct evidence for selective modulation of *psbA*, *rpoA*, *rbcL* and 16S RNA stability during barley chloroplast development. *Plant Mol Biol* **22**: 447-463
- Kim J, Klein PG and Mullet JE** (1994) Vir-115 gene product is required to stabilize D1 translation intermediates in chloroplasts. *Plant Mol Biol* **25**: 459-467
- Kim J and Mayfield SP** (1997) Protein disulfide isomerase as a regulator of chloroplast translational activation. *Science* **278**: 1954-1957
- Kim J and Mayfield SP** (2002) The active site of the thioredoxin-like domain of chloroplast protein disulfide isomerase, RB60, catalyzes the redox-regulated binding of chloroplast poly(A)-binding protein, RB47, to the 5' untranslated region of *psbA* mRNA. *Plant Cell Physiol* **43**: 1238-1243
- Kim J and Mullet JE** (2003) A mechanism for light-induced translation of the *rbcL* mRNA encoding the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in barley chloroplasts. *Plant Cell Physiol* **44**: 491-499
- Kitajima A, Asatsuma S, Okada H, Hamada Y, Kaneko K, Nanjo Y, Kawagoe Y, Toyooka K, Matsuoka K, Takeuchi M, Nakano A and Mitsui T** (2009) The rice alpha-amylase glycoprotein is targeted from the Golgi apparatus through the secretory

- pathway to the plastids. *Plant Cell* **21**: 2844-2858
- Klein RR and Mullet JE** (1987) Control of gene expression during higher plant chloroplast biogenesis. Protein synthesis and transcript levels of *psbA*, *psaA-psaB*, and *rbcL* in dark-grown and illuminated barley seedlings. *J Biol Chem* **262**: 4341-4348
- Klinkert B, Elles I and Nickelsen J** (2006) Translation of chloroplast *psbD* mRNA in *Chlamydomonas* is controlled by a secondary RNA structure blocking the AUG start codon. *Nucleic Acids Res* **34**: 386-394
- Kobayashi Y, Dokiya Y and Sugita M** (2001) Dual targeting of phage-type RNA polymerase to both mitochondria and plastids is due to alternative translation initiation in single transcripts. *Biochem Biophys Res Commun* **289**: 1106-1113
- Kogata N, Nishio K, Hirohashi T, Kikuchi S and Nakai M** (1999) Involvement of a chloroplast homologue of the signal recognition particle receptor protein, FtsY, in protein targeting to thylakoids. *FEBS Lett* **447**: 329-333
- Komenda J, Kuvikova S, Granvogel B, Eichacker LA, Diner BA and Nixon PJ** (2007) Cleavage after residue Ala352 in the C-terminal extension is an early step in the maturation of the D1 subunit of Photosystem II in *Synechocystis* PCC 6803. *Biochim Biophys Acta* **1767**: 829-837
- Kotera E, Tasaka M and Shikanai T** (2005) A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts. *Nature* **433**: 326-330
- Kramer DM, Avenson TJ and Edwards GE** (2004) Dynamic flexibility in the light reactions of photosynthesis governed by both electron and proton transfer reactions. *Trends Plant Sci* **9**: 349-357
- Kuchka MR, Goldschmidt-Clermont M, van Dillewijn J and Rochaix JD** (1989) Mutation at the *Chlamydomonas* nuclear NAC2 locus specifically affects stability of the chloroplast *psbD* transcript encoding polypeptide D2 of PS II. *Cell* **58**: 869-876
- Kudla J, Igloi GL, Metzlaff M, Hagemann R and Kossel H** (1992) RNA editing in tobacco chloroplasts leads to the formation of a translatable *psbL* mRNA by a C to U substitution within the initiation codon. *EMBO J* **11**: 1099-1103
- Kugita M, Yamamoto Y, Fujikawa T, Matsumoto T and Yoshinaga K** (2003) RNA editing in hornwort chloroplasts makes more than half the genes functional. *Nucleic Acids Res* **31**: 2417-2423
- Kühn K, Weihe A and Börner T** (2005) Multiple promoters are a common feature of mitochondrial genes in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res* **33**: 337-346
- Kurisu G, Zhang H, Smith JL and Cramer WA** (2003) Structure of the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science* **302**: 1009-1014
- Lennartz K, Bossmann S, Westhoff P, Bechtold N and Meierhoff** (2006) HCF153, a novel nuclear-encoded factor necessary during a post-translational step in biogenesis of the cytochrome bf complex. *Plant J* **45**: 101-112
- Lerbs-Mache S** (1993) The 110-kDa polypeptide of spinach plastid DNA-dependent RNA polymerase: single-subunit enzyme or catalytic core of multimeric enzyme complexes? *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 5509-5513
- Lerbs-Mache S** (2011) Function of plastid sigma factors in higher plants: regulation of gene expression or just preservation of constitutive transcription? *Plant Mol Biol* **76**: 235-249
- Li HM and Chiu CC** (2010) Protein transport into chloroplasts. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 157-180
- Liere K and Maliga P** (1999) *In vitro* characterization of the tobacco *rpoB* promoter reveals a core sequence motif conserved between phage-type plastid and plant mitochondrial promoters. *EMBO J* **18**: 249-257
- Loiselay C, Gumpel NJ, Girard-Bascou J, Watson AT, Purton S, Wollman FA and Choquet Y** (2008) Molecular identification and function of cis- and trans-acting determinants for *petA* transcript stability in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Mol Cell Biol* **28**: 5529-5542
- Loschelder H, Schweer J, Link B and Link G** (2006) Dual temporal role of plastid sigma factor 6 in *Arabidopsis* development. *Plant Physiol* **142**: 642-650
- Luirink J and Sinning I** (2004) SRP-mediated protein targeting: structure and function

- revisited. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 17-35
- Lurin C, Andres C, Aubourg S, Bellaoui M, Bitton F, Bruyere C, Caboche M, Debast C, Gualberto J, Hoffmann B, Lecharny A, Le Ret M, Martin-Magniette ML, Mireau H, Peeters N, Renou JP, Szurek B, Taconnat L and Small I** (2004) Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* **16**: 2089-2103
- Lyska D, Meierhoff K and Westhoff P** (2012) How to build functional thylakoid membranes: from plastid transcription to protein complex assembly. *Planta* **237**: 413-428
- Lyska D, Paradies S, Meierhoff K and Westhoff P** (2007) HCF208, a homolog of *Chlamydomonas* CCB2, is required for accumulation of native cytochrome *b₆* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **48**: 1737-1746
- Ma J, Peng L, Guo J, Lu Q, Lu C and Zhang L** (2007) LPA2 is required for efficient assembly of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **19**: 1980-1993
- Mant A, Woolhead CA, Moore M, Henry R and Robinson C** (2001) Insertion of Psak into the thylakoid membrane in a "Horseshoe" conformation occurs in the absence of signal recognition particle, nucleoside triphosphates, or functional *albino3*. *J Biol Chem* **276**: 36200-36206
- Marder JB, Goloubinoff P and Edelman M** (1984) Molecular architecture of the rapidly metabolized 32-kilodalton protein of photosystem II. Indications for COOH-terminal processing of a chloroplast membrane polypeptide. *J Biol Chem* **259**: 3900-3908
- Marin-Navarro J, Manuell AL, Wu J and Mayfield SP** (2007) Chloroplast translation regulation. *Photosynth Res* **94**: 359-374
- Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Hasegawa M and Penny D** (2002) Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 12246-12251
- Martin W, Stoebe B, Goremykin V, Hapsmann S, Hasegawa M and Kowallik KV** (1998) Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* **393**: 162-165
- Mathy N, Benard L, Pellegrini O, Daou R, Wen T and Condon C** (2007) 5'-to-3' exoribonuclease activity in bacteria: role of RNase J1 in rRNA maturation and 5' stability of mRNA. *Cell* **129**: 681-692
- Mattoo AK and Edelman M** (1987) Intramembrane translocation and posttranslational palmitoylation of the chloroplast 32-kDa herbicide-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 1497-1501
- Maul JE, Lilly JW, Cui L, de Pamphilis CW, Harris EH and Stern DB** (2002) The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats. *Plant Cell* **14**: 1-21
- Mayfield SP, Cohen A, Danon A and Yohn CB** (1994) Translation of the *psbA* mRNA of *Chlamydomonas reinhardtii* requires a structured RNA element contained within the 5' untranslated region. *J Cell Biol* **127**: 1537-1545
- McCarthy JE and Gualerzi C** (1990) Translational control of prokaryotic gene expression. *Trends Genet* **6**: 78-85
- Mehler AH** (1951) Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Arch Biochem Biophys* **33**: 65-77
- Mehler AH and Brown AH** (1952) Studies on reactions of illuminated chloroplasts. III. Simultaneous photoproduction and consumption of oxygen studied with oxygen isotopes. *Arch Biochem Biophys* **38**: 365-370
- Meierhoff, K., Felder, S., Nakamura, T., Bechtold, N. and Schuster, G.** (2003) HCF152, an *Arabidopsis* RNA binding pentatricopeptide repeat protein involved in the processing of chloroplast *psbB-psbT-psbH-petB-petD* RNAs. *Plant Cell* **15**: 1480-1495
- Meurer J, Lezhneva L, Amann K, Godel M, Bezhani S, Sherameti I and Oelmüller R** (2002) A peptide chain release factor 2 affects the stability of UGA-containing transcripts in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Cell* **14**: 3255-3269
- Michel F, Umesono K and Ozeki H** (1989) Comparative and functional anatomy of group II catalytic introns--a review. *Gene* **82**: 5-30

- Minai L, Wostrickoff K, Wollman FA and Choquet Y** (2006) Chloroplast biogenesis of photosystem II cores involves a series of assembly-controlled steps that regulate translation. *Plant Cell* **18**: 159-175
- Monod C, Goldschmidt-Clermont M and Rochaix JD** (1992) Accumulation of chloroplast *psbB* RNA requires a nuclear factor in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Gen Genet* **231**: 449-459
- Moore M, Harrison MS, Peterson EC and Henry R** (2000) Chloroplast Oxa1p homolog albino3 is required for post-translational integration of the light harvesting chlorophyll-binding protein into thylakoid membranes. *J Biol Chem* **275**: 1529-1532
- Mühlbauer SK and Eichacker LA** (1998) Light-dependent formation of the photosynthetic proton gradient regulates translation elongation in chloroplasts. *J Biol Chem* **273**: 20935-20940
- Mullet JE** (1993) Dynamic regulation of chloroplast transcription. *Plant Physiol* **103**: 309-313
- Mullet JE, Klein PG and Klein RR** (1990) Chlorophyll regulates accumulation of the plastid encoded chlorophyll apoproteins CP43 and D1 by increasing apoprotein stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4038-4042
- Mulo P, Sakurai I and Aro EM** (2012) Strategies for *psbA* gene expression in cyanobacteria, green algae and higher plants: from transcription to PSII repair. *Biochim Biophys Acta* **1817**: 247-257
- Mulo P, Sirpiö S, Suorsa M and Aro EM** (2008) Auxiliary proteins involved in the assembly and sustenance of photosystem II. *Photosynth Res* **98**: 489-501
- Myasnikov AG, Simonetti A, Marzi S and Klaholz BP** (2009) Structure-function insights into prokaryotic and eukaryotic translation initiation. *Curr Opin Struct Biol* **19**: 300-309
- Nagashima A, Hanaoka M, Shikanai T, Fujiwara M, Kanamaru K, Takahashi H and Tanaka K** (2004) The multiple-stress responsive plastid sigma factor, SIG5, directs activation of the *psbD* blue light-responsive promoter (BLRP) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **45**: 357-368
- Nakamura T, Meierhoff K, Westhoff P and Schuster G** (2003) RNA-binding properties of HCF152, an Arabidopsis PPR protein involved in the processing of chloroplast RNA. *Eur J Biochem* **270**: 4070-4081
- Nanjo Y, Oka H, Ikarashi N, Kaneko K, Kitajima A, Mitsui T, Munoz FJ, Rodriguez-Lopez M, Baroja-Fernandez, E. and Pozueta-Romero, J.** (2006) Rice plastidial N-glycosylated nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase is transported from the ER-golgi to the chloroplast through the secretory pathway. *Plant Cell* **18**: 2582-2592
- Naver H, Boudreau E and Rochaix JD** (2001) Functional Studies of Ycf3: Its Role in Assembly of Photosystem I and Interactions with Some of Its Subunits. *Plant Cell* **13**: 2731-2745
- Neckermann K, Zeltz P, Igloi GL, Kossel H and Maier RM** (1994) The role of RNA editing in conservation of start codons in chloroplast genomes. *Gene* **146**: 177-182
- Nelson N and Ben-Shem A** (2004) The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 971-982
- Neuhaus, H.E. and Emes, M.J.** (2000) Nonphotosynthetic Metabolism in Plastids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**: 111-140
- Nevo R, Charuvi D, Tsabari O and Reich Z** (2012) Composition, architecture and dynamics of the photosynthetic apparatus in higher plants. *Plant J* **70**: 157-176
- Nickelsen J, Fleischmann M, Boudreau E, Rahire M and Rochaix JD** (1999) Identification of cis-acting RNA leader elements required for chloroplast *psbD* gene expression in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* **11**: 957-970
- Nickelsen J and Link G** (1993) The 54 kDa RNA-binding protein from mustard chloroplasts mediates endonucleolytic transcript 3' end formation *in vitro*. *Plant J* **3**: 537-544
- Nisbet RE, Kilian O and McFadden GI** (2004) Diatom genomics: genetic acquisitions and mergers. *Curr Biol* **14**: R1048-1050
- Nixon PJ, Trost JT and Diner BA** (1992) Role of the carboxy terminus of polypeptide D1 in

- the assembly of a functional water-oxidizing manganese cluster in photosystem II of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: Assembly requires a free carboxyl group at C-terminal position 344. *Biochemistry* **31**: 10859-10871
- Nowaczyk MM, Heberler R, Schlodder E, Meyer HE, Warscheid B and Rogner M** (2006) Psb27, a cyanobacterial lipoprotein, is involved in the repair cycle of photosystem II. *Plant Cell* **18**: 3121-3131
- Oelmüller R, Herrmann RG and Pakrasi HB** (1996) Molecular studies of CtpA, the carboxyl-terminal processing protease for the D1 protein of the photosystem II reaction center in higher plants. *J Biol Chem* **271**: 21848-21852
- Okuda K, Chateigner-Boutin AL, Nakamura T, Delannoy E, Sugita M, Myouga F, Motohashi R, Shinozaki K, Small I and Shikanai T** (2009) Pentatricopeptide repeat proteins with the DYW motif have distinct molecular functions in RNA editing and RNA cleavage in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Cell* **21**: 146-156
- Okuda K, Hammani K, Tanz SK, Peng L, Fukao Y, Myouga F, Motohashi R, Shinozaki K, Small I and Shikanai T** (2010) The pentatricopeptide repeat protein OTP82 is required for RNA editing of plastid *ndhB* and *ndhG* transcripts. *The Plant Journal* **61**: 339-349
- Okuda K, Myouga F, Motohashi R, Shinozaki K and Shikanai T** (2007) Conserved domain structure of pentatricopeptide repeat proteins involved in chloroplast RNA editing. *Proc Natl Acad Sci* **104**: 8178-8183
- Okuda K, Nakamura T, Sugita M, Shimizu T and Shikanai T** (2006) A pentatricopeptide repeat protein is a site recognition factor in chloroplast RNA editing. *J Biol Chem* **281**: 37661-37667
- Ossenbuhl F and Nickelsen J** (2000) *cis*- and *trans*-Acting determinants for translation of *psbD* mRNA in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Cell Biol* **20**: 8134-8142
- Ostheimer GJ, Williams-Carrier R, Belcher S, Osborne E, Gierke J and Barkan A** (2003) Group II intron splicing factors derived by diversification of an ancient RNA-binding domain. *EMBO J* **22**: 3919-3929
- Osyczka A, Moser CC, Dutton PL** (2005) Fixing the Q cycle. *Trends Biochem Sci* **30**: 176-182.
- Peng L, Ma J, Chi W, Guo J, Zhu S, Lu Q, Lu C and Zhang L** (2006) LOW PSII ACCUMULATION1 is involved in efficient assembly of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **18**: 955-969
- Pfalz J, Bayraktar O, Prikryl J and Barkan A** (2009) Site-specific binding of a PPR protein defines and stabilizes 5' and 3' mRNA termini in chloroplasts. *EMBO J* **28**: 2042-2052
- Plader W and Sugiura M** (2003) The Shine-Dalgarno-like sequence is a negative regulatory element for translation of tobacco chloroplast *rps2* mRNA: an additional mechanism for translational control in chloroplasts. *Plant J* **34**: 377-382
- Plücken H, Müller B, Grohmann D, Westhoff P and Eichacker LA** (2002) The HCF136 protein is essential for assembly of the photosystem II reaction center in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **532**: 85-90
- Possingham JV** (1980) Plastid replication and development in the life cycle of higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* **31**: 113-129
- Prikryl J, Rojas M, Schuster G and Barkan A** (2011) Mechanism of RNA stabilization and translational activation by a pentatricopeptide repeat protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 415-420
- Radhamony RN and Theg SM** (2006) Evidence for an ER to Golgi to chloroplast protein transport pathway. *Trends Cell Biol* **16**: 385-387
- Rattanachaikunsopon P, Rosch C and Kuchka MR** (1999) Cloning and characterization of the nuclear *AC115* gene of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol* **39**: 1-10
- Raynaud C, Loiselay C, Wostrikoff, K, Kuras R, Girard-Bascou J, Wollman FA and Choquet Y** (2007) Evidence for regulatory function of nucleus-encoded factors on mRNA stabilization and translation in the chloroplast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 9093-9098
- Richter S, Zhong R and Lamppa G** (2005) Function of the stromal processing peptidase in

- the chloroplast import. *Physiol Plant* **123**: 362-368
- Robbins JC, Heller WP and Hanson MR** (2009) A comparative genomics approach identifies a PPR-DYW protein that is essential for C-to-U editing of the Arabidopsis chloroplast *accD* transcript. *RNA* **15**: 1142-1153
- Robertson DE, Farid, RS, Moser CC, Urbauer JL, Mulholland SE, Pidikiti R, Lear JD, Wand AJ, DeGrado WF and Dutton PL** (1994) Design and synthesis of multi-haem proteins. *Nature* **368**: 425-432
- Rochaix JD** (2011) Assembly of the Photosynthetic Apparatus. *Plant Physiol* **155**: 1493-1500
- Rokka A, Suorsa M, Saleem A, Battchikova N and Aro EM** (2005) Synthesis and assembly of thylakoid protein complexes: multiple assembly steps of photosystem II. *Biochem J* **388**: 159-168
- Roose JL and Pakrasi HB** (2004) Evidence that D1 processing is required for manganese binding and extrinsic protein assembly into photosystem II. *J Biol Chem* **279**: 45417-45422
- Roose JL and Pakrasi HB** (2008) The Psb27 protein facilitates manganese cluster assembly in photosystem II. *J Biol Chem* **283**: 4044-4050
- Rott R, Levy H, Drager RG, Stern DB and Schuster G** (1998a). 3'-Processed mRNA is preferentially translated in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Mol Cell Biol* **18**: 4605-4611
- Ryrie IJ, Anderson JM and Goodchild DJ** (1980) The role of the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex in chloroplast membrane stacking. Cation-induced aggregation of reconstituted proteoliposomes. *Eur j Biochem* **107**: 345-354
- Sakamoto W, Chen X, Kindle KL and Stern DB** (1994) Function of the *Chlamydomonas reinhardtii* *petD* 5' untranslated region in regulating the accumulation of subunit IV of the cytochrome *b₆/f* complex. *Plant J* **6**: 503-512
- Sane AP, Stein B and Westhoff P** (2005) The nuclear gene HCF107 encodes a membrane associated R-TPR (RNA tetratricopeptide repeat)-containing protein involved in expression of the plastidial *psbH* gene in Arabidopsis. *Plant J* **42**: 720-730
- Schein A, Sheffy-Levin S, Glaser F and Schuster G** (2008) The RNase E/G-type endoribonuclease of higher plants is located in the chloroplast and cleaves RNA similarly to the *E. coli* enzyme. *RNA* **14**: 1057-1068
- Scharff LB, Childs L, Walther D and Bock R** (2011) Local Absence of Secondary Structure Permits Translation of mRNAs that Lack Ribosome-Binding Sites. *PLoS Genet* **7**: e1002155
- Schmeing TM and Ramakrishnan V** (2009) What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature* **461**: 1234-1242
- Schmitz-Linneweber C and Small I** (2008) Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends Plant Sci* **13**: 663-670
- Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier RE and Barkan A** (2005) RNA immunoprecipitation and microarray analysis show a chloroplast Pentatricopeptide repeat protein to be associated with the 5' region of mRNAs whose translation it activates. *Plant Cell* **17**: 2791-2804
- Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier RE, Williams-Voelker PM, Kroeger TS, Vichas A and Barkan A** (2006) A pentatricopeptide repeat protein facilitates the trans-splicing of the maize chloroplast *rps12* pre-mRNA. *Plant Cell* **18**: 2650-2663
- Schmitz-Linneweber C and Small I** (2008) Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends Plant Sci* **13**: 663-670.
- Schöttler MA, Albus CA and Bock R** (2011) Photosystem I: Its biogenesis and function in higher plants. *J Plant Physiol* **168**: 1452-1461
- Schünemann D** (2004) Structure and function of the chloroplast signal recognition particle. *Curr Genet* **44**: 295-304
- Schünemann D, Gupta S, Persello-Cartieaux F, Klimyuk VI, Jones JD, Nussaume L and Hoffman NE** (1998) A novel signal recognition particle targets light-harvesting proteins to the thylakoid membranes. *Proc Natl Acad U S A* **95**: 10312-10316

- Schuster G and Stern D** (2009) RNA polyadenylation and decay in mitochondria and chloroplasts. *Prog Mol Biol Transl Sci* **85**: 393-422
- Schwarz C, Elles I, Kortmann J, Piotrowski M and Nickelsen J** (2007) Synthesis of the D2 protein of photosystem II in *Chlamydomonas* is controlled by a high molecular mass complex containing the RNA stabilization factor Nac2 and the translational activator RBP40. *Plant Cell* **19**: 3627-3639
- Schwarz C, Bohne AV, Wang F, Cejudo FJ and Nickelsen J** (2012) An intermolecular disulfide-based light switch for chloroplast psbD gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* **72**: 378-389
- Schweer J, Türkeri H, Kolpack A and Link G** (2010) Role and regulation of plastid sigma factors and their functional interactors during chloroplast transcription - recent lessons from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Cell Biol* **89**: 940-946
- Schwenkert S, Legen J, Takami T, Shikanai T, Herrmann RG and Meurer J** (2007) Role of the low-molecular-weight subunits PetL, PetG, and PetN in assembly, stability, and dimerization of the cytochrome b₆f complex in tobacco. *Plant Physiol* **144**: 1924-1935
- Shapira M, Lers A, Heifetz PB, Irihimovitz V, Osmond CB, Gillham NW and Boynton JE** (1997) Differential regulation of chloroplast gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* during photoacclimation: light stress transiently suppresses synthesis of the Rubisco LSU protein while enhancing synthesis of the PS II D1 protein. *Plant Mol Biol* **33**: 1001-1011
- Sharma MR, Wilson DN, Datta PP, Barat C, Schluenzen F, Fucini P and Agrawal RK** (2007) Cryo-EM study of the spinach chloroplast ribosome reveals the structural and functional roles of plastid-specific ribosomal proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 19315-19320
- Sharwood RE, Halpert M, Luro S, Schuster G and Stern DB** (2011) Chloroplast RNase J compensates for inefficient transcription termination by removal of antisense RNA. *RNA* **17**: 2165-2176
- Shen Y, Danon A and Christopher DA** (2001) RNA binding-proteins interact specifically with the *Arabidopsis* chloroplast *psbA* mRNA 5' untranslated region in a redox-dependent manner. *Plant Cell Physiol* **42**: 1071-1078
- Shiina T, Tsunoyama Y, Nakahira Y and Khan MS** (2005) Plastid RNA polymerases, promoters, and transcription regulators in higher plants. *Int Rev Cytol* **244**: 1-68
- Sirpio S, Allahverdiyeva Y, Suorsa M, Paakkarinen V, Vainonen J, Battchikova N and Aro EM** (2007) TLP18.3, a novel thylakoid lumen protein regulating photosystem II repair cycle. *Biochem J* **406**: 415-425
- Small ID and Peeters N** (2000) The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem Sci* **25**: 46-47.
- Soll J and Schleiff E** (2004) Protein import into chloroplasts. *Nat Rev Cell Biol* **5**: 198-208
- Srivastava R, Battchikova N, Norling B and Aro M** (2006) Plasma membrane of *Synechocystis* PCC 6803: a heterogeneous distribution of membrane proteins. *Arch Microbiol* **185**: 238-243
- Staub JM and Maliga P** (1993) Accumulation of D1 polypeptide in tobacco plastids is regulated via the untranslated region of the *psbA* mRNA. *EMBO J* **12**: 601-606
- Stern DB, Goldschmidt-Clermont M and Hanson MR** (2010) Chloroplast RNA metabolism. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 125-155
- Stöckel J, Bennewitz S, Hein P and Oelmüller R** (2006) The evolutionarily conserved tetratricopeptide repeat protein pale yellow green7 is required for photosystem I accumulation in *Arabidopsis* and copurifies with the complex. *Plant Physiol* **141**: 870-878
- Stoppel R, Lezhneva L, Schwenkert S, Torabi S, Felder S, Meierhoff K, Westhoff P and Meurer J** (2011) Recruitment of a ribosomal release factor for light- and stress-dependent regulation of *petB* transcript stability in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Cell* **23**: 2680-2695
- Stoppel R and Meurer J** (2013) Complex RNA metabolism in the chloroplast: an update on the psbB operon. *Planta* **237**: 441-449
- Stroebe D, Choquet Y, Popot JL and Picot D** (2003) An atypical haem in the cytochrome

- b(6)f complex. *Nature* **426**: 413-418
- Sturm NR, Kuras R, Buschlen S, Sakamoto W, Kindle KL, Stern DB and Wollman FA** (1994) The *petD* gene is transcribed by functionally redundant promoters in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Mol Cell Biol* **14**: 6171-6179
- Sugiura M** (1992) The chloroplast genome. *Plant Mol Biol* **19**: 149-168
- Sugiura M, Hirose T and Sugita M** (1998) Evolution and mechanism of translation in chloroplasts. *Annu Rev Genet* **32**: 437-459
- Sugita M, Miyata Y, Maruyama K, Sugiura C, Arikawa T and Higuchi M** (2006) Extensive RNA editing in transcripts from the *PsbB* operon and *RpoA* gene of plastids from the enigmatic moss *Takakia lepidozioides*. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**: 2268-2274
- Swiatecka-Hagenbruch M, Emanuel C, Hedtke B, Liere K and Börner T** (2008) Impaired function of the phage-type RNA polymerase RpoTp in transcription of chloroplast genes is compensated by a second phage-type RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **36**: 785-792
- Swiatecka-Hagenbruch M, Liere K and Börner T** (2007) High diversity of plastidial promoters in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics* **277**: 725-734
- Takahashi M, Shiraishi T and Asada K** (1988) COOH-terminal residues of D1 and the 44 kDa CPa-2 at spinach photosystem II core complex. *FEBS Lett* **240**: 6-8
- Timmis JN, Ayliffe MA, Huang CY and Martin W** (2004) Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet* **5**: 123-135
- Tissier C, Woolhead CA and Robinson C** (2002) Unique structural determinants in the signal peptides of "spontaneously" inserting thylakoid membrane proteins. *Eur J Biochem* **269**: 3131-3141
- Toor N, Hausner G and Zimmerly S** (2001) Coevolution of group II intron RNA structures with their intron-encoded reverse transcriptases. *RNA* **7**: 1142-1152
- Trebitsh T, Meiri E, Ostersetzer O, Adam Z and Danon A** (2001) The protein disulfide isomerase-like RB60 is partitioned between stroma and thylakoids in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *J Biol Chem* **276**: 4564-4569
- Tsudzuki T, Wakasugi T and Sugiura M** (2001) Comparative analysis of RNA editing sites in higher plant chloroplasts. *J Mol Evol* **53**: 327-332
- Tsunoyama Y, Ishizaki Y, Morikawa K, Kabori, M, Nakahira Y, Takeba G, Toyoshima Y and Shiina T** (2004) Blue light-induced transcription of plastid-encoded *psbD* gene is mediated by a nuclear-encoded transcription initiation factor, AtSig5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 3304-3309
- Tsunoyama Y, Morikawa K, Shiina T and Toyoshima Y** (2002) Blue light specific and differential expression of a plastid sigma factor, Sig5 in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **516**: 225-228
- Uniacke J and Zerges W** (2007) Photosystem II Assembly and Repair Are Differentially Localized in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* **19**: 3640-3654
- Vaistij FE, Boudreau E, Lemaire SD, Goldschmidt-Clermont M and Rochaix JD** (2000a) Characterization of Mbb1, a nucleus-encoded tetratricopeptide-like repeat protein required for expression of the chloroplast *psbB/psbT/psbH* gene cluster in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 14813-14818
- Vaistij FE, Goldschmidt-Clermont M, Wostrikoff K and Rochaix JD** (2000b) Stability determinants in the chloroplast *psbB/T/H* mRNAs of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* **21**: 469-482.
- van Wijk KJ and Eichacker L** (1996) Light is required for efficient translation elongation and subsequent integration of the D1-protein into photosystem II. *FEBS Lett* **388**: 89-93
- Villarejo A, Buren S, Larsson S, Dejardin A, Monne M, Rudhe C, Karlsson J, Jansson S, Lerouge P, Rolland N, von Heijne G, Grebe M, Bako L and Samuelsson G** (2005) Evidence for a protein transported through the secretory pathway en route to the higher plant chloroplast. *Nat Cell Biol* **7**: 1224-1231
- Walter M, Kilian J and Kudla J** (2002). PNPase activity determines the efficiency of mRNA 3'-end processing, the degradation of tRNA and the extent of polyadenylation in chloroplasts. *Embo J* **21**: 6905-6914

- Wank H, SanFilippo J, Singh RN, Matsuura M and Lambowitz AM** (1999) A reverse transcriptase/maturase promotes splicing by binding at its own coding segment in a group II intron RNA. *Mol Cell* **4**: 239-250
- Waters MT and Langdale JA** (2009) The making of a chloroplast. *EMBO J* **28**: 2861-2873
- Weber AP, Schwacke R and Flügge UI** (2005) Solute transporters of the plastid envelope membrane. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 133-164
- Wei L, Guo J, Ouyang M, Sun X, Ma J, Chi W, Lu C and Zhang L** (2010) LPA19, a Psb27 homolog in *Arabidopsis thaliana*, facilitates D1 protein precursor processing during PSII biogenesis. *J Biol Chem* **285**: 21391-21398
- Weihe A and Börner T** (1999) Transcription and the architecture of promoters in chloroplasts. *Trends Plant Sci* **4**: 169-170
- Weihe A, Hedtke B and Börner T** (1997) Cloning and characterization of a cDNA encoding a bacteriophage-type RNA polymerase from the higher plant *Chenopodium album*. *Nucleic Acids Res* **25**: 2319-2325
- Westhoff P and Herrmann RG** (1988) Complex RNA maturation in chloroplasts. The *psbB* operon from spinach. *Eur J Biochem* **171**: 551-564
- Wintz H and Hanson MR** (1991) A termination codon is created by RNA editing in the petunia *atp9* transcript. *Curr Genet* **19**: 61-64
- Wise, RR** (2007) The Diversity of Plastid Form and Function. In *The Structure and Function of Plastids*. Springer Verlag, Dordrecht
- Wolf PG, Rowe CA and Hasebe M** (2004) High levels of RNA editing in a vascular plant chloroplast genome: analysis of transcripts from the fern *Adiantum capillusveneris*. *Gene* **339**: 89-97
- Wollman FA** (2004) The structure, function and biogenesis of cytochrome *b₆f* complexes. *Adv Photosynth Res* **7**: 459-476
- Woodson JD and Chory J** (2008) Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nat Rev Genet* **9**: 383-395
- Wostrikoff K, Girard-Bascou J, Wollman FA and Choquet Y** (2004) Biogenesis of PSI involves a cascade of translational autoregulation in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *EMBO J* **23**: 2696-2705
- Xiao J, Li J, Ouyang M, Yun T, He B, Ji D, Ma J, Chi W and Lu C and Zhang L** (2012) DAC is involved in the accumulation of the cytochrome *b₆/f* complex in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **160**: 1911-1922
- Yamaguchi K and Subramanian AR** (2003) Proteomic identification of all plastid-specific ribosomal proteins in higher plant chloroplast 30S ribosomal subunit. *Eur J Biochem* **270**: 190-205
- Yamazaki H, Tasaka M and Shikanai T** (2004) PPR motifs of the nucleus-encoded factor, PGR3, function in the selective and distinct steps of chloroplast gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J* **38**: 152-163
- Yehudai-Resheff S, Hirsh M and Schuster G** (2001) Polynucleotide phosphorylase functions as both an exonuclease and a poly(A) polymerase in spinach chloroplasts. *Mol Cell Biol* **21**: 5408-5416
- Yohn CB, Cohen A, Danon A and Mayfield SP** (1996) Altered mRNA binding activity and decreased translational initiation in a nuclear mutant lacking translation of the chloroplast *psbA* mRNA. *Mol Cell Biol* **16**: 3560-3566
- Yoon HS, Hackett JD, Ciniglia C, Pinto G and Bhattacharya D** (2004) A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol Biol Evol* **21**: 809-818
- Yoon HS, Hackett JD, Pinto G and Bhattacharya D** (2002) The single, ancient origin of chromist plastids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15507-15512
- Young DA, Allen RL, Harvey AJ and Lonsdale DM** (1998) Characterization of a gene encoding a single-subunit bacteriophage-type RNA polymerase from maize which is alternatively spliced. *Mol Gen Genet* **260**: 30-37
- Yukawa M, Kuroda H and Sugiura M** (2007) A new in vitro translation system for non-radioactive assay from tobacco chloroplasts: effect of pre-mRNA processing on translation *in vitro*. *Plant J* **49**: 367-376.
- Yura K and Go M** (2008) Correlation between amino acid residues converted by RNA

- editing and functional residues in protein three-dimensional structures in plant organelles. *BMC Plant Biol* **8**: 79
- Zak E, Norling B, Maitra R, Huang F, Andersson B and Pakrasi HB** (2001) The initial steps of biogenesis of cyanobacterial photosystems occur in plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 13443-13448
- Zanduetta-Criado A and Bock R** (2004) Surprising features of plastid *ndhD* transcripts: addition of non-encoded nucleotides and polysome association of mRNAs with an unedited start codon. *Nucleic Acids Res* **32**: 542-550
- Zerges W, Auchincloss AH and Rochaix JD** (2003) Multiple translational control sequences in the 5' leader of the chloroplast *psbC* mRNA interact with nuclear gene products in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* **163**: 895-904
- Zhang L, Paakkari V, van Wijk KJ and Aro EM** (2000). Biogenesis of the chloroplast-encoded D1 protein: regulation of translation elongation, insertion, and assembly into photosystem II. *Plant Cell* **12**: 1769-1782
- Zhang D, Zhou G, Kong Y, Chen N, Qiu Q, Yin H, An J, Zhang F and Chen F** (2011) HCF243 encodes a chloroplast-localized protein involved in the D1 protein stability of the arabidopsis photosystem II complex. *Plant Physiol* **157**: 608-619
- Zhelyazkova P, Hammani K, Rojas M, Voelker R, Vargas-Suárez M, Börner T and Barkan A** (2012) Protein-mediated protection as the predominant mechanism for defining processed mRNA termini in land plant chloroplasts. *Nucleic Acids Res* **40**: 3092-3105
- Zhou W, Cheng Y, Yap A, Chateigner-Boutin AL, Delannoy E, Hammani K, Small I and Huang J** (2009) The Arabidopsis gene YS1 encoding a DYW protein is required for editing of *rpoB* transcripts and the rapid development of chloroplasts during early growth. *Plant J* **58**: 82-96
- Zito F, Kuras R, Choquet Y, Kossel H and Wollman FA** (1997) Mutations of cytochrome *b₆* in *Chlamydomonas reinhardtii* disclose the functional significance for a proline to leucine conversion by *petB* editing in maize and tobacco. *Plant Mol Biol* **33**: 79-86

6. Manuskript

Link S, Engelmann K, Meierhoff K and Westhoff P (2012) **The atypical short-chain dehydrogenases HCF173 and HCF244 are jointly involved in translational initiation of the *psbA* mRNA of Arabidopsis.** Plant Physiol **160**: 2202-2218

The Atypical Short-Chain Dehydrogenases HCF173 and HCF244 Are Jointly Involved in Translational Initiation of the *psbA* mRNA of Arabidopsis^{1[W]}

Sabine Link, Kerstin Engelmann, Karin Meierhoff*, and Peter Westhoff

Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen, Heinrich-Heine-Universität,
40225 Duesseldorf, Germany

The related proteins D1 and D2 together build up the photosystem II reaction center. Synthesis of D1 (PsbA) is highly regulated in all photosynthetic organisms. The mechanisms and specific protein factors involved in controlled expression of the *psbA* gene in higher plants are highly elusive. Here, we report on the identification of a chloroplast-located protein, HCF244 (for high chlorophyll fluorescence244), which is essentially required for translational initiation of the *psbA* messenger RNA in Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*). The factor is highly conserved between land plants, algae, and cyanobacteria. HCF244 was identified by coexpression analysis of HCF173, which encodes a protein that is also necessary for *psbA* translational initiation and in addition for stabilization of this messenger RNA. Phenotypic characterization of the mutants *hcf244* and *hcf173* suggests that the corresponding proteins operate cooperatively during *psbA* translation. Immunolocalization studies detected the majority of the two proteins at the thylakoid membrane. Both HCF244 and HCF173 are members of the atypical short-chain dehydrogenase/reductase superfamily, a modified group, which has lost enzyme activity but acquires new functions in the metabolism of the cell.

