

## Chloroplastenbiogenese

# Safety first: das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und die Photosynthese

JULIA GRIMMER<sup>1</sup>, SACHA BAGINSKY<sup>2</sup>

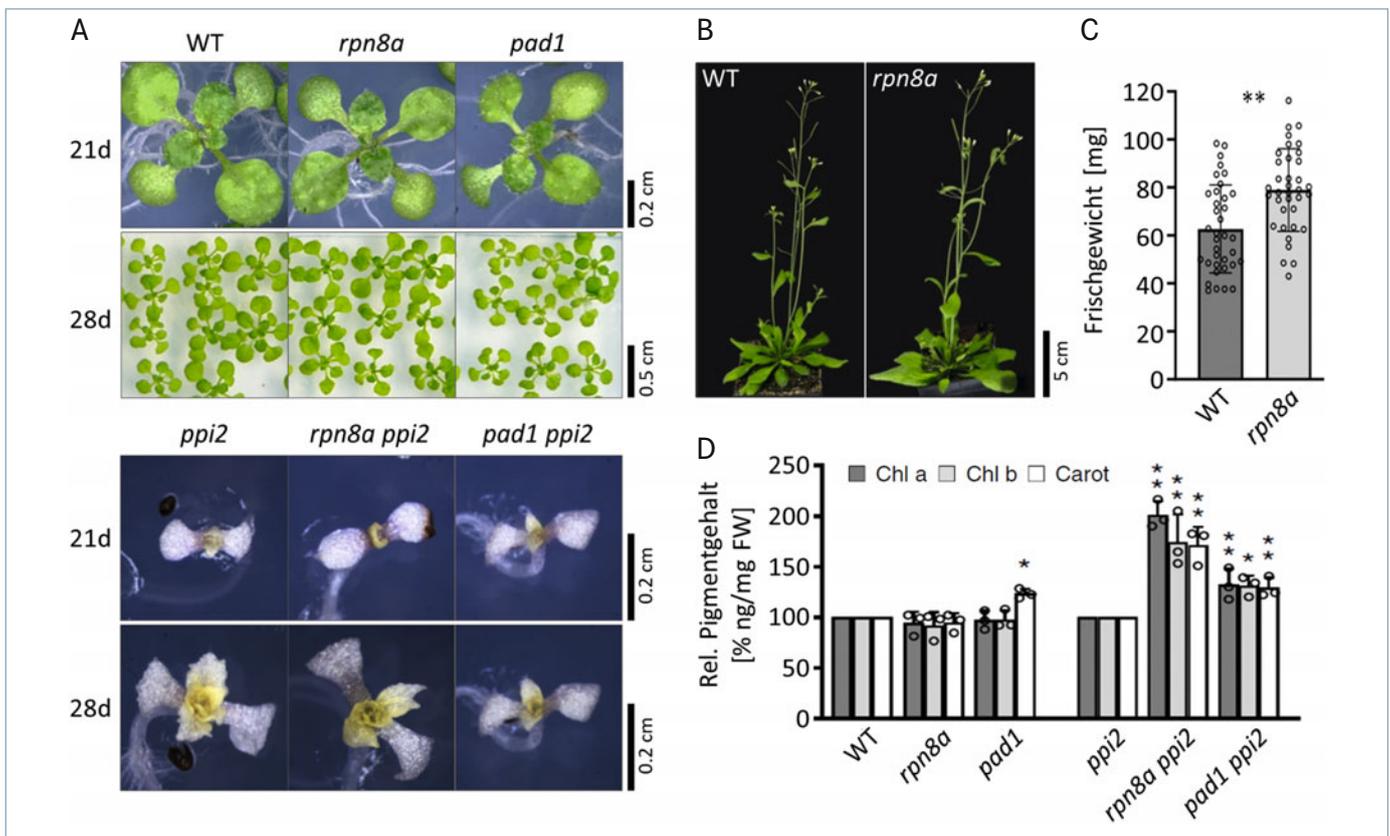
<sup>1</sup> INSTITUT FÜR BIOCHEMIE & BIOTECHNOLOGIE, UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG

<sup>2</sup> BIOCHEMIE DER PFLANZEN, FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND BIOTECHNOLOGIE, RUHR-UNIVERSITÄT BOCHUM

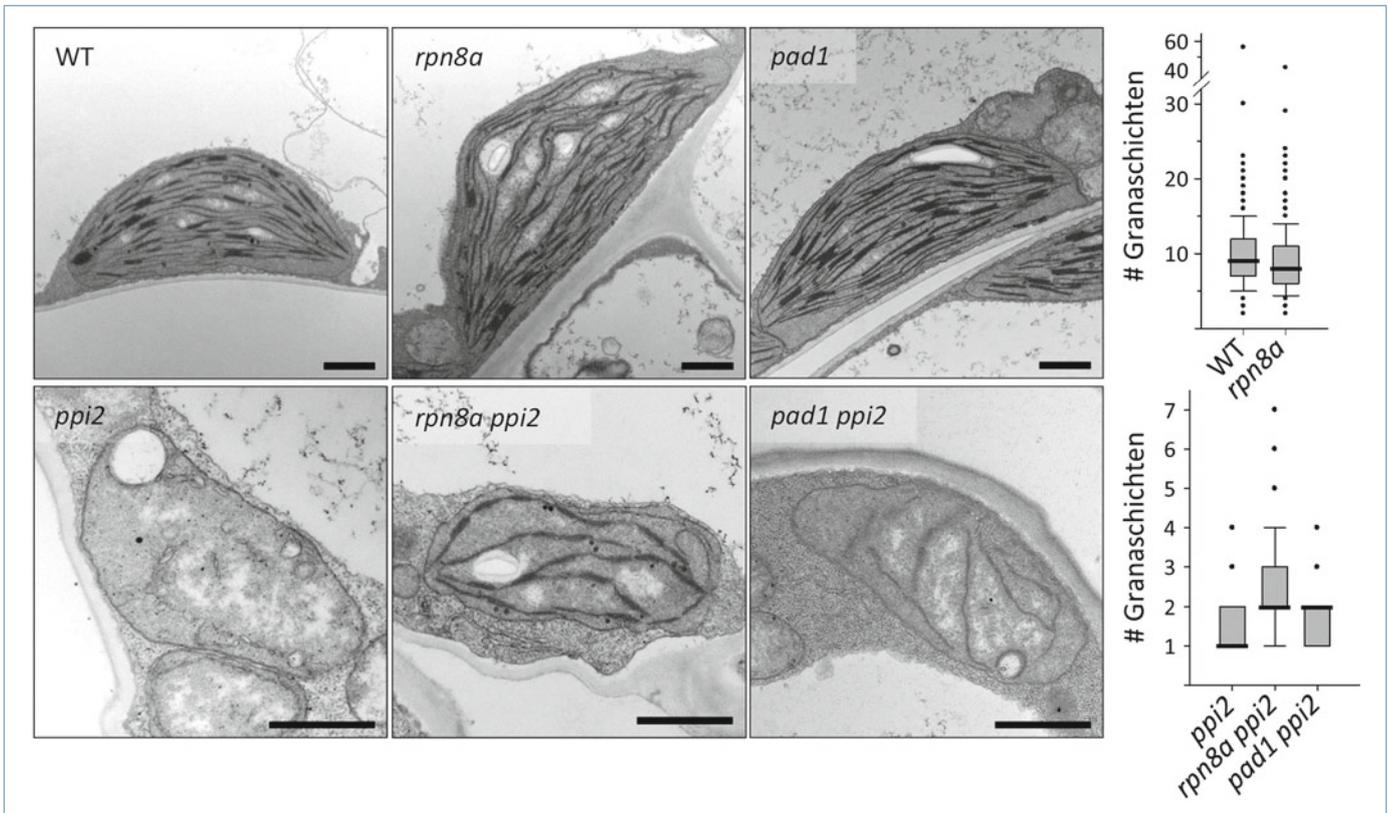
**The proteasome is essential for the control of protein turnover in the nucleus and the cytosol of eukaryotic cells. Chloroplasts and mitochondria import thousands of nuclear-encoded proteins as precursor proteins from the cytosol. We show that mild genetic proteasome impairment interferes with a cytosolic equilibrium between precursor protein import and degradation resulting in elevated precursor protein abundance in the cytosol and improved photosynthetic performance.**

