

Funktionelle Analyse des P-Klasse *pentatricopeptide repeat* Proteins DWEORG1 in Bezug auf die mitochondriale Translation in *Arabidopsis thaliana*

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Stefanie Grüttner
Kiel, 2021

Akademischer Betreuer: Prof. Dr. Frank Kempken

Gutachter: Prof. Dr. Dietrich Ober

Tag der mündlichen Prüfung: 12.04.2021

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Mitochondrien – Semi-autonome Organellen	1
1.2	<i>Pentatricopeptide repeat</i> Proteine	3
1.2.1	RNA-Bindung von PPR-Proteinen	4
1.2.2	Funktionen der PPR-Proteine	5
1.3	Regulation der Genexpression in Mitochondrien	7
1.3.1	Transkription	8
1.3.2	Reifung der 5'- und 3'-Transkriptenden	9
1.3.3	RNA-Stabilisierung/-Degradierung	11
1.3.4	RNA-Edierung	12
1.3.5	Spleißen von Introns	16
1.3.6	Post-translationale Regulierungsmechanismen	17
1.4	Translation in Mitochondrien	18
1.4.1	Mitoribosomen	20
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Geräte und Chemikalien	25
2.2	Verwendete Organismen und Anzuchtbedingungen	25
2.2.1	Verwendetes Pflanzenmaterial	25
2.2.2	Anzucht auf Erde	25
2.2.3	Anzucht in Sterilkultur	25
2.2.4	Sterile hydroponische Wurzelkulturen von <i>A. thaliana</i>	26
2.2.5	Verwendete Bakterien	27
2.2.6	Anzuchtbedingungen der verwendeten Bakterienstämme	27
2.2.7	Herstellung elektrokompenter Zellen	28
2.3	Molekularbiologische Methoden	28
2.3.1	Verwendete kommerzielle Kit-Systeme	28
2.3.2	Verwendete Oligonukleotide und Vektoren	29
2.3.3	Plasmid-DNA Isolierung aus <i>E. coli</i> Zellen	30
2.3.4	Transformation von Plasmid-DNA	30
2.3.5	Hydrolyse von DNA	31
2.3.6	Ligation von DNA	31
2.3.7	Dephosphorylierung von Nukleinsäuren	31
2.3.8	Phosphorylierung von Nukleinsäuren	32
2.3.9	Aufreinigung von PCR-Produkten und DNA aus Agarosegelen	32
2.3.10	Standard Polymerasekettenreaktion (PCR)	32
2.3.11	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	33
2.3.12	Quantitative reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	33
2.3.13	Transkriptenden-Kartierung über cRT-PCR	34
2.3.14	Gelelektrophorese	35
2.3.15	Northern Blot	36

2.3.16	RNA-Gelshift Analyse (REMSA).....	37
2.3.17	RNA-Isolierung mit TRIZOL.....	38
2.3.18	DNase-Behandlung von RNA-Proben.....	38
2.3.19	Entfernung von ribosomaler RNA für RNA-Sequenzierung.....	39
2.3.20	Erstellung von <i>libraries</i> für die Sequenzierung.....	39
2.3.21	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	39
2.3.22	Sanger-Sequenzierung.....	40
2.3.23	Illumina-Sequenzierung.....	40
2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	40
2.4.1	Heterologe Überexpression in <i>E. coli</i>	40
2.4.2	Native Proteinisolierung aus <i>E. coli</i>	40
2.4.3	Proteinisolierung aus <i>A. thaliana</i> Mitochondrien.....	41
2.4.4	Isolierung mitochondrialer Proteine aus <i>Arabidopsis</i> Pflanzenmaterial.....	41
2.4.5	Isolierung mitochondrialer Proteine aus <i>Arabidopsis</i> Pflanzenmaterial für eine BN-PAGE.....	42
2.4.6	Co-Immunpräzipitation von Protein.....	43
2.4.7	His- <i>tag</i> -Aufreinigung über Ni-Säule.....	43
2.4.8	Proteinbestimmung nach Bradford.....	44
2.4.9	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
2.4.10	Blue-Native-PAGE (BN-PAGE).....	45
2.4.11	In-Gel-Aktivitätsfärbung.....	45
2.4.12	Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blau.....	46
2.4.13	Proteinfärbung mit SYPRO™ Ruby (Thermo Fisher).....	46
2.4.14	LC-MS Analyse.....	46
2.4.15	Western Blot.....	47
2.4.16	Proteinfärbung mit Ponceau-Rot.....	48
2.5	Arbeiten mit Mitochondrien aus <i>A. thaliana</i>	48
2.5.1	Isolierung von Mitochondrien aus Wurzelkulturen.....	48
2.5.2	Bestimmung der Atmungsrate isolierter Mitochondrien.....	49
2.5.3	Polysomenanalyse.....	50
2.6	<i>Ribosome profiling</i>	52
2.6.1	Ribosomenextraktion aus <i>Arabidopsis</i> Blüten.....	52
2.6.2	Aufreinigung der <i>ribosome footprints</i> über eine Harnstoff-Acrylamid-Gelelektrophorese.....	54
2.7	Verwendete Software und Datenbanken.....	56
3	Ergebnisse.....	57
3.1	Einfluss von DWEORG1 auf mitochondriale RNA-Reifungsprozesse des <i>cox2</i> Transkripts.....	57
3.1.1	Die Prozessierung der 5'- und 3'-Enden des <i>cox2</i> Transkripts ist in <i>dweorg1</i> nicht beeinträchtigt.....	57
3.1.2	Das Spleißen des <i>cox2</i> Transkripts ist in <i>dweorg1</i> nicht beeinträchtigt.....	60
3.2	Heterologe Überexpression von DWEORG1 in <i>E. coli</i>	61
3.2.1	Heterologe Überexpression von DWEORG1-His- <i>tag</i> in <i>E. coli</i>	61

3.2.2	Co-Expression von DWEORG1-His- <i>tag</i> mit molekularen Chaperonen in <i>E. coli</i>	62
3.2.3	Heterologe Überexpression von MBP-DWEORG1 in <i>E. coli</i>	65
3.2.4	Heterologe Überexpression von DWEORG1 ohne Transitpeptidsequenz in <i>E. coli</i>	66
3.2.5	Heterologe Überexpression von SUMO3-DWEORG1 in <i>E. coli</i>	67
3.2.6	Aufreinigung des rekombinanten SUMO3-DWEORG1 über eine Ni-TED-Säule.....	69
3.3	Untersuchung der RNA-Bindung von DWEORG1 an <i>cox2</i> mRNA.....	70
3.3.1	Vorhersage der Ziel-RNA-Sequenz des PPR-Proteins DWEORG1.....	70
3.3.2	Die <i>cox2</i> RNA-Bindung von DWEORG1 wurde nicht nachgewiesen.....	71
3.4	<i>dweorg1s</i> Expressionsprofil gleicht dem von rPPR-Protein Genen.....	73
3.5	<i>dweorg1s</i> und <i>rppr1s</i> Phänotyp sind miteinander vergleichbar.....	74
3.6	Die mitochondriale Translation ist in <i>dweorg1</i> beeinträchtigt.....	75
3.7	Untersuchung der RNA-Reifungsprozesse der Transkripte <i>ccmF_{N2}</i> , <i>rps4</i> und <i>rpl5</i>	79
3.7.1	Untersuchung der 5'- und 3'-Enden der Transkripte <i>ccmF_{N2}</i> , <i>rps4</i> und <i>rpl5-cob</i>	79
3.8	Analyse der mitochondrialen Proteinmenge.....	81
3.9	DWEORG1 ist mit den Mitoribosomen assoziiert.....	83
3.10	DWEORG1 befindet sich in einem Komplex mit rPPR-Proteinen.....	86
3.11	Identifizierung putativer Protein-Interaktionspartner von DWEORG1.....	87
3.12	In <i>dweorg1</i> ist die mitochondriale rRNA Menge im Vergleich zum Wildtyp verringert.....	91
3.13	Überprüfung der Funktionalität der <i>dweorg1</i> Mitochondrien.....	93
3.13.1	Die Atmungsrate in <i>dweorg1</i> Mitochondrien ist nicht beeinträchtigt.....	94
3.13.2	Die Komplexe I und IV der mitochondrialen Atmungskette weisen keine verminderte Aktivität in <i>dweorg1</i> auf.....	97
3.14	Einfluss von hohem Salzgehalt auf <i>dweorg1</i> Pflanzen.....	99
4	Diskussion.....	102
4.1	DWEORG1 kann erfolgreich in <i>E. coli</i> synthetisiert werden.....	102
4.2	DWEORG1 ist ein Teil der Translationsmaschinerie in <i>A. thaliana</i> Mitochondrien.....	106
4.3	DWEORG1 ist ein rPPR-Protein.....	109
4.4	Eine RNA-Bindung von DWEORG1 wurde nicht nachgewiesen.....	111
4.5	DWEORG1 besitzt eine rRNA-stabilisierende Funktion.....	112
4.6	Ribosomales DWEORG1 spricht für die Heterogenität von Mitoribosomen.....	114
4.7	Gibt es weitere Funktionen von DWEORG1?.....	116
5	Zusammenfassung.....	119
6	Summary.....	121
7	Literaturverzeichnis.....	123

8	Anhang.....	147
8.1	Sequenzvergleiche der analysierten 5′-/3′-Enden	147
8.2	Der bisher bekannte PPR-Code.....	154
8.3	Ergebnisse der LC-MS-Analyse	154
8.4	Plasmidkarten	159
8.5	Verwendete Oligonukleotide	161
9	Publikationen und Kongressbeiträge	162
	Publikationen	162
	Vorträge.....	162
	Poster	162
10	Danksagung.....	163
11	Eigenanteil an den Experimenten.....	164
12	Eidesstattliche Erklärung.....	165

Abkürzungsverzeichnis

4-IPBA	4-Iodphenylboronsäure
A	Adenin
AA/BA	Acrylamid/Bisacrylamid
ADP	Adenosindiphosphat
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid Hydrochlorid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary DNA</i>)
DDM	Dodecyl- β -D-maltosid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	1,4-Dithiothreit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
G	Guanin
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactosid
kbp	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertani
LC-MS	<i>liquid chromatography</i> -Massenspektrometrie
Mbp	Megabasenpaare
MES	2-(N-morpholino) Ethan-Schwefelsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NAD ⁺ /NADP ⁺	Nicotinamidadeninukleotid/-phosphat, oxidierte Form
NADH/NADPH	Nicotinamidadeninukleotid/-phosphat, reduzierte Form
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
R	Purine

RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecyl Sulfat
T	Thymin
T-DNA	Transfer Desoxyribonukleinsäure
TES	<i>N</i> -Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-amino-ethansulfonsäure
Tris	Tri(hydroxymethyl)-Aminomethan
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
U	Uracil
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
Y	Pyrimidine

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt.

1 Einleitung

1.1 Mitochondrien – Semi-autonome Organellen

Mitochondrien sind ein wichtiger Bestandteil eukaryotischer Zellen, deren Hauptaufgabe in der Zellatmung besteht. Dabei wird der Zelle durch den Vorgang der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) geliefert (Saraste 1999). Zusätzlich sind Mitochondrien der Ort des Tricarbonsäurezyklus (TCA-Zyklus) und sind am Metabolismus von Aminosäuren sowie Nukleotiden beteiligt. Des Weiteren wirken Mitochondrien an der Biosynthese von Lipiden, Vitaminen, Chinon und Steroiden sowie der Eisen-Schwefel (Fe/S) Cluster Biogenese mit (Krebs und Johnson 1937; Mitchell 1961; Mackenzie und McIntosh 1999; Lill et al. 1999; Bowsher und Tobin 2001; Millar et al. 2011; Spinelli und Haigis 2018). Zudem spielen sie eine wichtige Rolle im programmierten Zelltod, der Apoptose, und der Signaltransduktion (Jones 2000; Vandecasteele et al. 2001; Logan und Knight 2003).

Der Ursprung der Mitochondrien geht auf ein Endosymbiose-Ereignis zurück, bei dem ein Bakterium der α -Proteobakterien von einer eukaryotischen Vorläuferzelle – vermutlich einem Archaeon – endosymbiontisch aufgenommen wurde (Zaremba-Niedzwiedzka et al. 2017; Martijn et al. 2018). Intrazellulär entwickelte sich dieses Bakterium dann zu einem Mitochondrion (Gray 1999, 2015; Archibald 2015). Aufgrund ihres endosymbiontischen Ursprungs, besitzen Mitochondrien ein eigenes Genom. Dieses Genom unterscheidet sich allerdings stark von dem des ursprünglichen Endosymbionten, da im Laufe der Eukaryogenese einige Gene verloren gegangen, neu hinzugekommen oder in den Zellkern transferiert wurden (Adams und Palmer 2003; Gualberto und Newton 2017). Dies führte dazu, dass Mitochondrien nicht mehr eigenständig dazu in der Lage sind, alle für ihre Funktionsfähigkeit wichtigen Proteine zu synthetisieren. Daher werden Mitochondrien als semi-autonome Organellen bezeichnet.