PSII is a multiprotein complex catalyzing the light-driven electron transfer from water to plastoquinone in oxygen-evolving photosynthetic organisms (Baena-González and Aro, 2002). The heart of this thylakoid membrane complex consists of the D1/D2 heterodimer, which binds most of the redox-active cofactors involved in PSII electron transfer. On either side, the chlorophyll *a*-binding proteins CP47 and CP43 flank the internal heterodimer. In addition, many low-molecular-mass proteins surround this PSII core complex. At the luminal side of the membrane, the subunits PsbO, PsbP, and PsbQ are attached and build up the water-splitting complex.

In consequence of the evolutionary gene transfer from the cyanobacterial ancestor to the host genome, PSII forms a genetic mosaic, consisting of nucleus- and plastid-encoded subunits. These circumstances require a well-orchestrated regulation of gene expression in both genetic compartments during biogenesis of the membrane complex. Nucleus-encoded proteins operate as essential or supportive factors during the expression

of plastid-encoded PSII genes. They are prime candidates for the regulation of plastid gene expression during developmental processes and in response to environmental cues. Thus, their identification is a prerequisite to understand the gene regulatory network between the nucleus and chloroplasts.

While the basic structure of PSII is highly conserved during the evolution of chloroplasts, cyanobacteria and photosynthetic eukaryotes show marked differences with regard to the regulation of PSII gene expression. In cyanobacteria, PSII biogenesis is predominantly regulated at the transcriptional level. In contrast, in green algae and land plants, plastid-encoded PSII genes are mainly regulated at the posttranscriptional level (Rochaix, 2006; Marín-Navarro et al., 2007).

The expression of *psbA*, encoding the PSII reaction center protein D1, reflects this differential regulation. In cyanobacteria, a small *psbA* gene family consisting of two to six genes encodes for distinct D1 isoforms (Mulo et al., 2009). According to the environmental conditions, the transcriptional activity of these genes is up- or down-regulated, generating variable mRNA amounts of the different D1 isoforms. Some regulatory cis-elements and trans-acting factors involved in *psbA* transcription have been identified (Mulo et al., 2012). The *psbA* mRNA in cyanobacteria is rather unstable, with a half-life of only 10 to 20 min (Mohamed and Jansson, 1991; Constant et al., 1997). Ribosomes immediately associate with the *psbA* RNA even in darkness (Tyystjärvi et al., 2004). Moreover, it was suggested that membrane targeting of the D1 nascent complex and translational elongation are important regulatory steps in expression of the D1 genes in

¹ This work was supported by the German Science Foundation (grant no. SFB-TR1 to P.W.).

* Corresponding author; e-mail karin.meierhoff@uni-duesseldorf.de.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) is: Karin Meierhoff (karin.meierhoff@uni-duesseldorf.de).

[W] The online version of this article contains Web-only data.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.112.205104

Synechocystis sp. PCC6803 (referred to as *Synechocystis* herein) and *Synechococcus* sp. PCC7942 (Mulo et al., 2012).

In higher plants and green algae, D1 is encoded by a single gene. In contrast to cyanobacteria, *psbA* is more or less constitutively transcribed and the *psbA* mRNA stability is considerably increased, facilitating a shift of main regulatory steps to posttranscriptional processes (Klauff and Grussem, 1991). In *Chlamydomonas reinhardtii*, a model is proposed in which translational initiation of the *psbA* mRNA demands the presence of a multisubunit complex (Danon and Mayfield, 1991; Yohn et al., 1996). In the light, this complex is believed to bind to the 5' untranslated region (UTR) of *psbA*, thereby enhancing the efficiency of translation initiation (Fong et al., 2000). In addition, the synthesis rate of D1 in *C. reinhardtii* directly depends on the availability of the interacting partner, D2. This regulatory relationship was found also for core subunits of the other photosynthetic membrane complexes and was termed control by epistasy of synthesis (Choquet and Wollman, 2002; Minai et al., 2006).

The existence of comparable mechanisms for the regulation of D1 translation in higher plants is still unclear. Nevertheless, cis-acting elements and trans-acting factors determining D1 translational initiation were identified. In the *psbA* 5' UTR of tobacco (*Nicotiana tabacum*), two potential ribosome-binding sites (RBS1 and RBS2) flank an adenine uracil box, which is a putative target of at least one trans-acting factor (Hirose and Sugiura, 1996). Proteins that bind to the *psbA* 5' UTR were also found in spinach (*Spinacia oleracea*; Alexander et al., 1998). The 43-kD RNA-binding protein of spinach is a homolog of the ribosomal protein S1 and binds to uracil-rich single-stranded RNA in response to light (Klauff and Grussem, 1995; Alexander et al., 1998). Detailed information about the second identified factor, a 47-kD protein, are not available. UV cross-linking experiments with the *psbA* 5' UTR of Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) established the presence of 43- and 30-kD proteins, both of which bind in a redox-dependent manner but have not been identified yet (Shen et al., 2001). Altogether, these findings suggest that the 5' UTR of the *psbA* mRNA from higher plants is very likely also a primary target of control mechanisms for D1 synthesis.

Previously, we identified HCF173 (for high chlorophyll fluorescence173), an essential factor involved in early processes of D1 synthesis in Arabidopsis (Schult et al., 2007). The loss of HCF173 causes a specific destabilization of the *psbA* transcript together with impaired translation initiation. HCF173 shows low similarity to members of the classical short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily. SDRs represent a large group of oxidoreductases, including epimerases, lyases, and isomerases, that depend on NAD⁺ or NADP⁺ or their reduced forms [NAD(P)(H)] as cofactors. These enzymes have a wide substrate spectrum and are involved in a variety of key metabolic processes (Filling et al., 2002; Kallberg et al., 2002). Classical SDR proteins contain two motifs. The N-terminal Gly-rich motif TGXXGXG mediates the binding of the dinucleotide cofactor and is arranged within a conserved domain of

alternating α -helices and β -sheets designated the Rossmann fold. The enzymatic activity of SDR proteins is associated with a catalytic tetrad (N-S-Y-K) consisting of the YXXXK motif in cooperation with conserved Asn (N) and Ser (S) residues (Kavanagh et al., 2008; Persson et al., 2009).

HCF173 belongs to the subfamily of atypical SDRs. Compared with classical SDRs, this subfamily has an altered Gly-rich NAD(P)(H)-binding motif and partly or completely lacks the signature catalytic tetrad; however, the three-dimensional architecture of the SDR fold is conserved (Persson et al., 2009). Atypical SDRs examined so far have obviously lost their enzymatic activity, and some of them gained new functions in RNA metabolism or as regulatory proteins. One of the well-characterized atypical SDRs is NmrA, a transcriptional repressor in fungi able to inactivate the transcription factor AreA in response to the nitrogen status of the cell (Stammers et al., 2001). A long-known chloroplast-located atypical SDR protein is CSP41 (for chloroplast stem loop-binding protein41; Yang et al., 1996; Bollenbach et al., 2003). Many different roles in the RNA metabolism of chloroplasts have been assigned to CSP41. The first reports detected endoribonuclease activity in spinach chloroplasts (Yang et al., 1996). In Arabidopsis, which encodes two copies of this gene, roles for CSP41 in ribosomal RNA (rRNA) metabolism and in transcription were described (Beligni and Mayfield, 2008), and recently, a role in RNA stabilization was demonstrated (Qi et al., 2012).

The factor HCF173 is also directly involved in the RNA metabolism of the chloroplast. Affinity purification revealed its association with the *psbA* mRNA in a high-*M_r* thylakoid membrane complex (Schult et al., 2007). Because a significant amount of HCF173 was also detected in the stroma, we discussed a role as an RNA-binding factor involved in the membrane targeting of nascent D1 ribosomal complex.

To identify additional components required during regulated expression of the D1 protein, we analyzed the coexpression profile of HCF173. In this context, we identified the new D1 biogenesis factor HCF244. Its knockout resulted in a very similar phenotype to that described previously for HCF173 inactivation. As in *hcf173*, the analysis of polysomal association revealed drastically impaired initiation of translation of the *psbA* mRNA in *hcf244*. This results in a severe reduction of D1 protein accumulation coupled with destabilization of all other PSII core subunits. By comparison with *hcf173*, only a slight reduction of the *psbA* mRNA level was detectable in *hcf244*. Interestingly, the factor HCF244 also belongs to the atypical SDR subfamily and possesses the modified Rossmann fold dinucleotide-binding site of this subgroup, together with an altered catalytic motif. HCF244 is associated with an approximately 300-kD thylakoid membrane complex. The *hcf173hcf244* double mutant shows a more pronounced phenotype than the single mutants, suggesting that photosynthetic activity is further improved due to a lesser extent of D1 synthesis.

RESULTS

Identification of the SDR Protein HCF244

In a forward genetic approach, we identified the nucleus-encoded factor HCF173 (*At1g16720*), which is a chloroplast-located SDR protein associated with the *psbA* mRNA and required for translational initiation of this transcript (Schult et al., 2007). To explore the functional and biological network of *At1g16720* in Arabidopsis, we analyzed condition-specific coexpression data sets using the Bio-Array Resource (Toufighi et al., 2005). All positively correlated genes ($r > 0.8$) have been analyzed concerning their function and the localization of the gene product. Interestingly, four genes with known functional relationships to PSII biogenesis and five SDR or SDR-like proteins were found (Supplemental Table S1). The first nine highly correlated genes encoding for unknown or less characterized products with a predicted or experimentally shown chloroplast localization were selected, and corresponding T-DNA insertion lines from the SALK (<http://signal.salk.edu/index.html>) and GABI-Kat (<http://www.gabi-kat.de/>) collections were analyzed (Supplemental Table S2). We screened the progeny of these lines for seedlings showing an *hcf* phenotype, indicative for an impaired photosynthetic capacity. Under our growth conditions ($60\text{--}80\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, 22°C), the mutant line N408380 (GABI-Kat) segregated an *hcf* phenotype and mutant seedlings were unable to survive under photoautotrophic growth conditions, revealing the relevance of the inactivated nuclear gene for an efficient photosynthesis rate. According to the observed phenotype, the mutant was designated *hcf244*. The *hcf244* T-DNA line possesses an insertion in the nuclear gene *At4g35250* (Fig. 1A), which has the second best correlation to *HCF173* expression. To localize the position of the T-DNA, we amplified the region around the insertion point by gene- and T-DNA-specific primers. Sequencing of the PCR products monitored the incorporation of the T-DNA at position +186 in the first of seven exons of *At4g35250*. As a consequence of the T-DNA insertion, the *HCF244* transcript is missing in the mutant (Fig. 1B), resulting in the absence of the HCF244 protein (Fig. 1C).

HCF244 encodes a protein consisting of 395 amino acids with a predicted M_r of 43.7 kD. The first 63 amino acids show characteristics of a chloroplast transit peptide, based on ChloroP prediction (Emanuelsson et al., 1999). Referring to the conserved domain database (Marchler-Bauer et al., 2011), the region of amino acids 81 to 284 is annotated as an atypical group (subgroup 5) of the SDR superfamily (Fig. 2A). The NAD(P)(H)-binding domain of HCF244 shows the conserved sequence GXXGXXG, which is similar to that of extended SDRs (Kavanagh et al., 2008). In contrast, a poorly conserved active site tetrad is present, consisting of only the Lys residue in the YXXXX motif. A Ser is located right beside its conserved position, and Asp is present instead of Asn (Fig. 2B). This results in the modified tetrad D-(S)-L-K. With regard to the stringent requirement of

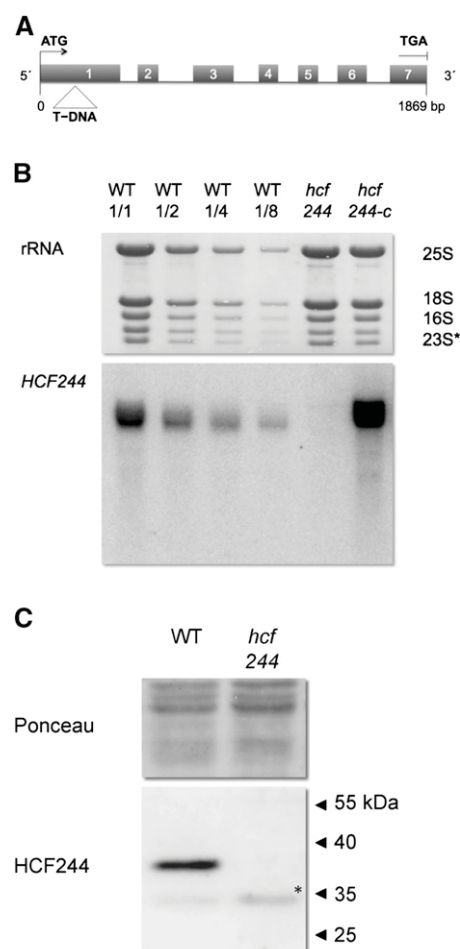


Figure 1. Gene structure and expression levels of *At4g35250* in wild-type and mutant seedlings. **A**, Structure of the gene *HCF244*. The *HCF244* open reading frame (1,869 bp) consists of seven exons separated by six introns. The mutant allele *hcf244* contains a T-DNA insertion at position +186, which is schematically marked by a triangle. Exons are shown in dark gray. **B**, Transcript analysis of *HCF244*. Five micrograms of total leaf RNA or the indicated dilutions, isolated from 2- to 3-week-old wild-type (WT), *hcf244* mutant, and complemented *hcf244* plants, were analyzed by RNA gel-blot hybridization using a radiolabeled probe against the *HCF244* cDNA. The distribution of rRNAs was visualized by methylene blue staining. The degradation product of the 23S rRNA is indicated by an asterisk. **C**, Immunoblot analysis of the HCF244 protein. Thylakoid membrane proteins were isolated from wild-type and *hcf244* leaves and separated by SDS-PAGE. Thirty micrograms of protein was loaded on the SDS gel. The detection of HCF244 was performed with the specific HCF244 antibody, whereas cytochrome *f* detection resulted from its heme-associated peroxidase activity. The position of cytochrome *f* is indicated by an asterisk.

Tyr for dehydrogenase/reductase activity (Jörnvall et al., 1995), the altered composition of this motif suggests the loss of enzymatic activity in HCF244.

BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and Phytozome (<http://www.phytozome.net/>) searches revealed a number of orthologs ranging from higher plants and mosses to green algae, glaucophytes, red algae,

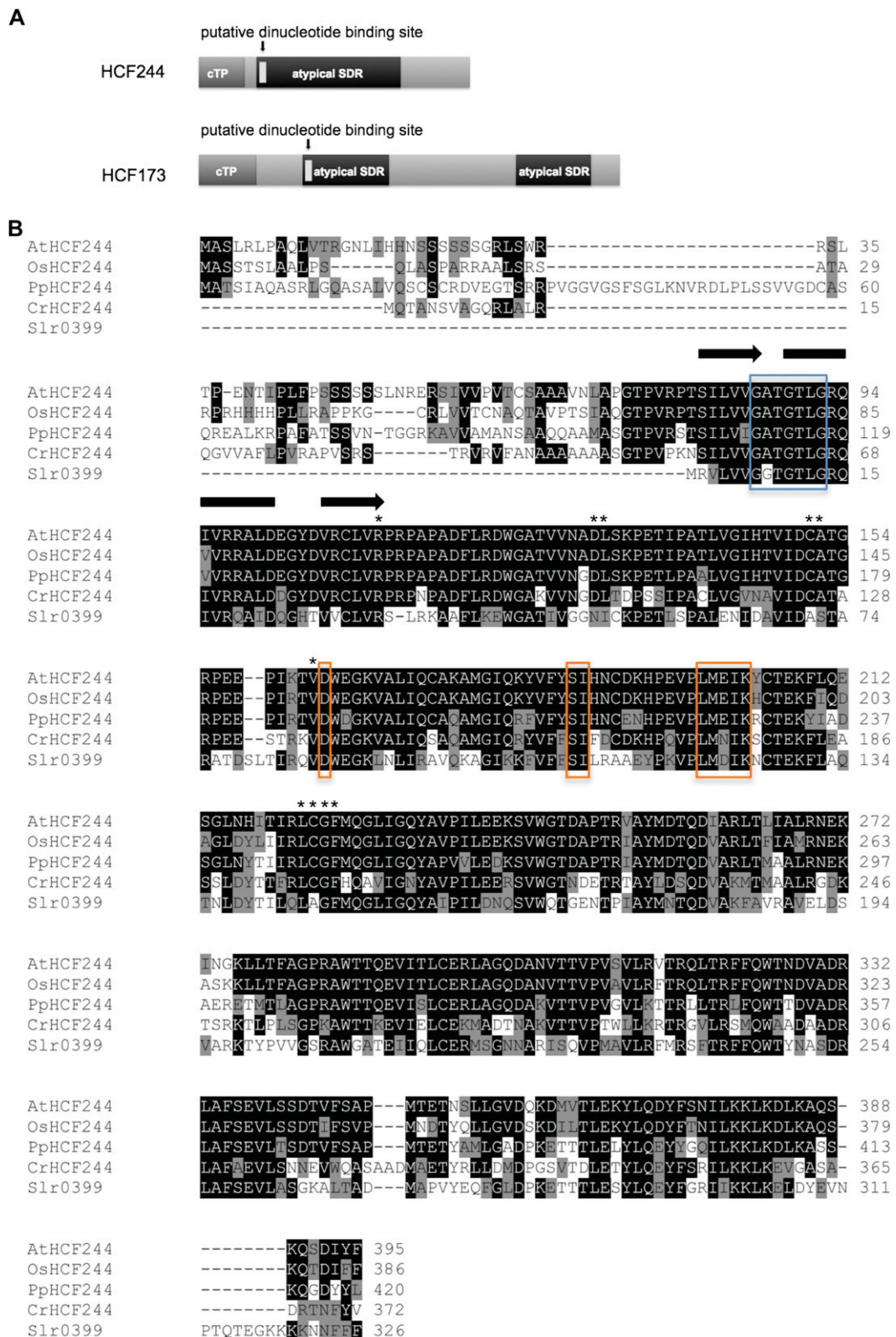


Figure 2. Domain structure of HCF244 and similarities to other homologous proteins. A, Domain composition of HCF244 in comparison with HCF173. Both nucleus-encoded factors contain a putative chloroplast transit peptide, indicated in dark gray. The conserved atypical SDR domain, including a putative dinucleotide binding site, is indicated in black and light gray, respectively. B, Multiple amino acid sequence alignment of Arabidopsis HCF244 and homologs from rice (*Oryza sativa*;

stramenopiles, and cyanobacteria (Fig. 3). Phylogenetic analyses of the representative sequences revealed very close evolutionary relationships among the HCF244 homologs of higher plants, mosses, and green algae, with protein identities in the range of 63% to 93%. Moreover, strong relationships were observed between orthologs of plants and cyanobacteria, revealing protein identities with AtHCF244 around 50%. In addition, orthologs of HCF244 were also found in the stramenopiles (dinoflagellata and heterokontophyta) and in rhodophyta. The phylogenetic analysis of HCF244 suggested that the protein is encoded by an ancient gene, which originated from a cyanobacterial progenitor.

The Mutant *hcf244* Is Deficient in PSII Function

To assess the function of HCF244, we explored the photosynthetic capacity and the accumulation of the corresponding thylakoid membrane complexes in the selected knockout mutant. Under autotrophic growth conditions, *hcf244* mutants merely produced cotyledons and died in the seedling stage. On Suc-supplemented medium, mutants could be cultivated under low-light conditions ($60\text{--}80\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$), but compared with the wild type, these mutant seedlings showed an impaired growth rate and pale green leaf color (Fig. 4). In addition, fertile flowers were not generated by the mutant plants under these conditions.

To gain insights into the functional state of PSII and the photosynthetic electron transport chain, chlorophyll *a* fluorescence was recorded. In dark-adapted wild-type seedlings, a short saturating light pulse induces a characteristic chlorophyll *a* emission reflecting high efficiency of PSII photochemistry (Fig. 5A). The ratio of variable to maximal fluorescence reached the usual value of 0.78 ± 0.013 . In contrast, a saturating light pulse did not induce an increased fluorescence signal in *hcf244*, indicating a severe defect in PSII photochemistry. To complement these measurements, we analyzed P700 redox reactions in the reaction center of PSI via its absorbance change at 830 nm (Fig. 5B). In the wild type, actinic light partially oxidized P700 whereas far-red illumination induced a maximum oxidation. In far-red background light, P700 was rereduced by a saturating light pulse due to the induction of electron transport from PSII. In contrast, actinic light already results in complete P700 oxidation in *hcf244*, and the application of a saturating light pulse

failed to rereduce P700. This observation indicates a functional PSI reaction center in the mutant but insufficient electron transport rate or absence of electron production in PSII.

HCF244 Is Specifically Necessary for the Accumulation of PSII Complex Proteins

To verify the results of the spectroscopic measurements, we analyzed the accumulation of distinct subunits of the photosynthetic electron transport chain by immunoblot analyses (Fig. 6). The levels of the reaction center proteins D1 and D2 of PSII were decreased below 12.5% and hardly detectable in the mutant. The PSII inner antenna polypeptides CP43, CP47, and cytochrome *b*₅₅₉ accumulated to about 12.5% to 25% of wild-type levels, whereas PsbP, a nucleus-encoded subunit of the oxygen-evolving complex, was found to be reduced to 50% in the mutant.

In parallel, we analyzed representative subunits of PSI (PsaD and PsaA/B), the cytochrome *b*₆*f* complex (Cyt*f* and SUIV), and ATP synthase (CF1- α -SU). In *hcf244*, 50% to 80% of PsaD and PsaA/B were present. The accumulation of the cytochrome *b*₆*f* complex and ATP synthase was not impaired. Modification of the light conditions to a lower intensity led to wild-type levels of PSI (data not shown), suggesting that the reduced PSI level is a secondary effect of the mutation, like those previously observed in *hcf136* (Meurer et al., 1998) and *hcf173* (Schult et al., 2007). Taken together, the immunoblot analysis data suggest that *hcf244* is characterized by a specific deficiency in PSII accumulation, whereas other complexes of the photosynthetic electron transport chain are not affected by the mutation.

To confirm that the *hcf244* phenotype is based on the single T-DNA insertion in the gene At4g35250, we transformed heterozygous *hcf244* plants with the At4g35250 complementary DNA (cDNA) under the control of the 35S promoter employing the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated floral dip method (Clough and Bent, 1998). Transgenic plants, which were homozygous for the *hcf244* mutation, were able to grow on soil under photoautotrophic conditions. In addition, spectroscopic measurements (Fig. 5) and immunoblot analysis (data not shown) confirmed the presence of a fully functional PSII. Thus, the mutant phenotype was rescued by the introduced cDNA, indicating that the single T-DNA insertion in the gene At4g35250 was exclusively responsible for the mutant defect.

Figure 2. (Continued.)

OsHCF244), moss (*Physcomitrella* spp.; PpHCF244), green algae (*C. reinhardtii*; CrHCF244), and cyanobacteria (Slr0399). Identical amino acids are marked white on black; similar amino acids are black on gray. The predicted secondary structure of the Rossmann fold dinucleotide binding site is schematically indicated above the sequence: black arrow for β -strand; black bar for α -helix. The position of the conserved Gly-rich motif (GXXGXXG) is indicated by a blue box. The conserved and altered residues of the catalytic tetrad (N-S-YXXXK) are marked by orange boxes. Further conserved amino acids are indicated by asterisks. The multiple amino acid sequence alignment was generated with ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). For secondary structure prediction, the Web tool Jpred (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>) was used.

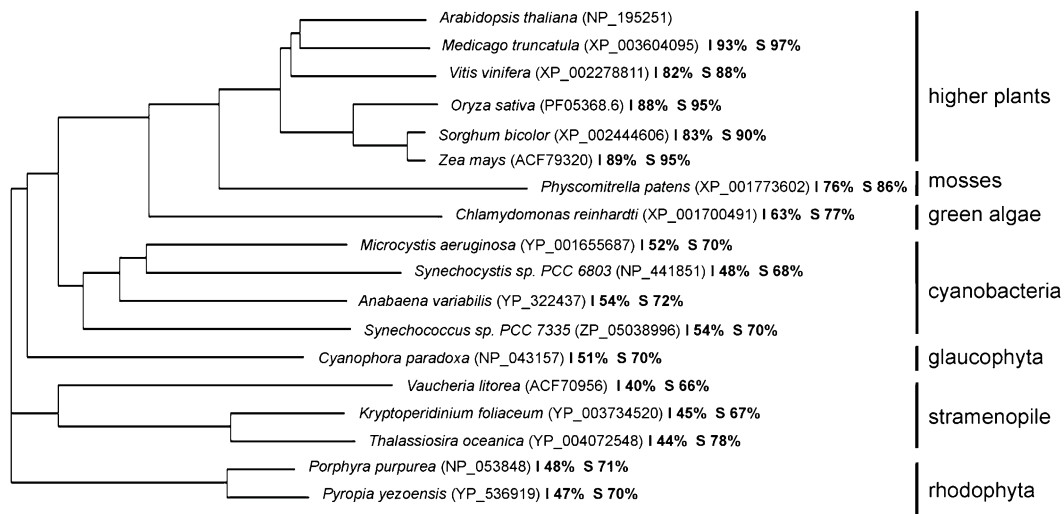


Figure 3. Phylogenetic analysis of HCF244. The phylogenetic tree was constructed using the ClustalW2 tool for multiple sequence alignment. The values of identity (I) and similarity (S) compared with the *Arabidopsis* HCF244 protein (NP_195251) are listed in percentages. Accession numbers are bracketed.

In addition, we tried to complement *hcf244* with several C-terminally tagged protein versions. As the smallest tag, we used the 27-amino acid triple hemagglutinin epitope (Sato and Wada, 1997) or this tag in combination with the 28-amino acid StrepIII tag (Junttila et al., 2005) and the protein A tag (IgG-binding domain of *Staphylococcus aureus* protein A). However, none of these fusion proteins was able to complement the mutant phenotype, indicating that the C terminus of the protein does not tolerate modifications of this type.

Translational Initiation of the *psbA* mRNA Is Drastically Impaired in the *hcf244* Mutant

To address the question whether the PSII defect in *hcf244* is caused by reduced synthesis rates of chloroplast-encoded PSII proteins, we performed in vivo labeling studies with [³⁵S]Met in intact leaves. Newly synthesized proteins were electrophoretically separated to analyze specific translation products. To simplify the complex labeling pattern, cytoplasmic translation was blocked by cycloheximide.

Comparison of the whole labeling pattern between wild-type and mutant leaves revealed that protein labeling is reduced by about 50% in *hcf244*, indicating that protein synthesis capacity is generally impaired in mutant chloroplasts (Fig. 7A). After a pulse of 30 min, we were able to visualize reaction center proteins A/B of PSI, the α/β -subunits of ATP synthase, and CP47, CP43, D2, and PsbH of PSII in the wild type and mutant. However, the protein with the strongest labeling intensity in wild-type leaves, the D1 protein, was not detectable in the mutant (Fig. 7A). To assess whether this drastically impaired labeling is caused by a decreased half-life, we allowed ³⁵S incorporation

only for 10 min. This short pulse period should facilitate D1 detection, even if D1 is degraded very fast. However, our results did not differ from the 30-min pulse, suggesting that the reduced D1 level results from an impaired D1 synthesis rate and not from increased protein degradation.

To determine if an altered transcript level caused the low synthesis rate of photosynthetic proteins, we measured the amount of numerous plastid- and nucleus-encoded transcripts by RNA gel-blot hybridization. These analyses showed that the *psbA* mRNA is decreased to 60% of the wild-type level in *hcf244* (Fig. 7B). All other analyzed transcripts of PSII (*psbB*, *psbC*, *psbD*, *psbE/F*, *psbO*, *psbR*, *psbP*, *psbH*, *psbK*, and *psbN*), PSI (*psaA* and *psaC*), the cytochrome *b₆/f* complex (*petA*), and ATP synthase (*atpA*) accumulated in size and abundance comparable to the wild type (data not shown), indicating that plastid RNA accumulation is not generally impaired by the mutation.

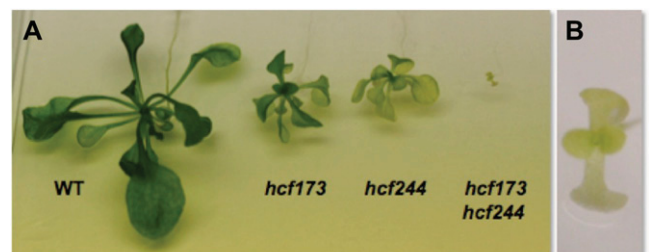


Figure 4. Presentation of 3- to 4-week-old *hcf* mutants and wild-type (WT) plants. Plants were grown under a 16-h-light/8-h-dark period at a PFD of 60 to 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a constant temperature of 22°C. A, Comparison of the wild type, *hcf173* and *hcf244* single mutants, and the *hcf173hcf244* double mutant. B, Closeup of the *hcf173hcf244* double mutant.