DOI: 10.1007/s12268-021-1597-1  
© Die Autoren 2021

■ Mit der Umwandlung von Lichtenergie in chemisch nutzbare Energie ist die Photosynthese einer der bedeutendsten biochemischen Prozesse der Erde. Die Reaktionen der Photosynthese sind in spezialisierten Zellorganellen, den Chloroplasten, lokalisiert. Chloroplasten entstanden vor etwa zwei Milliarden Jahren durch die Aufnahme eines Vorfahren der heutigen Cyanobakterien in eine eukaryotische Wirtszelle im Rahmen der Endosymbiose. Zur Etablierung des Endosymbionten als Zellorganell ist ein Großteil der ursprünglich im Bakterium enthaltenen Erbinformation in den Kern des eukaryotischen Wirts übergegangen [1]. Basierend auf Genomvorhersagen sind in höheren Pflanzen



▲ **Abb. 1:** Charakterisierung der Pflanzenlinien von *Arabidopsis thaliana* [8]. **A,** Erscheinungsbild von Wildtyp (WT), *rpn8a*, *pad1*, *ppi2*, *rpn8appi2* und *pad1ppi2*. **B,** Adulte WT- und *rpn8a*-Pflanzen (35 d). **C,** Durchschnittliches Frischgewicht von *rpn8a*- und Wildtyp-Pflanzen. **D,** Gehalte der photosynthetischen Pigmente Chlorophyll a (Chl a), Chlorophyll b (Chl b) und Carotinoide (Carot) in den angegebenen Genotypen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen; signifikante Unterschiede sind mit einem (p-Wert < 0.05) oder zwei Sternen (p-Wert < 0.005) nach zweiseitigem, ungepaar-tem T-Test gekennzeichnet. Abbildung modifiziert nach [8].



▲ **Abb. 2:** Transmissionselektronenmikroskopie(TEM)-Aufnahmen von Plastiden der angegebenen Genotypen von *Arabidopsis thaliana* [8]. Plastiden der Doppelmutanten, insbesondere von *rpn8appi2*, weisen deutlich differenziertere Membranstrukturen als Plastiden von *ppi2* auf. Dies zeigt sich in der erhöhten Anzahl an Granathylakoiden im Vergleich zu *ppi2* [8]. Dargestellt ist ein Box-Plot zur Anzahl der Thylakoidstapel in den angezeigten Genotypen ( $n = 153$  Plastiden, 459 Thylakoidstapel). Die schwarze Linie kennzeichnet den Median, i. e. *ppi2* = 1, *rpn8a ppi2* = 2, und *pad1 ppi2* = 2. Abbildung modifiziert nach [8].

etwa 2.500–3.000 plastidäre Proteine kerncodiert; diese werden im Cytosol translatiert und posttranslational in die Plastiden importiert [2].

Kerncodierte plastidäre Proteine werden als Vorläuferproteine im Cytosol translatiert. Die meisten davon tragen eine N-terminale Erkennungssequenz, das Transitpeptid, das den Import über die Translokationskomplexe der äußeren (TOC) und inneren (TIC) Chloroplastenhüllmembran ins Stroma vermittelt [2]. Der Import von Vorläuferproteinen in Plastiden ist essenziell für die Chloroplastenbiogenese. Ein Defekt im plastidären Proteinimport, wie z. B. in der *plastid protein import 2 (ppi2)*-Mutante, resultiert in einem albinotischen Phänotyp, in dem die Chloroplastenbiogenese gestört ist und die Plastiden in einem proplastidenähnlichen Stadium verbleiben [3, 4].

### Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und die Chloroplastenbiogenese

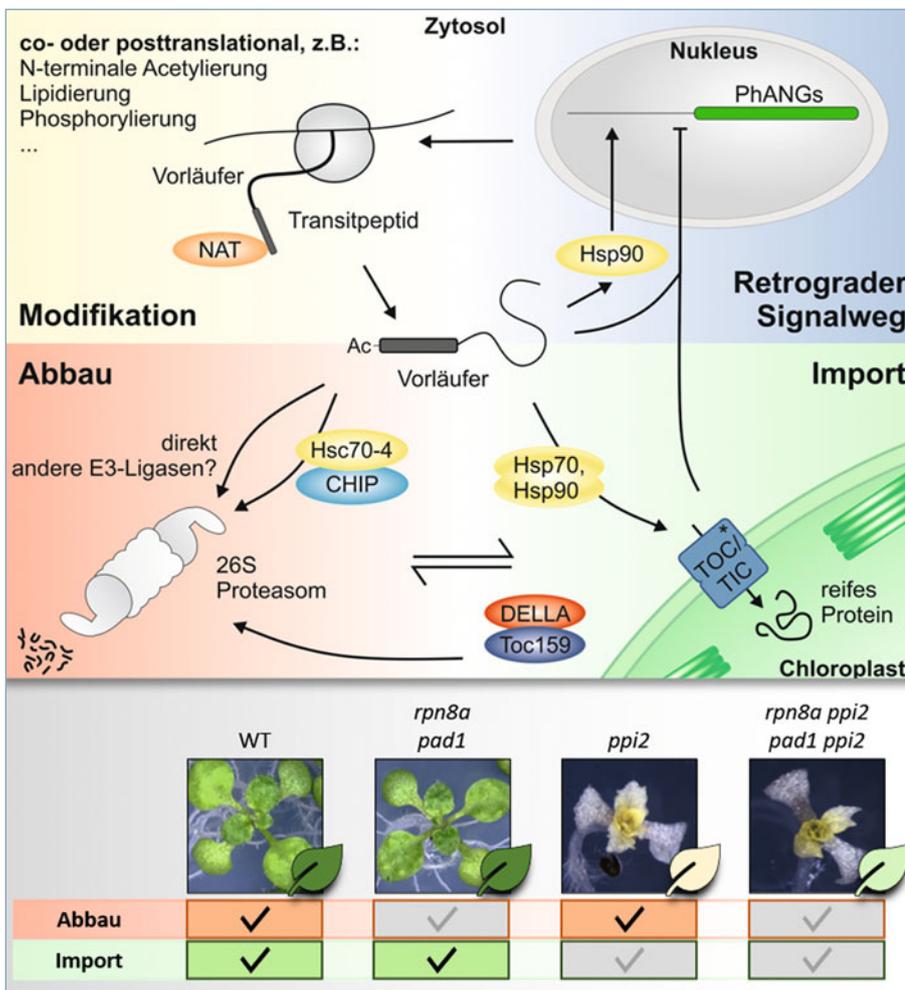
Für die gezielte Degradation von Proteinen im Cytosol und im Zellkern werden diese

durch kovalente Bindung von Ubiquitin markiert und von einem multikatalytischen Enzymkomplex, dem 26S-Proteasom, degradiert. Dieses Degradationssystem wird auch als Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) bezeichnet. Der 26S-Proteasomkomplex besteht aus zwei kleineren Proteinkom-

plexen, einer 700-kDa-Einheit, die nach ihrem Sedimentationskoeffizient 20S-Proteasom oder 20S *catalytic particle* (CP) benannt ist und einer ebenfalls etwa 700-kDa-Einheit eines ATPase regulatorischen Komplexes (PA700), auch 19S *regulatory particle* (RP) genannt, der an einem oder