Mit der Translokation der mitochondrialen Gene in den Zellkern gingen weitere Adaptationen einher. Um den erfolgreichen Gentransfer in den Zellkern zu gewährleisten, entwickelte sich in der Zelle eine Proteinimportmaschinerie, die den Reimport von Genprodukten der in den Zellkern transferierten Gene in die Organellen erlaubt. Der Import von im Cytosol synthetisierten Proteinen in die Mitochondrien erfolgt über N-terminale oder interne Transitpeptide, die von der Proteinimportmaschinerie, dem TOM und TIM Komplex (*translocase of the outer and inner membrane*), der äußeren und inneren mitochondrialen Membran erkannt werden (Truscott et al. 2003). Zudem entwickelten sich retro- und anterograde Kommunikationswege zwischen dem Zellkern und den Mitochondrien. Außerdem

bildete sich eine neue Regulierung der mitochondrialen Genexpression (Woodson und Chory 2008). Innerhalb der Mitochondrien wird diese vor allem durch im Zellkern codierte Gene gewährleistet (Hammani und Giegé 2014) (siehe hierzu 1.3).

Das mitochondriale Genom unterscheidet sich nicht nur stark von dem des ursprünglichen Endosymbionten, sondern auch hinsichtlich Struktur, Größe, Gengehalt und Expressionsmechanismen innerhalb der verschiedenen eukaryotischen Phyla. *Plasmodium falciparum* besitzt ein sehr kleines mitochondriales Genom von lediglich 6 kbp, während man bei Pflanzen wie *Silene conica* ein multi-chromosomales mitochondriales Genom von 11 Mbp findet (Feagin et al. 2012; Sloan et al. 2012). In *P. falciparum* besitzt das mitochondriale Genom nur drei proteincodierende Gene, wohingegen das mitochondriale Genom des Protisten *Reclinomonas americana* 65 proteincodierende Gene aufweist (Burger et al. 2013; Tyagi et al. 2014). *Arabidopsis thaliana* besitzt eine 367 kbp großes mitochondriales Genom, dass 57 Gene enthält. Davon sind 33 proteincodierend (mRNAs), drei codieren für rRNAs (26S, 18S und 5S) und 22 für tRNAs (Unseld et al. 1997; Sloan et al. 2018b). Die Tabelle 1 enthält weitere Beispiele für die Diversität der mitochondrialen Genome. Diese Diversität geht vermutlich darauf zurück, dass sich die Mitochondrien der einzelnen eukaryotischen Phyla unabhängig und dementsprechend unterschiedlich weiter entwickelt haben (Waltz und Giegé 2020).

Tabelle 1: Vergleich mitochondrialer Genome verschiedener phylogenetischer Gruppen

Organismus	Größe in kbp	Anzahl Gene	Referenz
<i>Plasmodium falciparum</i>	6	3	(Tyagi et al. 2014)
<i>Homo sapiens</i>	16,5	37	(Anderson et al. 1981)
<i>Trypanosoma brucei</i>	23	17	(Sloof et al. 1992)
<i>Reclinomonas americana</i>	69	96	(Burger et al. 2013)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	86	37	(Foury et al. 1998)
<i>Marchantia polymorpha</i>	187	96	(Ohyama et al. 2009)
<i>Brassica napus</i>	220	54	(Handa 2003)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	367	57	(Unseld et al. 1997)
<i>Beta vulgaris</i>	369	59	(Kubo et al. 2000)
<i>Zea mays</i>	570	58	(Clifton et al. 2004)
<i>Cucurbita pepo</i>	983	53	(Alverson et al. 2010)
<i>Silene noctiflora</i>	6.700	32	(Sloan et al. 2012)
<i>Silene conica</i>	11.000	30	(Sloan et al. 2012)

1.2 *Pentatricopeptide repeat* Proteine

Pentatricopeptide repeat Proteine (PPR-Proteine) kommen in allen Eukaryoten und in einigen wenigen pathogenen bzw. symbiontischen Prokaryoten der Gattungen *Rhodobacter*, *Ralstonia*, *Simkania*, *Erwinia* und *Legionella* vor (Hallam et al. 2004; Choudhary et al. 2007; Schmitz-Linneweber und Small 2008; Cazalet et al. 2010; Schallenberg-Rüdinger et al. 2013; Barkan und Small 2014). Die wenigen PPR-Gene in Prokaryoten stammen wahrscheinlich aus Eukaryoten und wurden über horizontalen Gentransfer übertragen. Ihre Funktion ist bisher noch nicht bekannt (Manna 2015). Generell unterscheidet sich die Anzahl an PPR-Proteinen stark von Organismus zu Organismus. Während die Anzahl von PPR Genen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mit 15 und im Menschen mit sieben relativ gering ist (Lipinski et al. 2011; Lightowlers und Chrzanowska-Lightowlers 2013), findet man in Landpflanzen mehrere hundert verschiedene PPR-Proteine. So liegen beispielsweise in *A. thaliana* über 450 PPR-Proteine vor (Lurin et al. 2004).

Damit bilden PPR-Proteine eine der größten Proteinfamilien in den Landpflanzen. Diese Expansion in den Landpflanzen könnte auf Genomduplikationen oder auf Retrotransposition bereits vorhandener PPR-Proteine basieren. Als wahrscheinlicher wird hierbei die Theorie der Retrotransposition der PPR-Proteine angesehen, da diese häufig keine Introns besitzen (Lurin et al. 2004; O'Toole et al. 2008). Beim Prozess der Retrotransposition wird DNA in das Genom integriert, welche über eine reverse Transkription einer gereiften mRNA synthetisiert wurde. Dadurch gehen die Introns des ursprünglichen Gens im retro-transkribierten Gen verloren (Babushok et al. 2007). PPR-Proteine werden im Zellkern kodiert und bis auf wenige Ausnahmen in Chloroplasten und/oder Mitochondrien transportiert, wo sie Funktionen in der Regulierung der Genexpression übernehmen (Delannoy et al. 2007; Colcombet et al. 2013). Zudem wurden sie kürzlich als Teil des mitochondrialen Ribosoms (Mitoribosoms) identifiziert (Waltz et al. 2019; Rugen et al. 2019).

PPR-Proteine gehören zu den Proteinen der α -Solenoid Familie. Sie sind nah verwandt mit *Tetra-* und *Octatricopeptide repeat* Proteinen (TPR und OPR), welche an Protein-Protein- bzw. RNA-Protein-Interaktionen beteiligt sind (Rahire et al. 2012; Bohne et al. 2016). Sie werden durch einen sich tandemartig wiederholenden, degenerierten Aminosäureabschnitt – dem PPR-Motiv – von je 31-36 Aminosäuren charakterisiert (Small und Peeters 2000). Die Anzahl der PPR-Motive variiert zwischen zwei und 30 Motiven je Protein (Lurin et al. 2004). Basierend auf der Art der enthaltenen PPR-Motive werden PPR-Proteine in zwei Klassen unterteilt: die P- und die PLS-Klasse (Lurin et al. 2004; Rivals et al. 2006a; Fujii und Small 2011). Der strukturelle Aufbau der verschiedenen PPR-Proteine ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Beide Klassen besitzen ein N-terminales Transitpeptid, welches die Lokalisierung der Proteine bestimmt. Proteine der P-Klasse besitzen lediglich das 35 Aminosäuren lange

P-Motiv und keine C-terminalen Domänen. Eine Ausnahme bilden die acht PPR-SMR Proteine, welche am C-Terminus eine *small MutS-related* (SMR) Domäne aufweisen (Liu et al. 2013a). Die Proteine der PLS-Klasse besitzen neben dem P-Motiv längere L- (35-36 Aminosäuren) und kürzere S-Motive (31 Aminosäuren), welche in der Regel in der Reihenfolge P-L-S angeordnet sind (Rivals et al. 2006b). Zusätzlich zu den P-L-S-Motiven besitzen die meisten Proteine der PLS-Klasse eine C-terminale E- oder E/E+-Domäne, welche Ähnlichkeiten zum PPR- bzw. TPR-Motiv aufweisen (Cheng et al. 2016). Etwa die Hälfte dieser E- bzw. E/E+-Proteine besitzen zusätzlich noch eine 136 Aminosäuren lange DYW-Domäne, die nach den konservierten Aminosäuren Aspartat (D), Tyrosin (Y) und Tryptophan (W) benannt ist, in denen die Domäne meist endet (Lurin et al. 2004).

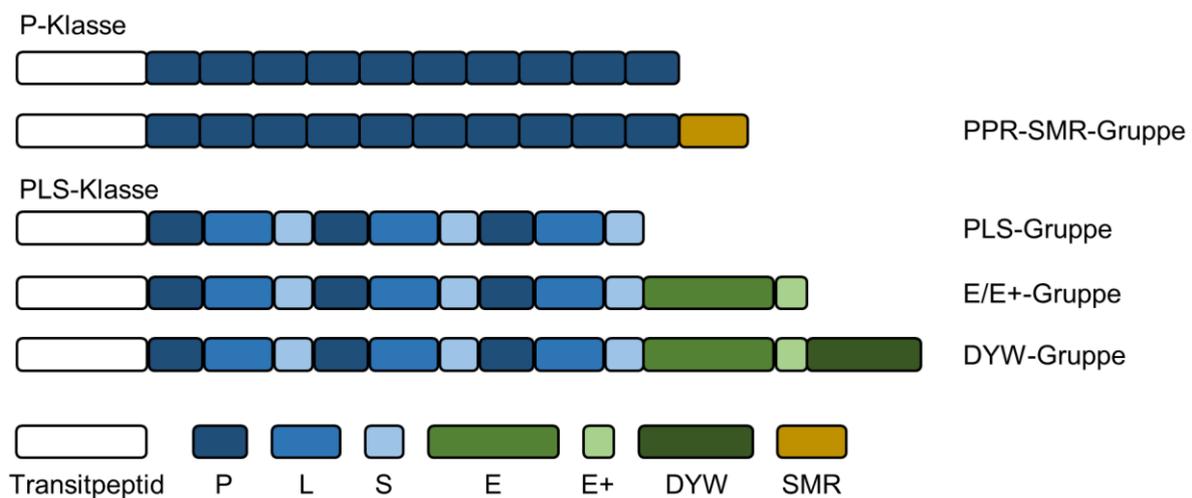


Abbildung 1: Schematische Darstellung der verschiedenen PPR-Klassen. Dargestellt sind die verschiedenen Hauptgruppen der PPR-Proteine. Die P-Klasse Proteine sind nur aus dem 35 Aminosäuren langem P-Motiv (*dunkelblau*) aufgebaut und besitzen im Fall der PPR-SMR-Gruppe eine *smallMutS*-verwandte Domäne (*Ocker*) am C-Terminus. PLS-Klasse Proteine besitzen zusätzlich 35-36 Aminosäuren lange L- (*mittelblau*) und 31 Aminosäure lange S-Motive (*hellblau*). Am C-Terminus können sie ein E- oder E/E+-Domäne aufweisen (*mittel- und hellgrün*) und können um eine DYW-Domäne erweitert sein (*dunkelgrün*). Beide Klassen besitzen ein Transitpeptid am N-Terminus (*weiß*).

1.2.1 RNA-Bindung von PPR-Proteinen

Jedes PPR-Motiv bildet zwei anti-parallele α -Helices wobei die aufeinanderfolgenden Motive eine Superhelix mit einer zentralen Furche formen. Diese Struktur ermöglicht den PPR-Proteinen an RNA zu binden (Delannoy et al. 2007). Die *cis*-Elemente, die durch PPR-Proteine gebunden werden, sind mit 12-29 Nukleotiden relativ lang. Die Länge der gebundenen Sequenz wird durch die Anzahl der PPR-Motive des jeweiligen PPR-Proteins bestimmt (Prikryl et al. 2011; Zhelyazkova et al. 2012). Die RNA-Zielsequenz wird durch Aminosäuren an den Positionen 5 und 35 (entspricht 6 und 1' bzw. 4 und ii nach Barkan et al. (2012) und Yagi et al.

(2013)) eines PPR-Motivs bestimmt (Yin et al. 2013; Cheng et al. 2016). Die Bindung der PPR-Proteine an die RNA erfolgt über einen ein-Motiv-ein-Nukleotid-Mechanismus (Barkan et al. 2012; Okuda et al. 2014; Kindgren et al. 2015). Aus der Kombination der Aminosäuren an den Positionen 5 und 35 eines jeden PPR-Motivs ergibt sich der sogenannte PPR-Code. Unter anderem präferiert die Kombination Threonin/Asparagin (T/N) die RNA-Base Adenin, während Threonin/Asparaginsäure (T/D) Guanin, Asparagin/Serin (N/S) Cytosin und Asparagin/Asparaginsäure (N/D) Uracil bevorzugt binden (Barkan und Small 2014). Dieser PPR-Code ist degeneriert und noch nicht vollständig entschlüsselt. Zudem sind Lücken und Fehlpaarungen zu beobachten, die vor allem bei P-Klasse Proteinen auftreten (Barkan et al. 2012). Trotzdem lassen sich mithilfe des PPR-Codes bereits einige Ziel-RNAs durch *in silico* Analysen vorhersagen (Takenaka et al. 2013a; Yagi et al. 2013).

Diese spezifische RNA-Bindfähigkeit und die Möglichkeit der Vorhersage der Zielsequenz wurden bereits genutzt um Designer-PPR-Proteine herzustellen, die als molekulares Werkzeug zur Manipulierung der Genexpression in den Organellen dienen können. Die Aminosäuresequenz des RPF2 (*RNA processing factor 2*) Proteins aus *Arabidopsis*, welches eigentlich für die Prozessierung der 5'-Enden der *cox3* und *nad9* mRNAs in Mitochondrien verantwortlich ist (Jonietz et al. 2010), wurde beispielsweise so verändert, dass es die Spaltung des *nad6* Transkripts in Mitochondrien ermöglicht (Colas des Francs-Small et al. 2018).