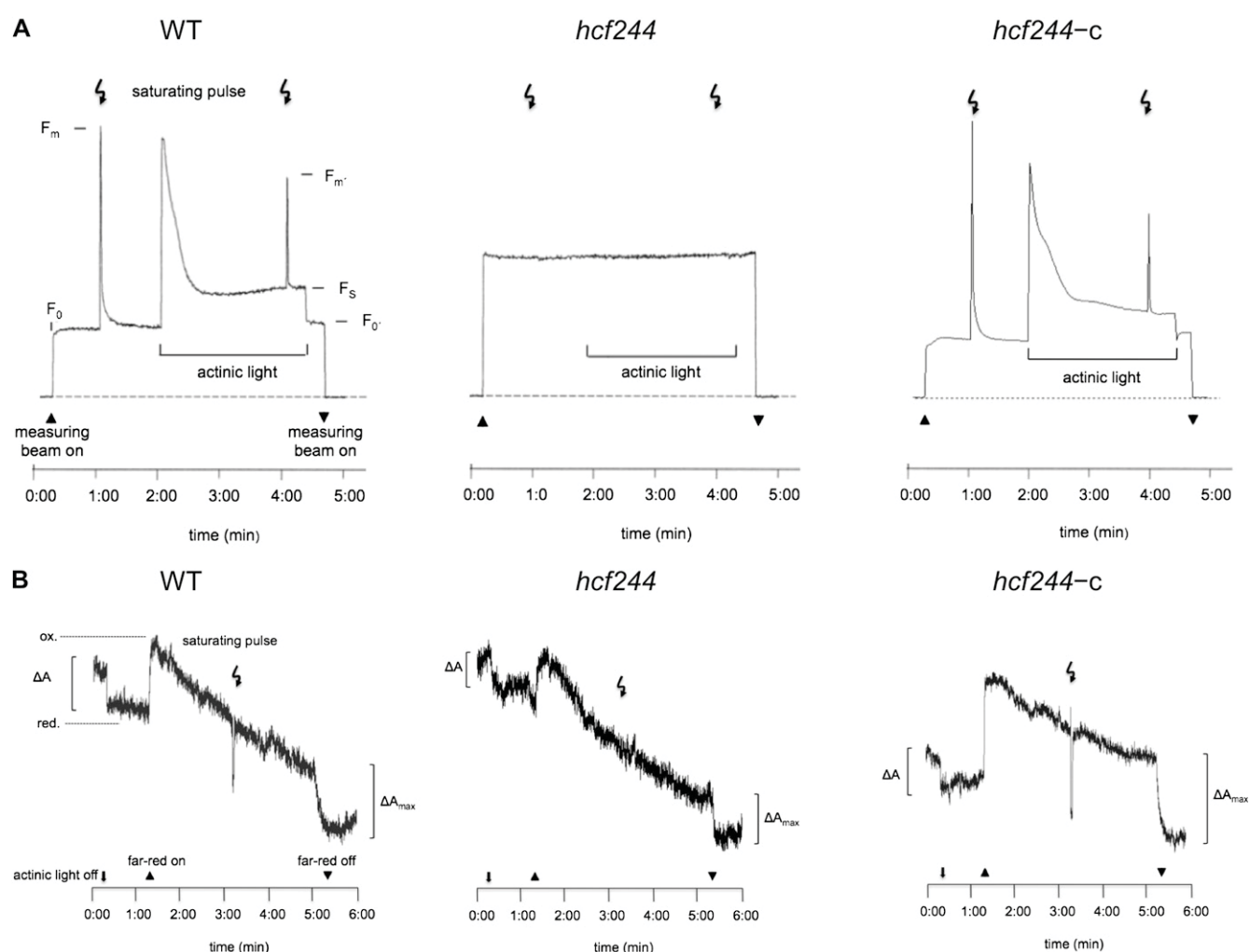


Figure 5. Spectroscopic analyses of wild type (WT), *hcf244* mutant, and complemented *hcf244* (*hcf244-c*) plants. Measurements of chlorophyll fluorescence induction (A) and P700 absorbance kinetics (B) were performed with intact 2- to 3-week-old plants.

Because the observed reduction of the *psbA* transcript alone is unlikely to be responsible for the absence of D1, we addressed the question of whether the efficiency of *psbA* translation is affected in the mutant. To this end, we analyzed ribosomal loading of this transcript by fractionation of leaf RNA in a Suc gradient and subsequent gel-blot hybridization of RNA fractions (Fig. 7C). Efficiently translated RNAs are located in polyribosomes, which migrate into the high-density fractions of a gradient; in contrast, monosomes and free RNA are located in the low-density range. Chelating agents like EDTA disrupt ribosomes, and once they are added in the RNA preparation, the typical distribution pattern of a polysomal gradient is shifted drastically to the low-density fractions, thereby confirming the position of free RNAs and monosomes in the gradient (Schult et al., 2007).

Staining of rRNAs reflected a comparable distribution in both the gradient of the wild type and the mutant *hcf244*, revealing that there is no general

difference in the distribution of ribosomes between the mutant and the wild type. Detection of the *psbA* mRNA by phosphor imaging and subsequent quantification of the results showed that 19% of wild-type *psbA* mRNA is located in polysomal fractions. Accordingly, 81% is located in monosomes or represents free RNA. In contrast, in the *hcf244* mutant, only 4% of the *psbA* mRNA is associated with polysomes, implying that the translational activity of this RNA is very low. A subsequent detection of polycistronic *psbB* transcripts (Westhoff and Herrmann, 1988) displayed a similar distribution in the wild type and the *hcf244* mutant.

Taken together, the results of the in vivo labeling assays and the analysis of polysomal distribution of the *psbA* mRNA indicated that the synthesis rate of the D1 protein is specifically impaired in *hcf244* due to reduced translational initiation. This leads to drastically reduced amounts of the D1 protein, with the consequence that no stable PSII core complex could

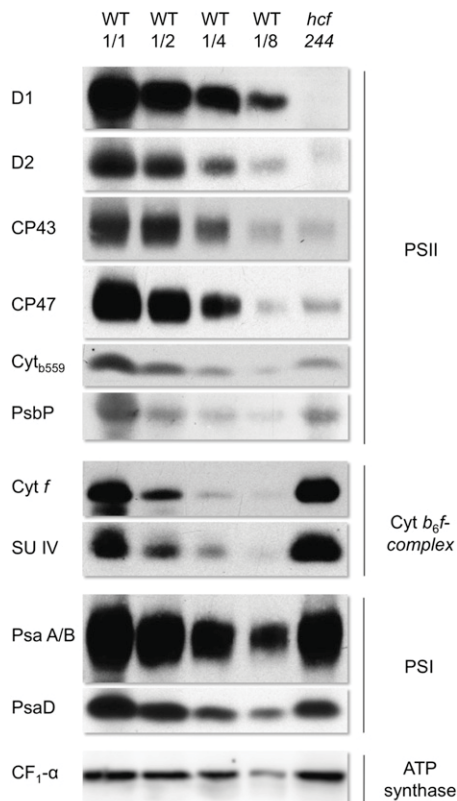


Figure 6. Protein composition of photosynthetic membranes of 2- to 3-week-old *hcf244* and wild-type (WT) plants. Membrane proteins were separated by SDS-PAGE and subsequently transferred onto nitrocellulose membranes. Lanes were loaded with 20 μ g (WT 1/1 and *hcf244*), 10 μ g (WT 1/2), 5 μ g (WT 1/4), and 2.5 μ g (WT 1/8) of protein.

be assembled and mutants are photosynthetically inactive.

HCF244 Is a Peripheral Thylakoid Membrane Protein

The database entry of the Plant Proteome Database (Sun et al., 2009) defines HCF244 to be a thylakoid-associated protein. To verify this localization and to precisely determine the partitioning of HCF244 in the chloroplast compartments, we prepared a specific antibody against the recombinant protein. In the first immunoblot analyses, the HCF244 antibody detected one clear signal around 38 kD in wild-type membrane protein extracts (Fig. 1C). Subsequently, intact chloroplasts were isolated from wild-type plants and further fractionated into stroma and membrane fractions (Fig. 8A). Compared with total leaf extracts, HCF244 is highly enriched in the chloroplast fraction. The stroma and membrane fractions both revealed a signal of HCF244, while the vast majority of the protein was bound to the membrane fraction. Defined chloroplast proteins like the soluble RbcL and the membrane integral PsaD corroborate the purity of the organelle

fractions, whereas α -tubulin as a cytosolic marker confirmed the complete removal of the cytosol. These findings verify that HCF244 is targeted into chloroplasts, where it mainly associates with the membrane fraction. The relative mass of HCF244 differs from the predicted value of 44 kD for the full-length product, suggesting that the import process of HCF244 is accompanied by cleavage of the predicted chloroplast transit peptide.

To explore the intensity of membrane binding of HCF244, sonicated thylakoids were treated with different salt washings (Fig. 8B). In the presence of sodium chloride, HCF244 remained attached to the membrane, whereas sodium carbonate released the majority of HCF244 protein into the supernatant. The same result was detected for the peripheral oxygen-evolving complex protein PsbO. As expected, the integral PSI protein PsaD was not affected by these treatments.

To address the question of whether HCF244 is located at the stromal or luminal side of the thylakoid membrane, we performed thermolysin protection assays. When intact thylakoids were treated with thermolysin, HCF244 was truncated by approximately 1 kD, indicating that HCF244 is accessible for this protease, but the main part of the protein remained protected (Fig. 8C). A second distinct HCF244 degradation product with a relative size of around 35 kD accumulated with increasing incubation time. In contrast, HCF173 was degraded within 1 min, comparable to the stromal ferredoxin NADP oxidoreductase. This result suggested that HCF244 might be located at the luminal side of the thylakoid membrane, where it is protected against proteolytic degradation. To prove this assumption, we investigated the luminal peripheral proteins in a preparation of thylakoids that were disrupted by sonification. While the luminal PsbO was degraded rapidly, the behavior of HCF244 proteolysis was not altered. Accordingly, the protection of HCF244 is very likely not the result of luminal localization but seems to be based on a highly protected stroma-exposed position.

Together, these data indicate that HCF244 is a peripheral membrane protein, which is tightly attached to the thylakoids. Only a very small domain of HCF244 is directly exposed to the stroma, whereas the residual part is protected against protease activity.

HCF244 Is Part of a Protein Complex, Which Does Not Stably Bind RNA

Recent explorations of accessory proteins involved in thylakoid membrane biogenesis often revealed the assembly of these factors with high- M_r complexes containing both proteins and RNA (Vaistij et al., 2000; Dauvillée et al., 2003; Schwarz et al., 2007; Boulouis et al., 2011). Our studies of HCF173 also showed that this factor is associated in a high- M_r complex of the chloroplast membrane fraction. In addition, an affinity-purified protein fraction of HCF173 preferentially contained the *psbA* mRNA,

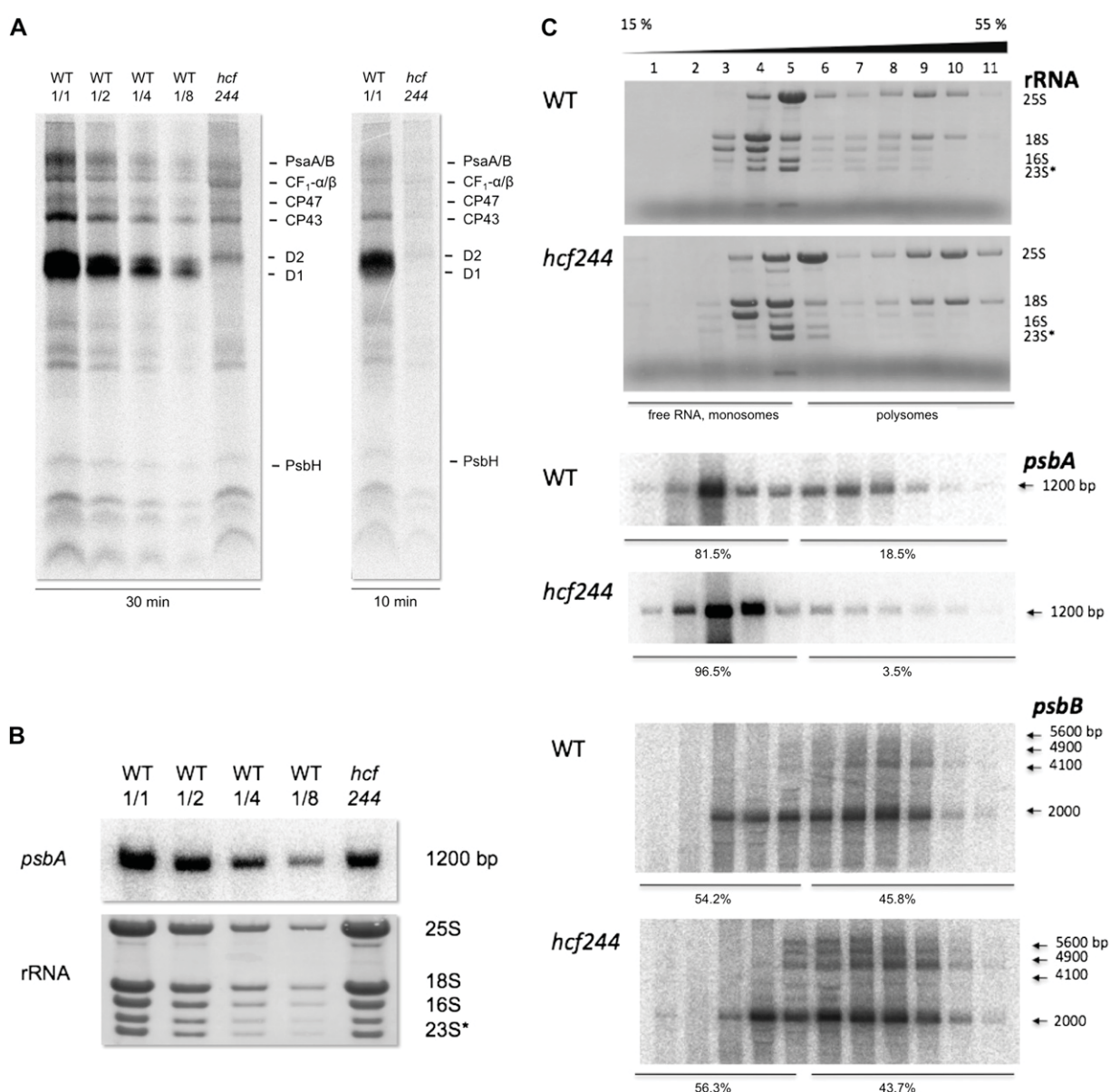


Figure 7. Gene expression of *psbA* in wild-type (WT) and *hcf244* mutant seedlings. A, In vivo labeling of newly synthesized membrane proteins by radioactive [³⁵S]Met. Primary leaves of 2-week-old wild-type and *hcf244* mutant plants were radiolabeled for 10 and 30 min. Subsequently, membrane proteins were isolated, separated by SDS-PAGE, and visualized by autoradiography. Lanes were loaded with an equivalent amount to 100,000 cpm (WT 1/1 and *hcf244*), 50,000 cpm (WT 1/2), 25,000 cpm (WT 1/4), and 12,500 cpm (WT 1/8). B, RNA gel-blot analyses of the *psbA* transcript from wild-type and *hcf244* mutant plants. Total leaf RNA was isolated from 2- to 3-week-old plants. Lanes were loaded with 5 μg of total RNA or the indicated dilutions. The degradation product of the 23S rRNA is indicated by an asterisk. C, Polysome association studies in the wild type and the *hcf244* mutant. Whole cell extracts of wild-type and *hcf244* mutant plants were fractionated by linear 15% to 55% Suc gradients. Afterward, 11 equal fractions were harvested and extracted, and RNA was analyzed by RNA gel-blot hybridization. The distribution of rRNAs was visualized by methylene blue staining. The RNA amounts of *psbA* and *psbB* were detected by a specific probe and quantified by phosphor imaging.

indicating specific binding of this transcript (Schult et al., 2007). Hence, the question arises whether HCF244 is also part of a high-*M_r* complex and, if so, whether the complex includes RNA.

To investigate the accumulation of higher order protein complexes of HCF244, dodecyl-maltoside-

solubilized chloroplast membrane extracts of the wild type were separated by Suc density gradient centrifugation. In parallel, we examined the ability of RNA to bind to the HCF244 complex by digestion of membrane protein extract with RNase A and subsequent monitoring of the fractionation behavior of HCF244

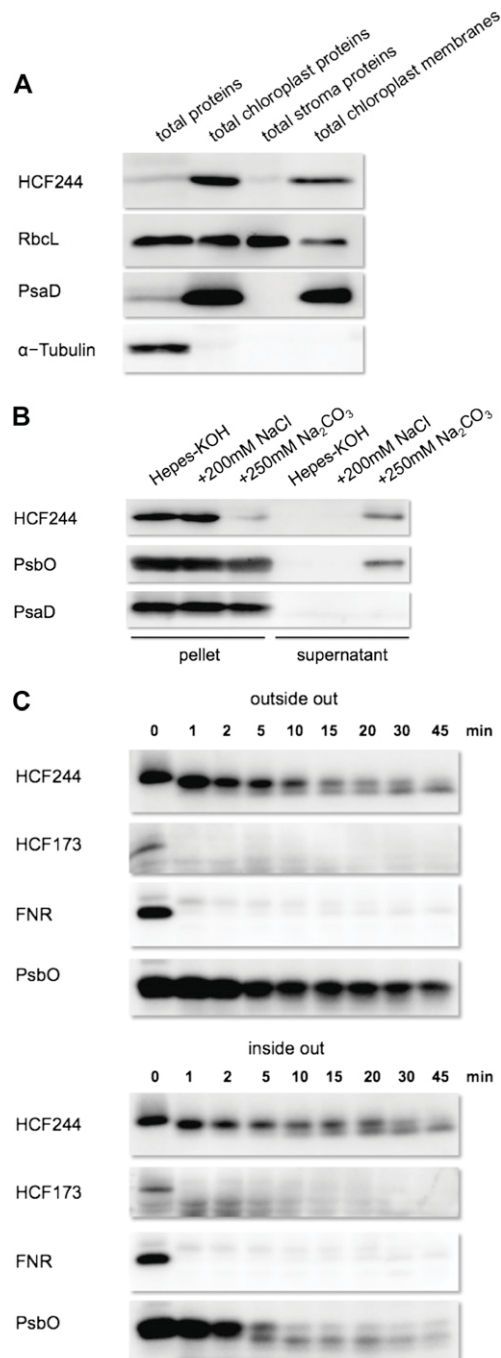


Figure 8. Immunolocalization of HCF244. A, Chloroplast localization of HCF244. Intact chloroplasts were isolated from 5- to 6-week-old wild-type plants by Percoll step gradient centrifugation and fractionated into chloroplast membranes and stroma proteins. An equivalent of 10 μ g of chlorophyll was loaded on the gel, together with a total leaf extract containing the same protein amount as the total chloroplast extract. B, Salt washing of thylakoid membranes. Thylakoids were sonicated in the indicated buffers, then afterward separated into membrane and soluble proteins by centrifugation and analyzed by SDS-PAGE. C, Protease protection assay. Intact and sonicated thylakoids were treated with thermolysin (final concentration, 0.1 mg mL⁻¹). To stop the reaction, EDTA was added to a final concentration of 50 mM. A total of 10 μ g of chlorophyll was loaded in each lane.

and HCF173 (Fig. 9A). Immunodetection of HCF244 in the fractions of the gradient showed that the majority of the protein was detectable in fractions 8 to 10, corresponding to an M_r between 40 and 80 kD; however, a faint signal of HCF244 was detectable up to fraction 2. These results indicate that HCF244 accumulates mainly in a small form. Besides this, the Suc gradient verified the existence of larger HCF244 complexes predominantly separating in a range between 200 and 400 kD. A related behavior could be observed for HCF173, which was enriched in fractions 7 to 10, but significant amounts of the protein were also detectable in the bottom fraction 1 that contained complexes of at least 500 kD. Since fraction 1 contained the complete protein pelleted at the bottom of the gradient, even larger complexes could be present in this fraction. To prove this assumption, we analyzed the migration behavior of HCF173 in a gradient with higher resolution. Figure 9B shows that parts of HCF173 can be detected far beyond the size of the Rubisco enzyme, which migrates at about 550 kD.

The RNase treatment does not alter the separation pattern of HCF244, indicating that RNA is not part of the detected protein assemblies. In contrast, the portion of HCF173 associated with high- M_r complexes disappeared after RNase treatment, and only signals in the range between 40 and 200 kD were still detectable (Fig. 9A).

Together, these findings support the assumption that HCF244 associates with other binding partners; however, this association seems to be rather weak or is especially instable under our conditions of membrane protein extraction. In addition, RNA is not stably associated with the HCF244 complex. In contrast, the data confirm the existence of high- M_r complexes of HCF173 that stably bind RNA. The size of the HCF173 complex presumably extends into the megadalton region, suggesting that HCF173 and a variety of proteins and RNA associate in a functional assembly.

Analysis of the *hcf173hcf244* Double Mutant

The detailed characterization of *hcf173* and *hcf244* knockout mutants discloses many parallels between the phenotypes of these mutants: both mutants are seedling lethal, show a substantially reduced ratio of variable to maximal fluorescence, and, according to current knowledge, the primary lesion in both is the drastically impaired translational initiation of the *psbA* mRNA, resulting in strong reduction of D1 accumulation. In addition, HCF173 and HCF244 are directly or indirectly necessary for stabilization of the *psbA* transcript, but not to the same extent. Altogether, these parallels provide evidence that both HCF proteins are players of the same or related steps of PSII biogenesis.

In order to analyze the relationship genetically, we crossed the mutants and examined the phenotype of the double mutant. While *hcf173* and *hcf244* single mutants grown on Suc-supplemented medium were pale green and reached nearly one-half of the wild-type

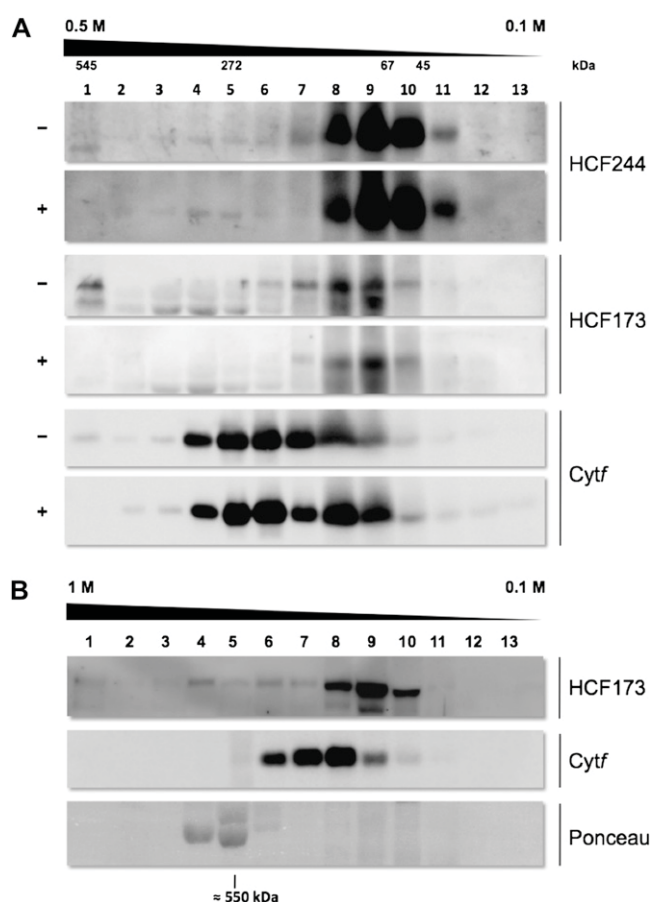


Figure 9. Analysis of HCF complexes by discontinuous sucrose gradient centrifugation. **A**, RNA association study. Wild-type thylakoid membrane proteins were solubilized with 1% (w/v) *n*-dodecyl- β -D-maltoside and treated with (+) or without (–) RNase A. An equivalent of 500 μ g of chlorophyll was loaded on each gradient (0.5–0.1 M suc). After centrifugation, 13 fractions were harvested. Proteins were precipitated with TCA and analyzed by SDS-PAGE. Exposure of immunoblots incubated with HCF244 antibody was increased to detect minor protein levels. **B**, Analysis of HCF173 complexes. Wild-type thylakoid membrane proteins were solubilized with 1% (w/v) digitonin and 0.5% *n*-dodecyl- β -D-maltoside. An equivalent of 500 μ g of chlorophyll was loaded on the gradient (1–0.1 M suc). The position of Rubisco is indicated by the Ponceau red staining of Rbcl.

size with eight rosette leaves after 3 weeks, the *hcf173hcf244* double mutant showed a substantially reduced size and produced only cotyledons and two small rosette leaves with yellow-green color (Fig. 4). The extreme small size of these seedlings prevented physiological measurements and further analyses; however, it suggests that D1 expression is further improved and PSII activity is close to zero in the double mutant.

To further verify the relationship between both proteins, the stability of HCF244 was measured in *hcf173* mutants and vice versa. Three independent experiments showed varying accumulation of HCF173 in *hcf244* and nearly no alterations for HCF244 in *hcf173* (data not shown). Thus, a mutual relationship between the

accumulation behaviors of both factors could not be distinguished.

DISCUSSION

Coexpression Analysis of *HCF173* Identifies the Highly Conserved SDR Protein HCF244

Coexpression analyses using the *psbA* translation factor HCF173 as bait revealed around 50 highly correlated genes. Among them, we identified several genes that encode for proteins involved in PSII biogenesis. We found HCF136, a factor essential for the assembly of PSII reaction center proteins (Meurer et al., 1998; Plücker et al., 2002), and the PSII repair proteins LQY1 (Lu et al., 2011) as well as the luminal PPL1 (Ishihara et al., 2007) and Psb27 (Chen et al., 2006). This result shows that functionally related genes cluster with the SDR protein HCF173, implying that there was a reasonable chance to find new PSII biogenesis factors among the unknown, coexpressed genes.

In a reverse genetic approach, we selected the first nine correlated genes with unknown or less characterized function and analyzed the phenotype of the corresponding T-DNA insertion mutants. The knockout of *At4g35250* resulted in phenotypical alterations visible under our low-light screening conditions during 2 to 3 weeks of seedling growth. It is possible that the collection of nine candidates comprises further *hcf* mutants, which have a weaker phenotype and thus are not detectable under our screening conditions.

The isolated T-DNA insertion line, *hcf244*, is seedling lethal and possesses specifically impaired PSII activity and protein levels. Like the bait gene *HCF173*, *HCF244* encodes a protein with similarity to the SDR superfamily. HCF244 is highly conserved in higher plants and mosses (*Physcomitrella* spp.), with identities of 75% to 95%. However, even between land plants and algae as well as cyanobacteria, identities remain 45% to 65% among HCF244 and different orthologs. Between higher plants and cyanobacteria, high conservation is found for the N terminus comprising the dinucleotide-binding domain. Thus, it can be suggested that one functional role of these atypical SDR proteins is coupled to the Rossmann fold cofactor-binding domain and is conserved in all these photosynthetic organisms.

Knockout and Suppressor Mutants of *Synechocystis HCF244* Reveal a Chaperone Function for the Cyanobacterial Protein

The ortholog of HCF244 from *Synechocystis* is designated Slr0399 and reveals 48% protein identity. It is similar to the hypothetical protein Ycf39 encoded in the chloroplast genomes of stramenopiles and rhodophyta and the cyanelle genome of *Cyanophora paradoxa* (Ermakova-Gerdes and Vermaas, 1999). The functional role of Slr0399 has been analyzed in suppressor studies

of a *Synechocystis* photosynthesis mutant with point mutations in the D2 subunit of PSII. The mutant is unable to grow photoautotrophically due to a modified binding site of the primary electron-accepting plastoquinone of PSII (Ermakova-Gerdes and Vermaas, 1998). The isolation of pseudorevertants of this phenotype revealed a secondary mutation in the reading frame of *slr0399* (Ermakova-Gerdes and Vermaas, 1999). The mutations in *slr0399* represent two different point mutations or a large deletion of around 60%, suggesting that even inactivation of *slr0399* leads to the restoration of photosynthetic growth. Knockout of *slr0399* in wild-type *Synechocystis* has no effect on photosynthetic growth but induces a decrease in thermotolerance of the mutant line. Due to these observations, Ermakova-Gerdes and Vermaas (1999) speculate that Slr0399 has a chaperone-like function that is not essential but advantageous during quinone binding to D2 and possibly other quinone-binding complexes.

While knockout of *slr0399* in *Synechocystis* has no significant phenotypic effects under moderate temperatures, inactivation of the orthologous gene *HCF244* in *Arabidopsis* has tremendous consequences for the plant. The *hcf244* mutant is unable to grow under autotrophic conditions due to drastically impaired accumulation of PSII proteins. PSII core polypeptides (CP47, CP43, D1, and D2) reach only about 10% to 20% of the wild-type levels. Determination of plastid protein synthesis rates indicates that D1 synthesis is specifically decreased; however, the corresponding *psbA* mRNA accumulates more or less normally, indicating that a reduced *psbA* mRNA level cannot account for impaired D1 synthesis. Instead, the analysis of ribosomal loading showed that only a minority of the *psbA* mRNA in *hcf244* is associated with polysomes. This demonstrates that impaired D1 accumulation is not the result of increased protein turnover but rather a consequence of a reduced synthesis rate.

Direct comparison of the knockout phenotypes in *Synechocystis* and *Arabidopsis* is currently difficult because only growth rates under different temperatures have been analyzed for the *slr0399*[−] mutant. However, marked discrepancies observed for knockout mutants of orthologous genes from cyanobacteria and higher plants are not unusual and were also found for mutants of HCF136/Ycf48 (Meurer et al., 1998; Komenda et al., 2008) and PAM68/Sll0933 (Armbruster et al., 2010). On the other hand, it cannot be ruled out that the proteins HCF244 and Slr0399 have evolved different functions in cyanobacteria and higher plants. To allow convincing conclusions, the phenotypes of *hcf244* and *slr0399*[−] mutants have to be analyzed in detail in a direct comparison.

HCF173 and HCF244 Mutational Analyses Reveal Their Direct Functions in Translational Initiation of *psbA*

Phenotypic characterization of *hcf244* reveals nearly the same phenotypic properties as we described previously for the *hcf173* mutant (Schult et al., 2007). In

this photosynthesis mutant, we also found specifically reduced synthesis of D1 coupled with impaired polysomal association of the *psbA* mRNA, indicating that translational initiation of the *psbA* mRNA is impaired in both mutants. This deficiency could be initiated directly or indirectly. An indirect effect is conceivable as a feedback regulation in consequence of the impaired D1 assembly. However, a feedback regulation is not supported by the known D1 assembly mutants of *Arabidopsis*, *lpa1*, *pam68*, and *hcf243* (Peng et al., 2006; Armbruster et al., 2010; Zhang et al., 2011). For all these mutants, a reduced labeling of the D1 protein was observed, but none of them showed impaired ribosomal loading for the *psbA* mRNA. Thus, a defective D1 assembly predominantly causes increased D1 degradation, but translational initiation of *psbA* is unaltered in these mutants. Decreased D1 synthesis was also reported for the *Arabidopsis* mutant *soldat10* (Meskauskiene et al., 2009). Phenotypic examination of the mutant revealed that decreased levels of plastid-specific rRNAs led to a disproportionate reduction of protein synthesis for proteins with high turnover, like D1. However, control panels for the mutants *hcf244* and *hcf173* and the wild type with methylene blue-stained rRNAs indicate that these RNAs accumulate normally in leaves of both mutants. Hence, we conclude that the identified chloroplast-located proteins HCF244 and HCF173 are both directly involved in the process of translational initiation of the D1-encoding *psbA* mRNA.

D1 synthesis and membrane insertion occur in a concerted manner at the thylakoid membrane (Zhang et al., 2000) under the assistance of membrane chaperones like ALB3 and LPA1 (Ossenbühl et al., 2004; Peng et al., 2006). Accordingly, we detected the majority of the translation initiation factor HCF244 at the thylakoid membrane. Sodium chloride washes were not sufficient to remove it, but sodium carbonate treatment extracted most of the protein, indicating that HCF244 resembles extrinsic polypeptides at the thylakoid membrane. This observation corresponds to the highly hydrophilic nature of the HCF244 protein sequence, which lacks any predicted membrane-spanning helices. Interestingly, this peripheral membrane association is a further parallel to HCF173, which behaves similarly when treated with both salts (Schult et al., 2007).

While membrane binding of HCF244 and HCF173 is obviously mediated by comparable interactions, both proteins are differently exposed to the stromal compartment. A thermolysin treatment of intact thylakoid membranes resulted in immediate degradation of HCF173, implying an exposed position of the factor. HCF244 was slightly reduced in size by this treatment, but this truncated form was stable for a considerable time period, independent of whether the luminal or stromal side of the thylakoid membrane was exposed. Obviously, HCF244 is protected by other proteins, which have a shielding function and retard the complete degradation by the protease.

HCF173 Is Part of a High- M_r Complex That Binds and Protects *psbA* mRNA

Many of the recently identified accessory factors involved in biogenesis of the photosynthetic membrane complexes interact with other partners in a stable manner and can be detected as high- M_r complexes (Sane et al., 2005; Schwarz et al., 2007). In very small quantities, HCF244 could be detected in a membrane-bound complex of around 200 to 400 kD. A considerable amount of HCF244 accumulated in the low-molecular-mass range, between 40 and 80 kD, and one can suppose that the vast majority of the larger assemblies do not survive the isolation procedure. HCF173 was found in different high-molecular-mass membrane complexes, reaching from 150 kD far beyond 550 kD (Schult et al., 2007, and refs. therein). Based on the predicted role of HCF173 in translation initiation, it can be assumed that ribosomal subunits contribute to the largest entities. Interestingly, in an independent proteomic approach, HCF173 was detected in a megadalton fraction of the chloroplast stroma (Olinares et al., 2010). Mass spectrometric analyses of this fraction revealed a high enrichment with ribosomal subunits and accessory and regulatory proteins of plastid gene expression. This observation corroborates our formerly stated hypothesis that HCF173 operates in nascent D1 ribosomal complexes, which assemble in the stroma and subsequently have to be attached to the thylakoids, where translation continues and membrane insertion of D1 commences.