# Hier steht eine Anzeige.

 Springer



▲ **Abb. 3:** Die Interaktionen plastidärer Vorläuferproteine im Cytosol. Veränderungen im Gleichgewicht zwischen den konkurrierenden Prozessen Vorläuferimport und -degradation können durch posttranslationale Modifikationen sowie Änderungen der Proteasomaktivität eingeleitet werden. Akkumulierende Vorläufer können Einfluss auf die Signalprozesse zwischen Plastid und Zellkern nehmen und damit eine Veränderung photosynthetischer Parameter induzieren [9]. Die funktionelle Interaktion von Proteinimport und -abbau ist im unteren Abbildungsteil phänotypisch illustriert. Abbildung modifiziert nach [9].

beiden Enden mit dem 20S CP assoziiert sein kann [5, 6].

In höheren Pflanzen konnte kürzlich ein direkter Einfluss des Proteasoms auf das Proteinimportsystem und damit auf die Chloroplastenbiogenese identifiziert werden. Zum Beispiel steuert die DELLA-Protein-vermittelte Degradation von Toc159 die Regulation der Chloroplastenbiogenese in einer frühen Entwicklungsphase [7]. Ein neu entdeckter Proteindegradationsweg ist mit Chloroplasten assoziiert und wird deshalb als CHLORAD (*chloroplast-associated protein degradation*) bezeichnet. Hier vermitteln drei Proteine (SP1, SP2 und CDC48) die Ubiquitinierung und Retrotranslokation von TOC-Komponenten und deren Abbau über das UPS. CHLORAD hat möglicherweise eine

Funktion bei der Reorganisation der Importmaschinerie der äußeren Hüllmembran, um die dynamische Regulation des Chloroplastenproteoms unter Stressbedingungen oder bei Entwicklungsprozessen zu ermöglichen [2].

### Die Proteasom-vermittelte Vorläuferdegradation beeinflusst die Photosyntheseleistung

In unseren Arbeiten haben wir einen bisher unbekanntem Mechanismus für die proteasomale Kontrolle plastidärer Prozesse identifiziert. Wir konnten zeigen, dass eine leichte Veränderung der Proteasomaktivität zu einer verbesserten Photosyntheseleistung im Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* führt. Zunächst haben wir Pflanzenlinien mit

Mutationen im 19S RP des Proteasoms identifiziert und den Effekt auf die Proteasombundanz sowie die proteolytische Aktivität untersucht (**Abb. 1**). Eine Mutation in der 19S-RP-Untereinheit *non-ATPase subunit 8a* (*Rpn8a*) führt zu einer signifikanten Erhöhung der 20S-Untereinheit, die vermutlich kompensatorische Funktion besitzt. So ist die proteolytische Gesamtaktivität trotz einer signifikanten Verringerung der 19S-Untereinheit nicht verändert [8]. Untersuchungen auf Transkriptebene zeigten dennoch klare Anzeichen für proteolytischen Stress in den *rpn8a*-Mutanten, denn die Expression der Komponenten des proteasomalen *stress regulators* (PSR) ist signifikant erhöht [8].

Vor dem Hintergrund dieser Änderung im UPS haben wir die *rpn8a*-Mutante mit der Proteinimportmutante *ppi2* gekreuzt, um die Chloroplastenbiogenese in *rpn8appi2*-Doppelmutanten zu untersuchen (**Abb. 1**). Hier zeigte sich eine teilweise Wiederherstellung der Chloroplastenbiogenese in der Doppelmutante im Vergleich zur *ppi2*-Einzelmutante (**Abb. 1** und **2**). Die Doppelmutante bildet vermehrt Thylakoidstapel und ist photosynthetisch aktiver als *ppi2*, was besonders durch Stärkeakkumulation am Ende der Belichtungsphase deutlich wird (**Abb. 2**). Darüber hinaus akkumulieren erhöhte Mengen der photosynthetischen Pigmente Chlorophyll und Carotinoide sowie von Thylakoidmembranproteinen in *rpn8appi2* (**Abb. 1** und **2**). Dieser Effekt der *rpn8a*-Mutation ist nicht auf die Doppelmutante beschränkt, denn auch die *rpn8a*-Einzelmutante zeigt verbesserte Photosyntheseleistung und gesteigerte Biomasseproduktion unter Wachstumskammerbedingungen im Vergleich zum Wildtyp (**Abb. 1**, [8]).