1.2.2 Funktionen der PPR-Proteine

Die P- und PLS-Klasse PPR-Proteine unterscheiden sich nicht nur in ihrem Aufbau, sondern auch in ihren Funktionen voneinander. In Abbildung 2 sind alle Prozesse in Mitochondrien, an denen PPR-Proteine beteiligt sind, schematisch abgebildet: Transkription, RNA-Prozessierung und -Stabilität, Spleißen und Edieren von Transkripten, sowie die Translation (Delannoy et al. 2007; Colcombet et al. 2013).

PLS-Proteine sind vorwiegend in den Prozess der RNA-Edierung involviert, bei dem auf Transkriptebene bestimmte Cytosine durch Uracil ersetzt werden (siehe auch 1.3.4). Eines der ersten PLS-Proteine, welches als Faktor der RNA-Edierung identifiziert wurde, ist CRR4 (*chlororespiratory reduction 4*) aus *A. thaliana*. CRR4 ist für die Edierung des *ndhD* Startcodons in Mitochondrien von Bedeutung (Kotera et al. 2005). Mittlerweile wurden noch viele weitere PPR-Proteine mit dem Prozess der RNA-Edierung in Verbindung gebracht. 53 % der bisher in Chloroplasten und 68 % der bisher in Mitochondrien beschriebenen PPR-Proteine sind an dem Prozess der RNA-Edierung beteiligt (Rovira und Smith 2019). Das macht diesen Prozess zum am besten untersuchten in Bezug auf PPR-Proteine. Die Anzahl der PLS-

Klasse PPR-Proteine korreliert in Pflanzen stark mit der Anzahl an Edierungspositionen in Mitochondrien und Chloroplasten. Des Weiteren agieren PPR-Proteine als transkriptspezifische Faktoren (Fujii und Small 2011; Rüdinger et al. 2012). Die Spezifität wird hierbei durch die PPR-Motive bestimmt (Ruwe et al. 2019; Oldenkott et al. 2019).

In wenigen Ausnahmen wurde die Beteiligung von PLS-Klasse Proteinen an anderen Prozessen der RNA-Reifung nachgewiesen. OTP70 (*organelle transcript processing 70*) in *Arabidopsis* Chloroplasten ist beispielsweise am Spleißen des *rpoC* Transkripts und PpPPR_43 am Spleißen des *cox1* Transkripts in *Physcomitrella patens* Mitochondrien beteiligt (Chateigner-Boutin et al. 2011; Ichinose et al. 2012).

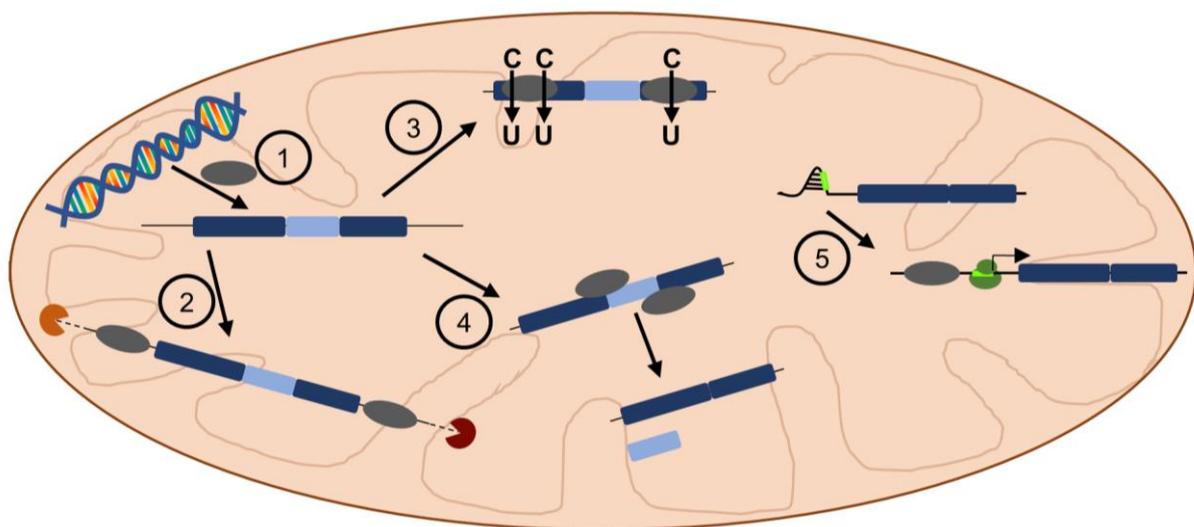


Abbildung 2: Schematische Darstellung der RNA Prozesse in Mitochondrien an denen PPR-Proteine beteiligt sind. In dieser Abbildung sind schematisch verschiedene Prozesse des mitochondrialen RNA-Metabolismus dargestellt. 1: Transkription; 2: 5'-/3'-Enden Prozessierung; 3: RNA-Edierung; 4: Spleißen; 5: Translation. *Grau:* PPR-Proteine; *dunkelblau:* Exons; *hellblau:* Introns; *orange/rot:* Exonkucleasen; *hellgrün:* Ribosomenbindestelle; *dunkelgrün:* Ribosomen.

Die P-Klasse Proteine sind dagegen an vielen verschiedenen Prozessen beteiligt. Das erste P-Klasse Protein, dessen Funktion identifiziert wurde, ist CRP1 (*chloroplast RNA processing 1*) aus *Zea mays* Chloroplasten, welches für die Transkriptstabilität von *petD* und die Translation der Photosynthese-Gene *petA* und *petD* wichtig ist (Fisk et al. 1999). Das Protein pTAC2 (*plastid transcriptionally active chromosome 2*) aus *A. thaliana* ist hingegen ein Teil der plastidären Transkriptionsmaschinerie (Pfalz et al. 2006). P-Klasse Proteine wie PGR3 (*proton gradient stabilisation*) stabilisieren das primäre tri-cistronische Transkript des plastidären *petL* Operons und MTSF1 (*mitochondrial stability factor 1*) und RPF5 (*RNA processing factor 5*) sind an der Reifung der 3'- bzw. 5'-Enden der Transkripte *nad4* bzw. *nad6*,

atp9 und der 26S rRNA in *Arabidopsis* Mitochondrien beteiligt (Yamazaki et al. 2004; Hauler et al. 2013; Haïli et al. 2013).

Zudem sind P-Klasse Proteine am Spleißen von Transkripten beteiligt. So ist THA8 (*thylakoid assembly 8*) in *Arabidopsis* Chloroplasten für das Spleißen der Transkripte *ycf3-2* und *trnA* verantwortlich und OTP43 (*organelle transcript processing defect 43*) in *Arabidopsis* Mitochondrien für das Spleißen von *nad1* mRNA wichtig (De Longevialle et al. 2007; Khrouchtchova et al. 2012). Auch der Prozess der Translation wird durch P-Klasse Proteine beeinflusst. Dabei dienen diese entweder als transkriptspezifischer Translationsinitiator wie PPR10 für das *atpH* Transkript in *Zea mays* Chloroplasten oder liegen als Teil des mitochondrialen Ribosoms vor (Prikryl et al. 2011; Waltz et al. 2019; Rugen et al. 2019) (siehe auch 1.4.1).

An dem Prozess der RNA-Edierung sind P-Klasse Proteine in der Regel nicht beteiligt. Allerdings gibt es einige Ausnahmen: NUWA stabilisiert die Protein-Protein-Interaktion zwischen dem PLS-Klasse Protein SLO2 ohne DYW-Domäne sowie dem DYW-PPR Protein DYW2 und beeinflusst so die Edierung gleich mehrerer Positionen in *Arabidopsis* Mitochondrien (Andrés-Colás et al. 2017). Auch das P-Klasse Protein POCO1 aus *Arabidopsis* beeinflusst die Edierungsaktivität mehrerer mitochondrialer Edierungspositionen (Emami und Kempken 2019). Die Proteine PPR596 und PPME hingegen beeinflussen lediglich partiell eine Edierungsposition des *rps3* Transkripts bzw. zwei Edierungspositionen des *nad1* Transkripts in *Arabidopsis* Mitochondrien (Doniwa et al. 2010; Leu et al. 2016). Außerdem gehören die meisten *restorer of fertility* (RF) Proteine zu den P-Klasse Proteinen.

Über die exakte Funktionsweise der PPR-SMR-Proteine weiß man noch nicht viel. Manche Proteine dieser Gruppe wie z. B. GUN1 (*genomes uncoupled 1*) spielen eine Rolle in der retrograden Kommunikation der Chloroplasten mit dem Zellkern (Liu et al. 2013b; Barkan und Small 2014; Singh et al. 2015; Zhao et al. 2019). EMB2217 (*embryo defective 2217*) aus Mitochondrien ist wichtig für die korrekte Entwicklung des Embryos und die Keimung der Samen, wobei der Wirkmechanismus hier bisher nicht nachgewiesen ist (Muralla et al. 2011). Zudem wurde für SOT1 (*suppressor of thylakoid formation 1*) eine Funktion in der endonukleolytischen Reifung der 23S und 4,5S rRNA in *Arabidopsis* Chloroplasten über die SMR-Domäne nachgewiesen. Eine derartige Endonuklease-Aktivität ist bereits für andere Proteine mit SMR-Domäne bekannt (Watanabe et al. 2003; Zhou et al. 2017).

1.3 Regulation der Genexpression in Mitochondrien

Den Großteil der in Mitochondrien codierten Proteine bilden die konservierten einzelnen Untereinheiten der Multiproteinkomplexe der mitochondrialen Atmungskette. Zusätzlich zu den

Proteinen der Atmungskette werden vor allem in den Mitochondrien der Pflanzen und Jakobiden auch mitoribosomale Komponenten, Proteine der Cytochrom-c Reifungsmaschinerie und RNA-Polymeraseuntereinheiten codiert (Sloan et al. 2018a). Für die Funktionalität der Mitochondrien reichen diese Proteine allerdings nicht aus. Sie müssen durch kerncodierte Proteine ergänzt werden, um funktionale Einheiten zu bilden. Das bedeutet, die Genexpression in den Mitochondrien muss mit der Genexpression des Zellkerns koordiniert werden. Die Komponenten der mitochondrialen Genexpression werden im Zellkern codiert und die Proteinprodukte dieser in die Mitochondrien importiert (Gray 2015).

Die Regulierung der Genexpression in den Mitochondrien unterscheidet sich zu der im Zellkern. Sie vereint bakterielle Eigenschaften mit den für Eukaryoten spezifischen Prozessen, die sich während der mitochondrialen Evolution unabhängig voneinander in den entsprechenden eukaryotischen Phyla entwickelt haben (Hammani und Giegé 2014). Anders als im Zellkern findet die Regulierung der mitochondrialen Genexpression nicht in erster Linie über eine transkriptionelle Regulierung statt. Dies führt dazu, dass häufig keine konkrete Aussage über die Proteinmenge aufgrund der entsprechenden Transkriptmenge getroffen werden kann (Planchard et al. 2018). Die Regulierung findet viel mehr auf der post-transkriptionellen Ebene in Form von 5'- und 3'-Prozessierung, RNA-Stabilisierung, Spleißen, RNA-Edierung, sowie der Regulierung der Translation (Giegé et al. 2000; Leino et al. 2005; Holec et al. 2008b; del Campo 2009) und dem post-translationalen Proteinabbau statt (Binder und Brennicke 2003; Giege et al. 2005). Auf die einzelnen Prozesse wird in den folgenden Abschnitten genauer eingegangen.

1.3.1 Transkription

Im Gegensatz zu Plastiden liegen in pflanzlichen Mitochondrien nur wenige Gene als polycistronische Transkriptionseinheiten vor. Die einzelnen Gene werden durch große nicht konservierte intergenische Sequenzen voneinander getrennt und in der Regel unabhängig voneinander transkribiert (Brennicke und Leaver 2007). In pflanzlichen Mitochondrien wurde eine Region identifiziert (CRTA-Motiv), die Ähnlichkeiten zur plastidären Promotor-Region und deren Kern-Motiv (YRTA) aufweist (Fey und Maréchal-Drouard 1999; Binder und Brennicke 2003; Kühn et al. 2005, 2007). Dieses CRTA-Motiv bildet die mitochondriale Kern-Promotor-Region monokotyler Pflanzen und befindet sich direkt stromaufwärts des ersten transkribierten Nukleotids (Fey und Maréchal-Drouard 1999). In dikotylen Pflanzen ist das konservierte CRTA-Motiv durch eine A/T-reiche Region am 5'-Ende des Promotors sowie eine Purin-reiche Region auf 18 Nukleotide erweitert und beinhaltet den Transkriptionsstart (Binder et al. 1996; Dombrowski et al. 1999).