The large complexes of HCF173, detected after Suc gradient fractionation, disappeared when extracted leaf proteins were RNase treated prior to fractionation. This clearly indicates that RNA binds to the HCF173 high- M_r complexes. In a previous work, we were able to show that immunoaffinity-purified HCF173-hemagglutinin or its complex specifically binds the *psbA* mRNA (Schult et al., 2007). Together, these data provide strong evidence that the *psbA* mRNA is the specific RNA component of the high- M_r complex of HCF173.

The *psbA* transcript accumulated to a substantial amount (60%) in *hcf244* mutants. In contrast, this RNA is highly unstable in *hcf173*, resulting in a drastically reduced level of only 10% (Schult et al., 2007). On the other hand, both mutants show the same marked decrease in *psbA* polysome association. With regard to this observation, we conclude that *psbA* mRNA destabilization in *hcf173* is not a secondary effect of impaired ribosomal loading, since the same effect has to be expected in *hcf244*. In fact, we assume that impaired *psbA* accumulation is a specific consequence of the missing HCF173 protein. Therefore, it is highly suggestive that, in addition to a role in translation initiation, HCF173 or its complex binds to the *psbA* mRNA to protect it against degrading RNases.

An RNA binding and stabilizing function was recently also shown for the atypical chloroplast-located SDR protein CSP41b (Qi et al., 2012). It is proposed that the factor stabilizes nontranslated RNAs coding for photosynthetic proteins and precursors of the 23S and 16S

rRNA during the night, when translational activity is low. CSP41b, together with its relative CSP41a, acts as a component of a high- M_r RNA-protein complex (greater than 1 MD), whose formation is very likely redox regulated.

The NAD(P)(H)-Binding Fold of SDRs Can Evolve RNA-Binding Capacity

The precise molecular mechanisms of HCF244 and HCF173 functions are still elusive. Both proteins are members of the atypical SDR family. As typically found in this group, HCF244 possesses the characteristic Rossmann fold dinucleotide-binding domain of atypical SDRs at the N terminus and a partly conserved catalytic domain. The absence of the conserved Tyr in the catalytic tetrad, whose hydroxyl group delivers or accepts protons to or from the substrates (Kavanagh et al., 2008), indicates that HCF244 has very likely lost its enzyme activity. In HCF173, the NAD(P)(H)-binding site shows a slightly altered sequence, and the catalytic center is fragmentary (Schult et al., 2007). The conservation of the dinucleotide-binding site in many atypical SDRs suggests that this motif has retained its function. In most SDR proteins, this domain binds NAD(H) or NADP(H). Moreover, this motif evolved the capability to bind RNA (Hentze, 1994). This was demonstrated for the NAD⁺-binding fold of glyceraldehyde-3-P dehydrogenase, which specifically binds to AU-rich RNA sequences (Nagy et al., 2000). This RNA binding interferes with the glycolytic activity of the enzyme. Likewise, the Rossmann fold dinucleotide-binding site of lactate dehydrogenase was identified to bind the AU-rich element of granulocyte macrophage colony-stimulating factor RNA (Pioli et al., 2002). Lactate dehydrogenase was identified in translationally active fractions of a polysomal gradient, indicating a role in posttranscriptional gene expression. It is conceivable, therefore, that HCF244 and/or HCF173 act as RNA-binding proteins, which allow translational initiation of *psbA* mRNA.

Furthermore, the SDR scaffold can also operate as a redox sensor. This property has been demonstrated for the atypical SDR NmrA, a fungal transcriptional regulator able to bind oxidized dinucleotide cofactor, thus mediating the redox status of the cell to the activity of a transcription factor (Lamb et al., 2003). A similar regulatory role has been identified for the factor CC3, a protein with proapoptotic and antimetastatic properties (El Omari et al., 2005). CC3 contains an SDR fold and binds NAD(P)(H); it is suggested that this binding modifies the interaction between CC3 and other proteins (e.g. the importins, which affect nuclear transport, or transcription factors such as c-myc/CIA). Many studies in plants and *C. reinhardtii* revealed that the synthesis of D1 is regulated by the generation of reducing equivalents from photosynthetic electron transport (Mulo et al., 2012). Thus, redox-sensor proteins are a prerequisite for this regulatory network. Both HCF244 and HCF173 are putative candidates for this function; they possibly could directly

sense the redox state of the chloroplast by binding NAD (P)(H) to adapt the rate of D1 synthesis.

The nuclear gene *HCF244* was selected by coexpression analysis of *HCF173*, indicating that both gene products act in a related or even similar biological process. The phenotypic characterization of the single mutants *hcf244* and *hcf173* indicates that both proteins closely cooperate during the process of translational initiation of *psbA*. However, the precise relationship is still unclear. So far, the first coimmunoprecipitation experiments and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) split-ubiquitin analyses do not show a direct interaction between both proteins (data not shown). However, it is conceivable that they act together in one complex, which is involved in the controlled expression of D1 in higher plants, reminiscent of the situation found in the chloroplast of *C. reinhardtii*. The coexpression analysis revealed that further SDR or SDR-like proteins cluster with *HCF173*. Thus, we assume that Rossmann fold-containing proteins not only recruit enzymes of the chloroplast but might also acquire further important roles in the process of D1 synthesis or other steps of plastid gene expression.

MATERIALS AND METHODS

Growth Conditions

Mutant and wild-type seeds of *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) were plated on Suc-supplemented Murashige and Skoog medium (Murashige and Skoog, 1962) containing 0.3% (w/v) gerite. Seedlings were illuminated at a photon flux density (PFD) of approximately 60 to 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a 16-h photoperiod (long-day conditions). The selection of mutant plants exhibiting the high-chlorophyll phenotype was performed under UV light according to Meurer et al. (1996).

For blue-native PAGE, Suc density centrifugation, and thermolysin protease protection assay, wild-type seeds were sown on Floraton I-soil (Floragard; <http://www.floragard.de/>) and cultivated in a growth chamber under short-day conditions (8 h of light/16 h of darkness), constant temperature of 21°C, and a PFD of 60 to 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Mutant Isolation, Determination of T-DNA Insertion, and Crossing of the Mutants *hcf244* and *hcf173*

The *hcf* phenotype was screened in the progeny of T-DNA insertion lines for genes coexpressed with *HCF173*. The *hcf244* mutant (mutant line N408380) was recovered from the GABI-Kat collection of T-DNA insertion lines. To determine the position of T-DNA incorporation, the region around the insertion was amplified using the oligonucleotides 8409 (5'-ATATTGACCAT-CATACTCATTGC-3') and 250R1 (5'-CTGCATATTGACCAATAAGACC-3') and subsequently sequenced.

To generate *hcf173hcf244* double mutants, heterozygous *hcf173-2* (Schult et al., 2007) was crossed with heterozygous *hcf244*. The genotype of the F1 seedlings was determined by PCR using the oligonucleotides 16720-R10 (5'-CGGTGTGTCCT-GAAAGTAAGTCC-3') and pC161LB (5'-CCCATTGGACGTGAATGTAGACAC-3') for the *hcf173* mutant T-DNA allele and 250R1 and 8409 for the *hcf244* mutant T-DNA allele.

Homozygous *hcf173hcf244* double mutants were selected from the F2 generation. The T-DNA insertions and the wild-type genes were verified using the primers described above as well as primer pairs 16720-H4 (5'-GTGGGATTAG-GACGACGATCGC-3')/16720-R10 for *HCF173* and 2505UTRupstream (5'-CGTGGCAGCAAATGCAAG-3')/250R1 for *HCF244*.

Complementation of the Mutant *hcf244*

For complementation of the *hcf244* mutant phenotype, a construct consisting of the *At4g35250* open reading frame and the 5' UTR under the control

of a 2x35S cauliflower mosaic virus promoter was created using Gateway technology (Hartley et al., 2000).

The *HCF244* cDNA was amplified by PCR with the primers 250attB15UTR (5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGTCAAAACACCAGCTGACG-3; the attB1 site is underlined and the beginning of the 5' UTR is shown in italics) and 250attB2stop (5'-GGGGACCACCTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTCAGAAAGTATGATGCTGATTGCTTGG-3; the attB2 site is underlined and the stop codon is shown in italics), employing wild-type cDNA as template. To create the entry clone, a pENTRY-HCF244 BP clonase reaction (Invitrogen; <http://www.invitrogen.com/>) between the *HCF244* PCR product and donor vector pDONR221 was performed according to the Gateway manual. pENTRY-HCF244 was transformed into *Escherichia coli* strain DH5 α and subsequently subjected to sequence analysis. To introduce the *HCF244* gene under the control of the 2x35S cauliflower mosaic virus promoter, LR clonase reaction (Invitrogen) was accomplished between pENTRY-HCF244 and the binary T₁ destination vector pMDC32 (Curtis and Grossniklaus, 2003). The created expression clone pMDC32-HCF244 was transferred to heterozygous *hcf244* plants by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation according to the floral dip method (Clough and Bent, 1998). Complemented transgenic plants were named HCF244-c.

Spectroscopic Measurements

Chlorophyll fluorescence and P700 absorbance measurements were performed as described by Meurer et al. (1996) with the following modifications: saturating light pulses had a length of 1 s, and actinic light had a PFD of 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The P700 absorbance kinetic was measured with the Dual-PAM100 (Walz; <http://www.walz.com/>).

Thylakoid Membrane Extraction

Crude leaf proteins from 2- to 3-week-old wild type and mutant plants were isolated as described by Meurer et al. (1996).

For blue-native PAGE, Suc density gradient centrifugation, and protease protection assay, thylakoid membrane proteins were isolated from 4- to 6-week-old wild-type plants grown on soil under short-day conditions. Plant material was homogenized in 10 volumes of lysis buffer (10 mM HEPES/KOH, pH 7.8, 10 mM MgCl₂, and 25 mM KCl) per gram fresh weight, filtered through two layers of Miracloth, and centrifuged at 5,900g and 4°C for 2 min. Subsequently, pelleted membranes were dissolved in the appropriate buffers.

SDS-PAGE and Immunoblotting

Proteins were separated by SDS-PAGE according to Schägger and von Jagow (1987) or Laemmli (1970) and transferred onto nitrocellulose membranes (BA79; 0.45 μm ; Whatman; <http://www.whatman.com/>) or polyvinylidene difluoride membranes (0.45 μm ; GE Healthcare; <http://www.ge.com/>). HCF244 and HCF173 proteins were immunodecorated with the specific antibodies described below for antiserum production. Other proteins were detected with specific antibodies as listed by Meurer et al. (1996) and visualized by enhanced chemiluminescence (GE Healthcare).

Antiserum Production

The nucleotide sequence encoding amino acids 55 to 395 of the HCF244 protein was fused to the sequence of an N-terminal T7 tag and a C-terminal hexa-His tag using the expression vector pET-21d(+) (Novagen; <http://www.novagen.com/>). The construct was transformed into *E. coli* strain Rosetta2 (DE3) (Novagen). Three hours after the induction of HCF244 expression with 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, the 41-kD fusion protein was isolated under denaturing conditions according to the QIAexpressionist manual (Qiagen; <http://www.qiagen.com/>) and purified on a nickel-nitrilotriacetic acid agarose column (Qiagen). The eluate was separated by SDS-PAGE. The Coomassie blue-stained HCF244 fusion protein was excised from the gel and used to generate polyclonal antibody in rabbits (Agrisera; <http://www.agrisera.com/>). In parallel, the same procedure was performed to produce a specific antibody against the HCF173 protein. The recombinant protein product comprised amino acids 80 to 598 of HCF173.

Both HCF antibodies detected several unspecific signals in addition to the HCF protein. Therefore, we decided to purify the polyclonal HCF antibodies. The affinity-purified HCF fusion protein was loaded on a SDS gel and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane. To excise the region of HCF protein, the membrane was stained with 1% (w/v) Ponceau red in 2%

(w/v) TCA. The antiserum was diluted 1:4 in Tris-buffered saline (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, and 0.1% [v/v] Tween 20, pH 7.6) and incubated with the blotted HCF fusion protein overnight. Unbound components of the sera were removed by washing the membrane three times in Tris-buffered saline at 4°C. To elute the HCF antibody, 1.125 volumes of elution buffer (0.1 M Gly, 0.5 M NaCl, and 0.05% [v/v] Tween 20, pH 2.6; related to the amount of antiserum used) was added to the membrane, vortexed for 90 s, and 1 M Tris-HCl, pH 8.0, was added to a final concentration of 100 mM Tris-HCl. For long-term storage of the purified antibody, 0.1 mg mL⁻¹ bovine serum albumin and 50% (v/v) glycerol (final concentration) were added.

Membrane-bound HCF proteins were visualized by chemiluminescence using the Supersignal West femto maximum sensitivity substrate (Thermo Scientific; <http://www.thermoscientific.com/>).

RNAse Treatment and Suc Density Gradient Centrifugation of Protein Complexes

Membranes were isolated as described above, adjusted to a chlorophyll concentration of 1 mg mL⁻¹ containing 1% (w/v) *n*-dodecyl- β -D-maltoside, and solubilized for 30 min at 4°C. Unsolubilized material was removed by centrifugation for 20 min at 4°C and 15,000g. Two units of RNase A (Qiagen) was added to 500 μ L of supernatant and incubated for 1 h at 4°C. In parallel, samples were incubated without RNase. A total of 500 μ L of the supernatant was loaded on a linear Suc density gradient (12.5 mL) ranging from 0.5 to 0.1 M Suc in lysis buffer supplemented with 0.06% (w/v) *n*-dodecyl- β -D-maltoside. Gradients were centrifuged at 4°C for 16 to 17 h at 180,000g (SW40Ti). One-milliliter fractions were collected using a gradient fractionator (Beckman Coulter; <http://www.beckmancoulter.de/>), precipitated with 15% (w/v) TCA, and analyzed by SDS-PAGE.

Immunolocalization Studies

To isolate total leaf extracts, wild-type plants were homogenized in a small volume of ice-cold lysis buffer and filtrated through glass wool to discard cell debris.

For the isolation of intact chloroplasts, wild-type plants were grown under short-day conditions for 4 to 6 weeks. According to Kunst (1998), the plant material was homogenized in 10 volumes of homogenization buffer (450 mM sorbitol, 20 mM Tricine/KOH, pH 8.4, 10 mM EDTA, 10 mM NaHCO₃, and 0.1% [w/v] bovine serum albumin) per gram fresh weight and filtrated through two layers of Miracloth. The chloroplast suspension was centrifuged at 4°C for 4 min and 300g. The pellet was resuspended in 0.04 volume of resuspension buffer (0.3 M sorbitol, 20 mM Tricine/KOH, pH 8.4, 2.5 mM EDTA, and 5 mM MgCl₂), loaded on a Percoll step gradient consisting of 80% and 40% Percoll in resuspension buffer, and centrifuged for 20 min at 4°C and 6,500g. Intact chloroplasts were collected, washed in 3 volumes of resuspension buffer three times, and lysed in ice-cold lysis buffer for 10 min. Stroma and membrane proteins were separated by 1 h of centrifugation at 17,000g at 4°C. Total leaf, total chloroplast, chloroplast membrane, and stroma proteins were separated by SDS-PAGE, blotted, and analyzed by immunoblot experiments.

The strength of the membrane association of HCF244 was analyzed by resuspending pelleted membranes in lysis buffer or lysis buffer supplemented with 200 mM NaCl or 250 mM Na₂CO₃. Membranes were centrifuged for 1 h at 100,000g and 4°C. Supernatants were precipitated with 15% (w/v) TCA. All samples were analyzed by SDS-PAGE and immunodetected with specific antibodies.

The intraorganellar location and topology of HCF244 were examined further by protease protection assay according to Meurer et al. (1998) with the following modifications: thylakoid membranes were isolated as above, and the output of the sonifier (Branson Sonifier B12; Hielscher; <http://www.hielscher.com>) was set to 5.

In Vivo Labeling of Chloroplast Proteins

The in vivo labeling was performed as described (Lennartz et al., 2001) with the variation that the labeling occurred for 30 and 10 min and the membrane pellet was resuspended in gel-loading buffer (Schägger and von Jagow, 1987). After SDS-PAGE, radiolabeled proteins were analyzed by autoradiography.

RNA Isolation and Gel-Blot Analysis

Isolation of total leaf RNA, electrophoresis, gel-blot analysis, and hybridization were performed according to Westhoff et al. (1991). Specific RNA

probes listed by Meurer et al. (1998) were applied for hybridization. Gene-specific probes for *At4g35250* were obtained by first-strand cDNA synthesis with total leaf RNA from wild-type plants and subsequent amplification by PCR with the following primer pair: 2505UTRupstream and 250R1 (see above).

Polysome Purification

Polysome fractions were prepared as described before (Barkan, 1993). After gel-blot analysis and hybridization with radiolabeled probes specific for *psbA* and *psbB* RNA, the observed signals were quantified using a Bioimager FLA3000 (<http://www.fujifilm.com/>).

The accession number of the protein that is encoded by the *HCF244* gene is NP_195251. Accession numbers of other proteins described in the text are as follows: XP_003604095 (MtHCF244), XP_002278811 (VvHCF244), PF05368.6 (OsHCF244), XP_002444606 (SbHCF244), ACF79320 (ZmHCF244), XP_001773602 (PpHCF244), XP_001700491 (CrHCF244), YP_001655687 (MaHCF244), NP_441851 (Slr0399), YP_322437 (AvHCF244), ZP_05038996 (SsHCF244), NP_043157 (CpHCF244), ACF70956 (VtHCF244), YP_003734520 (KfHCF244), YP_004072548 (ToHCF244), NP_053848 (PpuHCF244), and YP_536919 (PppHCF244).

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Table S1. List of genes positively coexpressed with *HCF173* revealing a relationship to PSII biogenesis or the SDR superfamily.

Supplemental Table S2. List of the first nine unknown or less characterized genes showing high correlation to *HCF173* expression.

Received August 6, 2012; accepted September 26, 2012; published October 1, 2012.

LITERATURE CITED

- Alexander C, Faber N, Klaff P (1998) Characterization of protein-binding to the spinach chloroplast *psbA* mRNA 5' untranslated region. *Nucleic Acids Res* **26**: 2265–2272
- Armbruster U, Zühlke J, Rengstl B, Kreller R, Makarenko E, Rühle T, Schünemann D, Jahns P, Weisshaar B, Nickelsen J, et al (2010) The *Arabidopsis* thylakoid protein PAM68 is required for efficient D1 biogenesis and photosystem II assembly. *Plant Cell* **22**: 3439–3460
- Baena-González E, Aro E-M (2002) Biogenesis, assembly and turnover of photosystem II units. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **357**: 1451–1459, discussion 1459–1460
- Barkan A (1993) Nuclear mutants of maize with defects in chloroplast polysome assembly have altered chloroplast RNA metabolism. *Plant Cell* **5**: 389–402
- Beligni MV, Mayfield SP (2008) *Arabidopsis thaliana* mutants reveal a role for CSP41a and CSP41b, two ribosome-associated endonucleases, in chloroplast ribosomal RNA metabolism. *Plant Mol Biol* **67**: 389–401
- Bollenbach TJ, Tatman DA, Stern DB (2003) CSP41a, a multifunctional RNA-binding protein, initiates mRNA turnover in tobacco chloroplasts. *Plant J* **36**: 842–852
- Boulouis A, Raynaud C, Bujaldon S, Aznar A, Wollman FA, Choquet Y (2011) The nucleus-encoded trans-acting factor MCA1 plays a critical role in the regulation of cytochrome *f* synthesis in *Chlamydomonas* chloroplasts. *Plant Cell* **23**: 333–349
- Chen H, Zhang D, Guo J, Wu H, Jin M, Lu Q, Lu C, Zhang L (2006) A Psb27 homologue in *Arabidopsis thaliana* is required for efficient repair of photodamaged photosystem II. *Plant Mol Biol* **61**: 567–575
- Choquet Y, Wollman FA (2002) Translational regulations as specific traits of chloroplast gene expression. *FEBS Lett* **529**: 39–42
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735–743
- Constant S, Perewoska I, Alfonso M, Kirilovsky D (1997) Expression of the *psbA* gene during photoinhibition and recovery in *Synechocystis* PCC 6714: inhibition and damage of transcriptional and translational

- machinery prevent the restoration of photosystem II activity. *Plant Mol Biol* **34**: 1–13
- Curtis MD, Grossniklaus U (2003) A Gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* **133**: 462–469
- Danon A, Mayfield SPY (1991) Light regulated translational activators: identification of chloroplast gene specific mRNA binding proteins. *EMBO J* **10**: 3993–4001
- Dauvillée D, Stampacchia O, Girard-Bascou J, Rochaix JD (2003) Tab2 is a novel conserved RNA binding protein required for translation of the chloroplast *psaB* mRNA. *EMBO J* **22**: 6378–6388
- El Omari K, Bird LE, Nichols CE, Ren J, Stammers DK (2005) Crystal structure of CC3 (TIP30): implications for its role as a tumor suppressor. *J Biol Chem* **280**: 18229–18236
- Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci* **8**: 978–984
- Ermakova-Gerdes S, Vermaas W (1998) Mobility of the primary electron-accepting plastoquinone QA of photosystem II in a *Synechocystis* sp. PCC 6803 strain carrying mutations in the D2 protein. *Biochemistry* **37**: 11569–11578
- Ermakova-Gerdes S, Vermaas W (1999) Inactivation of the open reading frame *slr0399* in *Synechocystis* sp. PCC 6803 functionally complements mutations near the Q_A niche of photosystem II: a possible role of Slr0399 as a chaperone for quinone binding. *J Biol Chem* **274**: 30540–30549
- Filling C, Berndt KD, Benach J, Knapp S, Prozorovski T, Nordling E, Ladenstein R, Jörnvall H, Oppermann U (2002) Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. *J Biol Chem* **277**: 25677–25684
- Fong CL, Lentz A, Mayfield SP (2000) Disulfide bond formation between RNA binding domains is used to regulate mRNA binding activity of the chloroplast poly(A)-binding protein. *J Biol Chem* **275**: 8275–8278
- Hartley JL, Temple GF, Brasch MA (2000) DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* **10**: 1788–1795
- Hentze MW (1994) Enzymes as RNA-binding proteins: a role for (di) nucleotide-binding domains? *Trends Biochem Sci* **19**: 101–103
- Hirose T, Sugiura M (1996) Cis-acting elements and trans-acting factors for accurate translation of chloroplast *psbA* mRNAs: development of an in vitro translation system from tobacco chloroplasts. *EMBO J* **15**: 1687–1695
- Ishihara S, Takabayashi A, Ido K, Endo T, Ifuku K, Sato F (2007) Distinct functions for the two PsbP-like proteins PPL1 and PPL2 in the chloroplast thylakoid lumen of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **145**: 668–679
- Jörnvalle H, Persson B, Krook M, Atrian S, González-Duarte R, Jeffery J, Ghosh D (1995) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* **34**: 6003–6013
- Junttila MR, Saarinen S, Schmidt T, Kast J, Westermarck J (2005) Single-step Strep-tag purification for the isolation and identification of protein complexes from mammalian cells. *Proteomics* **5**: 1199–1203
- Kallberg Y, Oppermann U, Jörnvall H, Persson B (2002) Short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) relationships: a large family with eight clusters common to human, animal, and plant genomes. *Protein Sci* **11**: 636–641
- Kavanagh KL, Jörnvall H, Persson B, Oppermann U (2008) Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: the SDR superfamily. Functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cell Mol Life Sci* **65**: 3895–3906
- Klaff P, Grussem W (1991) Changes in chloroplast mRNA stability during leaf development. *Plant Cell* **3**: 517–529
- Klaff P, Grussem W (1995) A 43 kD light-regulated chloroplast RNA-binding protein interacts with the *psbA* 5' non-translated leader RNA. *Photosynth Res* **46**: 235–248
- Komenda J, Nickelsen J, Tichý M, Prásl O, Eichacker LA, Nixon PJ (2008) The cyanobacterial homologue of HCF136/YCF48 is a component of an early photosystem II assembly complex and is important for both the efficient assembly and repair of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem* **283**: 22390–22399
- Kunst L (1998) Preparation of physiologically active chloroplasts from *Arabidopsis*. *Methods Mol Biol* **82**: 43–48
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685
- Lamb HK, Leslie K, Dodds AL, Nutley M, Cooper A, Johnson C, Thompson P, Stammers DK, Hawkins AR (2003) The negative transcriptional regulator NmrA discriminates between oxidized and reduced dinucleotides. *J Biol Chem* **278**: 32107–32114
- Lennartz K, Plücker H, Seidler A, Westhoff P, Bechtold N, Meierhoff K (2001) HCF164 encodes a thioredoxin-like protein involved in the biogenesis of the cytochrome b(6)f complex in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 2539–2551
- Lu Y, Hall DA, Last RL (2011) A small zinc finger thylakoid protein plays a role in maintenance of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **23**: 1861–1875
- Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Fong JH, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, et al (2011) CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res* **39**: D225–D229
- Marín-Navarro J, Manuell AL, Wu J, P Mayfield S (2007) Chloroplast translation regulation. *Photosynth Res* **94**: 359–374
- Meskauskiene R, Würsch M, Laloi C, Vidi PA, Coll NS, Kessler F, Baruah A, Kim C, Apel K (2009) A mutation in the *Arabidopsis* mTERF-related plastid protein SOLDAT10 activates retrograde signaling and suppresses (1)O(2)-induced cell death. *Plant J* **60**: 399–410
- Meurer J, Meierhoff K, Westhoff P (1996) Isolation of high-chlorophyll-fluorescence mutants of *Arabidopsis thaliana* and their characterisation by spectroscopy, immunoblotting and northern hybridisation. *Planta* **198**: 385–396
- Meurer J, Plücker H, Kowallik KV, Westhoff P (1998) A nuclear-encoded protein of prokaryotic origin is essential for the stability of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J* **17**: 5286–5297
- Minai L, Wostrickoff K, Wollman FA, Choquet Y (2006) Chloroplast biogenesis of photosystem II cores involves a series of assembly-controlled steps that regulate translation. *Plant Cell* **18**: 159–175
- Mohamed A, Jansson C (1991) Photosynthetic electron transport controls degradation but not production of *psbA* transcripts in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Mol Biol* **16**: 891–897
- Mulo P, Sakurai I, Aro EM (2012) Strategies for *psbA* gene expression in cyanobacteria, green algae and higher plants: from transcription to PSII repair. *Biochim Biophys Acta* **1817**: 247–257
- Mulo P, Sicora C, Aro EM (2009) Cyanobacterial *psbA* gene family: optimization of oxygenic photosynthesis. *Cell Mol Life Sci* **66**: 3697–3710
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473–497
- Nagy E, Henics T, Eckert M, Miseta A, Lightowers RN, Kellermaier M (2000) Identification of the NAD(+) -binding fold of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a novel RNA-binding domain. *Biochem Biophys Res Commun* **275**: 253–260
- Olinares PD, Ponnala L, van Wijk KJ (2010) Megadalton complexes in the chloroplast stroma of *Arabidopsis thaliana* characterized by size exclusion chromatography, mass spectrometry, and hierarchical clustering. *Mol Cell Proteomics* **9**: 1594–1615
- Ossenbühl F, Göhre V, Meurer J, Krieger-Liszak A, Rochaix JD, Eichacker LA (2004) Efficient assembly of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii* requires Alb3.1p, a homolog of *Arabidopsis* ALBINO3. *Plant Cell* **16**: 1790–1800
- Peng L, Ma J, Chi W, Guo J, Zhu S, Lu Q, Lu C, Zhang L (2006) LOW PSII ACCUMULATION1 is involved in efficient assembly of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **18**: 955–969
- Persson B, Kallberg Y, Bray JE, Bruford E, Dellaporta SL, Favia AD, Duarte RG, Jörnvall H, Kavanagh KL, Kedishvili N, et al (2009) The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chem Biol Interact* **178**: 94–98
- Pioli PA, Hamilton BJ, Connolly JE, Brewer G, Rigby WF (2002) Lactate dehydrogenase is an AU-rich element-binding protein that directly interacts with AUF1. *J Biol Chem* **277**: 35738–35745
- Plücker H, Müller B, Grohmann D, Westhoff P, Eichacker LA (2002) The HCF136 protein is essential for assembly of the photosystem II reaction center in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **532**: 85–90
- Qi Y, Armbruster U, Schmitz-Linneweber C, Delannoy E, de Longevialle AF, Rühle T, Small I, Jahns P, Leister D (2012) *Arabidopsis* CSP41 proteins form multimeric complexes that bind and stabilize distinct plastid transcripts. *J Exp Bot* **63**: 1251–1270
- Rochaix JD (2006) The role of nucleus- and chloroplast-encoded factors in the synthesis of the photosynthetic apparatus. In RR Wise, JK Hooper, eds, *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Vol 23. The Structure and Function of Plastids. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 145–165

- Sane AP, Stein B, Westhoff P (2005) The nuclear gene HCF107 encodes a membrane-associated R-TPR (RNA tetratricopeptide repeat)-containing protein involved in expression of the plastidial psbH gene in *Arabidopsis*. *Plant J* **42**: 720–730
- Sato MH, Wada Y (1997) Universal template plasmid for introduction of the triple-HA epitope sequence into cloned genes. *Biotechniques* **23**: 254–256
- Schägger H, Cramer WA, von Jagow G (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem* **217**: 220–230
- Schägger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**: 368–379
- Schult K, Meierhoff K, Paradies S, Töller T, Wolff P, Westhoff P (2007) The nuclear-encoded factor HCF173 is involved in the initiation of translation of the psbA mRNA in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **19**: 1329–1346
- Schwarz C, Elles I, Kortmann J, Piotrowski M, Nickelsen J (2007) Synthesis of the D2 protein of photosystem II in *Chlamydomonas* is controlled by a high molecular mass complex containing the RNA stabilization factor Nac2 and the translational activator RBP40. *Plant Cell* **19**: 3627–3639
- Shen Y, Danon A, Christopher DA (2001) RNA binding-proteins interact specifically with the *Arabidopsis* chloroplast psbA mRNA 5' untranslated region in a redox-dependent manner. *Plant Cell Physiol* **42**: 1071–1078
- Stammers DK, Ren J, Leslie K, Nichols CE, Lamb HK, Cocklin S, Dodds A, Hawkins AR (2001) The structure of the negative transcriptional regulator NmrA reveals a structural superfamily which includes the short-chain dehydrogenase/reductases. *EMBO J* **20**: 6619–6626
- Sun Q, Zybailov B, Majeran W, Friso G, Olinares PD, van Wijk KJ (2009) PPDB, the Plant Proteomics Database at Cornell. *Nucleic Acids Res* **37**: D969–D974
- Toufighi K, Brady SM, Austin R, Ly E, Provart NJ (2005) The Botany Array Resource: e-Northern, Expression Angling, and promoter analyses. *Plant J* **43**: 153–163
- Tyystjärvi T, Sirpiö S, Aro EM (2004) Post-transcriptional regulation of the psbA gene family in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *FEBS Lett* **576**: 211–215
- Vaistij FE, Boudreau E, Lemaire SD, Goldschmidt-Clermont M, Rochaix JD (2000) Characterization of Mbb1, a nucleus-encoded tetratricopeptide-like repeat protein required for expression of the chloroplast *psbB/psbT/psbH* gene cluster in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 14813–14818
- Westhoff P, Herrmann RG (1988) Complex RNA maturation in chloroplasts: the psbB operon from spinach. *Eur J Biochem* **171**: 551–564
- Westhoff P, Offermann-Steinhard K, Höfer M, Eskins K, Oswald A, Streubel M (1991) Differential accumulation of plastid transcripts encoding photosystem II components in the mesophyll and bundle-sheath cells of monocotyledonous NADP-malic enzyme-type C₄ plants. *Planta* **184**: 377–388
- Yang J, Schuster G, Stern DB (1996) CSP41, a sequence-specific chloroplast mRNA binding protein, is an endoribonuclease. *Plant Cell* **8**: 1409–1420
- Yohn CB, Cohen A, Danon A, Mayfield SP (1996) Altered mRNA binding activity and decreased translational initiation in a nuclear mutant lacking translation of the chloroplast psbA mRNA. *Mol Cell Biol* **16**: 3560–3566
- Zhang D, Zhou G, Liu B, Kong Y, Chen N, Qiu Q, Yin H, An J, Zhang F, Chen F (2011) HCF243 encodes a chloroplast-localized protein involved in the D1 protein stability of the *Arabidopsis* photosystem II complex. *Plant Physiol* **157**: 608–619
- Zhang LX, Paakkarinen V, van Wijk KJ, Aro EM (2000) Biogenesis of the chloroplast-encoded D1 protein: regulation of translation elongation, insertion, and assembly into photosystem II. *Plant Cell* **12**: 1769–1782

Beitragsanteil der Autoren

SL führte alle Experimente durch und schrieb das Manuskript (ausgenommen die Diskussion). Die Co-Expressionsanalyse führten SL und KE durch. KM schrieb die Diskussion und war mit PW in die Überarbeitung des Manuskriptes eingebunden.

7. Addendum

**Analyse der Komplexbildung und Proteinfunktion der D1-Biogenesefaktoren
HCF244 und HCF173**

Einleitung

Licht ist ein entscheidender Impulsgeber für die Expression photosynthetischer Gene (Kloppstech, 1997; Tyagi and Gaur, 2003). Dies wird insbesondere am Beispiel von D1 deutlich. Die Regulation der D1-Expression erfolgt bei Cyanobakterien hauptsächlich auf transkriptionaler Ebene. Eine kleine Genfamilie von zwei bis sechs Genen kodiert für verschiedene D1-Isoformen. Die prozentuale Verteilung zwischen den Transkripten dieser Isoformen wird über die Lichtintensität reguliert (zusammengefasst in Mulo et al., 2009). Unter Standardwachstumsbedingungen dominiert eine dieser Isoformen. Die Änderung der Umweltbedingungen, beispielsweise durch die Applikation von Starklicht oder UVB-Strahlung, führt dann zur verstärkten Transkription insbesondere der stressinduzierten Isoformen.