Um den Einfluss der erhöhten 20S-Aktivität zu verstehen, haben wir nachfolgend eine weitere Proteasommutante mit einem Defekt in der 20S-CP-Untereinheit *proteasome subunit alpha-type 1* (*PAD1*) analysiert. Diese Mutante hat im Gegensatz zu *rpn8a* eine signifikant verringerte Menge an 20S CP, während das 19S RP unverändert ist (Hristou und Baginsky, unveröffentlicht). Auch diese Mutation führt in Kombination mit *ppi2* (*pad1ppi2*) zu einer erhöhten Thylakoidstapelanzahl (**Abb. 2**). Diese Daten legen nahe, dass das UPS einen generellen Effekt auf die Chloroplastenbiogenese in importdefizienten Mutanten besitzt. Im Gegensatz zur Funktionsweise von CHLORAD ist der hier beschriebene Effekt nicht auf einen direkten Einfluss auf die TOC-Maschinerie zurück-

zuführen, denn deren Abundanz ist in den Doppelmutanten im Vergleich zu *ppi2* unverändert [8].

Es zeigt sich vielmehr, dass chloroplastische Vorläuferproteine im Cytosol der Doppelmutante in erhöhter Menge vorliegen [8]. Daraus lässt sich folgendes Modell ableiten (**Abb. 3**): Nichtimportierte Vorläuferproteine, die im Cytosol von Importmutanten normalerweise über das 26S-Proteasom abgebaut werden [9], haben in Proteasommutanten eine längere Halbwertszeit. Durch die Vergrößerung des Pools an Vorläufern im Cytosol stehen die Proteine länger für den Import durch eine kompromittierte Importmaschinerie in Mutanten zur Verfügung, was zu deren Translokation in die Plastiden führt. Der vermehrte Import plastidärer Proteine steigert die Photosyntheseleistung der importdefizienten Pflanzen. Diese Beobachtung und der Effekt der *rpn8a*-Mutation auf die Einzelmutante lassen darauf schließen, dass permanent funktionale Vorläufer durch das UPS abgebaut werden, obwohl diese zur Leistungssteigerung der Photosynthese beitragen könnten (**Abb. 3**). Hierbei scheint es sich um einen vorsorglichen Sicherheitsmechanismus zu handeln, der die Photosynthese bereits auf Ebene der Vorläuferproteine einschränkt.

Es ist zu erwarten, dass der von uns hier beschriebene Einfluss des UPS auf alle Zellorganellen wirkt, die Proteine aus dem Cytosol importieren. Tatsächlich ist ein Einfluss der UPS-Aktivität auf die Proteinakkumulation in Mitochondrien der Hefe beschrieben worden [10]. Aktuell ist unbekannt, ob – und wenn ja welche – Spezifitäten sich in diesem regulatorischen System ergeben. Es zeigt sich allerdings sowohl in unseren Arbeiten als auch in der Arbeit von Wang *et al.* 2020 ein deutlicher Einfluss des UPS auf die Akkumulation von Carotinoiden [8, 11]. Dies könnte die erhöhte Anzahl der Thylakoidstapel in beiden Doppelmutanten erklären, da Carotinoide für die Senkung der Rigidität der Thylakoidmembran wichtig sind und damit

die Bildung der Stapel vereinfachen [12]. Warum allerdings Vorläuferproteine von Enzymen der Carotinoidbiosynthese im Cytosol einer besonderen Kontrolle durch das UPS unterliegen sollen, ist völlig unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