In pflanzlichen Mitochondrien wurde die bakterielle RNA-Polymerase (RNAP) durch eine Phagen-Typ RNAP ersetzt, die im Zellkern durch die *rpoT*-Genfamilie codiert wird. Lediglich im mitochondrialen Genom von *R. americana* sind die ursprünglichen bakteriellen RNAP-Gene erhalten geblieben (Lang et al. 1997). Monokotyle Pflanzen besitzen zwei verschiedene Phagen-Typ RNAPs, eine mitochondriale (RpoTm) und eine plastidäre (RpoTp). In Dikotyledonen liegt zusätzlich noch eine dual-lokalisierte RNAP (RpoTmp) vor (Liere et al. 2011). Die RpoTm ist für die Transkription fast aller mitochondrialer Gene in Dikotyledonen essentiell und wird daher als die allgemeine RNAP betrachtet (Kühn et al. 2009). Dahingegen dient die zweite RNAP RpoTmp vermutlich nur der Regulierung der Expression bestimmter Gene. Während die Menge der meisten Transkripte in *rpotmp* Mutanten unverändert bleibt, wurde eine reduzierte Transkriptmenge von *nad2*, *nad6* und *cox1* nachgewiesen (Kühn et al. 2009). Für eine effiziente Transkription benötigen die RpoT Polymerasen zusätzliche Faktoren. In Hefen und Tieren sind dies mtTFA und mtTFB (mitochondrialer Transkriptionsfaktor A und B) (McCulloch et al. 2002).

Zusätzlich zu diesen Faktoren wurden in tierischen Mitochondrien sogenannte mTERF (*mitochondrial transcription termination factor*) Faktoren identifiziert, die eine Rolle in der Terminierung der Transkription spielen (Fernandez-Silva et al. 1997). In *Arabidopsis* konnten keine funktionalen Homologe von mtTFA und mtTFB identifiziert werden, sodass man davon ausgeht, dass Pflanzen andere Faktoren für die Transkriptions-Initiation nutzen (Richter et al. 2010b). Im Weizen wurde beispielsweise ein PPR-Protein identifiziert, welches die *cox2* Transkription stimuliert und Ähnlichkeiten zu dem Hefe mtTFB und bakteriellen Sigma-Faktoren aufweist (Ikeda und Gray 1999). In *Arabidopsis* wurden zudem Homologe der mTERF Faktoren identifiziert. So beeinflusst mTERF22 die mitochondriale Transkription wie folgt. Der Phänotyp der *mterf22* Pflanzen erscheint unter normalen Temperaturen (22 °C) gewöhnlich, während er sich bei höheren Temperaturen (28 °C) verändert (Shevtsov et al. 2018). Dies spricht für eine regulierende Funktion von mTERF22. Zudem vermutet man eine Regulierung der Transkription durch unterschiedlich starke Promotoren. So wurden unterschiedliche Transkriptionsraten für *cox1*, *nad4L*, *nad9*, *ccmb*, *rps7* und *rrn5* in *Arabidopsis*, einer CMS (*cytoplasmic male sterility*) und fertilen *Brassica napus* Linie nachgewiesen, die spezifisch für die einzelne Spezies waren und auf unterschiedlich starke Promotoren zurückgeführt wurden (Leino et al. 2005).

1.3.2 Reifung der 5'- und 3'-Transkriptenden

Im Anschluss an die Transkription durchlaufen mitochondriale Transkripte eine Reihe an RNA-Reifungsprozessen, die einen Einfluss auf die Expression des entsprechenden Genprodukts haben können. Hierzu gehört auch die 5'- und 3'-Enden-Reifung. Über die Methode der

Transkriptenden-Kartierung wurden die 5'- und 3'-Enden mitochondrialer Transkripte in *Arabidopsis* bestimmt (Forner et al. 2007; Kempken et al. 2007). Diese Analysen ergaben, dass mit der Ausnahme des *ccmF_C* Transkripts mit zwei unterschiedlichen 3'-Enden, die sich um 105 Nukleotide unterscheiden, jedes Transkript in der Regel ein einzelnes 3'-Ende aufweist (Forner et al. 2007). Im Gegensatz dazu weisen viele mitochondriale Transkripte verschieden lange 5'-Enden auf. Beispielsweise wurden zwei verschiedene 5'-Enden für das *cox2* Transkript (-205 und -151 Nukleotide aufwärts des Startcodons) und sogar drei verschiedene Enden, -361, -267 und -124 Nukleotide aufwärts des Startcodons, für das *atp1* Transkript nachgewiesen (Forner et al. 2007). Die Diversität der 5'-Enden liegt darin begründet, dass diese in pflanzlichen Mitochondrien auf zwei Wegen generiert werden können: primär und sekundär. Primäre Enden entstehen direkt durch die Transkriptionsinitiierung und besitzen daher zwei bis drei Phosphatreste. Sekundäre Enden werden dagegen post-transkriptionell gebildet und besitzen nie mehr als einen Phosphatrest (Kühn et al. 2005; Kempken et al. 2007; Binder und Kühn 2015). Die sekundären 5'-Enden bilden hierbei den größeren Anteil in pflanzlichen Mitochondrien (Binder et al. 2013).

Die Bildung der sekundären 5'- und 3'-Enden erfordert eine Spaltung der Vorläufer-RNA an definierten Positionen. Einige mitochondriale mRNAs weisen sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende RNA-Stammschleifen-Strukturen auf, ähnlich der tRNA-Struktur (t-Elemente). Diese dienen als Erkennungsmerkmal für die Prozessierung (Dombrowski et al. 1997; Forner et al. 2007). Die Spaltung der 3'-Enden erfolgt über zwei 3'-5'-Exoribonukleasen, die Polynukleotid-Phosphorylase PNPase und die RNase II (Perrin et al. 2004b). Die meisten mitochondrialen mRNAs weisen allerdings weder RNA-Stammschleifen noch distinkte Sequenzmotive an ihren 5'- und 3'-Enden auf, die als Erkennungsstelle für die Prozessierung dienen könnten. Man geht davon aus, dass in diesem Fall an die RNA gebundene Proteine, die die Nukleasen blockieren oder zur Bildung von ähnlichen RNA-Sekundärstrukturen führen, als Ersatz für die t-Elemente dienen. Dies wurde für das PPR-Protein MTSF1 in *Arabidopsis* nachgewiesen, es bindet an das 3'-Ende des *nad4* Transkripts und verhindert den Abbau des Transkripts durch Nukleasen (Haïli et al. 2013).

Im Fall der 5'-Enden geht man hingegen von einer endonukleolytischen Bildung dieser aus. Hierbei vermutet man ein Zusammenspiel einer Endonuklease und t-Elementen direkt aufwärts des 5'-Endes und/oder Hilfsmolekülen in Form von PPR-Proteinen. Die Hilfsmoleküle werden als *RNA processing factors* (RPF) bezeichnet (Hauler et al. 2013; Binder et al. 2016). Alle bisher bekannten RPFs sind in Tabelle 2 zusammengefasst. In allen Fällen handelt es sich um PPR-Proteine der P-Klasse. In pflanzlichen Mitochondrien gibt es zwei Endonukleasen, die als Kandidaten für die endonukleolytische Bildung der 5'-Enden in Frage kommen: PRORP (eine *protein-only* RNase P) und RNase Z (Canino et al. 2009; Gobert et al.

2010; Gutmann et al. 2012). Für das *rps4* Transkript wurde beispielsweise gezeigt, dass die RNase Z das RNA-Vorläufermolekül am 3'-Ende des t-Elements spaltet und somit das 5'-Ende des *rps4* Transkripts generiert. Man vermutet, dass auch andere RNA-Sekundärstrukturen, die z. B. durch RPFs stabilisiert werden, von PRORP und RNase Z erkannt werden können (Binder et al. 2013).

Tabelle 2: Proteine, die an der Prozessierung von 5'- oder 3'-Enden beteiligt sind

Protein	RNA	Terminus	Organismus	Referenz
RPF1	<i>nad4</i>	5'	<i>A. thaliana</i>	(Hölzle et al. 2011)
RPF2	<i>nad9, cox3</i>	5'	<i>A. thaliana</i>	(Jonietz et al. 2010)
RPF3	<i>ccmC</i>	5'	<i>A. thaliana</i>	(Jonietz et al. 2011)
RPF4	<i>ccmB</i>	5'	<i>A. thaliana</i> (Ler)	(Binder et al. 2016)
RPF5	<i>atp9, nad6, 26S rRNA</i>	5'	<i>A. thaliana</i>	(Hauler et al. 2013)
RPF6	<i>ccmC</i>	5'	<i>A. thaliana</i> (C24)	(Stoll et al. 2015)
RPF7	<i>nad2</i>	5'	<i>A. thaliana</i>	(Stoll et al. 2014)
RFL9	<i>rps3, rpl16, orf204a</i>	5'	<i>A. thaliana</i>	(Arnal et al. 2014)
MPPR6	<i>rps3</i>	5'	<i>Zea mays</i>	(Manavski et al. 2012)
MTSF1	<i>nad4</i>	3'	<i>A. thaliana</i>	(Haïli et al. 2013)

Die Bildung korrekter 5'- und 3'-Enden kann einen negativen oder auch keinen Effekt auf die mitochondrielle Genexpression haben. In *rpf3* und *mppr6* Mutanten von *A. thaliana* und *Zea mays* ist beispielsweise eine Reduzierung der CcmC bzw. RPS3 Proteinmenge zu beobachten, welche auf die Generierung unreifer 5'-Enden zurückzuführen ist (Jonietz et al. 2011; Manavski et al. 2012). Hingegen ist in *rpf4* Mutanten von *A. thaliana* kein negativer Effekt der beeinträchtigten 5'-Enden-Bildung auf die Synthetisierung des NAD4 Proteins zu beobachten (Hölzle et al. 2011).

1.3.3 RNA-Stabilisierung/-Degradierung

Auch über den RNA-Abbau kann die Genexpression teilweise gesteuert werden. Da die Transkription in den pflanzlichen Mitochondrien kaum Kontrollmechanismen unterliegt, werden viele kryptische Transkripte, wie Antisense-RNAs und intergenische RNAs oder auch unvollständige Transkripte generiert. Durch den gezielten RNA-Abbau wird verhindert, dass diese RNAs translatiert und somit falsche Proteine synthetisiert werden. Diese RNA-Qualitätskontrolle gleicht die kaum regulierte Transkription der Mitochondrien aus (Hammani und Giegé 2014). Die RNA-Abbaurrate wird dabei durch ein Zusammenspiel von

destabilisierender Polyadenylierung und stabilisierenden Sekundärstrukturen bestimmt (Kuhn et al. 2001).

Für den gezielten RNA-Abbau werden die abzubauenen Transkripte (rRNAs, mRNAs, Nebenprodukte der rRNA- und tRNA-Reifung und kryptische Transkripte) mit einem Poly(A)-Schwanz versehen, der als Abbau-Signal dient (Li-Pook-Than und Bonen 2006; Gagliardi und Binder 2007). Die RNA-Polyadenylierung in Mitochondrien ähnelt der in Bakterien und ist demnach höchstwahrscheinlich ein Relikt des prokaryotischen Vorläufers der Mitochondrien (Holec et al. 2008a). In pflanzlichen Mitochondrien dient die Polyadenylierung dem RNA-Abbau, in den Mitochondrien anderer Eukaryoten erfüllt sie hingegen andere Zwecke. Während sie in Hefen gar nicht existiert (Schäfer 2005), generiert sie in menschlichen Mitochondrien Stopcodone (Bobrowicz et al. 2008). In Trypanosomen wird hierüber neben der Stabilität/Degradierung der RNA auch die vollständige Edierung der Transkripte sichergestellt (Kao und Read 2005; Etheridge et al. 2008). Der Hauptabbauweg der Poly(A)-markierten RNAs wird durch die Exonukleasen PNPase und PARN (Poly(A)-spezifische Ribonuklease) durchgeführt (Perrin et al. 2004a, b; Holec et al. 2006). In *A. thaliana* reguliert AHG2 (*ABA-hypersensitive germination 2*), eine PARN, im Zusammenspiel mit AGS1 (*AHG2-1 suppressor 1*), einer Bakterien ähnlichen Poly(A)-Polymerase, die mitochondriale RNA-Menge über die Polyadenylierung der RNAs (Hirayama et al. 2013).

Wie wichtig die Regulierung der RNA-Menge und die damit verbundene RNA-Qualitätskontrolle für die Pflanze ist, wird dadurch deutlich, dass eine herab regulierte PNPase letal für die Pflanze ist (Lange et al. 2009). Auch eine Störung des AGH2/AGS1-Systems führt zu einer veränderten Stress-Antwort der Pflanzen und kann sich embryoletal auswirken (Hirayama et al. 2013). Dieses System der RNA-Degradierung scheint gewissen Regulierungen zu unterliegen, so können hohe Temperaturen zu einer erhöhten Polyadenylierung in *Arabidopsis* führen (Adamo et al. 2008).

1.3.4 RNA-Edierung

Die RNA-Edierung ist ein essentieller Schritt der RNA-Reifung und ist dadurch gekennzeichnet, dass sich der Informationsgehalt des Transkripts im Vergleich zu dem der codierenden genomischen DNA-Sequenz durch Insertion, Deletion oder Konversion von bestimmten Nukleotiden unterscheidet (Giege und Brennicke 1999). Die verschiedenen Arten der RNA-Edierung sind in Tabelle 3 zusammengefasst. In pflanzlichen Mitochondrien und Chloroplasten besteht die RNA-Edierung überwiegend aus der Konversion von Cytosinen zu Uracilen (C→U), in Hornmoosen, Farnen und Bärlappgewächsen werden hingegen überwiegend Uracile in Cytosine (U→C) umgewandelt (Covello und Gray 1989; Gualberto et

al. 1989; Hiesel et al. 1989; Hoch et al. 1991; Schallenberg-Rüdinger und Knoop 2016; Knie et al. 2016). Hierbei handelt es sich um eine Deaminierungs-Reaktion der Cytosine zu Uracil, bzw. einer Aminierung im umgekehrten Fall (Chen et al. 1987; Knie et al. 2016). RNA-Edierung kommt in den Organellen aller Vertreter der Landpflanzen vor. Außer im Lebermoos *Marchantia polymorpha*, welches eine Ausnahme bildet. Dabei handelt es sich vermutlich um einen sekundären Verlust dieses Prozesses (Oda et al. 1992; Groth-Malonek et al. 2007). In Grünalgen hingegen beobachtet man keine RNA-Edierung, sodass davon auszugehen ist, dass sich der Prozess der RNA-Edierung erst in der frühen Evolution der Landpflanzen entwickelt hat (Turmel et al. 2003).