Darüber hinaus wird vermutet, dass das D1-Protein seine eigene Synthese über die Abbauprodukte, die in Folge der oxidativen Schädigung entstehen, reguliert. Diese binden innerhalb oder stromaufwärts ihres eigenen Promotors und könnten dadurch eine verstärkte Transkription induzieren (Stelljes and Koenig, 2007).

In Abwesenheit von Licht binden putative Repressoren an stromaufwärts liegende Bereiche der *psbA*-Gene und verdeutlichen damit ebenfalls die Notwendigkeit von Licht für die Akkumulation der *psbA*-Transkripte (Eriksson et al., 2000; Herranen et al., 2001).

Die translationale Feinregulation der D1-Expression wird über die Elongation erreicht. Bereits im Dunkeln wird die Translation initiiert, jedoch pausieren die Ribosomen an distinkten Punkten. Erst durch die Anwesenheit von Licht wird der Komplex aus Ribosomen und naszierenden D1-Protein zur Membran gebracht, wo die Synthese abgeschlossen wird (Tyystjärvi et al., 2001; 2004).

In *Chlamydomonas* wird D1 von einem einzigen Gen kodiert. Im Gegensatz zu Cyanobakterien wird die Transkription hier nicht strikt reguliert. Vielmehr wird *psbA* relativ konstant exprimiert (Nickelsen, 1998). Während in Anwesenheit von Licht die Transkriptionsrate kaum merklich ansteigt, wird die D1-Synthese verstärkt auf posttranskriptionaler Ebene reguliert. Die *psbA* Vorläufer-mRNA enthält vier Gruppe I Introns (Erickson et al., 1984), die teilweise unter nichtphysiologischen Bedingungen *in vitro* selbstsplicing sind (Herrin et al., 1991). Das Spleißen der Introns erfordert zum einen die Anwesenheit von Licht, wahrscheinlich in Form von lichtaktivierten Spleißfaktoren, und zum anderen den photosynthetischen Elektronentransfer (Deshpande et al., 1997; Li et al., 2002). Auch auf translationaler Ebene findet eine strikte Regulation innerhalb der Translationsinitiation statt. Ein Komplex aus den vier Proteinen RB38, RB47, RB55 und RB60 soll lichtinduziert an die *psbA* 5'UTR binden und damit die Translation initiieren (Danon and Mayfield, 1991, 1994; Mayfield et al., 1994; Yohn et al., 1996).

Die Aktivität der RNA-bindenden Komponente RB47 wird über die Proteine RB60 und Tba1 und den stromalen pH-Wert gesteuert (Kim and Mayfield, 1997, 2002; Somanchi et al., 2005; Alergand et al., 2006). RB60 ist eine Disulfidisomerase, die den Redoxzustand von RB47 über dessen intramolekulare Disulfidbrücke reguliert (Kim and Mayfield, 1997, 2002). Die Aktivität von RB60 wird über das Ferredoxin-Thioredoxinsystem von PSI und einer Serin/Threonin Protein Phosphatase gesteuert (Danon and Mayfield, 1994; Trebitsh et al., 2001). Das für die ADP-abhängige Phosphorylierung benötigte ADP/ATP Verhältnis wird meist nur während der Nacht erreicht. Daher wird vermutet, dass dieser Mechanismus dazu dienen könnte, den Komplex in der Nacht von der *psbA* mRNA zu lösen und auf diesem Weg die Translation zu reprimieren (Danon and Mayfield, 1994).

Tba1 fördert die RNA-Assoziation von RB47 und damit die ribosomale Beladung des Transkriptes (Somanchi et al., 2005). Die Homologie von Tba1 zu Oxidoreduktasen suggeriert eine Funktion als Redoxregulator, indem Tba1 über die Steuerung der RNA-Bindaktivität von RB47 auf die Translationsinitiation Einfluss nimmt (Somanchi et al., 2005).

In höheren Pflanzen wird die lichtabhängige D1-Expression nur in geringem Ausmaß über die Transkription gesteuert. Zwar erhöht sich die Transkriptionsrate leicht im Licht, jedoch ist der starke Akkumulationsanstieg der *psbA* mRNA mehr auf eine gesteigerte Stabilität zurückzuführen (Deng and Gruissem, 1987; Klein and Mullet, 1987; Kim et al., 1993; Staub and Maliga, 1993).

Für die Translation von D1 ist die Anwesenheit von Licht hingegen essentiell. Im Dunkeln ist das *psbA*-Transkript bereits mit Ribosomen besetzt, jedoch akkumuliert das D1-Protein erst in Anwesenheit von Licht (Klein et al., 1988; Kim et al., 1994; Edhofer et al., 1998). Während der Elongation pausieren die Ribosomen auch in höheren Pflanzen an distinkten Punkten, um die Bindung des Chlorophylls zu ermöglichen und das naszierende Protein zu stabilisieren (Kim et al., 1991; Kim et al., 1994). Sowohl ein Protonengradient an der Thylakoidmembran als auch eine intakte Elektronentransportkette werden für die D1-Elongation benötigt und zeugen damit von der strikten Lichtregulation auf dieser Ebene (Mühlbauer and Eichacker, 1998; Zhang et al., 2000).

Welchen Einfluss das Licht auf die Translationsinitiation nimmt, ist noch weitgehend unerforscht. Erste Indizien für einen zu *Chlamydomonas* ähnlichen Mechanismus in höheren Pflanzen liefert die redoxabhängige Bindung zweier bisher uncharakterisierter Proteine (30 und 43 kDa) an die *psbA* 5'UTR aus *Arabidopsis* (Shen et al., 2001). In Spinat bindet ein 43 kDa Protein ebenfalls lichtabhängig an U-reiche einzelsträngige Sequenzbereiche der *psbA* mRNA (Klauff and Gruissem, 1995). Es ist homolog zum ribosomalen S1 Protein aus *E. coli* und akkumuliert in Korrelation zum *psbA*-Transkriptpegel (zusammengefasst in Alexander et al., 1998). Darüber hinaus bindet ein stromales 47 kDa Protein in Spinat an die *psbA* 5'UTR

(Klauff and Gruissem, 1995; Alexander et al., 1998). Es ist jedoch noch ungewiss inwieweit dieses Protein überhaupt in ein lichtreguliertes Netzwerk integriert ist.

Die nukleärokodierten Faktoren HCF244 und HCF173 sind gute Kandidaten für eine Beteiligung an solch einem Netzwerk. Beide Proteine gehören zur Familie der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR) und besitzen ein NAD(P)(H)-Bindemotiv. Die Abwesenheit des jeweiligen HCF-Faktors führt zu einer massiven Reduktion der PSII-Untereinheiten und infolgedessen zur Letalität der auf Erde angezogenen Keimlinge (Schult et al., 2007; Link et al., 2012). Der PSII-Defekt resultiert aus einer dramatisch gestörten ribosomalen Beladung des *psbA*-Transkripts. Neben der essentiellen Bedeutung für die Translationsinitiation sind HCF244 und HCF173 außerdem in die Stabilisierung der *psbA* mRNA involviert, wobei der Verlust von HCF173 zu einem stärkeren Stabilitätsverlust der *psbA* mRNA führt. HCF173 ist Teil eines hochmolekularen Komplexes, der nachweislich an die *psbA* mRNA bindet (Schult et al., 2007; Link et al., 2012). HCF244 bildet ebenfalls einen Komplex, der unter den gewählten Bedingungen jedoch nicht stabil an RNA bindet. Entdeckt wurde HCF244 im Rahmen einer Co-Expressionsanalyse, die dazu dienen sollte, HCF173-Interaktoren bzw. D1-Biogenesefaktoren zu identifizieren (Link et al., 2012). Der mutante Phänotyp beider HCF-Proteine ähnelt sich stark. Werden beide Gene gleichzeitig ausgeschaltet, resultiert dies in einer im Vergleich zu den Einzelmутanten noch weiter reduzierten Blattgröße und -anzahl (Link et al., 2012). Zusammen weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass HCF173 und HCF244 im selben oder in aufeinanderfolgenden Schritten der PSII Biogenese involviert sind.

Auf der Grundlage dieser Voraussetzungen wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob HCF244 und HCF173 Teil eines gemeinschaftlichen Komplexes sind und ob Expression sowie Formation bzw. Zusammensetzung der HCF-Komplexe der Einflussnahme von Licht unterliegen. Darüber hinaus wurde geprüft, in wieweit sich beide HCF-Proteine gegenseitig in ihrer Komplexbildung beeinflussen. Ein Funktionsmodell wurde basierend auf der Charakterisation der *hcf173*- und *hcf244*-Mutanten und der Analyse der konservierten Motive aufgestellt.

Ergebnisse

Die Expression von HCF173 und HCF244 wird durch Licht nicht beeinflusst

Der exogene Faktor Licht reguliert die Akkumulation des D1-Proteins in höheren Pflanzen vorrangig auf Ebene der Transkriptstabilisierung und Translation (zusammengefasst in Mulo et al., 2012). Die kernkodierte Biogenesefaktoren HCF173 und HCF244 üben auf diesen Ebenen eine essentielle Funktion aus. Es ist daher naheliegend, dass ihre Akkumulation bzw. Aktivität durch Licht beeinflusst werden könnte.

Um eine mögliche Abhängigkeit zwischen der Verfügbarkeit von Licht und der HCF-Expression zu prüfen, wurde mithilfe des Programms DIURNAL zunächst die Transkriptakkumulation innerhalb des Tagesverlaufes analysiert (Mockler et al., 2007). Die dafür zugrunde liegenden Daten wurden unter Langtag- (16h Licht/ 8h Dunkelheit) und Kurztagbedingungen (8h Licht/ 16h Dunkelheit), basierend auf Datenbankeinträgen, erhoben (Abb. 1A).

Die Expressionsmuster der HCF-Proteine korrelieren unter beiden ausgewerteten Lichtbedingungen ausgesprochen gut miteinander. Innerhalb des Tagesverlaufes schwanken die Transkriptpegel beider HCF-Proteine sehr stark. Mit Einsetzen der Lichtphase wird der Pegel beider HCF-Transkripte in etwa verdoppelt. Nach Erreichen des Maximums sinken die Transkriptpegel deutlich unterhalb den Ausgangswert bei Tagesbeginn, bis das Minimum nach etwa 12 Stunden erreicht ist. Bereits zum Ende der Belichtungsphase (Langtag) bzw. innerhalb der frühen Dunkelphase (Kurztag) steigen sie dann wieder kontinuierlich an.

Insgesamt weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die Transkriptpegel von HCF244 und HCF173 in einem Zyklus von 24 Stunden oszillieren, d.h. einem circadianen Rhythmus unterliegen. Beide Transkriptpegel werden jedoch erheblich mit Beginn der Belichtung gesteigert.

Die Abnahme der RNA-Pegel während der Lichtperiode scheint zunächst konträr zur Funktion beider HCF-Proteine zu stehen, da die Anwesenheit von Licht für die D1-Synthese essentiell ist. Daher wurde in einem ersten Durchgang die Akkumulation beider HCF-Proteine alle zwei Stunden über einen Zeitraum von 24 Stunden unter Langtagbedingungen gemessen (Abb. 1B).

Tendenziell zeigen beide HCF-Proteine auch auf Proteinebene ein gemeinsames Expressionsmuster. Sie akkumulieren mit jeweils einem Maximum zu Beginn und Ende der Lichtperiode. Während das erste Maximum noch in etwa mit dem Maximum der RNA-Pegel korreliert, tritt das zweite Proteinmaximum zeitgleich mit dem Transkriptminimum gegen Ende der Lichtperiode auf.

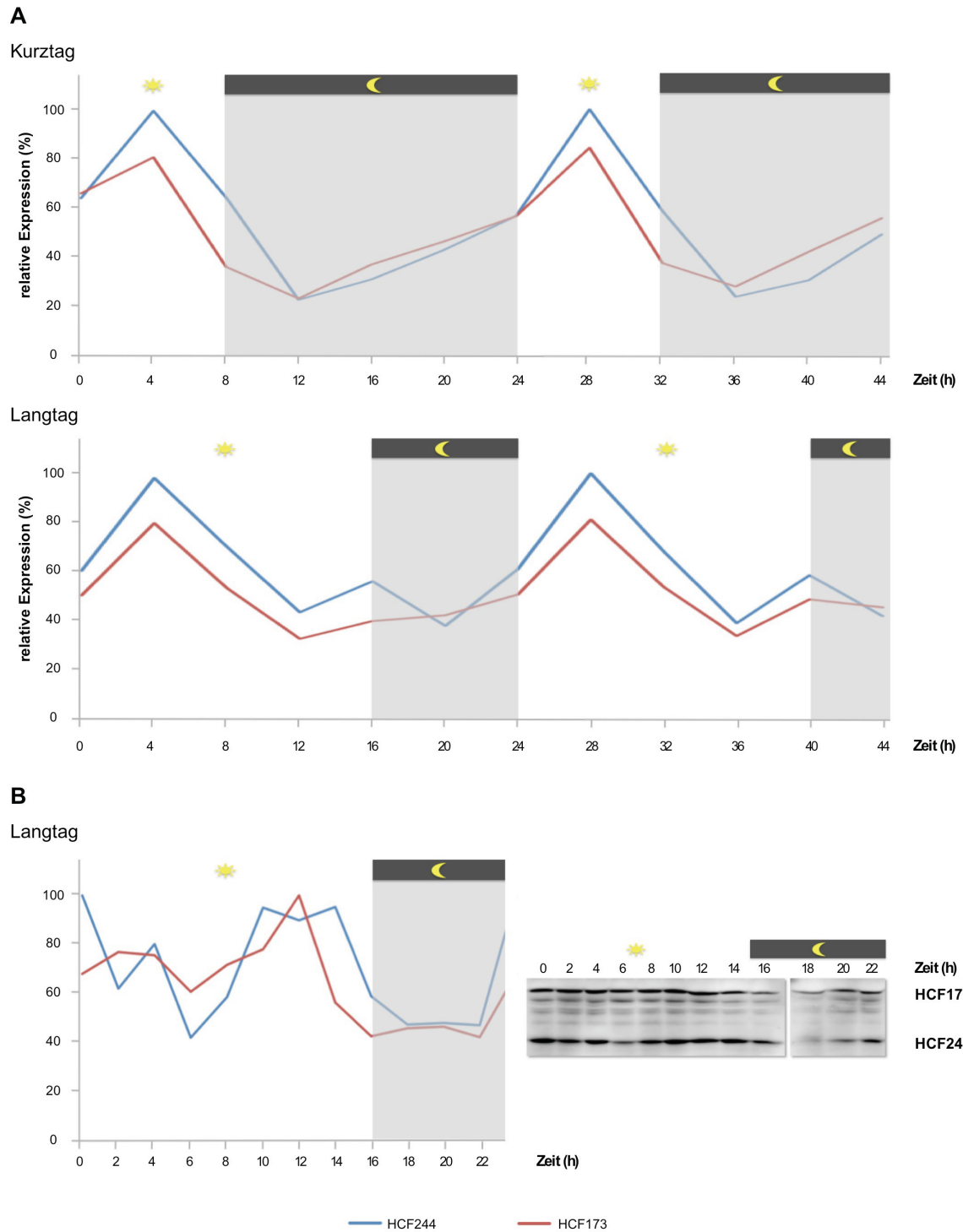


Abb. 1: Regulation der HCF244 und HCF173 Expression. (A) Transkriptakkumulation unter Lang- und Kurzttagbedingungen. Die Daten wurden mit Hilfe des Internetprogramms DIURNAL erstellt. (B) Proteinakkumulation innerhalb des Tagesverlaufes. In einem ersten Durchgang wurden wildtypische Pflanzen für zwei Wochen unter Langtagbedingungen auf Erde angezogen. Das Pflanzenmaterial wurde alle zwei Stunden über einen Zeitraum von 24 Stunden geerntet und anschließend die Gesamtmembranen isoliert. Der immunologische Nachweis der HCF-Proteine erfolgte anhand der spezifischen Antikörper (rechts). Die jeweiligen Signale wurden quantifiziert und prozentual in Bezug zur maximalen Signalintensität gesetzt (links).

Vergleichbar zur steigenden RNA-Akkumulation in der Dunkelphase, erhöht sich der Proteinpegel beider Faktoren gegen Ende der Dunkelperiode ebenfalls. Insgesamt sind auch auf Proteinebene deutliche Pegelunterschiede innerhalb des Tagesverlaufes zu erkennen, jedoch liegen diese fast ausschließlich im Bereich der Lichtphase. In diesem Zusammenhang sprechen die Ergebnisse daher gegen eine Lichtregulation und weisen somit auf eine lichtunabhängige oszillierende Expression im Tagesverlauf hin. Die circadiane Rhythmik beider HCF-Faktoren bestätigt sich somit auch auf der Proteinebene.

Die Bildung der HCF-Komplexe ist nicht lichtreguliert

HCF173 ist Teil eines hochmolekularen Komplexes, dessen Größe und Aktivität in direktem Zusammenhang mit der gebundenen RNA steht (Link et al., 2012, Schult et al., 2007). Durch Co-Immunopräzipitation konnte die *psbA* mRNA als eine Komponente des HCF173-Komplexes identifiziert werden (Schult et al., 2007). HCF244 bildet hingegen einen kleineren Komplex von etwa 300 kDa, der nicht stabil an RNA zu binden scheint (Link et al., 2012).

Um zu überprüfen, ob sich die Anwesenheit von Licht auf die Formation bzw. Zusammensetzung der HCF-Komplexe auswirkt, wurde deren Akkumulation in Ab- und Anwesenheit von Licht in vier bis sechs Wochen alten Pflanzen untersucht (Abb. 2).

Ein Teil der Pflanzen wurde für die Untersuchung für 20 Stunden vorverdunkelt. Die Aufarbeitung dieser Thylakoidmembrankomplexe und die Beladung der Saccharosegradienten erfolgte statt unter Weißlicht bei Grünlicht, da Pflanzen dieses Farbspektrum über ihre Blaulicht- (Cryptochrome) und Rotlichtrezeptoren (Phytochrome) nicht wahrnehmen können.

In drei unabhängigen Experimenten konnte in Proteinextrakten aus licht- bzw. dunkeladaptierten Pflanzen ein hochmolekularer HCF173-Komplex von ca. 500 kDa oder mehr detektiert werden (Abb. 2B). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der Komplex auch im Dunkeln stabil ist. Nach der Behandlung mit RNase akkumuliert dieser Komplex nicht länger (2C, und Link et al., 2012). Ebenfalls unabhängig von der Anwesenheit von Licht tritt ein weiterer kleinerer Komplex in den Fraktionen 7 bis 10 auf. Er korreliert in seiner Größe mit einem niedermolekularen HCF173-Komplex, der auch nach einer Behandlung mit RNase nachweisbar bleibt (2C und Link et al., 2012). Lediglich im Rahmen einer einzelnen Präparation lichtadaptierter Pflanzen konnte dieser Komplex nicht nachgewiesen werden (Abb. 2A). Daher liegt es nahe, dass dieser Komplex in Folge der langwierigen Aufreinigungs- und Zentrifugationsprozedur entsteht und seine Abwesenheit weniger auf eine lichtabhängige Regulation zurückzuführen ist.

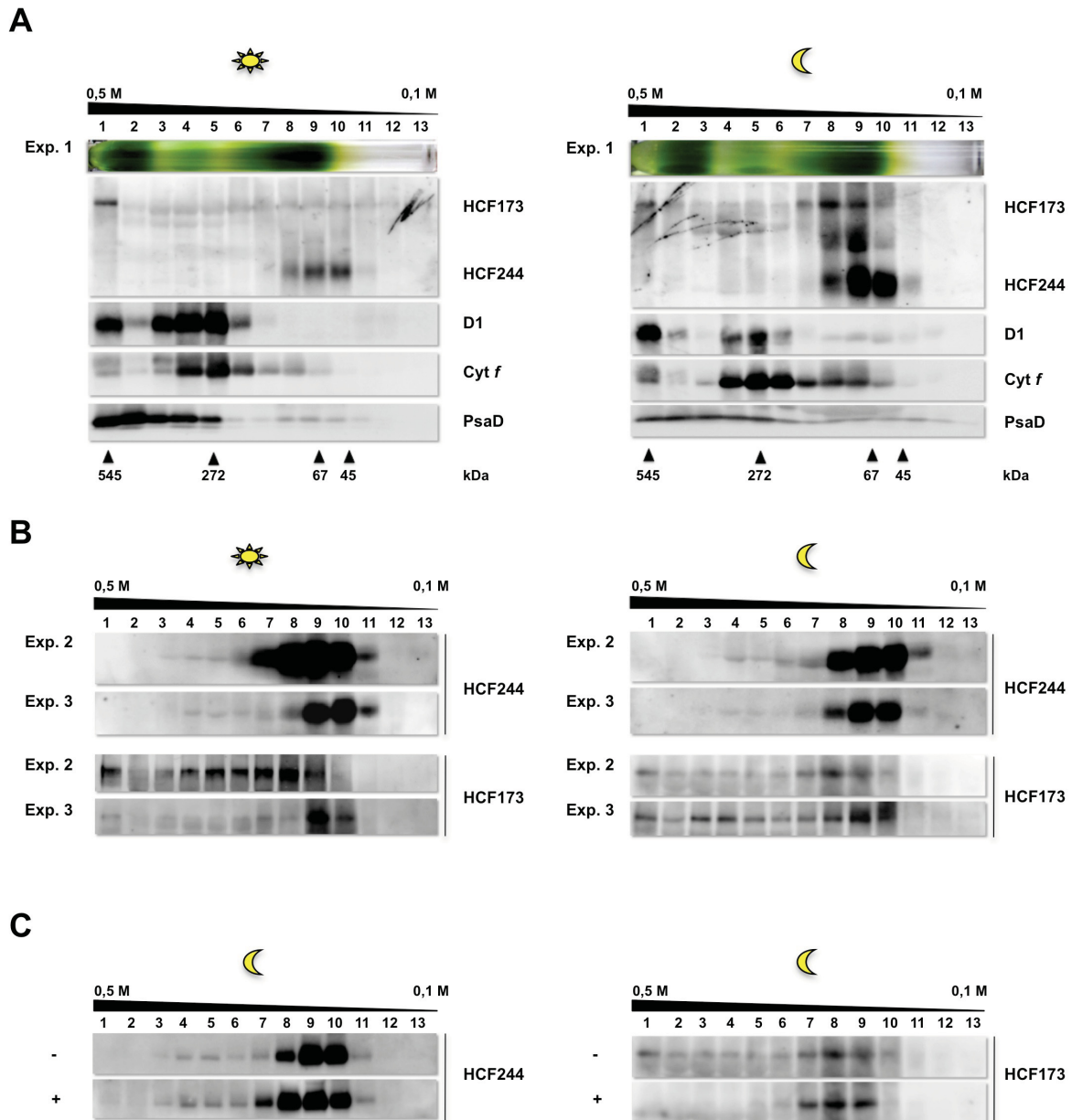


Abb. 2: Analyse von Thylakoidmembrankomplexen unter Licht – und Dunkeladaption. (A) Aus vier bis sechs Wochen alten licht- bzw. dunkeladaptierten wildtypischen Pflanzen wurden Thylakoidmembranen isoliert und mit 1% (w/v) Digitonin solubilisiert. Ein Äquivalent von 500 µg Chlorophyll wurde auf einen 0.1 – 0.5 M Saccharosegradienten geladen und die Proteinkomplexe durch Dichtegradientenzentrifugation der Größe nach voneinander separiert. Der Gradient wurde in 13 Fraktionen zu je 1 ml geerntet, die darin enthaltenen Proteine mit Trichloressigsäure gefällt und anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Einzelne Proteine wurden über Immunodetektion mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. (B) Es wurden für jeden untersuchten HCF-Faktor zwei weitere, voneinander unabhängige, Experimente dargestellt. (C) Untersuchung der HCF-Komplexakkumulation dunkeladaptierter Pflanzen mit (+) und ohne (-) RNaseA-Behandlung. Thylakoidmembranen wurden wie unter (A) beschrieben solubilisiert und vor der Beladung der Gradienten mit (+) bzw. ohne (-) RNaseA versetzt.

Das Akkumulationsverhalten von HCF244 zeigte ebenfalls keine Veränderung zwischen dunkel- und lichtadaptierten Pflanzen. Unter beiden Bedingungen akkumulierte HCF244

gleichermaßen vorrangig in den Fraktionen 8 bis 11, wobei geringe Mengen auch in höher molekularen Bereichen bis etwa 300 kDa nachgewiesen werden konnten.

Daher verdeutlichte die Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation nativer Proteinextrakte von licht- und dunkeladaptierten Pflanzen, dass die HCF173- und HCF244-Komplexe in ihrem Sedimentationsverhalten nicht durch Licht beeinflusst werden.

Die Akkumulation der HCF-Komplexe erfolgt unabhängig von einander

Bei der Analyse von nativen Membrankomplexen mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation traten neben dem hochmolekularen HCF173-Komplex und dem etwa 300 kDa HCF244-Komplex niedermolekulare Komplexe auf, die partiell miteinander cosegregierten (Fraktionen 8 bis 11 Abb.2). Der geringe Auftrennungsbereich innerhalb der einzelnen Fraktionen erschwert die genaue Größenabschätzung der einzelnen Komplexe mit dieser Methode. Um die Ergebnisse der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation zu verifizieren, die Größen der Komplexe genauer bestimmen zu können und die putative co-Segregation der niedermolekularen HCF244- und HCF173-Komplexe zu prüfen, wurde eine zweidimensionale BN/SDS-PAGE durchgeführt (Abb. 3).

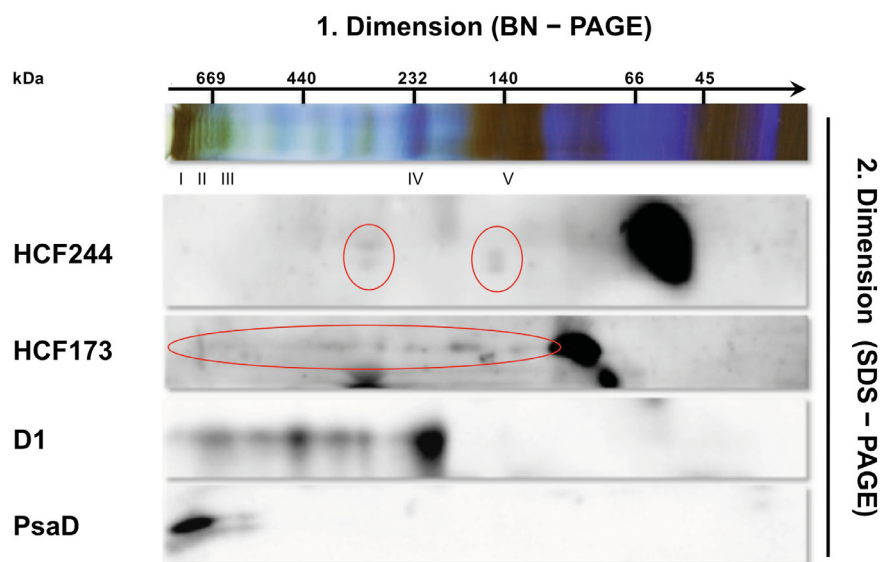


Abb. 3: Auftrennung von Thylakoidmembrankomplexen mittels 2D-(Blue Native/SDS-)Gelelektrophorese. Aus vier bis sechs Wochen alten Wildtyp-Pflanzen wurden Thylakoidmembranen isoliert und mit 1% (w/v) Digitonin solubilisiert. Nach anschließender Zentrifugation wurde der Solubilisierungsüberstand mit n-Dodecyl- β -D-maltosid in einer Endkonzentration von 0.5% (w/v) versetzt. Die solubilisierten Membrankomplexe wurden nach ihrem Molekulargewicht durch BN-Gelelektrophorese (1.Dimension) von einander separiert. Anschließend wurden die Proteinkomplexe durch SDS-PAGE (2.Dimension) in ihre jeweiligen Untereinheiten aufgetrennt. Einzelne Proteine wurden über Gelblotanalyse mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Die höhermolekularen HCF-Komplexe wurden rot eingekreist. (I) PSI-NDH-Komplex (II) PSII-Superkomplexe (III) PSII-Dimer/PSI-Monomer (IV) CP43-PSII (V) LHCII-Trimer

Wie erwartet, entsprach das Verteilungsmuster beider HCF-Faktoren den Ergebnissen der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation. HCF244 akkumuliert hauptsächlich im Bereich um 66 kDa, während kleinere Mengen auch im höhermolekularen Bereich bis ca. 300 kDa bandieren. Ein ähnliches Verteilungsmuster wurde auch für HCF173 detektiert. Auch hier akkumuliert nur ein kleiner Anteil in hochmolekularen Komplexen im Größenbereich bis 700 kDa, während sich das Gros im niedermolekularen Bereich von 140 bis 66 kDa anreichert. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit früheren Untersuchungen in denen HCF173-überexprimierende Linien untersucht wurden (Schult et al., 2007).

Um die Versuchsbedingungen zu verifizieren, wurden das Bandenmuster der ersten Dimension sowie die Verteilung von PSI und PSII-Assemblierungsintermediate durch den immunologischen Nachweis von D1 und PsaD untersucht. Es akkumulierten unterschiedlichste PSII-Assemblierungskomplexe beginnend mit PSII-CP43 (IV) bis hin zum PSII-Dimer (III) und PSII-Superkomplexen (II). Auch PSI-Monomer (II) und PSI-NDH-Komplex (I) konnten durch die Detektion von PsaD nachgewiesen werden.

Mit Hilfe der 2D-(Blue Native/SDS)PAGE konnten somit die Ergebnisse der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation für HCF173 und HCF244 verifiziert werden. Die Detektion zweier schwach abundanter distinkter Komplexe im Bereich um 300 und 140 kDa ermöglichte eine genauere Größenzuordnung des HCF244-Komplexes. Der Hauptanteil beider HCF-Faktoren akkumuliert bei beiden Methoden in Bereichen oberhalb der Größe des Monomers und deutet auf die Anwesenheit von Interaktionspartnern hin. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass diese stark abundanten Signale auf Monomere mit veränderten Laufverhalten zurückzuführen sind. Eine Cosegregation der HCF-Faktoren kann unter den gewählten Bedingungen lediglich für den höher molekularen Bereich mit Vorsicht in Betracht gezogen werden. Die Bildung eines gemeinsamen stabilen Komplexes ist daher unter den gewählten Bedingungen sehr unwahrscheinlich.

Die Coexpressionsdaten und die hohe Ähnlichkeit beider mutanter Phänotypen weisen jedoch darauf hin, dass beide Faktoren im gleichen oder aufeinander folgenden Biogenesewegen involviert sind. Es könnte zudem eine Abhängigkeit beider Faktoren, beispielsweise durch die Rekrutierung von Interaktionspartnern, gegeben sein. Um diese Hypothese zu testen, wurde die Komplexbildung in Abwesenheit des jeweils anderen HCF-Proteins durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation analysiert (Abb. 4). Dafür wurden Thylakoidmembranen aus zwei bis drei Wochen alten Keimlingen isoliert. Der Chlorophyllgehalt beider Mutanten weicht stark vom Wildtyp ab. Um einheitliche Solubilisierungsbedingungen zu garantieren, wurde auf die Proteinkonzentration (2,5 µg Protein/µl) normiert, die im Wildtyp 1 µg Chlorophyll/µl entspricht. Alle Gradienten wurden mit einer Proteinmenge beladen, die im Wildtyp 500 µg Chlorophyll entspricht.