### Danksagung

Die Arbeiten wurden durch die DFG unter AZ. BA 1902/3-2 (S. Baginsky) gefördert. ■

### Literatur

- [1] Martin W, Herrmann RG (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus. How much, what happens, and why? *Plant Physiol* 118: 9–17
- [2] Thomson SM, Pulido P, Jarvis RP (2020) Protein import into chloroplasts and its regulation by the ubiquitin-proteasome system. *Biochem Soc Trans* 48: 71–82
- [3] Bauer J, Chen K, Hiltbunner A *et al.* (2000) The major protein import receptor of plastids is essential for chloroplast biogenesis. *Nature* 403: 203–207
- [4] Bischof S, Baerenfaller K, Wildhaber T *et al.* (2011) Plastid proteome assembly without Toc159: photosynthetic protein import and accumulation of N-acetylated plastid precursor proteins. *Plant Cell* 23: 3911–3928
- [5] Sakata E, Eisele MR, Baumeister W (2021) Molecular and cellular dynamics of the 26S proteasome. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom* 1869: 140583
- [6] Sharma B, Joshi D, Yadav PK *et al.* (2016) Role of ubiquitin-mediated degradation system in plant biology. *Front Plant Sci* 7: 806
- [7] Shanmugabala V, Chahtane H, Accossato S *et al.* (2018) Chloroplast biogenesis controlled by DELLA-TOC159 interaction in early plant development. *Curr Biol* 28: 2616–2623
- [8] Grimmer J, Helm S, Dobritsch D *et al.* (2020) Mild proteasomal stress improves photosynthetic performance in Arabidopsis chloroplasts. *Nat Commun* 11: 1662

- [9] Hristou A, Grimmer J, Baginsky S (2020) The secret life of chloroplast precursor proteins in the cytosol. *Mol Plant* 13: 1111–1113
- [10] Bragoszewski P, Turek M, Chacinska A (2017) Control of mitochondrial biogenesis and function by the ubiquitin-proteasome system. *Open Biol* 7: 170007
- [11] Wang P, Wang Y, Wang W *et al.* (2020) Ubiquitination of phytoene synthase 1 precursor modulates carotenoid biosynthesis in tomato. *Commun Biol* 3: 730
- [12] Bykowski M, Mazur R, Wójtowicz J *et al.* (2021) Too rigid to fold: Carotenoid-dependent decrease in thylakoid fluidity hampers the formation of chloroplast grana. *Plant Physiol* 185: 210–227

**Funding note:** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.  
**Open Access:** Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

### Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Sacha Baginsky  
Biochemie der Pflanzen, ND3/126  
Ruhr-Universität Bochum  
Universitätsstraße 150  
D-44801 Bochum  
sacha.baginsky@rub.de

### AUTOREN



#### Sacha Baginsky

1990–1995 Biologiestudium an der Ruhr-Universität Bochum mit anschließender Promotion (1998). 1998–2000 Postdoktorand an der UC Berkeley, CA, USA. 2000–2010 Gruppenleiter an der ETH Zürich, Schweiz. 2010–2019 W3-Professor an der Universität Halle-Wittenberg. Seit 2019 Leiter des Lehrstuhls „Biochemie der Pflanzen“ der Ruhr-Universität Bochum.



#### Julia Grimmer

2004–2010 Biologiestudium an der Universität Halle-Wittenberg. 2011–2019 Wissenschaftliche Mitarbeiterin Abteilung Pflanzenbiochemie. 2019 Abschluss der Promotion. Seit 2019 wissenschaftliche Koordinatorin des Graduiertenkollegs „Kommunikation und Dynamik pflanzlicher Zellkompartimente“ an der Universität Halle-Wittenberg.