Tabelle 3: Verschiedene Arten der RNA-Edierung

Art der RNA-Edierung	Organismus/Ort	Referenz
Insertion und Deletion von Uracilen (U)	Protozoen	(Benne 1989)
Deaminierung von Adenin zu Inosin (A→I)	Metazoa und Pilze, Nukleus; Bakterien	(Wolf et al. 2002; Liu et al. 2016; Walkley und Li 2017; Bar-Yaacov et al. 2018)
Insertion von einzelnen Cytosinen (C) oder Uracilen (U), Di-Nukleotidinsertionen und Konversion von C zu U (C→U)	Myxomycota, Mitochondrien	(Mahendran et al. 1991)
Insertion von Guanin (G) und Adenin (A)	Paramyxovirus	(Thomas et al. 1988)
N→N'	Amöben und Pilze, Mitochondrien; Dinoflagellaten, Mitochondrien und Chloroplasten	(Lonergan und Gray 1993; Laforest et al. 1997; Lin et al. 2002; Zauner et al. 2004)
Konversion von Cytosin zu Uracil (C→U)	Säugetiere, Nukleus	(Chen et al. 1987; Powell et al. 1987)
	Archaeen Landpflanzen Mitochondrien und Chloroplasten	(Rundau et al. 2009) (Covello und Gray 1989; Gualberto et al. 1989; Hiesel et al. 1989; Hoch et al. 1991)
Substitution von Uracil durch Cytosin (U→C)	Hornmoose, Bärlappgewächse und Farne	(Schallenberg-Rüdinger und Knoop 2016; Knie et al. 2016)

Die RNA-Edierung stellt in der Regel Basenabfolgen, die für konservierte Aminosäuren codieren wieder her oder generiert Start- bzw. Stopcodone, sodass eine korrekte Exprimierung der Gene sichergestellt ist. Es handelt sich also um eine Art Korrekturmechanismus (Stern et

al. 2010; Knoop 2011). Befindet sich das zu edierende Cytosin an der dritten Stelle des Codons, hat dies nicht immer eine Änderung der codierten Aminosäure zur Folge. Ist dies der Fall, spricht man von stillen Edierungen, da sich die Aminosäuresequenz des Proteinproduktes nicht ändert (Gualberto et al. 1991). Neben mRNAs werden auch tRNAs, rRNAs, Introns und die 5'- und 3'- Enden der Transkripte ediert (Small et al. 2020). Die Edierung in nicht-codierenden Bereichen stellt oft Basenpaarungen her, die wichtig für die Bildung von funktionellen Sekundär- und Tertiärstrukturen sind (Bégu et al. 2011; Oldenkott et al. 2014).

Die Anzahl an Edierungspositionen in pflanzlichen Organellen variiert stark von Organismus zu Organismus, während in *Physcomitrella patens* nur 13 Positionen ediert werden (11 in Mitochondrien, 2 in Chloroplasten) (Miyata und Sugita 2004; Rüdinger et al. 2009), findet man in *Isoetes engelmannii* mehr als 1.000 Positionen (Grewe et al. 2011). In Mitochondrien von *A. thaliana* liegen wiederum 489 Positionen ediert vor (Bentolila et al. 2013). Dabei werden etwa 80% der Positionen vollständig ediert und die restlichen Positionen werden nur partiell, also mit einer geringeren Effizienz, ediert (Bentolila et al. 2013). Partielle Edierung beobachtet man vor allem in bestimmten Gewebetypen oder unter bestimmten Entwicklungsbedingungen (Bock et al. 1993; Hirose et al. 1996; Chateigner-Boutin und Hanson 2003).

Die RNA-Edierung in pflanzlichen Organellen wird durch das Editosom koordiniert. Dabei handelt es sich um einen oligomeren Proteinkomplex, dessen Bestandteile im Zellkern codiert werden (Sun et al. 2016). Der erste identifizierte Edierungsfaktor ist das PPR Protein CRR4 aus *Arabidopsis* Chloroplasten, welches für die Generierung des Startcodons des plastidären *ndhD* Transkripts benötigt wird (Kotera et al. 2005). Mittlerweile wurden viele weitere Bestandteile des Editosoms identifiziert. Hierzu gehören unter anderem Proteine der PPR-, MORF- (*multiple organellar RNA editing factor*), RRM- (*RNA recognition motif*) und ORRM- (*organelle RRM*) Familie (Small et al. 2020).

Derzeit werden etwa 100 PPR-Proteine mit der RNA-Edierung assoziiert. Sie dienen zum einen als Spezifitätsfaktoren und im Fall der DYW-PPR Proteine stellen sie die katalytische Domäne dar (Barkan und Small 2014; Sun et al. 2016; Takenaka et al. 2019). Die Spezifität wird durch *cis*-Elemente gebildet, die sich in unmittelbarer Nähe der Edierungsposition befinden und von PPR-Proteinen erkannt und gebunden werden (Kindgren et al. 2015). Die Länge des *cis*-Elements kann variieren. So wurde für das *cox2* Transkript aus Weizen Mitochondrien eine Region von 16 Nukleotiden stromaufwärts und sechs Nukleotiden abwärts der Edierungsposition identifiziert (Farré und Araya 2001). In *atp9* Transkripten der Erbse wurden zwei Bereiche, -40 bis -35 nt und -15 bis -5 nt von der Edierungsposition, identifiziert, die wichtig für die RNA-Edierung sind (Takenaka 2004). *In organello* Systeme des Mais und Blumenkohl haben zudem gezeigt, dass auch der 5'- und 3'-Bereich eines Transkripts sowie

die Sekundärstruktur dessen einen Einfluss auf die RNA-Edierung haben können (Staudinger und Kempken 2003; Staudinger et al. 2005; Grüttner et al. 2013).

Die DYW-Domäne weist Ähnlichkeiten zu Cytosin-Deaminasen anderer Organismen auf und mittlerweile wurde die Deaminase-Aktivität dieser Domäne experimentell nachgewiesen (Oldenkott et al. 2019; Hayes und Santibanez 2020). An der RNA-Edierung beteiligte PPR-Proteine ohne DYW-Domäne interagieren meist mit DYW-PPR-Proteinen. Dies wurde zum ersten Mal für CRR4 und DYW1 gezeigt, beide Faktoren sind notwendig für die korrekte Edierung des *ndhD* Transkripts in Chloroplasten (Boussardon et al. 2012). Studien identifizierten weitere DYW1-ähnliche Proteine, die sich durch nur wenige PPR-Motive und eine C-terminale DYW-Domäne auszeichnen (Boussardon et al. 2012; Andrés-Colás et al. 2017; Guillaumot et al. 2017).

Im Gegensatz zu den PPR-Proteinen sind die anderen Bestandteile des Editosoms weniger spezifisch und beeinflussen mehrere Edierungspositionen gleichzeitig. Hierzu zählen Proteine der MORF Familie (fünf mitochondrial lokalisierte, zwei plastidäre und zwei dual-lokalisierte) (Glass et al. 2015). MORF8 beeinflusst beispielsweise mehr als 300 Edierungspositionen in Mitochondrien und einige wenige in Chloroplasten (Bentolila et al. 2012). Sie dienen vermutlich als Brücke zwischen dem PPR-Faktor und der Deaminase des Editosoms und/oder sie erhöhen die Affinität der PLS-Motive in Bezug auf die Ziel-RNA (Zehrmann et al. 2015; Yan et al. 2017). Auch im Fall der ORRM und RRM Proteine ist ein Einfluss auf mehrere Edierungspositionen zu beobachten, ORRM2 beeinflusst 6 %, ORRM3 19 % und ORRM4 44 % der mitochondrialen Edierungspositionen (Takenaka et al. 2013b; Shi et al. 2015, 2016b, a), indem sie Homo- oder Heterodimere mit MORF-Proteinen bilden (Shi et al. 2015, 2016b; Sun et al. 2015). CP31A, ein RRM Protein, ist wiederum wichtig für 13 Edierungspositionen in *A. thaliana* Chloroplasten (Tillich et al. 2009).

Die Zusammensetzung des Editosoms unterscheidet sich demnach für jede Edierungsposition vor allem durch das PPR-Protein – dem Spezifitätsfaktor – aber auch in den anderen Edierungsproteinen. Dies wird dadurch deutlich, dass in Mutanten der anderen Edierungsproteine zwar viele aber nie alle Edierungspositionen beeinflusst werden. MORF8 beeinträchtigt beispielsweise 77 % der mitochondrialen Edierungspositionen, MORF1 dagegen nur 19 % (Takenaka et al. 2012; Bentolila et al. 2013). Einige Edierungsproteine teilen sich mehrere Edierungspositionen und können die Abwesenheit des anderen Faktors bis zu einem gewissen Grad ausgleichen. Dies wurde beispielsweise durch die Untersuchung von *orrm3* und *orrm2/orrm3* Doppelmutanten gezeigt. In *orrm3* Pflanzen wurde nur eine leichte Störung der Edierungseffizienz beobachtet. In *orrm2/orrm3* Mutanten sinkt die Effizienz noch weiter (Shi et al. 2015).

Diese Eigenschaften des Editosoms lassen einen gewissen Spielraum zur Regulierung der RNA-Edierungseffizienz zu. Ob diese zu einer Regulierung der Genexpression selbst führt, ist allerdings fraglich. Denn auch partiell- und nicht-edierte Transkripte assoziieren mit Ribosomen und werden translatiert. Dies wurde für *atp6* und *rps12* Transkripte in Mitochondrien der Petunie nachgewiesen (Lu und Hanson 1994; Lu et al. 1996).

1.3.5 Spleißen von Introns

Im mitochondrialen Genom der Angiospermen liegen fast ausschließlich Gruppe II Introns vor (Bonen und Vogel 2001; Bonen 2008). Eine Ausnahme bildet dabei das Intron des *cox1* Transkripts einiger weniger Angiospermen, welches durch horizontalen Gentransfer ein Gruppe I Intron beinhaltet (Sanchez-Puerta et al. 2008). Das mitochondriale Genom von *Arabidopsis* weist 23 Gruppe II Introns in neun Genen auf (Unselde et al. 1997), von denen fünf Introns *trans* gespleißt werden: Intron 1 und 3 des *nad1* Transkripts, Intron 2 des *nad2* Transkripts und Intron 2 und 3 des *nad5* Transkripts. Diese gehen auf eine DNA-Rekombination zurück, welche ein zuvor ununterbrochenes Intron zerteilte (Bonen 2008). Beim *trans*-Spleißen liegen, im Gegensatz zum *cis*-Spleißen einzelne Exons eines Gens sowie Teile der entsprechenden Introns an unterschiedlichen Positionen im Genom vor und werden einzeln transkribiert. Die funktionale mRNA kann erst gebildet werden, nachdem die verschiedenen Transkripte des Gens durch die Interaktion von Basenpaarungen in *trans* zusammengefügt werden und die für das Spleißen notwendige Sekundärstruktur wiederhergestellt wird (Bonen 2008).

Gruppe II Introns sind sowohl durch ihre Struktur als auch die Fähigkeit des selbst-Spleißens charakterisiert und kommen auch in Bakterien vor. Dort besitzen sie sechs helikale Domänen (Domäne I-VI) (Michel und Ferat 1995; Qin und Pyle 1998) und können ORFs beinhalten, die ein Homolog einer reversen Transkriptase codieren (Michel und Lang 1985). Diese katalysieren das selbst-Spleißen des Transkripts, in dessen Intron sie codiert werden. Sie werden dann als Maturase bezeichnet (Wank et al. 1999). Der Spleißvorgang selbst erfolgt über zwei *trans*-Esterifizierungen, die einen nukleophilen Angriff am 5'-Ende der Spleißstelle initiieren (Bonen 2008). Pflanzliche Gruppe II Introns divergieren allerdings stark von denen der Bakterien und codieren meist für degenerierte Maturasen. Ausnahmen bilden dabei sowohl das *trnK* Intron in Chloroplasten mit dem *matK* ORF als auch das fünfte Intron des *nad1* Transkripts mit dem *matR* ORF in Mitochondrien, die beide funktionale Maturasen codieren (Wahleithner et al. 1990).

Die mitochondriale Maturase MatR unterscheidet sich von bakteriellen Maturasen, da sie nicht nur für das Spleißen des *nad1* Introns wichtig ist sondern auch für weitere Gruppe II Introns in

Mitochondrien (Sultan et al. 2016). Zudem ist sie *in vivo* nicht in der Lage das selbst-Spleißen zu katalysieren und benötigt zusätzliche im Zellkern codierte Protein-Faktoren hierfür (Bonen und Vogel 2001; Bonen 2008; Brown et al. 2014). Im Zellkern der Angiospermen liegen vier Gene für weitere Maturasen vor (*nmat1*, *nmat2*, *nmat3* und *nmat4*), die alle eine mitochondriale Lokalisation aufweisen (Mohr und Lambowitz 2003; Keren et al. 2009). Auch diese Maturasen beeinflussen das Spleißen mehrerer Introns. (Keren et al. 2009, 2012; Cohen et al. 2014).