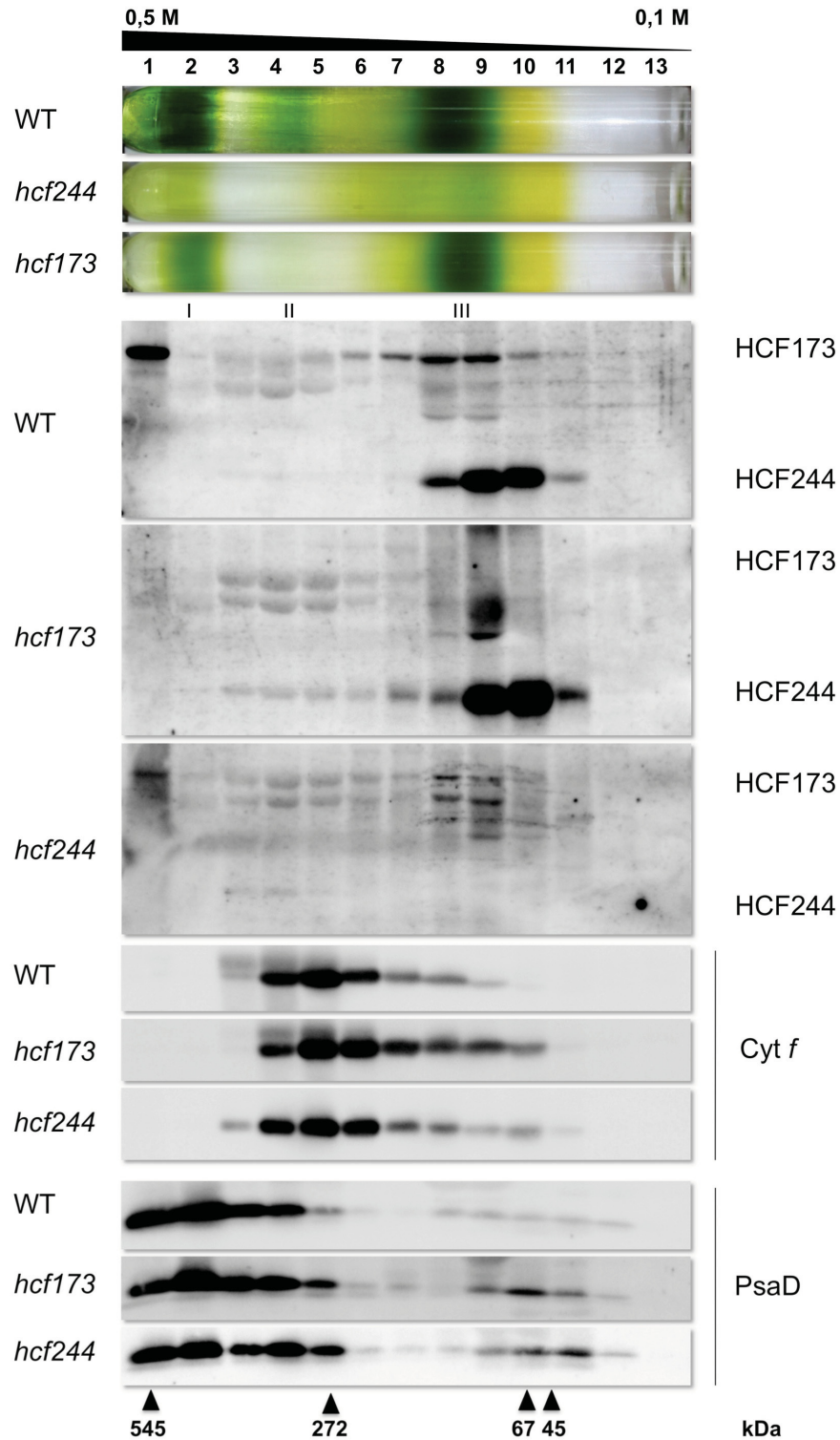


Abb. 4: Analyse von HCF-Komplexen durch Zentrifugation im diskontinuierlichen Saccharosegradienten. Aus zwei bis drei Wochen alten *hcf244*-, *hcf173*- und Wildtyp-Pflanzen wurden Thylakoidmembranen isoliert und mit 1% n-Dodecyl- β -D-maltosid solubilisiert. Die Gradienten wurden mit einem Proteinäquivalent, welches 500 μ g Chlorophyll des Wildtyps entspricht, beladen. Nach der Zentrifugation wurden jeweils 1 ml Fraktionen geerntet und die enthaltenen Proteine mit Trichloressigsäure gefällt. Nach Müller und Eichacker (1999) lassen sich den Banden folgende Proteinkomplexe zuordnen: (I) PSII-Dimer (etwa 620 kDa)/PSI-LHCI (etwa 540 kDa) (II) PSII-Monomer (etwa 280 kDa) (III) LHCII-Trimer (etwa 130 kDa)

Die Bandenmuster der Gradienten sind hinsichtlich der Position, jedoch nicht in der Intensität, der einzelnen Banden untereinander vergleichbar. Die beiden charakteristisch stark grün gefärbten Banden im Bereich der Fraktionen 2 und 8/9 und die schwächer gefärbte Bande in Fraktion 4 sind in ihrer Ausprägung in *hcf173* deutlich reduziert und akkumulieren in *hcf244* nur noch sehr schwach. Da sie dem LHCII-Trimer (III) bzw. PSII-Monomer (II) und -Dimer (I) entsprechen, war eine dramatische Reduktion dieser Banden aufgrund der stark beeinträchtigten Akkumulation von PSII-Untereinheiten in beiden Mutanten zu erwarten (Schult et al., 2007; Link et al., 2012).

Versuchsbedingte Schwankungen können beispielsweise beim Gießen oder Ernten der Gradienten auftreten. Um die daraus entstehenden Abweichungen nachzuweisen, wurde die Verteilung der Cyt b_6f -Komplex Untereinheit Cyt *f* und der PSI Untereinheit PsdA untersucht. Sowohl im Wildtyp als auch in beiden Mutanten akkumuliert der Hauptanteil des Cyt *f*-Signals in Fraktion 4 bis 6. Diese Fraktionen entsprechen in etwa einem Größenbereich von 270 kDa. Vermutlich handelt es sich hierbei um die aktive Form des Cyt b_6f -Komplexes, dem Homodimer mit einer Größe von etwa 220 kDa. PsdA akkumuliert in Wildtyp und Mutanten hauptsächlich im hochmolekularen Bereich (PSI-LHCI) in einer vergleichbaren Verteilung. Somit verifizieren das Bandenmuster der Gradienten und beide Photosynthesekontrollen annähernd vergleichbare Versuchsbedingungen.

Vergleicht man die Akkumulation von HCF244 zwischen dem Wildtyp und der *hcf173*-Mutante, zeigt sich ein nahezu übereinstimmendes Verteilungsmuster. Bei beiden Gradienten ist HCF244 hauptsächlich in Fraktion 9 und 10 lokalisiert und zieht sich in geringen Mengen bis in hochmolekulare Bereiche (Fraktion 3) bis etwa 300 kDa. HCF173 bildet im Wildtyp und der *hcf244*-Mutante einen hochmolekularen Komplex (Fraktion 1) und akkumuliert zusätzlich im Bereich um Fraktion 8 und 9. Somit wirkt sich der Verlust eines der beiden HCF-Proteine nicht essentiell auf die Komplexbildung des jeweilig anderen HCF-Faktors aus. In beiden Mutanten wurde das durch die Mutation betroffene HCF-Protein nicht nachgewiesen und verifiziert so die Abwesenheit von Kontaminationen durch wildtypische oder heterozygote Pflanzen.

Zusammenfassend weisen die gewonnenen Daten darauf hin, dass HCF173 unter den gegebenen Versuchsbedingungen mit HCF244 weder einen stabilen Komplex bildet noch für die Assemblierung des HCF244-Komplexes essentiell ist. In der *hcf244* Mutante lässt sich kein verändertes Laufverhalten von HCF173 erkennen. Der hochmolekulare HCF173-Komplex bleibt weiterhin detektierbar. Zu bemerken ist jedoch, dass eine Größenzunahme im hochmolekularen Bereich aufgrund des Auftrennungsbereichs des Gradienten nicht auszuschließen ist. Jedoch ist diese Möglichkeit bei Fehlen eines Bindepartners kaum zu erwarten. Somit ist der detektierbare HCF173-Komplex in seiner Stabilität sehr wahrscheinlich unabhängig von HCF244.

Diskussion

Die PSII-Biogenesefaktoren HCF244 und HCF173 akkumulieren lichtunabhängig im Tagesverlauf

Wie bereits eingangs dargestellt wurde, ist die D1-Biogenese ein im hohen Maße lichtabhängiger Prozess. HCF173 und HCF244 üben eine essentielle Funktion innerhalb der D1-Synthese aus. Um zu gewährleisten, dass D1 in den benötigten Mengen bereitgestellt wird, würde eine lichtabhängige Expression der Biogenesefaktoren daher nahe liegen.

In der Tat ist auf RNA-Ebene zunächst eine gewisse lichtabhängige Expression erkennbar, denn mit Einsetzen der Lichtphase steigt der Transkriptpegel beider HCF-Proteine deutlich an. Diese Tendenz bestätigt sich jedoch nicht auf Proteinebene. Dort ist lediglich ein minimaler Anstieg zu verzeichnen. Darüber hinaus steigen auch die Proteinpegel beider HCF-Faktoren bereits vor Einsetzen der Lichtperiode an. In diesem Zusammenhang sprechen die Ergebnisse folglich gegen eine Lichtregulation.

Unter Langtagbedingungen zeigt sich ein weiterer deutlicher Unterschied zwischen der RNA- und der Proteinakkumulation am Ende der Lichtphase. Während die Transkriptpegel ihren Tiefpunkt erreicht haben, akkumulieren beide Proteine in einem zweiten Maximum. Diese Diskrepanz ist wahrscheinlich auf translationale oder posttranslationale Regulation der HCF244/HCF173-Expression zurückzuführen.

Im Tagesverlauf korrelieren die Expressionsmuster von HCF173 und HCF244 auf RNA- und Proteinebene insgesamt ausgesprochen gut miteinander. Diese Coexpression unterstreicht ein weiteres Mal die Parallelen zwischen beiden HCF-Faktoren und liefert darüber hinaus einen weiteren Hinweis auf eine gemeinsame Funktionsausübung innerhalb der D1-Biogenese.

Durch die circadiane Uhr werden zahlreiche physiologische und metabolische Prozesse, wie z.B. das Öffnen und Schließen der Stomata und Blüten, die Blattbewegung und die CAM (Crassulacean Acid Metabolism)-Photosynthese, gesteuert (Sweeney, 1987; McClung and Kay, 1994; Hartwell, 2005). Auch die Photosynthese wird durch diese Rhythmik reguliert (Kloppstech, 1985; Giuliano et al., 1988; Nagy et al., 1988; Hennessey and Field, 1991,1992). Die Expression der Thioredoxine TRXf und TRXm, die in die lichtabhängige Aktivierung von einigen Enzymen des Calvinzyklus involviert sind, unterliegt einem circadianen Rhythmus (Troncoso-Ponce and Mas, 2012). Die PSII-Aktivität wird ebenfalls durch diesen Mechanismus reguliert (Samuelsson et al., 1983; Salvador et al., 1993; zusammengefasst in Piechulla, 1999). Durch die circadiane Uhr wird beispielsweise die Aktivität des *psbD* light-responsive promoter (LRP) (Nakahira et al., 1998) oder die Expression von *atpA*, *atpB* und der *Lhc*-Gene gesteuert (Salvador et al., 1993; zusammengefasst in Piechulla,

1999). Die *Lhc* mRNA und die LHC-Proteinlevel steigen beide mit Tagesbeginn an, erreichen ihr Maximum am Mittag und sinken nachmittags wieder (zusammengefasst in Piechulla, 1999).

Diese Beispiele belegen die circadiane Expression zahlreicher photosynthetischer Thylakoidmembranproteine. Es liegt daher nahe, dass die Akkumulation von Hilfsfaktoren, die in die Biogenese dieser Untereinheiten eingreifen, ebenfalls über diesen Mechanismus gesteuert wird. Für HCF244 und HCF173 bestätigt sich diese Annahme. Beide Proteine oszillieren in einem Rhythmus von 24 Stunden, durch den sichergestellt wird, dass das Expressionsmaximum während der Lichtperiode erreicht wird. Der Protein- und RNA-Pegel beider Faktoren beginnt jedoch schon in der späten Dunkelperiode zu steigen. Damit könnte sichergestellt werden, dass HCF173 und HCF244 direkt zu Beginn der Lichtperiode für die D1-Synthese bereitstehen und nicht erst synthetisiert werden müssen.

Die circadiane Uhr wird durch exogene Stimuli, wie Licht oder Temperatur, mit den herrschenden Umweltbedingungen synchronisiert (Devlin and Kay, 2001). Die lichtunabhängige Expression beider HCF-Faktoren deutet hier jedoch auf andere Zeitgeber, wie allgemeine oder retrograde Signale hin. Durch retrograde Signale wird der Entwicklungsstatus und metabolische Zustand des Chloroplasten an den Zellkern übermittelt und in Antwort darauf die Transkription kernkodierter Gene reguliert. Auch HCF173 und HCF244 sind im Zellkern kodiert. Eine Regulation auf dieser Ebene wäre daher nicht ausgeschlossen, jedoch ist zu beachten, dass es bei beiden HCF-Faktoren deutliche Expressionsunterschiede zwischen der Protein- und RNA-Ebene gibt. Somit müssten gegebenenfalls neben retrograden Signalen weitere Faktoren die Expression der HCF-Faktoren auf posttranskriptionalem Weg regulieren.

Der exogene Faktor Licht nimmt keinen Einfluss auf die Akkumulation der HCF-Komplexe

Auch wenn die Expression der HCF-Proteine vermutlich nicht direkt von Licht gesteuert wird, schließt dies eine lichtabhängige Regulation auf anderer Ebene nicht aus. Zahlreiche Studien belegen, dass der exogene Faktor Licht auf verschiedenen Wegen Einfluss auf ein Protein nehmen kann. Diese Ebenen schließen u.a. auch die Aktivität des Proteins oder die Interaktion mit Bindepartnern ein (Schwarz et al., 2012; Qi et al., 2012; Lyska, 2011).

Daher wurde untersucht, ob die Formation der HCF-Komplexe durch Licht beeinflusst wird. Der Vergleich von dunkel- und lichtadaptierten Pflanzen zeigte, dass keine Unterschiede hinsichtlich der Verteilung bzw. Größe der HCF-Komplexe auftraten. Auch im Dunkeln akkumuliert HCF173 in einem hochmolekularen Komplex, der durch RNase abgebaut wird. Folg-

lich bindet HCF173 lichtunabhängig an RNA. Im Zusammenhang mit den drastisch reduzierten *psbA*-Transkriptpegel in der *hcf173*-Mutante deutet dies darauf hin, dass HCF173 die mRNA sowohl in der Nacht als auch am Tag vor dem Zugriff von Nukleasen schützt und somit wahrscheinlich eine generell stabilisierende Rolle einnimmt. Da der geringe noch akkumulierende *psbA* mRNA Anteil außerdem eine stark gestörte ribosomale Beladung zeigt (Schult et al., 2007), muss HCF173 darüber hinaus noch eine direkte oder indirekte Rolle innerhalb der Translationsinitiation einnehmen. Inwieweit diese Funktion durch Licht beeinflusst wird, bleibt weiter Gegenstand der Forschung.

Das unveränderte Sedimentationsverhalten von HCF244 weist ebenfalls darauf hin, dass sich die Abwesenheit von Licht offenbar nicht auf dessen Komplexstabilität und wahrscheinlich auch nicht auf dessen Zusammensetzung auswirkt.

Konträr dazu stehen die Ergebnisse anderer Biogenesefaktoren (Lyska, 2011, Schwarz et al., 2007, 2012, Qi et al., 2012). In *Chlamydomonas* bilden der RNA Stabilisationsfaktor Nac2 und der translationale Aktivator RBP40 einen hochmolekularen Komplex, der die D2-Expression lichtabhängig reguliert (zusammengefasst in Schwarz et al., 2012). Im Licht bindet RBP40 über die Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke an Nac2 und wird dadurch zu seiner urazilreichen Zielsequenz 15 nt stromaufwärts des Translationsstarts rekrutiert. Durch die Bindung von RBP40 wird die RNA-Konformation der *psbD* 5'UTR geändert, wodurch das Startkodon aus einer Sekundärstruktur entlassen und somit für die Ribosomen zugänglich gemacht wird (Schwarz et al., 2007, 2012). Im Dunkeln führt die NADPH-abhängige Reduktion der Disulfidbrücke zur Entlassung von RBP40 aus dem Nac2-Komplex und damit zur Drosselung der D2-Synthese (Schwarz et al., 2012). Es wird vermutet, dass das dafür benötigte NADPH aus dem oxidativen Pentosephosphatweg stammt und daher den plastidären Kohlenstoffmetabolismus mit der Genexpression verknüpft.

Proteine CSP41 a und b bilden in *A.thaliana* miteinander einen Komplex, der im Dunkeln an eine Reihe von photosynthetischen Transkripten (u.a. *psbA*, *psbD/C*, *psaA/B* und *rbcL*) und die unprozessierte Form der 16S (*rrn16*) bzw. 23S (*rrn23*) rRNA bindet und diese dadurch über die Nacht hinweg stabilisiert (Qi et al., 2012). Während Licht ein positiver Stimulator für die Assemblierung des Nac2/RBP40 Komplexes ist, führt die Anwesenheit von Licht zur Dissoziation des HMW CSP41-RNA-Komplexes, wobei kleinere CSP41-Komplexe auch im Licht detektiert werden können.

Die Akkumulation der sRNAs gibt einen Hinweis auf putative Bindestellen der HCF-Proteine innerhalb der *psbA* 5'UTR

Mit HCF173 und HCF244 wurden die ersten beiden essentiellen D1-Translationsinitiationsfaktoren in *Arabidopsis* beschrieben (Schult et al., 2007; Link et al., 2012). Beide Proteine

üben zusätzlich eine stabilisierende Funktion auf das *psbA*-Transkript aus, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß.

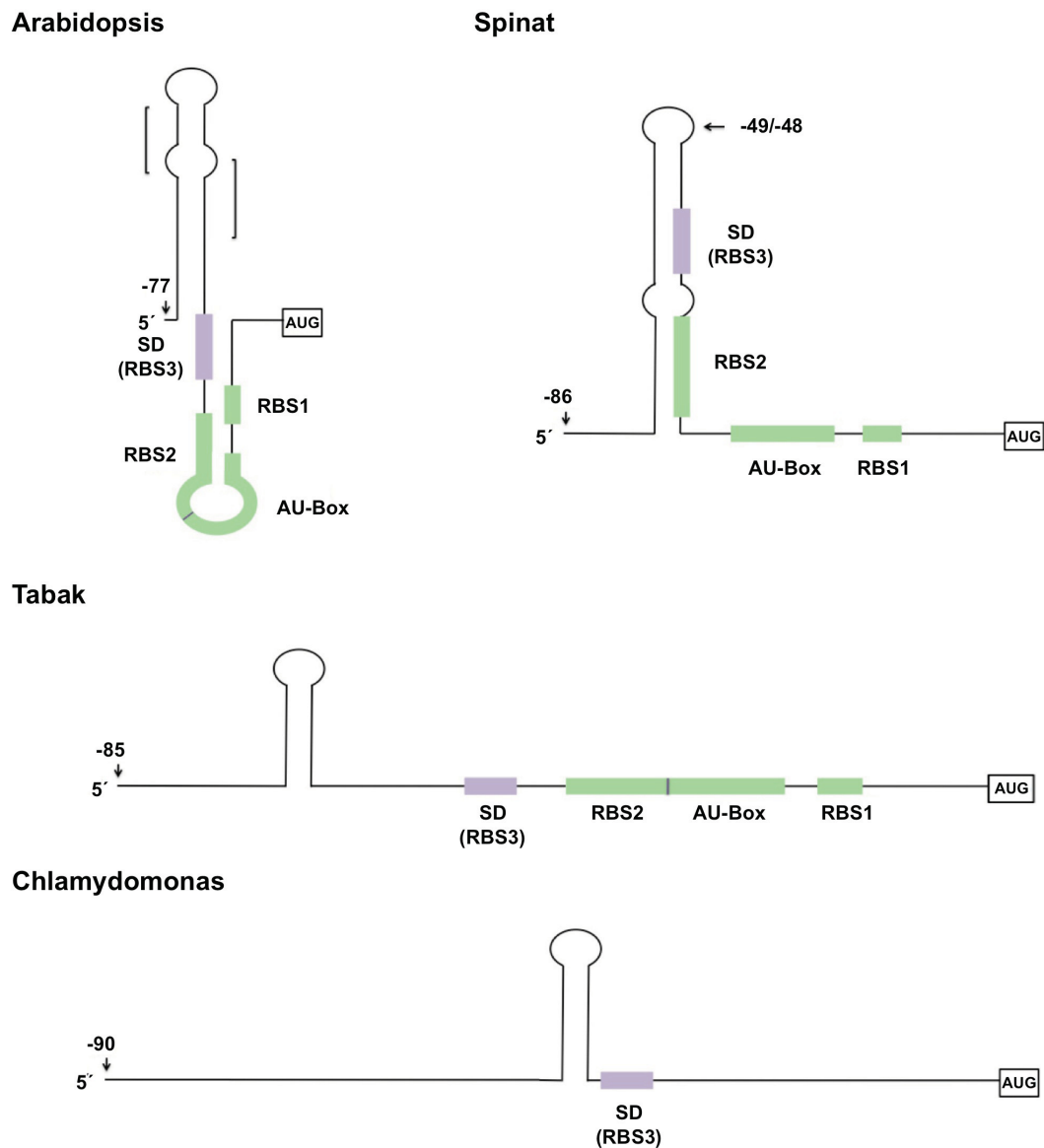
Biochemische Untersuchungen zeigten HCF173 als Komponente eines hochmolekularen Membrankomplexes, der nach RNase-Behandlung deutlich verkleinert vorliegt und somit auf eine RNA-Komponente hinweist (Link et al., 2012). Coimmunopräzipitationsanalysen zeigen, dass es sich dabei um *psbA* mRNA handelt (Schult et al., 2007). Ein geringer Anteil der HCF173-Proteine ist auch im Stroma vertreten. Dort bildet HCF173 ebenfalls hochmolekulare Komplexe, die im Größenbereich von über 1-3 MDa liegen (Olinares et al., 2010). Diese HCF173-Superkomplexe könnten in Folge der beginnenden Translationsinitiation Ribosomen bzw. ribosomale Untereinheiten enthalten. Komplexe in einer ähnlichen Größenordnung wären auch für den membrangebunden Teil von HCF173 und HCF244 denkbar. Dies geht aus der massenspektrometrischen Analyse von Thylakoidmembrankomplexen mit einer Größe von > 700 kDa hervor, die zuvor mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt wurden. HCF173 und HCF244 wurden dabei zusammen mit einer Vielzahl von ribosomalen Proteinen und rRNA detektiert (Lyska, 2011). Über Immuno-detektion konnte HCF244 jedoch nur in Komplexen um die 300 kDa nachgewiesen werden (Link et al., 2012).

Angesichts dieser Ergebnisse wäre es vorstellbar, dass HCF173 und/oder HCF244 an die *psbA* 5'UTR binden und infolgedessen (i) das Transkript vor endo- und/oder exonukleolytischen Abbau schützen und (ii) die Translationseffizienz durch Remodulierung der Sekundärstruktur erhöhen.

Diese Hypothese setzt die Existenz einer (i) Sekundärstruktur mit maskierten essentiellen *cis*-Elementen innerhalb der *psbA* 5'UTR sowie (ii) RNA-bindende Domänen in HCF244 und/oder HCF173 voraus.

Für den *psbA* 5'UTR Bereich wurde die Ausbildung einer Sekundärstruktur in *Chlamydomonas* und höheren Pflanzen (u.a. Arabidopsis, Spinat, Tabak, Tomate, Reis und Mais) beschrieben (Abb. 5A; Erickson et al., 1986; Hirose and Sugiura, 1996; Bruick and Mayfield, 1998; Alexander et al., 1998; Shen et al., 2001; Zou et al. 2003, Ruhlman et al., 2010). In Arabidopsis besteht sie aus einer doppelten Haarnadelstruktur (Abb. 5A; Shen et al., 2001). Das Hauptende im Ökotyp Columbia wurde auf -77 Nukleotide ausgehend vom Translationsstart terminiert (Shen et al., 2001). Dieser Bereich befindet sich direkt am Anfang der ersten Haarnadelstruktur. Zusätzlich akkumulieren zwei niedrig abundante Termini bei etwa -64 und -48. Letzterer überlappt mit der endonukleolytischen Schnittstelle aus Spinat (Klauff et al., 1997; Alexander et al., 1998; Shen et al., 2001). Dort führt die Prozessierung an dieser Position zur Degradation der *psbA* mRNA. In Anbetracht der Akkumulation der verschiedenen 5' Termini erscheint in Arabidopsis ein vergleichbares Resultat wahrscheinlich.

A



B

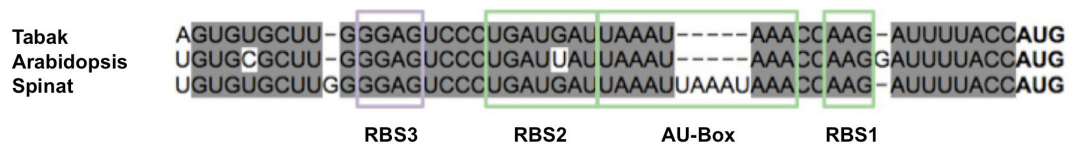


Abb. 5: Vergleichende Darstellung der *psbA* 5'UTR in höheren Pflanzen und Grünalgen. (A) Schematische Darstellung der *psbA* 5'UTR Sekundärstruktur von Arabidopsis (basierend auf Shen et al., 2001), Spinat (basierend auf Alexander et al., 1998), Tabak (basierend auf Hirose and Sugiura, 1996) und Chlamydomonas (basierend auf Bruick and Mayfield, 1998). Putative ribosomale Bindestellen und die AU-Box sind durch grüne Boxen dargestellt. Sie wurden infolge der hohen Sequenzkonservation von Tabak auf Arabidopsis und Spinat übertragen. Die Shine-Dalgarno Sequenz ist in lila dargestellt. Bereiche, die in Arabidopsis als niedrig abundante 5'Termini (Shen et al., 2001) akkumulieren, sind durch Klammern gekennzeichnet. Die endonukleolytische Schnittstelle bei -48/-49 in Spinat ist durch einen Pfeil markiert. (B) Sequenzvergleich der Translationsinitiationsregion der *psbA* 5'UTR aus höheren Pflanzen. Zu der Sequenz aus Tabak identische Aminosäuren sind grau unterlegt. Die Position der ribosomalen Bindestellen und AU-Box basiert auf Hirose und Sugiura (1996) und ist lila bzw. grün umrahmt.

Konträr dazu stehen die Daten aus *Chlamydomonas*, wo die 5'UTR durch Prozessierung von 90 auf 36 nt in eine translatierbare Form überführt wird (Erickson et al., 1986; Bruick and Mayfield, 1998).

In der zweiten Haarnadelstruktur in *Arabidopsis* sind drei putative ribosomale Bindestellen (RBS) und eine AU-Box angeordnet (Abb. 5). Die SD-Sequenz (RBS3; GGAG) entspricht der typischen Sequenzfolge prokaryotischer SD-Elemente und ist in höheren Pflanzen und *Chlamydomonas* hoch konserviert (Hirose and Sugiura, 1996; Alexander et al., 1998; Shen et al., 2001; Ruhlman et al., 2010). Ob dieses *cis*-Element für die D1-Translation in *Arabidopsis* essentiell ist, ist bisher unbekannt. In Tabak ist die translationale Relevanz dieser SD-Sequenz gering (Hirose and Sugiura, 1996). Eine essentielle Funktion übernehmen hingegen zwei weiter stromabwärts liegende RBS (RBS1 und RBS2) und die von ihnen flankierte AU-reiche Sequenz (AU-Box) (Hirose and Sugiura, 1996). Beide RBS sind komplementär zum 3'Terminus der 16S rRNA angelegt (Tohdoh and Sugiura, 1982) und führen bei Sequenzveränderungen zu stark reduzierten Translationsraten (Hirose and Sugiura, 1996). Die partielle Deletion der AU-Box bewirkt die komplette Einstellung der Translation. Aufgrund dessen, dass diese AU-reiche Sequenz keine komplementäre Region zur 16S rRNA aufweist, aber dennoch für die Translation essentiell ist, wird sie als Zielsequenz von potentiellen Translationsfaktoren angesehen (Hirose and Sugiura, 1996). Hirose und Sugiura (1996) postulieren daher, dass RBS1 und RBS2 als zweiteilige SD-Sequenz wirken und die AU-Box durch deren Wechselwirkung mit der 16S rRNA für die Interaktion mit Proteinen zugänglich gemacht wird.

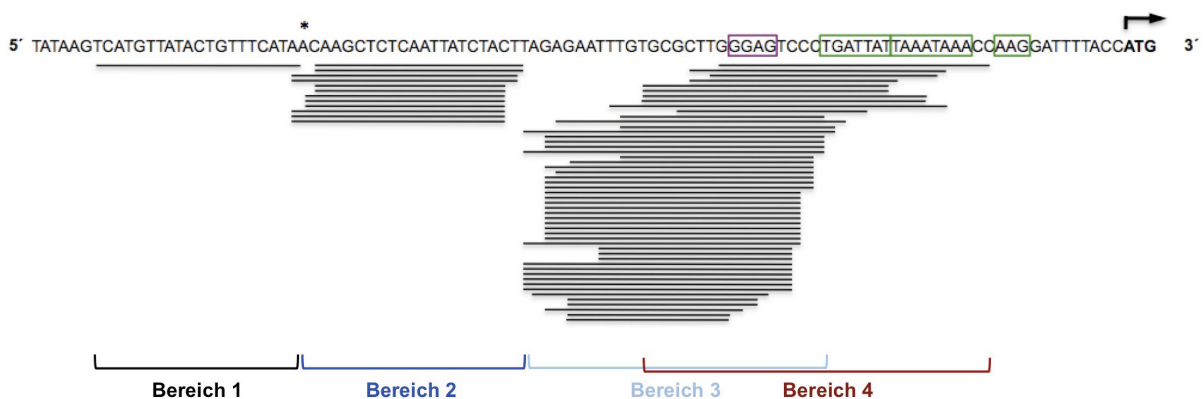
In höheren Pflanzen ist die Region der ribosomalen Bindestellen einschließlich der AU-Box zu 80% konserviert (Shen et al., 2001). Die Sequenzen aus Tabak und *Arabidopsis* unterscheiden sich lediglich in einer Base (Abb. 5B). Eine vergleichbare Funktion der *cis*-Elemente ist daher auch in *Arabidopsis* sehr wahrscheinlich.

Um potentielle Bindestellen der HCF-Komplexe innerhalb der *psbA* 5'UTR zu identifizieren, bietet sich die Analyse der sRNA-Verteilung in diesem Bereich an. sRNAs sind kurze, nicht-kodierende RNA-Fragmente von ca. 20 bp. Sie entstehen, wenn bestimmte Bereiche eines Transkriptes durch die Interaktion mit Proteinen oder durch Ausbildung von Sekundärstrukturen vor der Degradation durch Endo- und Exonukleasen geschützt werden (Ruwe and Schmitz-Linneweber, 2012; Zhelyazkova et al., 2012). Folglich reichern sie sich nach Abbau des Transkriptes als stabile Degradationsintermediate in der Zelle an. Sie können somit als potentielle Bindestellen für Faktoren angesehen werden, die in posttranskriptionalen Prozessen, wie Stabilisierung und Translation von Transkripten, involviert sind (Schmitz-Linneweber et al., 2005; Prikryl et al., 2011; Ruwe and Schmitz-Linneweber, 2012; Zhelyazkova et al., 2012).

sRNA-Lokalisationsdaten sind mittlerweile für *Arabidopsis* und Gerste erhältlich (Ruwe and

Schmitz-Linneweber, 2012; Zhelyazkova et al., 2012). In *Arabidopsis* (Ökotyp Columbia) umfasst die *psbA* 5'UTR eine Gesamtlänge von 113 nt, wobei der Hauptterminus des reifen Transkriptes bei -77 nt liegt (Shen et al., 2001). Innerhalb dieser Region akkumulieren sRNAs in vier distinkten Bereichen (Abb. 6A). Die Daten für die Lokalisation der sRNAs wurden von H. Ruwe (Humboldt Universität Berlin) zur Verfügung gestellt. Geht man davon aus, dass einer oder beide HCF-Faktoren an die *psbA* 5'UTR binden, wäre die entsprechende Bindesequenz infolgedessen höchst wahrscheinlich vor nukleolytischen Abbau geschützt und damit als sRNA nachweisbar.

A



B

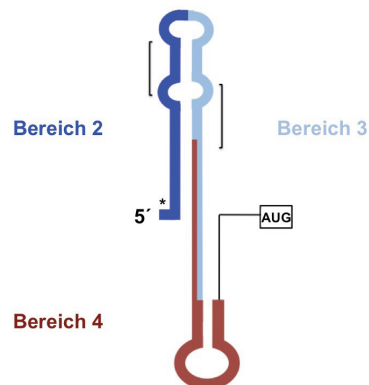


Abb. 6: Schematische Darstellung der *psbA* 5'UTR aus *A.thaliana* (Columbia) mit der Lokalisation von sRNAs. (A) sRNA-Akkumulation innerhalb der Vollängen-UTR. Die Lokalisation und die Häufigkeit der sRNAs ist unterhalb der UTR-Sequenz angegeben (basierend auf Ruwe und Schmitz-Linneweber, 2012). Der Beginn der reifen 5'UTR bei Position -77 nt ist durch einen Stern gekennzeichnet (Shen et al., 2001). Die SD-Sequenz ist in lila markiert und weitere putative *cis*-Elemente sind in grün umrahmt. (B) Lokalisation der sRNA-Bereiche innerhalb der reifen 5'UTR. Der Beginn des reifen Hauptterminus ist durch einen Stern gekennzeichnet und die Positionen der niedrig abundante 5'Termini sind durch Klammern markiert (Shen et al., 2001).

In der *hcf*-Mutante würde diese sRNA aufgrund der fehlenden Proteininteraktion nicht akkumulieren. Für den Nachweis der sRNAs wurden Sonden gegen die Bereiche 1 bis 4

generiert. Im Gegensatz zur *petL*-Kontrollsonde bildeten alle *psbA*-Sonden in Abwesenheit eines Interaktionspartners Sekundärstrukturen aus (Daten nicht gezeigt) und lassen somit keine verlässliche Aussage hinsichtlich der sRNA-Akkumulation in Abhängigkeit des jeweiligen HCF-Faktors zu.

Dennoch können zumindest theoretisch Rückschlüsse auf putative HCF-Bindestellen gezogen werden. Die sRNA des ersten Bereiches akkumuliert stromaufwärts des Hauptterminus. Sie könnte die Bindestelle eines *trans*-Faktors markieren, der die allgemeinen Endoribonukleasen RNaseE und RNaseJ zur 5'UTR rekrutiert und damit den Hauptterminus generiert (Schein et al., 2008; de la Sierra-Gallay et al., 2008). Es ist unwahrscheinlich, dass die HCF-Faktoren an diese Sequenz binden, da beide Proteine essentiell für die Translationsinitiation sind, und dieser Bereich außerhalb des reifen Transkriptes liegt. Der zweite und dritte Bereich erstreckt sich über die gesamte erste Haarnadelstruktur und wird von der SD-Sequenz innerhalb der zweiten Haarnadelstruktur begrenzt (Abb. 6B). Der überwiegende Anteil der sRNAs akkumuliert in dieser Region. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass sich beide niedrig abundanten Termini ebenfalls in diesen Bereichen befinden. Es wird vermutet, dass zumindest eines der beiden Enden durch endonukleolytische Schnitte entsteht (Shen et al., 2001). Da sich der Hauptterminus weiter stromaufwärts befindet, ist es somit sehr wahrscheinlich, dass in diesem Bereich Faktoren binden, die das Transkript vor dem Zugriff der Ribonukleasen schützen und die akkumulierenden sRNAs deren Bindestelle markieren. Gestützt wird diese These durch RNase-Schutzexperimente, die zeigen, dass ein Großteil des *psbA*-Volllängentranskript durch Ausbildung eines RNA-Protein-Komplex vor dem Abbau geschützt wird (Shen et al., 2001). Aufgrund der transkriptstabilisierenden Funktion beider HCF-Proteine könnte diese Region daher als putative HCF-Bindestelle dienen.