Neben den Maturasen sind in pflanzlichen Mitochondrien und Chloroplasten auch Proteine anderer Proteinfamilien am Spleißvorgang beteiligt. Hierzu gehören beispielsweise DEAD-box RNA-Helikasen wie PHM2 und CRM-Proteine, wie CSF1 (Matthes et al. 2007; Köhler et al. 2010; Zmudjak et al. 2013). Zusätzlich zu diesen allgemeinen Faktoren, spielen spezifische Faktoren eine Rolle, die nur für ein einzelnes oder einige wenige Introns benötigt werden. Diese gehören zu den PPR-Proteinen (z. B. OTP43 (*nad1* Intron 1), BIR6 (*nad7* Intron 1) und ABO5 (*nad2* Intron 3)) (De Longevialle et al. 2007; Liu et al. 2010; Koprivova et al. 2010; Colas des Francs-Small et al. 2012), den PORR- (*plant organellar RNA recognition*) Proteinen und den RCC- (*regulator of chromosome condensation*) Proteinen (Kühn et al. 2011; Colas des Francs-Small et al. 2012).

1.3.6 Post-translationale Regulierungsmechanismen

Im Anschluss an die Translation durchlaufen die neu synthetisierten Proteine eine Protein Qualitätskontrolle (PQK). Diese stellt die funktionelle Integrität der Proteine sicher, verhindert die Akkumulation beschädigter Proteine (z. B. durch genetische Mutationen oder Biosynthesefehler) sowie falsch gefalteter Proteine und gleicht darüber hinaus Ungleichgewichte in der Synthese der OXPHOS-Untereinheiten aus (Leidhold und Voos 2007). Ein Hauptbestandteil dieser PQK sind die AAA- (*ATPases associated with diverse cellular activities*) Proteasen (auch FtsH-Proteasen genannt). Hierbei handelt es sich um Proteine der inneren mitochondrialen Membran mit proteolytischer und Chaperon-ähnlicher Funktion, die in Eubakterien, Chloroplasten sowie Mitochondrien vorkommen (Ogura und Wilkinson 2001). Im *A. thaliana* Genom existieren 12 Gene für AAA-Proteasen, von denen acht plastidär, drei mitochondrial und eine dual-lokalisiert vorliegen (Sakamoto et al. 2003; Heazlewood et al. 2004). Eine Störung dieser Proteasen führt beispielsweise zu einer gestörten OXPHOS-Komplex-Assemblierung bzw. -Stabilität. FtsH3 ist wichtig für die Komplex I-Assemblierung bzw. -Stabilität sowie in Kombination mit FtsH4 für die Assemblierung/Stabilität des Komplex V (Kolodziejczak et al. 2007).

Es gibt einige Hinweise darauf, dass die PQK auch eine wichtige Rolle in der Regulierung der Genexpression spielt. So wurde gezeigt, dass die Abundanz der *atpA* und *atp9* Transkripte

der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*) nicht mit der Proteinmenge der im funktionalen Komplex V eingebauten Proteine korreliert (Woloszynska et al. 2006). Ähnliches wurde in *Arabidopsis* Mitochondrien gezeigt, die einem Zuckermangel ausgesetzt wurden. Während die Transkript- und Proteinmenge der im Zellkern codierten OXPHOS-Komponenten sank, wurde in den Mitochondrien lediglich eine Reduzierung der Proteinmenge funktionaler OXPHOS-Komplexe beobachtet ohne eine signifikante Veränderung auf transkriptioneller, post-transkriptioneller oder translationaler Ebene (Giege et al. 2005). Dies spricht dafür, dass die Regulierung der OXPHOS-Komponenten post-translational während des Einbaus dieser in die entsprechenden Komplexe geschieht und überschüssige Untereinheiten abgebaut werden.

Eine derartige Regulierung vermutet man auch für mitoribosomale Proteine. In *Arabidopsis* werden überschüssige, nicht eingebaute mitoribosomale Proteine von AAA-Proteasen abgebaut (Kwasniak et al. 2013). Eine post-translationalen Regulierung ist auch für Proteinprodukte nicht- oder unvollständig edierter bzw. falsch gespleißter mRNAs zu beobachten. Diese assoziieren mit translatierenden Ribosomen und werden vollständig translatiert. Allerdings können in den entsprechenden Multi-Protein-Komplexen nur Proteinprodukte korrekt edierter und gespleißter mRNAs nachgewiesen werden (Millar et al. 2001; Planchard et al. 2018; Kwasniak-Owczarek et al. 2019). In Bezug auf die Edierung wurde dies für RPS12 und RPS13 in Mais, ATP9 in Weizen, NAD9 in Kartoffel und ATP6 in Petunien Mitochondrien gezeigt (Bégu et al. 1990; Grohmann et al. 1994; Lu und Hanson 1994; Phreaner et al. 1996; Williams et al. 1998). Hier findet demnach weder auf post-transkriptioneller noch translationaler Ebene eine Regulierung statt, sondern ebenfalls erst post-translational. Die hier genannten Beispiele verdeutlichen die wichtige Rolle der post-translationalen Prozesse bei der Regulierung der mitochondrialen Genexpression.

1.4 Translation in Mitochondrien

Im Allgemeinen gliedert sich der Prozess der Translation in drei Schritte: die Initiation, Elongation und Termination (Schmeing und Ramakrishnan 2009). Während der Initiation der Translation binden die kleine Untereinheit (SSU = *small subunit*) und die große Untereinheit (LSU = *large subunit*) der Ribosomen am Translationsstart. Zusammen bilden die SSU und die LSU die funktionalen Ribosomen, auf die in 1.4.1 genauer eingegangen wird. Neben den Ribosomen werden weitere Proteinfaktoren für die Initiation, Elongation und Termination der Translation benötigt. In Hefen und tierischen Mitochondrien wurden bereits einige dieser Faktoren identifiziert. Im Gegensatz dazu sind in pflanzlichen Mitochondrien erst sehr wenige Faktoren bekannt (Bonen 2004; Waltz et al. 2019; Rugen et al. 2019).

Mit Ausnahme der Mitochondrien des Jakobiden *Reclinomonas americana* besitzen mitochondriale Transkripte anders als die ihrer prokaryotischen Vorfahren sowie der Chloroplasten keine Shine-Dalgarno oder Shine-Dalgarno-ähnliche Sequenz (Lang et al. 1997; Giegé und Brennicke 2001; Raczynska et al. 2006). Die Erkennung der Ribosomenbindestelle muss in Mitochondrien daher anders erfolgen als in den prokaryotischen Vorfahren. Tierische mitochondriale Transkripte besitzen keine 5'-Enden und starten direkt mit dem AUG Startcodon. Das mitoribosomale Protein mS39, welches am mRNA-Eingang der SSU sitzt, sorgt hier vermutlich für die Erkennung und Integration der mRNA in die Ribosomen, indem es eine in allen elf mRNAs konservierte U-reiche Region abwärts des Startcodons bindet (Kummer et al. 2018).

Mitochondriale Transkripte der Hefe weisen hingegen lange 5'-Enden auf, in denen transkriptspezifische Translationsaktivatoren binden können (Derbikova et al. 2018). Hierzu zählen beispielsweise Pet111p und Mam33p, die für die Translations-Aktivierung der Transkripte *cox2* und *cox1* benötigt werden (Mulero und Fox 1993; Roloff und Henry 2015). Die Translationsinitiation in pflanzlichen Mitochondrien ist dagegen bisher kaum verstanden. Die ebenfalls langen 5'-Enden innerhalb des mitochondrialen Genoms unterscheiden sich stark voneinander, sodass bisher noch keine eindeutige, allgemeine Ribosomenbindestelle in den 5'-Enden identifiziert werden konnte. Lediglich 17 der 32 mitochondrialen mRNAs weisen eine Adenin/Purin-reiche Sequenz (AxAAA-Sequenz) 19 Nukleotide aufwärts des Startcodons auf, die für eine Ribosomenbindestelle in Frage kommen könnte (Waltz et al. 2020b). Da nicht alle mitochondrialen Transkripte diese Sequenz aufweisen, muss es aber alternative Initiationsmechanismen geben. Man geht daher davon aus, dass die Rekrutierung der Ribosomen über genspezifische Sequenzen und *trans*-Faktoren reguliert wird, die ähnlich wie die Translationsaktivatoren in der Hefe, transkriptspezifisch an die 5'-Enden der mitochondrialen Transkripte binden (Hazle und Bonen 2007; Choi et al. 2012; Hammani und Giegé 2014).

Alle bisher identifizierten Proteine, die an der Regulierung bzw. Kontrolle der Translation in pflanzlichen Mitochondrien beteiligt sind, gehören zur Familie der PPR-Proteine. PPR-B gehört zu den RF-Proteinen in *Raphanus sativus*, es wirkt sich negativ auf die Regulierung der Translation des CMS verursachenden Transkripts *orf138* aus (Uyttewaal et al. 2008a). Positive Auswirkungen auf die Translation haben hingegen die PPR-Proteine PPR336 und MTL1 (*mitochondrial translation factor 1*) aus *A. thaliana* sowie MPPR6 aus *Z. mays*. PPR336 wurde erstmals als ein mit Polysomen assoziiertes Protein beschrieben, später als Teil des Mitoribosoms identifiziert und in rPPR1 umbenannt. Eine Mutation dieses Proteins wirkt sich negativ auf die Translation aller mitochondrialer Transkripte aus (Uyttewaal et al. 2008b; Waltz et al. 2019). MPPR6 und MTL1 sind dagegen transkriptspezifische Translationsfaktoren. Sie

beeinflussen die Translation des *rps3* (MPPR6) und *nad7* (MTL1) Transkripts (Manavski et al. 2012; Haili et al. 2016).

Eine weitere Besonderheit der Mitochondrien besteht in der Nutzung verschiedener Startcodone. In pflanzlichen Mitochondrien werden neben dem klassischen AUG Startcodon auch GGG, GUG und AAU in *Arabidopsis* sowie GUG und ACG in *Oenothera* Arten und *Raphanus sativus* verwendet (Bock et al. 1994; Unseld et al. 1997; Dong et al. 1998). Wie das korrekte Startcodon durch die Translationsmaschinerie erkannt wird, ist bisher noch nicht bekannt.

In pflanzlichen Mitochondrien weisen Transkripte der OXPHOS-Komponenten im Vergleich zu anderen mRNAs eine erhöhte Menge an assoziierten Ribosomen je mRNA auf. Dies weist darauf hin, dass diese bevorzugt translatiert werden (Planchard et al. 2018; Kwasniak-Owczarek et al. 2019). In bestimmten Mutanten beobachtet man eine Veränderung dieser generellen Translationspräferenz. So erfolgt eine Reduzierung der Assoziation der Mitoribosomen mit Transkripten der ATP-Synthase-Komponenten in Komplex I Mutanten von *A. thaliana* (Planchard et al. 2018). Zudem verlagert sich die Translationspräferenz der OXPHOS-Komponenten mRNAs auf mRNAs der r-Proteine in *Arabidopsis rps10* Mutanten (Kwasniak et al. 2013). Aber auch in diesem Fall sind die für die Regulierung verantwortlichen Faktoren noch nicht bekannt.

1.4.1 Mitoribosomen

Mitoribosomen leiten sich von den Ribosomen der prokaryotischen Vorfahren der Mitochondrien ab. Allerdings haben sie sich im Laufe der eukaryotischen Evolution stark von diesen differenziert. Auch innerhalb der Eukaryoten weisen Mitoribosomen starke Unterschiede in Größe, Aufbau, dem Protein- sowie rRNA-Gehalt auf (Amunts et al. 2015; Greber et al. 2015; Desai et al. 2017; Ramrath et al. 2018; Waltz et al. 2020b). Dies steht im starken Gegensatz zu cytoplasmatischen und plastidären Ribosomen, die eine stärkere Konservierung innerhalb der Eukaryoten aufweisen (Desmond et al. 2011; Yusupova und Yusupov 2017). In Tabelle 4 werden einige dieser Unterschiede vergleichend aufgelistet.

Ribosomen sind große Ribonukleoprotein-Komplexe aus zwei Untereinheiten: der kleinen und großen Untereinheit (SSU und LSU). Diese Untereinheiten setzen sich aus r-Proteinen und rRNAs zusammen und sind für die Proteinsynthese in allen Zellen und Zellorganellen essentiell (Steitz 2008; Schmeing und Ramakrishnan 2009). Die SSU bindet an die mRNA und translatiert die einzelnen Codone in die korrespondierende Aminosäure. Dies geschieht über Aminoacyl-tRNAs die das dem Codon entsprechende Anti-Codon aufweisen (Schmeing und Ramakrishnan 2009). In der LSU befindet sich der katalytische Kern der Ribosomen, das

Peptidyl-Transferase Zentrum (PTC), welches die Bildung der Peptidbindungen katalysiert, die zur Polymerisierung der Aminosäuren zu einer Polypeptidkette führt (Nissen et al. 2000; Polikanov et al. 2014). Die synthetisierte Polypeptidkette verlässt das Ribosom über den Ausgangskanal der LSU. Hier interagiert sie mit verschiedenen Proteinfaktoren der Protein-Prozessierung, Zielortbestimmung und der Inserierung in die Membran (Ban et al. 2000; Jenni und Ban 2003; Kramer et al. 2009).