Des Weiteren akkumulieren sRNAs zwischen dem zweiten niedrig abundanten Terminus bei etwa -48 und der AU-Box (vierter Bereich). Auch diese sRNAs könnten durch die Interaktion mit *trans*-Faktoren, wie HCF173 und HCF244, entstanden sein. Gelverzögerungsanalysen in *Arabidopsis* belegten für den vierten Bereich (zuzüglich der RBS1) die Bildung eines RNA-Protein-Komplexes (Shen et al., 2001). In der Region der zweiten Haarnadelstruktur liegen alle bisher bekannten translationsrelevanten *cis*-Elemente (RBS und AU-Box; siehe auch Abb. 5A). Damit die ribosomale 30S Untereinheit an ein Transkript binden kann, muss dieser Bereich jedoch einzelsträngig vorliegen (Scharff et al., 2011). *Trans*-Faktoren, die innerhalb der zweiten Haarnadel binden, könnten diesen Bereich durch ihre Assoziation in eine einzelsträngige Form überführen und damit die *cis*-Elemente für Ribosomen zugänglich machen. Somit kommt auch dieser Bereich als putative Bindestelle für die Translationsinitiationsfaktoren HCF173 und HCF244 in Betracht.

In Grünalgen und höheren Pflanzen ist bei vielen Biogenesefaktoren die Verknüpfung einer

transkriptstabilisierenden und translationsinitiiierenden Funktion erkennbar (Schwarz et al., 2007; Prikryl et al., 2011; Schwarz et al., 2012; Hammani et al., 2012). Das Pentatricopeptide repeat (PPR) Protein PPR10 aus Mais bindet u.a. an die intergenische Region *atpI-atpH* und blockiert dadurch die weitere Prozessierung der mRNA durch 5'→3' bzw. 3'→5' Exoribonukleasen (Pfalz et al., 2009; Prikryl et al., 2011; Zhelyazkova et al., 2012). Neben seiner transkriptstabilisierenden Eigenschaft wird durch die Bindung von PPR10 auch die Sekundärstruktur der *atpH* 5'UTR remoduliert. Dadurch wird eine ribosomale Bindestelle aus dem Doppelstrang der Sekundärstruktur entlassen und ist damit für die Ribosomen zugänglich.

Der Verlust des HCF107-Faktors führt in Arabidopsis zu einer gestörten Translation und einer beeinträchtigten Stabilität von 5' prozessierten *psbH* mRNAs (Felder et al., 2001; Sane et al., 2005). HCF107 bindet an mindestens 11 Nukleotide innerhalb einer Haarnadelstruktur in der *psbH* 5'UTR, die auch das Startkodon einschließt (Hammani et al., 2012). Zum einen schützt diese Assoziation die nachfolgende mRNA vor 5'→3' Exoribonukleasen und remoduliert zum anderen die RNA-Struktur von einer größtenteils doppelsträngigen in eine überwiegend einzelsträngige für Ribosomen zugängliche Form.

Für beide Beispiele ist die Bindestelle als sRNA nachweisbar (Prikryl et al., 2011; Hammani et al., 2012; Zhelyazkova et al., 2012). Bisher wurde der Mechanismus, bei dem ein Protein die Ziel-RNA vor dem Zugriff von Ribonukleasen schützt und gleichzeitig durch seine Bindung zuvor maskierte essentielle *cis*-Elemente für Ribosomen zugänglich gemacht, nur für PPR- und PPR-ähnliche Proteine bestätigt (Schwarz et al., 2007; Prikryl et al., 2011; Schwarz et al., 2012; Hammani et al., 2012). Betrachtet man die Parallelen zwischen HCF107, PPR10, Nac2/RBP40 und HCF173/HCF244 könnte dieser Mechanismus auch die Funktionsweise von beiden HCF-Faktoren erklären. Die Voraussetzungen, wie die Existenz einer (i) Sekundärstruktur mit maskierten essentiellen *cis*-Elementen innerhalb der *psbA* mRNA sowie (ii) RNA-bindenden Domäne in HCF244 und/oder HCF173, sind erfüllt.

NADP-abhängige Oxidoreduktasen sind putative RNA-Bindeproteine

Beide Faktoren sind Mitglieder der Superfamilie der kurzkettigen Dehydrogenasen/ Reduktasen (SDR; short-chain dehydrogenase/reductase), einer großen Gruppe von NAD(P)(H)-abhängigen Oxidoreduktasen. SDRs übernehmen vielfältige Aufgaben in einer Reihe von metabolischen Prozessen (Filling et al., 2002; Kallberg et al., 2002).

Die Ähnlichkeit der SDR-Proteinen untereinander bezieht sich weniger auf ihre Proteinsequenz, die lediglich 15-30 % beträgt (Oppermann et al., 2003). Vielmehr zeigen sie hinsichtlich ihrer dreidimensionalen Architektur deutliche Gemeinsamkeiten. Eine alternier-

ende Folge von β -Faltblättern und α -Helices bildet die konservierte Rossmannfaltung aus. Sie beherbergt ein glycinreiches Motiv (TGXXXGXG), über welches die Dinukleotidcofaktoren NAD(H) oder NADP(H) gebunden werden. Eine konservierte Aminosäure in der Nähe dieses Motivs ist entscheidend an der Diskriminierung des Co-Faktors beteiligt.

Neben der Bindung des Co-Enzyms ist das glycinreiche Motiv einiger SDR-Proteine in der Lage, RNA zu binden (Hentze, 1994). In den letzten Jahren belegten immer mehr Beispiele diese zusätzliche Funktion als RNA-Bindedomäne (Hentze 1994, Nagy and Rigby, 1995; Nagy et al., 2000; Pioli et al., 2002). Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ist eines dieser Beispiele. Neben der Schlüsselfunktion innerhalb der Glykolyse wird GAPDH auch mit der Stabilisierung und Translation von verschiedenen Transkripten in Verbindung gebracht (zusammengefasst in Nagy et al., 2000). GAPDH bindet nachweislich an AU-reiche Sequenzen bzw. tRNAs und wurde darüber hinaus in der polysomalen Fraktion von T-Lymphozyten detektiert (Nagy and Rigby, 1995; Nagy et al., 2000; Singh and Green, 1993). Mutagenesestudien schränkten den RNA-bindenden Teil von GAPDH auf die ersten 43 AS ein (Nagy et al., 2000). Diese Region enthält die erste Nukleotidbindestelle des NAD(H)-Bindemotivs.

Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Lactatdehydrogenase (LDH), einem weiteren Enzym der Glykolyse, erzielt. LDH bindet über die Rossmannfaltung ebenfalls an AU-reiche Sequenzen und wurde bei Polysomengradientenanalysen in translational aktiven Bereichen detektiert (Pioli et al., 2002).

Anhand einer kürzlich erschienen Klassifizierung werden SDR-Proteine in die zwei großen Hauptgruppen der „klassischen“ und „erweiterten“ SDRs sowie in die Nebengruppen der „intermediaten“, „divergenten“, „komplexen“ und „atypischen“ SDRs unterteilt (Persson et al., 2009). HCF244 und HCF173 gehören zur Unterfamilie der atypischen SDRs. Entsprechend dieser Einordnung unterscheidet sich das glycinreiche Motiv beider HCF-Faktoren von klassischen SDRs (Tab. 1). In HCF244 gleicht es dem Co-Faktorbindemotiv von erweiterten SDRs (GXXGXXG) (Kavanagh et al., 2008), während bei HCF173 (GXXXXXXG) hingegen nur noch der erste und letzte Glycinrest dieses Motivs konserviert sind. Dennoch ist die RNA-Bindung über diese abgewandelten Motive durchaus nahe liegend. Für andere atypische SDR-Proteine, wie beispielsweise CSP41a und CSP41b, wurden RNA-bindende Eigenschaften nachgewiesen (Yang et al., 1995; Bollenbach und Stern, 2003). Beide CSP41-Proteine bilden zusammen einen Komplex (CSP41-Komplex) in Arabidopsis, der eine Reihe von photosynthetischen Transkripten (u.a. *psbA*, *psbD/C*, *psaA/B* und *rbcL*) und die unprozessierte Form der 16S (*rrn16*) bzw. 23S (*rrn23*) rRNA im Dunkeln bindet und infolgedessen stabilisiert (Qi et al., 2012). Durch Mutagenesestudien konnte die RNA-bindende Region für CSP41b auf die ersten 73 AS eingeschränkt werden (Bollenbach and Stern, 2003). Dieser Bereich enthält bei AS 60 bis 66 das glycinreiche Motiv und ist

ausreichend, um RNA zu binden. Die NAD(P)(H)-Bindedomäne beider CSP41-Proteine (GGXXXXG) ähnelt dem glycinreichen Motiv aus HCF173 (Tab. 1). Auch dort ist die Position des zweiten Glycins nicht konserviert, jedoch befindet sich ein Weiteres in direkter Nachbarschaft zum ersten Glycin. Betrachtet man die Aminosäurezusammensetzung des Bindemotivs, fällt die Anwesenheit einer positiv geladenen Aminosäure bei HCF173 (Arginin) und beiden CSP41-Proteinen (Arginin bei CSP41B; Histidin bei CSP41b) auf, während sie in HCF244 nicht anzutreffen ist (Tab. 1).

Tabelle 1: Sequenzvergleich des Dinukleotidbindemotivs verschiedener SDRs. Die Glycine des NAD(P)(H)-Bindemotivs sind fett markiert. Positiv geladene Aminosäuren sind dunkelgrau, negative geladene Aminosäuren hellgrau unterlegt.

Protein	Motiv	Sequenz
15-PGDH	TGXXXGXG	A L V T G A A Q G I G R A F A E
GAPDH	GXGXXG	I G I D G F G R I G R L V L R
CSP41A	GGXXXXG	N T N S G G H A V I G F Y F A K
CSP41B	GGXXXXG	I L I M G G T R F I G L F L S R
HCF173	GXXXXXG	V L V V G A T S R I G R I V V R
HCF244	GXXGXXG	I L V V G A T G T L G R Q I V R

Darüber hinaus befinden sich positiv geladene Aminosäuren in unmittelbarer Nachbarschaft des Motivs. Ob sich aus der Anwesenheit dieser positiven Ladungen innerhalb der Gly-Motive eine Relevanz für die RNA-Assoziation ergibt, bleibt Gegenstand zukünftiger Untersuchungen. Interessant in diesem Zusammenhang ist jedoch, dass die Gegenwart von positiv geladenen Aminosäureresten innerhalb und in Nachbarschaft des Gly-Motivs auch bei anderen nachweislich RNA-bindenden SDR-Proteinen wie GAPDH nachgewiesen werden kann (Tab. 1).

Vergleichbar zu GAPDH oder LDH könnten HCF173 und/oder HCF244 ebenfalls AU-reiche Bereiche in der *psbA* 5'UTR ansteuern. Diese befinden sich (i) in direkter Nachbarschaft des zweiten niedrigabundanten Terminus bei -48, (ii) in der terminalen Schleife der zweiten Haarnadel (AU-Box) und (iii) 9 nt stromaufwärts des Startkodons innerhalb eines Bereiches der eine partielle Basenpaarung mit der SD-Sequenz (RBS3) ausbildet. Die Co-Lokalisation der sRNAs und der putativen Endonukleaseschnittstelle bzw. der AU-Box weist zudem auf eine mögliche Proteininteraktion hin. Darüber hinaus bindet an die Region von -9 bis -43 mindestens ein Protein (Shen et al., 2001). Die Nähe dieser putativen HCF-Bindestellen zur vermeintlichen Endonukleaseschnittstelle, den ribosomalen Bindestellen und dem Translationsstart bietet eine optimale Voraussetzung für die essentielle Rolle, die durch die HCF-Faktoren innerhalb der D1-Synthese eingenommen wird.

HCF244 und HCF173 als putative Bindeglieder zwischen Photosynthese und Genexpression

Zahlreiche Studien belegen die enge Verknüpfung zwischen dem Redoxstatus und der Genexpression einer Zelle (Salvador and Klein, 1999; Barnes and Mayfield, 2003; Pfannschmidt, 2003; Cohen et al., 2005; Omari et al., 2005; Zheng et al., 2007; Zhao et al., 2008; Dietz and Pfannschmidt, 2011; Qi et al., 2012). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass einige gut untersuchte SDR-ähnliche Proteine als Redoxsensoren wirken.

NmrA gehört wie HCF244 und HCF173 zu den atypischen SDRs. Er wirkt in Pilzen als transkriptionaler Repressor, der die Aktivität des Transkriptionsfaktors AreA reguliert (zusammengefasst in Macios et al., 2012). NmrA interagiert mit AreA über hydrophobe und polare Wechselwirkung (Kotaka et al., 2008). Die Bindestellen von NmrA und der DNA-Zielsequenz sind bei AreA in direkter Nachbarschaft zueinander angeordnet und lassen damit die gleichzeitige Bindung beider Komponenten nicht zu. NmrA bindet über das Gly-Motiv (NXXGXXA) sowohl NAD^+ als auch NADP^+ , diskriminiert aber zwischen reduzierten und oxidierten Dinukleotidcofaktoren (Stammers et al., 2001; Lamb et al., 2003). Daher wird vermutet, dass NmrA den Redoxstatus der Zelle mit der Transkription verbindet (Lamb et al., 2003). Die Interaktion mit AreA wird jedoch offensichtlich nicht über die Bindung des Co-Faktors gesteuert (Kotaka et al., 2008). In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass die humane NmrA-Homologe HSCARG ebenfalls als NADPH-Sensor agieren soll, der in Abhängigkeit des zellulären NADPH/NADP^+ Levels die Aktivität eines ratenbestimmenden Enzyms der NO-Synthese reguliert und damit Einfluss auf die zelluläre NO-Akkumulation nimmt (Zheng et al., 2007; Zhao et al., 2008).

CC3/TIP30 ist ein proapoptotisches Onkogen (Shtivelman, 1997). Seine tumorunterdrückenden Eigenschaften sollen aus der Inhibition des nuklearen Transports aufgrund der Bindung des Importin $\beta 2$ bzw. einer Rolle in der transkriptionalen Regulation resultieren. Die biologische Aktivität des SDR-Proteins erfordert die Bindung von NADPH und verbindet somit vergleichbar zu NmrA den Redoxstatus der Zelle mit der Regulation der Genexpression (El Omari et al., 2005).

Der CSP41-Komplex bindet, wie bereits erwähnt, im Dunkeln in Abhängigkeit des Redoxstatus des Stromas an seine Ziel-RNAs und stabilisiert sie infolgedessen (Qi et al., 2012). Die nur sehr fragmentarisch erhaltene katalytische Tetrade deutet im Zusammenhang mit dem stark abgewandelten NAD(P)(H) -Bindemotiv nicht auf eine herkömmliche Funktion als Oxidoreduktase. Dennoch fungiert der CSP41-Komplex als Redoxsensor. Wahrgenommen werden die Änderungen des Redoxstatus vermutlich über posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung oder Lysinacetylierung (zusammengefasst in Qi et al.,

2012). Außerdem besitzen beide CSP41-Proteine redoxaktive Cysteinste und CSP41a gilt als putatives Ziel von Thioredoxinen (zusammengefasst in Qi et al., 2012).

Auch für HCF244 und HCF173 wäre eine Funktion als Bindeglied zwischen der Photosynthese und der Genexpression denkbar. Die redoxabhängige Bindung eines 30 und eines 43 kDa Proteins an die *psbA* 5'UTR in *A.thaliana* lieferte erste Indizien für die Existenz eines redoxabhängigen Regulationsmechanismus ähnlich zu *Chlamydomonas* (Shen et al., 2001). Dort soll ein Komplex aus den vier Untereinheiten RB38, RB47, RB55 und RB60 in Abhängigkeit des Redoxstatus an die Haarnadelstruktur in der *psbA* 5'UTR binden und infolgedessen die D1-Synthese regulieren (Danon and Mayfield, 1991,1994; Mayfield et al., 1994; Yohn et al., 1996). Die Bindeaktivität des Komplexes korreliert dabei direkt mit dem Level der D1-Translation und wird über das Ferredoxin-Thioredoxinsystem, einer Serin/Threonin Protein Phosphatase und dem stromalen pH-Wert reguliert (Danon and Mayfield, 1994; Trebitsh et al., 2001; Alergand et al., 2006).

Voraussetzung für die Funktion als Redoxsensor ist die Fähigkeit, den Redoxstatus des Chloroplasten wahrzunehmen und weiterleiten zu können. Wie sich u.a. am Beispiel der CPS41 Proteine oder RB47 zeigt, können intramolekulare reaktive Cysteine diese Aufgabe übernehmen. Ein Regulationsmechanismus auf dieser Ebene ist jedoch im Falle der HCF-Faktoren eher unwahrscheinlich, da auf der Basis verschiedener Vorhersageprogramme (DiANNA 1.1, Ferre and Clote, 2005a,b,2006; DISULFIND, Ceroni et al., 2006) weder HCF244 noch HCF173 intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden.

Eine weitere Möglichkeit der Wahrnehmung bietet die Bindung eines Co-Enzyms. Ob HCF244 ein Co-Enzym bindet, wurde bisher nicht untersucht. Vergleichbar zu den NAD(P)(H)-bindenden SDRs, wie CC3, ist jedoch auch bei HCF244 das typische Dinukleotidbindemotiv der erweiterten SDRs (GXXGXXG) erhalten. Somit ist die Assoziation eines Co-Enzyms vorstellbar. Darüber hinaus ist in HCF244 die für die Bindung des Co-Enzyms wichtige konservierte Aminosäure (Asparaginsäure) in der Nähe des Gly-Motives ebenfalls erhalten. Diese Aminosäure ist auch bei HCF173 konserviert, jedoch weicht das NAD(P)(H) Bindemotiv durch den Verlust des zweiten Glycinrestes von erweiterten SDRs ab. Ob dennoch ein Co-Faktor über diese Region gebunden werden kann, müsste auf experimentellem Weg erschlossen werden. Dafür bieten sich beispielsweise isotherme Titrationskalorimetriemessungen mit dem aufgereinigten rekombinanten HCF-Protein an.

Die enzymatische Aktivität von SDRs wird über ein zweites Motiv, die katalytische Tetrade (N-S-Y-K), vermittelt (Jörnvall et al., 1995, Filling et al., 2002). Im Verlauf der enzymatischen Reaktion erfolgt der Hydridtransfer zwischen Co-Faktor und Substrat (zusammengefasst in Oppermann et al., 2003 und Kavanagh et al., 2008). Tyrosin (Y) wirkt dabei als katalytische Säure bzw. Base, indem seine Hydroxygruppe Protonen an das Substrat abgibt bzw. von diesem annimmt. Das benachbarte Lysin bindet den Co-Faktor über die Hydroxygruppe der

Nicotinamidribose und fixiert seine Position während der enzymatischen Reaktion. Darüber hinaus senkt Lysin in Kombination mit dem oxidierten, positiv geladenen Co-Enzym den pK_a von Tyrosin und wirkt somit unterstützend. Eine weitere wichtige Komponente des Protonenübertragungssystems ist ein Wassermolekül, das durch die Carbonylgruppe des konservierten Asparagins (N) gebunden wird und dadurch in Wasserstoffbrückendistanz zum katalytisch wichtigen Lysin des YXXXX Motivs positioniert wird. Das ebenfalls konservierte Serin (S) stabilisiert und polarisiert hingegen die Carbonylseitenkette des Substrates.

In HCF244 ist das aktive Zentrum (N-S-Y-K) mit D-(S)-L-K stark abgewandelt und bei HCF173 (D-V-K) nur noch rudimentär vorhanden. Bei beiden HCF-Proteinen ist nur noch Lysin (K) erhalten. Tyrosin wurde durch die aliphatischen Aminosäuren Leucin (L) bzw. Valin (V) ersetzt. Diesen Aminosäuren fehlt die für den Protonentransfer wichtige Hydroxygruppe. Mit dem Austausch von Asparagin (N) durch Asparaginsäure (D) bleibt zwar die für die Ligation des Wassermoleküls wichtige Carbonylgruppe erhalten, jedoch spricht die Abwesenheit des für die Dehydrogenase/Reduktaseaktivität essentiellen Tyrosins (Jörnvall et al., 1995) eher für den Verlust der enzymatischen Aktivität beider HCF-Proteine.

Die Weiterleitung des Redoxsignales könnte trotz der Degenerierung auch über die Region um die katalytische Tetrade der HCF-Proteine erfolgen, jedoch nicht in Form einer enzymatischen Reaktion, sondern über eine Protein-Proteininteraktion. Einen Hinweis darauf liefert CC3 (El Omari et al., 2005). Bei diesem SDR-Protein sind alle katalytisch aktiven Aminosäuren konserviert, jedoch besitzen sie aufgrund ihrer veränderten Orientierung offensichtlich keine enzymatische Aktivität mehr. Stattdessen bindet CC3 seinen Interaktionspartner Importin $\beta 2$ u.a. über zwei Aminosäuren, die in direkter Nachbarschaft zum YXXXX Motiv liegen (El Omari et al., 2005). Die Interaktion wird durch die Mutation der NADPH-Bindestelle beeinträchtigt und deutet somit auf eine regulative Funktion des Co-Faktors hin (King and Shtivelman, 2004; El Omari et al., 2005). Übertragen auf HCF244 bzw. HCF173 wäre über einen solchen Mechanismus die transiente Interaktion der HCF-Proteine miteinander oder mit anderen Interaktionspartnern denkbar. Die Interaktion könnte dabei über die Bindung des Co-Faktors reguliert werden.

Eine redoxregulierte Interaktion zwischen beiden Faktoren, basierend auf der Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke, ist hingegen unwahrscheinlich. Diese Bindungsart ist sehr stabil und die Ergebnisse der BN-PAGE bzw. Saccharosegradienten lieferten keinen Hinweis auf einen gemeinsamen Komplex.

Daraus ergibt sich folgendes Arbeitsmodell (Abb. 11): HCF173 bindet über sein Co-Faktorbindemotiv an das *psbA*-Transkript und schützt es dadurch vor endo- und exonukleolytischem Angriffen. Gleichzeitig dient HCF173 als Ankerpunkt für eine direkte oder indirekte, transiente Interaktion mit HCF244, durch die HCF244 zu seiner Bindestelle rekrutiert wird. Als putative Bindebereiche könnten AU-reiche Sequenzen innerhalb der

Haarnadelstruktur dienen. Infolge dieser Bindung werden die ribosomalen Bindestellen demaskiert und damit die Translation initiiert.

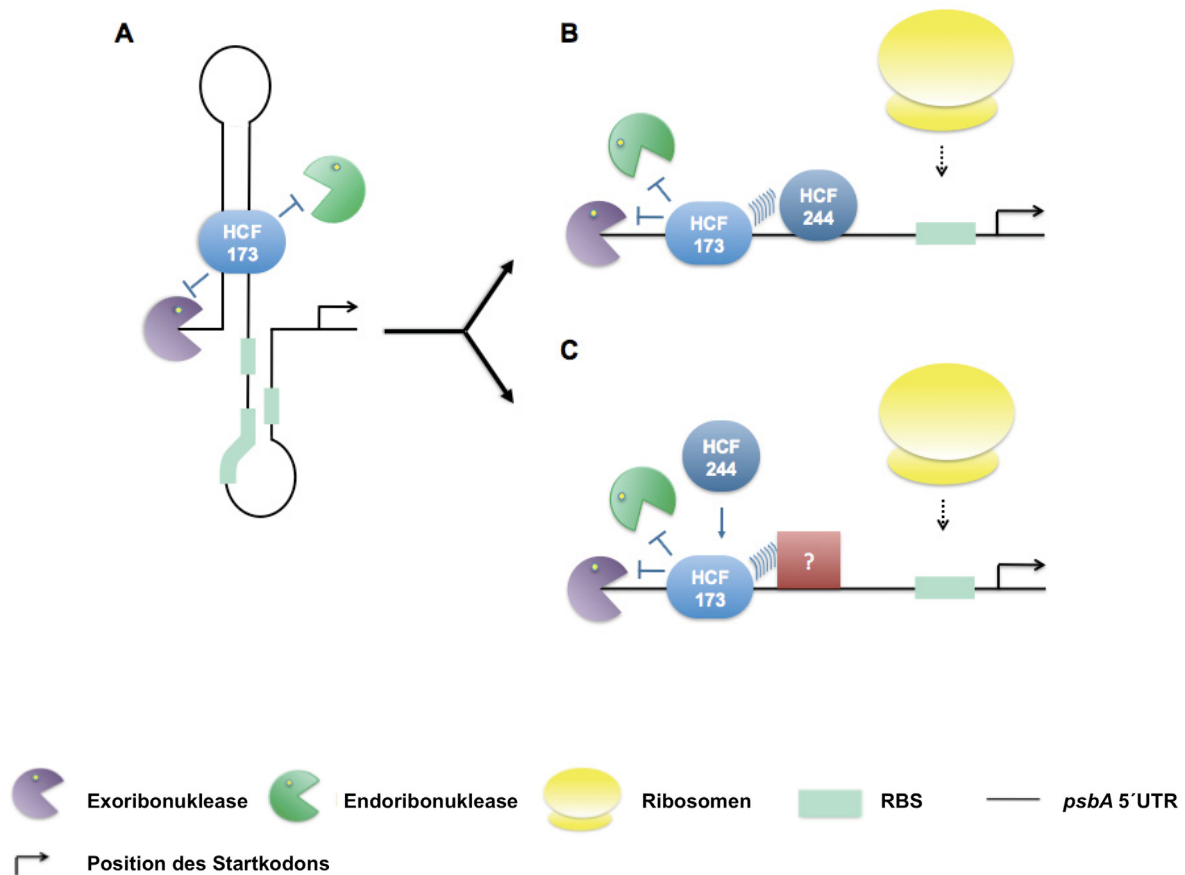


Abb. 11: Regulationsmodell der HCF244- und HCF173 Funktion. (A) Stabilisierung der *psbA* mRNA infolge der Blockierung von Exo- und/oder Endoribonukleasen durch HCF173. (B) und (C) Demaskierung ribosomaler Bindestellen infolge des Strukturverlustes im Bereich der translationalen Initiationszone. Die Umstrukturierung wird durch die Rekrutierung von HCF244 (B) bzw. eines unbekannten *trans*-Faktors (C) hervorgerufen. RBS-ribosomale Bindestelle

Ebenfalls vorstellbar wäre, dass HCF244 in Abhängigkeit des Redoxstatus des Co-Faktors an HCF173 bindet und dadurch dessen Aktivität beeinflusst. Infolge seiner Aktivierung kann HCF173 nun als Ankerpunkt für dritte Translationsinitiationsfaktoren dienen, die nun an die 5'UTR rekrutiert werden können und dadurch die Sekundärstruktur remodulieren.

Eine Interaktion von HCF244 und HCF173 könnte in beiden Fällen durch ein hohes NADP/NADPH Verhältnis im Chloroplasten stimuliert werden und würde so eine direkte Regulation der D1-Translation ermöglichen.

Methoden

Pflanzenanzucht und Selektion von *hcf*-Mutanten

Für die sterile Pflanzenanzucht wurde das Saatgut 5 Minuten mit einem Gemisch aus 25% (v/v) DanKlorix (Colgate-Palmolive GmbH, Hamburg) und 0.02% (v/v) TritonX-100 inkubiert und anschließend 4 mal mit sterilem Wasser gewaschen. Das oberflächensterilisierte Saatgut wurde auf 1/2 MS Medium (Murashige und Skoog, 1962) (1% (w/v) Saccharose, 0.5 g/l MES, 2.35 g/l MS-Salze; pH 5,7 und 0.3% (w/v) Gelrite) ausplattiert und anschließend für mindestens 3 Tage bei 4°C stratifiziert. Die Anzucht der Keimlinge erfolgte unter Langtagbedingungen (16h/8h Licht-/Dunkelrhythmus) in einem Anzuchtschrank (Philips MASTER TL-D 36W/865) bei 22°C und einer Lichtintensität von 60 bis 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ für zwei bis drei Wochen.

Für Experimente in denen ausschließlich mit wildtypischen Arabidopsis Pflanzen gearbeitet wurde, erfolgte die Aussaat nach der Oberflächensterilisation und Stratifikation auf Floraton I-Erde (Floragard, Oldenburg). Bei einer Lichtintensität von 50 bis 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ wurde der Wildtyp unter Kurztagbedingungen (8h/16h Licht-/Dunkelrhythmus) bei etwa 21°C für vier bis sechs Wochen in einer Klimakammer angezogen. Für die Untersuchung des 24 stündigen Expressionsverlaufs wurde der Wildtyp abweichend unter Langtagbedingungen angezogen.

Allgemeine proteinanalytische Methoden

Isolierung von Gesamtmembranen. Das Pflanzenmaterial wurde unter Zugabe von flüssigem Stickstoff in einem Mörser zu einem feinen Pulver zermahlen. Anschließend wurde das Pulver in vorgekühltes Homogenisationsmedium (50 mM Tris/HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 2 mM EGTA, 10 mM DTE (frisch dazu gegeben)) überführt und solange gerührt, bis sich alle Pulverklümpchen aufgelöst haben. Das Homogenat wurde dann durch zwei Lagen Miracloth filtriert und bei 4°C und 10 000 UpM im SS34-Festwinkelrotor zentrifugiert. Die sedimentierten Thylakoidmembranen wurden in Carbonatpuffer (100 mM Na_2CO_3 , 10% (w/v) Saccharose, 50 mM DTE) aufgenommen.

Isolierung von grob aufgereinigten Thylakoidmembranen. Für die Blue Native-PAGE und die Saccharosegradienten wurden vier bis sechs Wochen alte Arabidopsis Wildtyp-Pflanzen bzw. zwei bis drei Wochen alte *hcf*-Mutanten und der Wildtyp in einem Waring-Blender in 10 ml 1x Lysisbuffer (10 mM HEPES/KOH (pH 7.8), 25 mM KCl, 10 mM MgCl_2) pro Gramm Frischgewicht für 3 x 2 Sekunden homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat durch zwei Lagen Miracloth filtriert und 2 Minuten bei 4 °C und 6 000 UpM im

GSA-Rotor zentrifugiert. Für die BN-PAGE wurden die Thylakoidmembranen in einem Volumen von etwa 10 bis 15 μl 1x ACA-Puffer (750 mM ϵ -Aminocapronsäure, 50 mM Bis-Tris, 0.5 mM EDTA; pH 7.0) pro Gramm Frischgewicht rückgelöst. Für andere Anwendungen wurden die Membranen in ca. 10 bis 15 μl 1x Lysispuffer pro Gramm Frischgewicht resuspendiert.

Bestimmung der Chlorophyllkonzentration. Für die Bestimmung der Chlorophyllkonzentration wurden 2.5 μl Thylakoidmembransuspension in 1 ml 80% (v/v) Aceton resuspendiert, für 1 Minute gevortext und anschließend für 5 Minuten bei 13 000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Absorptionsbestimmung bei den Wellenlängen 645 nm und 663 nm eingesetzt. Für die Berechnung der Chlorophyllkonzentration wurden die Formeln von Chory et al. (1991) und die spezifischen Absorptionskoeffizienten von MacKinney (1941) herangezogen. Daraus ergeben sich für die Berechnung der Chlorophyllkonzentration folgende Gleichungen: $\text{Chl a} = 12.7 \times A_{663} - 2.69 \times A_{645}$ und $\text{Chl b} = 22.9 \times A_{645} - 4.48 \times A_{663}$. Die Gesamtchlorophyllkonzentration bildet die Summe aus der Chlorophyll a (Chl a)- und Chlorophyll b (Chl b)- Konzentration in der Einheit $\mu\text{g/ml}$.

Bestimmung der Proteinkonzentration. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (1976). Dafür wurde die Membranproteinprobe je nach Bedarf 1:10 bzw. 1:20 verdünnt und davon 20 μl mit 1 ml Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München) versetzt. Nach sofortigem vortexen und anschließender 10 minütiger Inkubation wurde die Absorption im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Zusätzlich wurde die Absorption einer Verdünnungsreihe von 0.1 bis 1 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA) gemessen, um anhand der daraus erstellten Eichgerade die Konzentration der Membranproteine bestimmen zu können.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Membranproteinen wurden die diskontinuierlichen Gelsysteme nach Lämmli (1970) bzw. Schägger (Schägger und von Jagow, 1987) verwendet. Bei beiden Gelsystemen umfasste die Trennstrecke 14 bis 18 cm bei einer Geldicke von 0.1 cm.

Im Lämmli-Gelsystem setzt sich das Trenngel aus 10% (v/v) Polyacrylamid (30%ige Stammlösung mit einem Verhältnis von Acrylamid: Bismethylenbisacrylamid von 29:1, Sigma-Aldrich, München), 375 mM Tris/HCl (pH 8.8) und 0.1% (w/v) SDS zusammen. Das Sammelgel enthielt 5% Polyacrylamid, 125 mM Tris/HCl (pH 6.8) und 0.1% (w/v) SDS. Für die Gelelektrophorese wurde ein Laufpuffer (pH 8.8) bestehend aus 192 mM Glycin, 25 mM Tris/HCl und 0.1% (w/v) SDS eingesetzt. Vor dem Beladen des Gels wurden die Proben mit einem Volumen 2x Lämmli-Probenpuffer (90 mM Tris/HCl pH 6.8, 40% (v/v) Glycerin, 2% SDS, 0.02% (w/v) Bromphenolblau und 0.25 mM DTT) versetzt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 30 Sekunden auf 70°C erhitzt und für 10 Minuten bei 13 000 UpM zentrifugiert, um ungelöste Bestandteile zu sedi-

mentieren. Die Elektrophorese erfolgte in der ersten Stunde bei 60 V. Nachdem die Proben in das Gel eingelaufen waren, wurde die Elektrophorese bei 100 V über Nacht fortgesetzt.

Im Schägger-Gelsystem setzte sich das Trenngel aus 10% (v/v) Polyacrylamid (40%ige Stammlösung, Verhältnis 32:1, Sigma-Aldrich), 1 M Tris/HCl (pH 8.45), 0.1% (w/v) SDS und 13.3% (w/v) Glycerin zusammen. Das Sammelgel bestand aus 4% (v/v) Polyacrylamid, 740 mM Tris/HCl (pH 8.45) und 0.74% (w/v) SDS. Im Schäggersystem wird ein Anodenpuffer (1 M Tris/HCl pH 8.9) und sowie ein Kathodenpuffer (100 mM Tris/HCl, 100 mM Tricin und 0.1% (w/v) SDS; pH 8.45) als Elektrophoresepuffer verwendet. Die Proteinproben wurden mit einem Volumen 2x Schägger-Probenpuffer (100 mM Na_2CO_3 , 10% (w/v) Saccharose, 50 mM DTE, 5% (w/v) SDS und 0.02% Bromphenolblau) versetzt und im Anschluss wie im Lämmli-System weiter verfahren.

Elektrotransfer von Proteinen. Für den immunologischen Nachweis von Zielproteinen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine mit Hilfe einer Trockenblot-Apparatur (CTI, Taunusstein) auf eine Nitrocellulose- (0.45µm, BA79, Whatman, Dassel) bzw. eine PVDF(Polyvinylidenfluorid)-Membran (0.45µm, Hybond-P, GE Healthcare, Freiburg) transferiert. Der Transferpuffer (96 mM Glycin, 10 mM Tris und 10% (v/v) Methanol) wurde nach Towbin et al. (1979) eingesetzt. Der Transfer wurde 2 Stunden bei einer konstanten Stromstärke von 0.35 mA/cm^2 durchgeführt. Um freie Proteinbindeplätze zu besetzen, wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in TBS-B (20 mM Tris/HCl pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween20, 5% (w/v) Magermilchpulver) inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran 3 x 10 Minuten mit TBS-T (20 mM Tris/HCl pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween20) gewaschen.

Ponceaurot-Färbung von filtergebundenen Proteinen. Die Membran wurde etwa 1 Minute in der Ponceaurot-Färbelösung (2% (w/v) Ponceaurot, 3% (w/v) Trichloressigsäure) geschwenkt. Anschließend wurde die Membran mit bidestillierten Wasser gewaschen, bis die Hintergrundfärbung verschwand.

Immunodetektion von filtergebundenen Proteinen. Für den immunologischen Nachweis filtergebundener Proteine wurde die Membran 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit dem Erstantikörper (Verdünnung 1:1000 bis 1:5000 in TBS-T) auf einem Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Sollte ein HCF-Protein nachgewiesen werden, wurde der Erstantikörper in einer Verdünnung von 1:400 über Nacht eingesetzt. Im Falle des HCF173-Antikörpers führte die Ausdehnung der Inkubationszeit auf 3 Tage zu einem Anstieg der Signalintensität. Im Anschluss wurde die Membran 3 x 10 Minuten in TBS-T gewaschen und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit dem Sekundäntikörper (Anti-Rabbit-Peroxidase-Konjugat, Verdünnung 1:80 000 in TBS-T, A9169, Sigma-Aldrich) inkubiert. Für die Detektion von HCF-Proteinen wurde als Substrat Super-signal West Femto Maximum Sensivity Substrate (Thermo Scientific, Asheville, USA) nach

Herstellerangaben in jedoch reduzierter Menge eingesetzt. Für alle anderen Nachweisreaktionen wurde das ECL-(Enhanced Chemiluminescence) System (GE Healthcare) eingesetzt. Alle Antikörpersignale wurden mit dem LAS-4000 System (Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf) detektiert.

2D-(Blue Native-/SDS-) Gelelektrophorese

Membranproteinkomplexe und ihre Untereinheiten wurden durch die 2D-Blue Native-PAGE nach Schagger (Schagger et al., 1994) aufgetrennt. Homogenisation und Solubilisierung des wildtypischen Blattmaterials erfolgten wie in Schult et al. (2007) beschrieben, mit der Ausnahme, dass das homogenisierte Blattmaterial zwei Minuten zentrifugiert wurde. Für die erste Dimension wurde das 6 bis 16%ige Gradientengel (Trennstrecke 14 bis 18 cm) mit jeweils 70 µg Chlorophyll pro Spur beladen. Um die molekulare Größe der detektierten Proteinkomplexe abschätzen zu können, wurden zusätzlich verschiedene Größenstandards (HMW Native Marker Kit, GE Healthcare; Native Marker Liquid Mix for BN/CN, Serva, Heidelberg) nach Herstellerangaben aufgetragen.

Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation plastidärer Membrankomplexe und RNase-Behandlung

Thylakoidmembranen wurden wie unter Punkt beschrieben isoliert und zunächst auf eine Chlorophyllkonzentration von 2 µg/µl eingestellt.

Wurde mit *hcf*-Mutanten gearbeitet, erfolgte zuvor die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford. Um vergleichbare Solubilisierungsbedingungen zwischen den Mutanten und dem Wildtyp zu gewährleisten, wurde vom Wildtyp neben der Chlorophyllkonzentration ebenfalls die Proteinkonzentration bestimmt. Anschließend wurden die *hcf*-Mutanten vorerst auf die Proteinkonzentration eingestellt, die im Wildtyp einer Chlorophyllkonzentration von 2 µg/µl entspricht.

Die Solubilisierung der Thylakoidmembranen erfolgte bei einer Chlorophyllkonzentration von 1 µg/µl in 1% (w/v) n-Dodecyl-β-D-Maltosid für 30 Minuten bei 4°C auf einem Drehinkubator. Nicht solubilisiertes Material wurde durch einen 30 minütigen Zentrifugationsschritt bei 13 000 UpM und 4°C sedimentiert.

Für die RNase-Behandlung wurden den solubilisierten Thylakoidmembranen RNaseA in einer Endkonzentration von 4 U/ml zugesetzt und für eine Stunde bei 4°C zeitgleich mit den unbehandelten Thylakoidmembranen auf dem Drehinkubator inkubiert.

Die Saccharosegradienten (12.5 ml) wurden mit Hilfe eines Gradientenmischers gegossen. Sie umfassten eine Saccharosekonzentration von 0.1 M bis 0.5 M in 1x Lysispuffer und 0.06% (w/v) n-Dodecyl- β -D-Maltosid. Jeder Gradient wurde mit einem Äquivalent, entsprechend 500 μ g Chlorophyll, beladen und 16 bis 17 Stunden bei 180 000 x g bei 4 °C im SW40Ti-Rotor zentrifugiert. Anschließend wurden mit Hilfe eines Gradientenernters (Beckmann Coulter, Krefeld) 1 ml Fraktionen vom Boden ausgehend geerntet. Die darin enthaltenen Proteine wurden mit 15% (w/v) Trichloressigsäure präzipitiert, in 80 % (v/v) Aceton gewaschen und anschließend in 60 μ l 3,33% (w/v) SDS resuspendiert. Zur besseren Rücklösung wurde das Pellet mit einem Pistil zerrieben und mit 20 μ l 4x Probenpuffer ohne SDS versetzt.

Zur Größenabschätzung der Proteinkomplexe wurde pro Lauf ein Gradient mit dem Native Marker Liquid Mix for BN/CN (Serva) beladen. Dafür wurden 20 μ l Marker in 400 μ l 1x Lysispuffer (darin enthalten 0.06% (w/v) n-Dodecyl- β -D-Maltosid) aufgenommen und komplett aufgetragen.

Literatur

- Alergand T, Peled-Zehavi H, Katz Y and Danon A** (2006) The chloroplast protein disulfide isomerase RB60 reacts with a regulatory disulfide of the RNA-binding protein RB47. *Plant Cell Physiol* **47**: 540-548
- Alexander C, Faber N and Klaff P** (1998) Characterization of protein-binding to the spinach chloroplast *psbA* mRNA 5' untranslated region. *Nucleic Acids Res* **26**: 2265-2272
- Barnes D and Mayfield SP** (2003) Redox control of posttranscriptional processes in the chloroplast. *Antioxid Redox Signal* **5**: 89-94
- Bollenbach TJ and Stern DB** (2003) Secondary structures common to chloroplast mRNA 3'-untranslated regions direct cleavage by CSP41, an endoribonuclease belonging to the short chain dehydrogenase/reductase superfamily. *J Biol Chem* **278**: 25832-25838
- Bowden GA, Paredes AM and Georgiou G** (1991) Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Biotechnology* **9**: 725-30
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Bruick RK and Mayfield SP** (1998) Processing of the *psbA* 5' Untranslated Region in *Chlamydomonas reinhardtii* Depends upon Factors Mediating Ribosome Association. *J Cell Biol* **143**: 1145-1153
- Ceroni A, Passerini A, Vullo A and Frasconi P** (2006) DISULFIND: a Disulfide Bonding State and Cysteine Connectivity Prediction Server. *Nucleic Acids Research* **34** (Web Server issue): W177-W181
- Chory J, Nagpal P and Peto CA** (1991) Phenotypic and Genetic Analysis of *det2*, a New Mutant That Affects Light-Regulated Seedling Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **3**: 445-459
- Cohen I, Knopf JA, Irihimovitch V and Shapira M** (2005) A proposed mechanism for the inhibitory effects of oxidative stress on Rubisco assembly and its subunit expression. *Plant Physiol* **137**: 738-746
- Danon A and Mayfield SP** (1991) Light regulated translational activators: identification of chloroplast gene specific mRNA binding proteins. *Embo J* **10**: 3993-4001
- Danon A and Mayfield SP** (1994) Light-regulated translation of chloroplast messenger RNAs through redox potential. *Science* **266**: 1717-1719
- Deng XW and Gruissem W** (1987) Control of plastid gene expression during development: the limited role of transcriptional regulation. *Cell* **49**: 379-387
- Deshpande NN, Bao Y and Herrin DL** (1997) Evidence for light/redox-regulated splicing of *psbA* pre-RNAs in *Chlamydomonas* chloroplasts. *RNA* **3**: 37-48
- Devlin PF and Kay SA** (2001) Circadian photoperception. *Annu. Rev. Physiol.* **63**: 677-694
- Dietz KJ and Pfannschmidt T** (2011) Novel regulators in photosynthetic redox control of plant metabolism and gene expression. *Plant Physiol* **155**: 1477-1485
- Edhofer I, Mühlbauer SK and Eichacker LA** (1998) Light regulates the rate of translation elongation of chloroplast reaction center protein D1. *Eur J Biochem* **257**: 78-84
- El Omari K, Bird LE, Nichols CE, Ren J and Stammers DK** (2005) Crystal structure of CC3 (TIP30): implications for its role as a tumor suppressor. *J Biol Chem* **280**: 18229-18236
- Erickson JM, Rahire M and Rochaix JD** (1984) *Chlamydomonas reinhardtii* gene for the 32 000 mol. wt. protein of photosystem II contains four large introns and is located entirely within the chloroplast inverted repeat. *EMBO J* **3**: 2753-2762
- Erickson JM, Rahire M, Malnoë P, Girard-Bascou J, Pierre Y, Bennoun P and Rochaix JD** (1986) Lack of the D2 protein in a *Chlamydomonas reinhardtii* *psbD* mutant affects photosystem II stability and D1 expression. *EMBO J* **5**: 1745-1754
- Eriksson J, Salih GF, Ghebramedhin H and Jansson C** (2000) Deletion mutagenesis of the 5' *psbA2* region in *Synechocystis* 6803: identification of a putative cis element involved in photoregulation. *Mol Cell Biol Res Commun* **3**: 292-298

- Ermakova-Gerdes S and Vermaas W** (1999) Inactivation of the open reading frame *slr0399* in *Synechocystis* sp. PCC 6803 functionally complements mutations near the Q(A) niche of photosystem II: a possible role of *Slr0399* as a chaperone for quinone binding. *J Biol Chem* **274**: 30540–30549
- Felder S, Meierhoff K, Sane AP, Meurer J, Driemel C, Plücken H, Klaff P, Stein B, Bechtold N and Westhoff P** (2001) The nucleus-encoded HCF107 gene of *Arabidopsis* provides a link between intercistronic RNA processing and the accumulation of translation competent *psbH* transcripts in chloroplasts. *Plant Cell* **13**: 2127–2141
- Ferre F and Clote P** (2005a) Disulfide connectivity prediction using secondary structure information and diresidue frequencies. *Bioinformatics* **21**: 2336–2346
- Ferre F and Clote P** (2005b) **DiANNA: a web server for disulfide connectivity prediction**. *Nucleic Acids Res* **33**(Web Server issue): W230–232
- Ferre F and Clote P** (2006) DiANNA 1.1: an extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification. *Nucleic Acids Res* **34** (Web Server issue): W182–185
- Filling C, Berndt KD, Benach J, Knapp S, Prozorovski T, Nordling E, Ladenstein R, Jörnvall H and Oppermann U** (2002) Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. *J Biol Chem* **277**: 25677–25684
- Giuliano G, Hoffman NE, Ko K, Scolnik PA and Cashmore AR** (1988) A light-entrained circadian clock controls transcription of several plant genes. *EMBO J* **7**: 3635–3642
- Hammani K, Cook WB and Barkan A** (2012) RNA binding and RNA remodeling activities of the half-a-tetratricopeptide (HAT) protein HCF107 underlie its effects on gene expression. *PNAS* **109**: 5651–5656
- Hartwell J** (2005 Nov) The co-ordination of central plant metabolism by the circadian clock. *Biochem Soc Trans* **33**: 945–948
- Hennessey TL and Field CB** (1991) Circadian Rhythms in Photosynthesis' Oscillations in Carbon Assimilation and Stomatal Conductance under Constant Conditions. *Plant Physiol.* **96**: 831–836
- Hennessey TL and Field CB** (1992) Evidence of multiple circadian oscillators in bean plants. *J Biol Rhythms.* **7**: 105–113
- Hentze MW** (1994) Enzymes as RNA-binding proteins: a role for (di) nucleotide-binding domains? *Trends Biochem Sci* **19**: 101–103
- Herranen M, Aro EM and Tyystjärvi T** (2001) Two distinct mechanisms regulate the transcription of photosystem II genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Physiol Plant* **112**: 531–539
- Herrin DL, Bao Y, Thompson AJ and Chen YF** (1991) Self-splicing of the *Chlamydomonas* chloroplast *psbA* introns. *Plant Cell* **3**: 1095–1107
- Hirose T and Sugiura M** (1996) Cis-acting elements and trans-acting factors for accurate translation of chloroplast *psbA* mRNAs: development of an in vitro translation system from tobacco chloroplasts. *EMBO J* **15**: 1687–1695
- Jörnvall H, Persson B, Krook M, Atrian S, González-Duarte R, Jeffery J and Ghosh D** (1995) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* **34**: 6003–6013
- Kallberg Y, Oppermann U, Jörnvall H and Persson B** (2002) Short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) relationships: a large family with eight clusters common to human, animal, and plant genomes. *Protein Sci* **11**: 636–641
- Kavanagh KL, Jörnvall H, Persson B and Oppermann U** (2008) Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: the SDR superfamily. Functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cell Mol Life Sci* **65**: 3895–3906
- Kim M, Christopher DA and Mullet JE** (1993) Direct evidence for selective modulation of *psbA*, *rpoA*, *rbcL* and 16S RNA stability during barley chloroplast development. *Plant Mol Biol* **22**: 447–463
- Kim J, Eichacker LA, Rudiger W and Mullet JE** (1994) Chlorophyll regulates accumulation of the plastid-encoded chlorophyll proteins P700 and D1 by increasing apoprotein stability. *Plant Physiol* **104**: 907–916
- Kim J, Klein PG and Mullet JE** (1991) Ribosomes pause at specific sites during synthesis

- of membrane-bound chloroplast reaction center protein D1. *J Biol Chem* **266**: 14931–14938
- Kim J and Mayfield SP** (1997) Protein disulfide isomerase as a regulator of chloroplast translational activation. *Science* **278**: 1954–1957
- Kim J and Mayfield SP** (2002) The active site of the thioredoxin-like domain of chloroplast protein disulfide isomerase, RB60, catalyzes the redox-regulated binding of chloroplast poly(A)-binding protein, RB47, to the 5' untranslated region of *psbA* mRNA. *Plant Cell Physiol* **43**: 1238–1243
- King FW and Shtivelman E** (2004) Inhibition of Nuclear Import by the Proapoptotic Protein CC3. *Mol Cell Biol* **24**: 7091–7101
- Klaff P and Gruissem W** (1995) A 43 kD light-regulated chloroplast RNA-binding protein interacts with the *psbA* 5' non-translated leader RNA. *Photosyn Res* **46**: 235–248
- Klaff P, Mundt SM and Steger G** (1997) Complex formation of the spinach chloroplast *psbA* mRNA 5' untranslated region with proteins is dependent on the RNA structure. *RNA* **3**: 1468–1479
- Klein RR, Mason HS and Mullet JE** (1988) Light-regulated translation of chloroplast proteins. I. Transcripts of *psaA-psaB*, *psbA*, and *rbcL* are associated with polysomes in dark-grown and illuminated barley seedlings. *J Cell Biol* **106**: 289–301
- Klein RR and Mullet JE** (1987) Control of gene expression during higher plant chloroplast biogenesis. Protein synthesis and transcript levels of *psbA*, *psaA-psaB*, and *rbcL* in dark-grown and illuminated barley seedlings. *J Biol Chem* **262**: 4341–4348
- Kloppstech K** (1985) Diurnal and circadian rhythmicity in the expression of light-induced plant nuclear messenger RNAs. *Planta* **165**: 502–506
- Kloppstech K** (2003) Light regulation of photosynthetic genes. *Physiologia Plantarum* **100**: 739–747
- Kotaka M, Johnson C, Lamb HK, Hawkins AR, Ren J and Stammers DK** (2008) Structural analysis of the recognition of the negative regulator NmrA and DNA by the zinc finger from the GATA-type transcription factor AreA. *J Mol Biol* **381**: 373–382
- Lamb HK, Leslie K, Dodds AL, Nutley M, Cooper A, Johnson C, Thompson P, Stammers DK and Hawkins AR** (2003) The negative transcriptional regulator NmrA discriminates between oxidized and reduced dinucleotides. *J Biol Chem* **278**: 32107–32114
- Lämmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685
- Li F, Holloway SP, Lee J and Herrin DL** (2002) Nuclear genes that promote splicing of group I introns in the chloroplast 23S rRNA and *psbA* genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* **32**: 467–480
- Link S** (2007) Diplomarbeit: Molekularbiologische Analyse der Photosynthesemutanten *hcf126* und *hcf173* von *Arabidopsis thaliana*
- Link S, Engelmann K, Meierhoff K and Westhoff P** (2012) The atypical short-chain dehydrogenases HCF173 and HCF244 are jointly involved in translational initiation of the *psbA* mRNA of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **160**: 2202–2218
- Lyska DA** (2011) Dissertation: Analyses on the Formation of Regulatory Systems for Expression and Maturation of Photosynthetic Complexes in *Arabidopsis thaliana*
- MacKinney G** (1941) Absorption of light by chlorophyll solutions. *J Biol Chem* **140**: 315–322
- Mayfield SP, Cohen A, Danon A and Yohn CB** (1994) Translation of the *psbA* mRNA of *Chlamydomonas reinhardtii* requires a structured RNA element contained within the 5' untranslated region. *J Cell Biol* **127**: 1537–1545
- McClung CR and Kay SA** (1994) Circadian rhythms in *Arabidopsis thaliana*. In EM Meyerowitz, CR Somerville, eds, *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 615–637
- Mitraki A and King J** (1989) Protein Folding Intermediates and Inclusion Body Formation. *Nature Biotech* **7**: 690 - 697
- Mockler TC, Michael TP, Priest HD, Shen R, Sullivan CM, Givan SA, McEntee C, Kay S and Chory J** (2007) The DIURNAL project: DIURNAL and circadian expression

- profiling, model-based pattern matching, and promoter analysis. Cold Spring Harb Symp Quant Biol **72**: 353-363
- Mühlbauer SK and Eichacker LA** (1999) Light-dependent formation of the photosynthetic proton gradient regulates translation elongation in chloroplasts, J Biol Chem **273**: 20935–20940
- Müller B and Eichacker LA** (1999) Assembly of the D1 precursor in monomeric photosystem II reaction center precomplexes precedes chlorophyll a-triggered accumulation of reaction center II in barley etioplasts. Plant Cell **11**: 2365-2377
- Mulo P, Sakurai I and Aro EM** (2012) Strategies for psbA gene expression in cyanobacteria, green algae and higher plants: from transcription to PSII repair. Biochim Biophys Acta **1817**: 247–257
- Mulo P, Sicora C and Aro EM** (2009) Cyanobacterial psbA gene family: optimization of oxygenic photosynthesis. Cell Mol Life Sci **66**: 3697–3710
- Nagy E, Henics T, Eckert M, Miseta A, Lightowlers RN and Kellermayer M** (2000) Identification of the NAD⁺-binding fold of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a novel RNA-binding domain. Biochem Biophys Res Commun **275**: 253–260
- Nagy F, Kay SA and Chua NH** (1988) A circadian clock regulates transcription of the wheat *Cab-1* gene. Genes Dev **2**: 376–382
- Nagy E and Rigby WFC** (1995) Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Selectively Binds AU-rich RNA in the NAD⁺-binding Region (Rossmann Fold). J Biol Chem **270**: 2755-2763
- Nakahira Y, Baba K, Yoneda A, Shiina T, and Toyoshima Y** (1998) Circadian-regulated transcription of the *psbD* light-responsive promoter in wheat chloroplasts. Plant Physiol **118**: 1079-1088
- Nickelsen J** (1998) Chloroplast RNA stability, in: J.D. Rochaix, M. Goldschmidt-Clermont, S. Merchant (Eds.), The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 151–163
- Olinares PDB, Ponnala L and van Wijk KJ** (2010) Megadalton Complexes in the Chloroplast Stroma of *Arabidopsis thaliana* Characterized by Size Exclusion Chromatography, Mass Spectrometry, and Hierarchical Clustering. Mol Cell Proteomics **9**: 1594–1615
- Oppermann U, Filling C, Hult M, Shafqat N, Wu X, Lindh M, Shafqat J, Nordling E, Kallberg Y, Persson B and Jörnvall H** (2003) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update Chem Biol Interact **143-144**: 247–253
- Persson B, Kallberg Y, Bray JE, Bruford E, Dellaporta SL, Favia AD, Duarte RG, Jörnvall H, Kavanagh KL, Kedishvili N, Kisiela M, Maser E, Mindnich R, Orchard S, Penning TM, Thornton JM, Adamski J and Oppermann U** (2009) The SDR (short-chain dehydrogenase/ reductase and related enzymes) nomenclature initiative. Chem Biol Interact **178**: 94–98
- Pfalz J, Bayraktar O, Prikryl J and Barkan A** (2009) Site-specific binding of a PPR protein defines and stabilizes 5' and 3' mRNA termini in chloroplasts. EMBO J **28**: 2042-2052
- Pfannschmidt T** (2003) Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. Trends Plant Sci **8**: 33–41
- Piechulla B** (1999) Circadian expression of the light-harvesting complex protein genes in plants. Chronobiology Int. **16**: 115 – 128
- Pioli PA, Hamilton BJ, Connolly JE, Brewer G and Rigby WF** (2002) Lactate dehydrogenase is an AU-rich element-binding protein that directly interacts with AUF1. J Biol Chem **277**: 35738–35745
- Prikryl J, Rojas M, Schuster G and Barkan A** (2011) Mechanism of RNA stabilization and translational activation by a pentatricopeptide repeat protein. PNAS **108**: 415–420
- Qi, Y, Armbruster U, Schmitz-Linneweber C, Delannoy E, de Longevialle AF, Rühle T, Small I, Jahns P and Leister D** (2012) Arabidopsis CSP41 proteins form multimeric complexes that bind and stabilize distinct plastid transcripts. J Exp Bot **63**: 1251-1270
- Ruhlman T, Verma D, Samson N and Daniell H** (2010) The Role of Heterologous

- Chloroplast Sequence Elements in Transgene Integration and Expression. *Plant Phys* **152**: 2088–2104
- Ruwe H and Schmitz-Linneweber C** (2012) Short non-coding RNA fragments accumulating in chloroplasts: footprints of RNA binding proteins? *Nucleic Acids Res* **40**: 3106–3116
- Salvador ML and Klein U** (1999) The redox state regulates RNA degradation in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **121**: 1367–1374
- Salvador ML, Klein U and Bogorad L** (1993) Light-regulated and endogenous fluctuations of chloroplast transcript levels in *Chlamydomonas*. Regulation by transcription and RNA degradation. *Plant J* **3**: 213–219
- Samuelsson G, Sweeney BM, Matlick HA and Prézélin BB** (1983) Changes in Photosystem II Account for the Circadian Rhythm in Photosynthesis in *Gonyaulax polyedra*. *Plant Physiol* **73**: 329–331
- Sane AP, Stein B and Westhoff P** (2005) The nuclear gene HCF107 encodes a membrane associated R-TPR (RNA tetratricopeptide repeat)-containing protein involved in expression of the plastidial psbH gene in Arabidopsis. *Plant J* **42**: 720–730
- Schägger H, Cramer WA and von Jagow G** (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem* **217**: 220–230
- Schägger H and von Jagow G** (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**: 368–379
- Scharff LB, Childs L, Walther D and Bock R** (2011) Local Absence of Secondary Structure Permits Translation of mRNAs that Lack Ribosome-Binding Sites. *PLoS Genet* **7**: e1002155
- Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier R and Barkan A** (2005) RNA Immunoprecipitation and Microarray Analysis Show a Chloroplast Pentatricopeptide Repeat Protein to Be Associated with the 5' Region of mRNAs Whose Translation It Activates. *Plant Cell* **17**: 2791–2804
- Schult K** (2005) Dissertation: Molekularbiologische und biochemische Analysen zur Funktion des nukleären Hilfsfaktors HCF173 bei der Biogenese des Photosystems II in *Arabidopsis thaliana*
- Schult K, Meierhoff K, Paradies S, Töller T, Wolff P and Westhoff P** (2007) The nuclear-encoded factor HCF173 is involved in the initiation of translation of the psbA mRNA in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **19**: 1329–46
- Schwarz C, Bohne AV, Wang F, Cejudo FJ and Nickelsen J** (2012) An intermolecular disulfide-based light switch for chloroplast psbD gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Journal* **72**: 378–389
- Schwarz C, Elles I, Kortmann J, Piotrowski M and Nickelsen J** (2007) Synthesis of the D2 Protein of Photosystem II in *Chlamydomonas* Is Controlled by a High Molecular Mass Complex Containing the RNA Stabilization Factor Nac2 and the Translational Activator RBP40. *Plant Cell* **19**: 3627–3639
- Shen Y, Danon A and Christopher DA** (2001) RNA binding-proteins interact specifically with the Arabidopsis chloroplast psbA mRNA 5' untranslated region in a redox-dependent manner. *Plant Cell Physiol* **42**: 1071–1078
- Shtivelman E** (1997) A link between metastasis and resistance to apoptosis of variant small cell lung carcinoma. *Oncogene* **14**: 2167–2173
- Singh R and Green MR** (1993) Sequence-specific binding of transfer RNA by glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase. *Science* **259**: 365–368
- Singh SM and Panda AK** (2005) Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng* **99**: 303–310
- Somanchi A, Barnes D and Mayfield SP** (2005) A nuclear gene of *Chlamydomonas reinhardtii*, Tba1, encodes a putative oxidoreductase required for translation of the chloroplast psbA mRNA. *Plant J* **42**: 341–352
- Stammers DK, Ren J, Leslie K, Nichols CE, Lamb HK, Cocklin S, Dodds A and Hawkins AR** (2001) The structure of the negative transcriptional regulator NmrA reveals a

- structural superfamily which includes the short-chain dehydrogenase/reductases. *EMBO J* **20**: 6619–6626
- Staub JM and Maliga P** (1993) Accumulation of D1 polypeptide in tobacco plastids is regulated via the untranslated region of the *psbA* mRNA. *EMBO J* **12**: 601–606
- Stelljes C and Koenig F** (2007) Specific binding of D1 protein degradation products to the *psbA* promoter in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Bacteriol* **189**: 1722–1726
- Sweeney BM** (1987) *Rhythmic Phenomena in Plants*. Academic Press
- The QIAexpressionist™ Manual**, A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. 2003 Fifth Edition. Qiagen
- Tohdoh N and Sugiura M** (1982) The complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from tobacco chloroplasts. *Gene* **17**: 213–218
- Trebitsh T, Meiri E, Ostersetzer O, Adam Z and Danon A** (2001) The protein disulfide isomerase-like RB60 is partitioned between stroma and thylakoids in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *J Biol Chem* **276**: 4564–4569
- Troncoso-Ponce MA and Mas P** (2012) Newly described components and regulatory mechanisms of circadian clock function in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* **5**: 545–553
- Tyagi AK and Gaur T** (1997) Light Regulation of Nuclear Photosynthetic Genes in Higher Plants. *Critical Reviews Plant Sci* **22**: 417–452
- Tyystjärvi T, Herranen M and Aro EM** (2001) Regulation of translation elongation in cyanobacteria: membrane targeting of the ribosome nascent-chain complexes controls the synthesis of D1 protein. *Mol Microbiol* **40**: 476–484
- Tyystjärvi T, Sirpio S and Aro EM** (2004) Post-transcriptional regulation of the *psbA* gene family in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *FEBS Lett* **576**: 211–215
- Yang J, Usack L, Monde RA and Stern DB** (1995) The 41 kDa protein component of the spinach chloroplast *petD* mRNA 3' stem-loop: protein complex is a nuclear encoded chloroplast RNA-binding protein. *Nucleic Acids Symp Ser* **33**: 237–239
- Yohn CB, Cohen A, Danon A and Mayfield SP** (1996) Altered mRNA binding activity and decreased translational initiation in a nuclear mutant lacking translation of the chloroplast *psbA* mRNA. *Mol Cell Biol* **16**: 3560–3566
- Zhang L and Aro EM** (2002) Synthesis, membrane insertion and assembly of the chloroplast encoded D1 protein into photosystem II. *FEBS Lett* **512**: 13–18
- Zhang L, Paakkari V, van Wijk KJ and Aro EM** (2000) Biogenesis of the chloroplast encoded D1 protein: regulation of translation elongation, insertion, and assembly into photosystem II. *Plant Cell* **12**: 1769–1782
- Zhao Y, Zhang J, Li H, Li Y, Ren J, Luo M and Zheng X** (2008) An NADPH sensor protein (HSCARG) down-regulates nitric oxide synthesis by association with argininosuccinate synthetase and is essential for epithelial cell viability. *J Biol Chem* **283**: 11004–11013
- Zheng X, Dai X, Zhao Y, Chen Q, Lu F, Yao D, Yu Q, Liu X, Zhang C, Gu X and Luo M** (2007). Restructuring of the dinucleotide-binding fold in an NADP(H) sensor protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**: 8809–8814
- Zhelyazkova P, Hammani K, Rojas M, Voelker R, Vargas-Suárez M, Börner T and Barkan A** (2012) Protein-mediated protection as the predominant mechanism for defining processed mRNA termini in land plant chloroplasts. *Nucleic Acids Res* **40**: 3092–3105
- Zou Z, Eibl C and Koop HU** (2003) The stem-loop region of the tobacco *psbA* 5'UTR is an important determinant of mRNA stability and translation efficiency. *Mol Gen Genomics* **269**: 340–349

Beitragsanteil der Autoren

SL führte alle Experimente durch und schrieb das Addendum. KM und PW haben die Arbeiten konzeptionell unterstützt. KM war in die Überarbeitung des Addendums eingebunden.

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bedanken bei...

- ... Prof. Dr. Peter Westhoff für die Möglichkeit nach der Diplomarbeit weiter mit „meinem“ HCFer(n) arbeiten zu können, die Betreuung dieser Arbeit, sein offenes Ohr und die vielen hilfreichen Diskussionen und Ratschläge.
- ... Prof. Dr. Peter Jahns für die Übernahme des Korreferates und die Einweisung und Benutzung des PAMs.
- ... Dr. Karin Meierhoff für Ihre Unterstützung bei dieser Arbeit, die vielen Ratschläge und Diskussionen und Ihr immer offenes Ohr.
- ... Hannes Ruwe für die Überlassung der sRNA-Daten.
- ... den Benutzern der unteren Klimakammer für das Gießen meiner Pflänzchen im Exil.
- ... den Angestellten des Dachgewächshauses für die Pflege meiner Pflanzen.
- ... den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der HCF-Arbeitsgruppe für die schöne Zeit und die Schwätzchen zwischen durch.
- ... Daagmaar, Susi und Dr. Kerstin für die feierabendliche Ablenkung und ihren Beistand in vielen Dingen.
- ... dem HL3 für die Ertragung meiner Wagenburgen und Bergen von Inkubationsschalen auf dem Schüttler. Danke für den Spaß, den wir hatten, wenn auch (oder gerade weil) wir von Zeit zu Zeit von Flo mit Scooter gequält worden sind.
- ... allen Mitgliedern der Botanik IV für die schöne Arbeitsatmosphäre, die vielen Gespräche und das leckere Essen zu den Geburtstagen und Feiern (wer mich kennt, weiß warum ich das schreibe).
- ... meinen alten und neuen Freunden und ganz besonders meinen Eltern und meinem Bruder für die bedingungslose Unterstützung in den Höhen und Tiefen meines Lebens. Ohne Euch wäre ich nicht die, die ich bin. Ihr seid die Sonne in meinem Herzen.