Tabelle 4: Vergleich verschiedener Mitoribosomen mit den Ribosomen aus *Escherichia coli*
Die Tabelle zeigt die Eigenschaften der Mitoribosomen verschiedener Eukaryoten und der Ribosomen aus *E. coli* auf.

	<i>E. coli</i>	Tierische Mitoch.	Hefe Mitoch.	Pflanzliche Mitoch.	<i>T. brucei</i> Mitoch.	
Ribosom	SK	70S	55S	74S	78S	50S
	MW	2,3 MDa	2,7 MDa	3-3,3 MDa	n.b.	4,5 MDa
	rRNAs	3	3	2	3	2
	Proteine	54	82	82	82	127
	rPPRs	nein	ja	nein	ja	ja
LSU	SK	50S	39S	54S	3 MDa ¹	2 MDa ¹
		23S (2.904 nt)	16S (1.569 nt)	21S (3.296 nt)	26S (3.169 nt)	12S (1.176 nt)
	rRNAs	5S (120 nt)	CP tRNA (73-75 nt)		5S (118 nt)	
	Proteine	33	52	46	45	70
		SK	30S	28S	37S	5,7 MDa ^a
SSU	rRNAs	16S (1.534 nt)	12S (962 nt)	15S (1.649 nt)	18S (1.935 nt)	9S (620 nt)
	Proteine	21	30	36	37	57
	Referenz	a	b	c	d	e

SK: Sedimentationskoeffizient; **MW:** Molekulargewicht; **LSU:** Große ribosomale Untereinheit; **SSU:** Kleine ribosomale Untereinheit; **n. b.:** nicht bekannt; **1:** da hier kein SK bekannt ist, wurde das MW angegeben; **a:** (Yusupova und Yusupov 2014); **b:** (Amunts et al. 2015; Greber et al. 2015); **c:** (Desmond et al. 2011; Amunts et al. 2014); **d:** (Waltz et al. 2019; Rugen et al. 2019); **e:** (Ramrath et al. 2018).

Die ersten hochauflösenden Ribosomenstrukturen, die mithilfe von Kristallstrukturanalysen dargestellt und analysiert wurden, stammen von cytoplasmatischen Ribosomen aus Bakterien und Hefen (Clemons et al. 1999; Ben-Shem et al. 2011). Später wurden dann die Strukturen von Mitoribosomen aus Tieren, Hefen und Trypanosomen mittels Kryo-Elektronenmikroskopie entschlüsselt (Amunts et al. 2015; Greber et al. 2015; Desai et al. 2017; Ramrath et al. 2018).

Erst danach folgte die Strukturanalyse pflanzlicher Mitoribosomen (Waltz et al. 2020b). Im Vergleich zu bakteriellen Ribosomen weisen Mitoribosomen einen erhöhten Proteingehalt auf und sind 1,2-1,5-fach größer (Tomal et al. 2019).

Pflanzliche Mitoribosomen sind die größten und komplexesten bisher beschriebenen Mitoribosomen (Waltz et al. 2019). Ihr Proteingehalt ist mit 82 r-Proteinen in *Arabidopsis* deutlich erhöht im Gegensatz zu Ribosomen aus *E. coli* mit 54 r-Proteinen. Von diesen 82 r-Proteinen in *Arabidopsis* sind 19 spezifisch für Pflanzen, dabei gehören elf davon zur Familie der PPR-Proteine (rPPR-Proteine) (Waltz et al. 2019, 2020b; Rugen et al. 2019). Weiterhin weisen die 18S rRNA sowie die 26S rRNA viele Erweiterungssegmente (ES) auf, wodurch diese 9 % bzw. 20 % größer sind als die rRNAs der bakteriellen SSU und LSU. Bei den ES handelt es sich um faltungsfähige RNA Fragmente, die im Laufe der Evolution in Kernelemente der rRNA inseriert wurden und dabei zu einer Verlängerung der rRNA geführt haben, ohne die Struktur der Kernelemente zu beeinträchtigen (Petrov et al. 2015). Besonders auffällig ist eine 370 nt ES der 18S rRNA, die die pflanzenspezifische Kopf-Domäne der SSU bildet und durch zwei rPPR-Proteine stabilisiert wird (Waltz et al. 2020b). Der Fuß der SSU wird ebenso durch ein rRNA ES in Helix h44 sowie h6 gebildet und ebenfalls durch rPPR-Proteine stabilisiert. Im Gegensatz zu Mitoribosomen aus Tieren, Hefen und Trypanosomen, in denen die 5S rRNA im Laufe der mitochondrialen Evolution durch eine tRNA (Tiere), eine Expansion der 21S rRNA (Hefe) und durch r-Proteine (Trypanosomen) ersetzt wurde, ist diese in pflanzlichen Mitoribosomen erhalten geblieben (Amunts et al. 2015; Greber et al. 2015; Ramrath et al. 2018). Die 5S rRNA befindet sich in der zentralen Protuberanz der LSU, welche den Kontakt zur SSU vermittelt. Zusätzlich zur 5S rRNA befinden sich in der zentralen Protuberanz die für Mitochondrien spezifischen Proteine mL40, mL46, mL59/64 und mL60, durch die die Protuberanz vergrößert wird (Waltz et al. 2020b).

Mit Ausnahme des Var1 Proteins aus Hefe synthetisieren die Mitoribosomen in Tieren und Hefen ausschließlich hydrophobe Membranproteine. Daher sind diese an die innere mitochondriale Membran (IMM) gebunden. Dies erfolgt in tierischen Mitochondrien über das r-Protein mL45 und in Hefen über das Homolog Mba1 sowie eine rRNA-Expansion in der Helix H96 der 21S rRNA der LSU, welche den Kontakt zu der membranständigen Insertase Oxa1 vermitteln (Pfeffer et al. 2015; Englmeier et al. 2017). In pflanzlichen Mitochondrien werden neben hydrophoben Membranproteinen auch hydrophile Proteine wie die r-Proteine synthetisiert (Unselde et al. 1997). Daher geht man davon aus, dass in Pflanzen eine heterogene Mischung aus freien und an die Membran gebundenen Ribosomen vorliegt. Bisher konnte aber weder ein r-Protein noch eine rRNA-Expansion identifiziert werden, welche die Kopplung der pflanzlichen Mitoribosomen an die IMM vermitteln könnte (Waltz et al. 2019). Für diese Kopplung spricht aber, dass nicht-ionische Detergenzien für die Solubilisierung von

Membranproteinen benötigt werden, um Mitoribosomen zu isolieren (Waltz et al. 2019). Zudem wurde durch Kryo-Elektronenmikroskop Analysen gezeigt, dass Mitoribosomen in einigen Fällen über ein nicht-ribosomales Protein mit Oxa1 verbunden sind. Diese Beobachtung wurde durch die Co-Immunpräzipitation des Oxa1 Proteins mit Mitoribosomen in *Arabidopsis* unterstützt (Waltz et al. 2019, 2020b).

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Die mitochondriale Genexpression wird durch im Zellkern codierte Proteinfaktoren reguliert, ein Großteil dieser Proteine gehört zu den PPR-Proteinen (Barkan und Small 2014). Zudem scheinen PPR-Proteine einen Teil der Translationsmaschinerie in Mitochondrien auszumachen. Sie stellen dabei Translations-Initiations-Faktoren dar und sind als Teil der Mitoribosomen beschrieben (Manavski et al. 2012; Haili et al. 2016; Waltz et al. 2019). Über den Prozess der mitochondrialen Translation in Pflanzen ist bisher nur wenig bekannt und obwohl bereits einige wenige PPR-Proteine mit der plastidären und mitochondrialen Translation in Verbindung gebracht wurden, sind die genauen Wirkmechanismen noch unbekannt.

Im Vorfeld an diese Arbeit wurde das PPR-Protein DWEORG1 (At3G15590) als ein an RNA gebundenes Protein identifiziert. Bei dem gebundenen RNA-Fragment handelte es sich um ein 40 Nukleotid langes *cox2* RNA-Fragment, das eine Edierungsposition beinhaltet (Bolle 2008). In einer weiteren Arbeit wurde DWEORG1 näher untersucht. Es wurde als ein mitochondriales Protein identifiziert, welches Einfluss auf die *cox2* Translation hat (Bruhs 2012).

Im Rahmen dieser Arbeit soll eine nähere Charakterisierung von DWEORG1 in Bezug auf die mitochondriale Translation erfolgen. Der Fokus soll dabei auf der Identifizierung des Wirkortes von DWEORG1 liegen. Dies erfolgt mithilfe verschiedener molekularbiologischer und biochemischer Untersuchungsmethoden. Es soll dabei bestimmt werden, ob es sich bei DWEORG1 um einen transkriptspezifischen oder einen allgemeinen Translationsfaktor handelt. Die Identifizierung der Ziel-RNA-Sequenz DWEORG1s über RNA-Bindestudien und/oder der Vorhersage dieser über den entsprechenden PPR-Code können hier erste Hinweise auf eine Transkriptspezifität liefern. Für einige PPR-Proteine wurde gezeigt, dass ihre Beteiligung an der 5'-Enden Prozessierung einen Einfluss auf die Translation der entsprechenden Transkripte haben kann (Jonietz et al. 2011; Manavski et al. 2012). Daher sollen Analysen der 5'- und 3'-Enden Prozessierung ausgewählter mitochondrialer Transkripte über die Transkriptenden-Kartierung durchgeführt werden. Sollte es sich bei DWEORG1 nicht um einen transkriptspezifischen Faktor handeln, wird zusätzlich eine allgemeine Beteiligung

DWEORG1s an der Translation über ein *ribosome profiling* untersucht. Zudem soll eine mögliche Assoziation DWEORG1s mit den Mitoribosomen über eine Saccharose-Gradienten-Analyse erfolgen. Auch die Identifizierung putativer Interaktionspartner DWEORG1s durch eine Co-Immunpräzipitation soll hier weitere Informationen liefern. Da die heterologe Expression pflanzlicher PPR-Proteine oft problematisch ist (Andrés-Colás und Van Der Straeten 2017), ist ein weiterer wichtiger Gegenstand dieser Arbeit die Optimierung der heterologen Überexpression von DWEORG1 in *E. coli*.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme wurden, sofern nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (München), Merck (Darmstadt), Qiagen (Hilden), BioRad (München), Macherey und Nagel (Düren), Thermo-Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA), New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, USA), VWR (Radnor, Pennsylvania, USA). Die verwendeten Geräte entsprechen der Laborüblichen Ausstattung. Wenn nicht anders erwähnt, wurden die folgenden Zentrifugen der Firma Beckman Coulter verwendet, Avanti, Optima™ L-90K Ultracentrifuge

2.2 Verwendete Organismen und Anzuchtbedingungen

2.2.1 Verwendetes Pflanzenmaterial

In dieser Arbeit wurden Wildtyppflanzen von *Arabidopsis thaliana* des Ökotyps Columbia-0 (Col-0) und T-DNA Insertionslinien des gleichen Ökotyps verwendet. Die T-DNA Insertionslinie GK_188B06 wurde vom *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC; <http://arabidopsis.info/>) bezogen. GK_188B06 weist eine T-DNA Insertion im ersten Exon des Gens *at3g15590* auf (Li et al. 2007).

2.2.2 Anzucht auf Erde

Einzelne Samen wurden auf einem 2:3 Gemisch aus Sand und Torfkultursubstrat (TKSII, Floragard) ausgesät. Zur Vernalisierung und Synchronisation der Keimung der Samen, wurden die Pflanztöpfe mit den Samen 2-4 Tage im Dunkeln bei 4-8 °C gehalten, bevor sie in die Klimakammer zum Auskeimen transferiert wurden. In der Klimakammer wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen (16 h Licht/ 8 h Dunkel) kultiviert. Die Luftfeuchtigkeit wurde konstant auf 65 % gehalten, die Lichtintensität betrug zwischen 120 und 122 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ und die Temperatur betrug konstante 22 °C.

2.2.3 Anzucht in Sterilkultur

Um die Samen vor Kontaminationen zu schützen, wurden sie zunächst nach Weigel und Glazebrook (Weigel und Glazebrook 2002) oberflächensterilisiert. Hierzu wurden 20-25 mg

Samen von *A. thaliana* in einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß für 1 min in 1 ml EtOH abgeschüttelt und anschließend sedimentiert. Danach wurde der Alkohol entfernt und die Samen für 10 min in einer Natriumhypochloridlösung geschüttelt. Nachdem die Samen sedimentiert wurden, wurde die Lösung abgenommen und die Samen vier Mal mit autoklaviertem Wasser gewaschen. Nachdem letzten Sedimentieren wurden sie in 1 ml steriler 0,1 %-iger Agarose aufgenommen. Im Anschluss wurden die Samen auf Murashige und Skoog Festmedium nach Murashige und Skoog (1962) auf Petrischalen (92 mm x 16 mm oder 100 mm x 100 mm x 20 mm, Sarstedt, Nümbrecht) ausgebracht. Die Vernalisierung, Synchronisation und Anzuchtbedingungen entsprechen denen in Abschnitt 2.2.2. Optional erfolgte ein Umsetzen der ca. 2 Wochen alten Keimlinge auf Erde oder eine weitere Kultivierung der 2 Wochen alten Keimlinge in einer hydroponischen Wurzelkultur (siehe Abschnitt 2.2.4).

Natriumhypochloridlösung

50 % (v/v) Natriumhypochlorid

0,05 % (v/v) Triton X-100

Murashige und Skoog Festmedium

2,203 g/l Murashige und Skoog Medium mit Vitaminen

1 % (w/v) Saccharose

0,05 % (w/v) MES

14-20 g/l Agar-Agar

p H 5,7 (mit KOH)

2.2.4 Sterile hydroponische Wurzelkulturen von *A. thaliana*

Zur Isolierung von Mitochondrien aus *Arabidopsis* wird eine große Menge an Biomasse benötigt. Um diese Menge an Biomasse in relativ kurzer Zeit zu erhalten, wurden hydroponische Wurzelkulturen von *Arabidopsis* nach dem Protokoll von Czakó et al. (1993) angezogen. Hierzu wurden ca. 20 steril angezogene Keimlinge von *Arabidopsis* (siehe Abschnitt 2.2.3) in 200 ml sterilem Wurzelkulturmedium (WKM) in einen 250 ml Erlenmeyerkolben überführt und sechs Wochen bei 25 °C, 80 rpm und im Dunkeln inkubiert. Nach 2 Wochen Anzucht wurde dem WKM Indol-3-Essigsäure (IAA), ein zu den Auxinen gehörendes Phytohormon, in einer Endkonzentration von 50 µg/l hinzugefügt um das Wurzelwachstum anzuregen (Rahman et al. 2001). Nach einer weiteren Woche wurde das Medium durch frisches WKM ohne Phytohormon-Zusatz ersetzt.

Wurzelkulturmedium

4,4 g/l Murashige und Skoog basale Salze
 3 % (w/v) Saccharose
 0,3 % Millers Lösung (6 % (w/v) KH_2PO_4)
 0,2 % Vitamix Lösung
 pH 5,8 (mit KOH)

Vitamix Lösung

0,5 % (w/v) Vitamin B1
 0,05 % (w/v) Vitamin B6
 0,1 % (w/v) Glycin
 0,05 % (w/v) Nikotinsäure
 0,025 % (w/v) Folsäure
 0,05 % (w/v) Biotin

2.2.5 Verwendete Bakterien

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme, ihre Bezeichnung, der Genotyp, die Verwendung und die entsprechende Referenz sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp	Verwendung	Referenz
<i>E. coli</i> XL1-Blue	F ⁺ ::Tn10 proA+B+lacIq $\Delta(\text{lacZ})\text{M15}/\text{recA1 endA1 gyrA96}$ (Nal ^r) thi hsdR17(rK ⁻ mK ⁺) glnV44 relA1 lac	Klonierungen	(Bullock et al. 1987)
BL21 (DE3) pLysS	F ⁻ , ompT, hsdSB (rB ⁻ , mB ⁻), dcm, gal, $\lambda(\text{DE3})$, pLysS, Cm ^r	Heterologe Überexpression von Proteinen	(Studier und Moffatt 1986)

2.2.6 Anzuchtbedingungen der verwendeten Bakterienstämme

E. coli wurde unter aeroben Bedingungen in LB-Flüssig- oder Festmedium (Zusatz von 1,5 % (w/v) Agar-Agar) bei 37 °C kultiviert. Um steriles Medium zu erhalten wurde es 20 min bei 121 °C autoklaviert. Die Anzucht in Flüssigmedium erfolgte schüttelnd bei 180-220 rpm.

LB-Medium

1 % (w/v) Trypton/Pepton aus Casein

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

0,5 % (w/v) NaCl

pH 7,2 (mit NaOH)

2.2.7 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurde zunächst eine über Nacht-Kultur der Bakterien in 50 ml LB-Flüssigmedium bei 37 °C und 180 rpm angezogen. Am darauffolgenden Tag wurden 250 ml LB-Flüssigmedium mit 1 % der über Nacht-Kultur inokuliert und bis zu einer OD_{600} von 0,6 schüttelnd bei 37 °C angezogen. Anschließend wurden die Kulturen 30 min auf Eis gehalten und abzentrifugiert (JLA 16.250 Rotor, 4.500 rpm, 15 min, 4 °C). Die Zellen wurden mit kaltem autoklaviertem Wasser gewaschen, um alle Salze zu entfernen. Hierzu wurden die Zellen in 250 ml Wasser resuspendiert und erneut pelletiert (JLA 16.250 Rotor, 4.500 rpm, 15 min, 4 °C). Das erhaltene Pellet wurde in 125 ml Wasser resuspendiert und erneut gewaschen. Dann wurden die Zellen in insgesamt 20 ml sterilem, kaltem 10 % Glycerin resuspendiert, gepoolt und erneut zentrifugiert (JA 25.50 Rotor, 5.500 rpm, 15 min, 4 °C). Im Anschluss wurde das Pellet in 2 ml sterilem, kaltem 10 % Glycerin aufgenommen und in 40 µl Aliquots bei -80 °C gelagert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Verwendete kommerzielle Kit-Systeme

Die in dieser Arbeit verwendeten kommerziellen Kit-Systeme sind in der Tabelle 6 unter Angabe des Herstellers und der Art der Verwendung aufgeführt. Die Kit-Systeme wurden nach den Herstellerangaben verwendet.

Tabelle 6: Die Tabelle listet die in dieser Arbeit verwendeten Kit-Systeme auf, unter Angabe des Herstellers und der Verwendung

Kit-Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
QIAGEN OneStep RT-PCR Kit	Qiagen	RT-PCR
QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen	qRT-PCR
RNeasy Plant Mini Kit	Qiagen	RNA Aufreinigung
NucleoSpin® Plasmid EasyPure	Macherey und Nagel	Plasmidisolierung
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey und Nagel	DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen
Protino® Ni-TED	Macherey und Nagel	Proteinaufreinigung über His-Tag
µMACS™ GFP-Isolation Kit	Miltenyi Biotec	Co-Immunpräzipitation
RiboMinus™ Plant Kit for RNA-Seq	invitrogen	rRNA-Entfernung aus RNA Proben
Qubit microRNA Assay Kit	invitrogen	Bestimmung der RNA-Konzentration
NEXTflex Small RNA-Seq Kit v3	Bioo Scientific	Herstellung von <i>small</i> RNA-Sequenzier-Bibliothek
NEXTflex Rapid Directional RNA-Seq Kit	Bioo Scientific	Herstellung von RNA-Sequenzier-Bibliothek

2.3.2 Verwendete Oligonukleotide und Vektoren

Alle Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden von der Firma eurofins Genomics synthetisiert. Verwendet wurden die Oligonukleotide in den verschiedenen PCR-Reaktionen (2.3.10/2.3.11/2.3.12) zur Amplifizierung von DNA oder cDNA, sowie für die Sequenzierung verschiedener DNA-Moleküle (2.3.22). Die verwendeten Oligonukleotide sind gesondert in Tabelle A 3 unter 8.5 aufgelistet. Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren sind der Tabelle 7 zu entnehmen, die Plasmidkarten befinden sich im Anhang unter 8.4.

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Verwendung	Referenz
pJet	Zwischen-Klonierung	ThermoFisher
pBB530	Heterologe Überexpression von Chaperonen in <i>E. coli</i>	(de Marco et al. 2007)
pBB535	Heterologe Überexpression von Chaperonen in <i>E. coli</i>	(de Marco et al. 2007)
pBB540	Heterologe Überexpression von Chaperonen in <i>E. coli</i>	(de Marco et al. 2007)
pBB541	Heterologe Überexpression von Chaperonen in <i>E. coli</i>	(de Marco et al. 2007)
pBB550	Heterologe Überexpression von Chaperonen in <i>E. coli</i>	(de Marco et al. 2007)
pBB572	Heterologe Überexpression von Chaperonen in <i>E. coli</i>	(de Marco et al. 2007)
pAB719	Heterologe Überexpression von DWEORG1 in <i>E. coli</i>	(Bruhs 2012)
pKA763	Heterologe Überexpression von DWEORG1 in <i>E. coli</i>	(Knittler 2011)
pSG819	Heterologe Überexpression von DWEORG1 in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
pSG858	Heterologe Überexpression von DWEORG1 in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit

2.3.3 Plasmid-DNA Isolierung aus *E. coli* Zellen

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen erfolgte mit dem NucleoSpin EasyPure Kit (Macherey und Nagel), nach den Angaben des Herstellers. Die *E. coli* Zellen wurden in 2-3 ml LB-Flüssigmedium, welches mit entsprechenden Antibiotika versetzt wurde, über Nacht bei 37 °C und 180-220 rpm aerob angezogen.

2.3.4 Transformation von Plasmid-DNA

E. coli Zellen wurden mittels Elektroporation nach Dower et al. (1988) mit doppelsträngiger, zirkulärer Fremd-DNA (Plasmid-DNA) transformiert. Hierzu wurden 40 µl elektrokompente *E. coli* Zellen mit der zu transformierenden Plasmid-DNA gemischt, 1 min auf Eis gehalten und anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Biorad) überführt. Mithilfe des Gene Pulser® II Elektroporation System (Biorad), wurden die Bakterien bei 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω elektroporiert. Bei der Elektroporation wird ein elektrisches Feld erzeugt, welches die Membran der Bakterien durchlässig für Plasmid-DNA macht. Im Anschluss an die Elektroporation wurden die Zellen in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und 10 min bei RT inkubiert, um sich zu regenerieren. Die transformierten Zellen wurden daraufhin auf entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

SOC-Medium

2 % (w/v) Trypton/Pepton aus Casein

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

20 mM α -D(+)-Glucose

10 mM $MgCl_2$

2,5 mM KCl

10 mM $MgSO_4$

pH 7,0 (mit HCl)

2.3.5 Hydrolyse von DNA

Für die Klonierung von DNA oder zur Überprüfung von Vektoren, wurden in dieser Arbeit Restriktionsendonukleasen des Typs II von New England Biolabs verwendet. Hierbei handelt es sich um Enzyme, die in der Lage sind doppelsträngige DNA über eine hydrolytische Spaltung gezielt zu zerteilen. Die Spezifität wird durch eine palindromische Erkennungssequenz von 4-8 bp ermöglicht, die sich bei den unterschiedlichen Enzymen unterscheidet. Bei dieser Spaltung können sowohl glatte als auch kohesive Enden entstehen (Nathans und Smith 1975). Die Reaktionsbedingungen wurden je nach Enzym angepasst und nach den Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.6 Ligation von DNA

Um DNA-Fragmente in einen linearisierten Vektor zu ligieren, wurde die T4-DNA Ligase (New England Biolabs) verwendet. Die T4-DNA Ligase verbindet zwei DNA-Fragmente über eine Phosphodiesterbindung zwischen einem 5'-Phosphatrest und einer 3'-OH-Gruppe zweier DNA-Moleküle. Es können sowohl DNA-Fragmente mit glatten als auch kohesiven Enden miteinander ligiert werden. Die Vektor-DNA und die einzufügende DNA (Insert) wurden in einem molaren Verhältnis von 1:4 eingesetzt und die Ligationsreaktion über Nacht bei 4 °C im Ligase-Puffer durchgeführt.

2.3.7 Dephosphorylierung von Nukleinsäuren

Die Dephosphorylierung von Nukleinsäuren erfolgte mit der Antarctic Phosphatase (New England Biolabs). Hierbei handelt es sich um eine alkaline Phosphatase, die eine Aktivität von 5 U/ μ l aufweist. Sie entfernt unspezifisch die Phosphatmonoester des 5'- sowie des 3'-Endes der Nukleinsäure. Für die Dephosphorylierung von 1 pmol DNA- oder RNA-Enden wurden 5 U

des Enzyms verwendet und die Reaktion im Antarctic Phosphatase Puffer für 30 min bei 37 °C durchgeführt. Anschließend wurde das Enzym durch Hitze inaktiviert (5 min 65 °C).

2.3.8 Phosphorylierung von Nukleinsäuren

Die Phosphorylierung von Nukleinsäuren erfolgte mit der T4-Polynukleotid-Kinase (T4-PNK) mit einer Aktivität von 10 U/μl (Thermo Fisher). Das Enzym katalysiert den Transfer des γ -Phosphats von ATP auf die 5'-OH-Gruppe von einzel- oder doppelsträngiger DNA- und RNA-Molekülen. In Anwesenheit von ADP kann die Reaktion rückgängig gemacht werden. Mit 10 U der T4-PNK können, in Anwesenheit von 20 mM ATP, 1-20 pmol DNA- oder RNA-Enden phosphoryliert werden. Die Reaktion erfolgte im entsprechenden Puffer für 20-60 min bei 37 °C.

2.3.9 Aufreinigung von PCR-Produkten und DNA aus Agarosegelen

Nach der Hydrolyse von DNA (2.3.5) für eine Ligation (2.3.6) oder bei der Amplifizierung von mehr als einem PCR-Produkt in der PCR (2.3.10) wurde eine Gelelektrophorese (2.3.14) durchgeführt um die DNA-Fragmente voneinander zu trennen. Das DNA-Fragment von Interesse wurde anschließend mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey und Nagel) nach Herstellerangaben aus dem Gel eluiert.

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten für die Sanger-Sequenzierung (2.3.22) wurde ebenfalls das NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey und Nagel) nach Herstellerangaben verwendet.

2.3.10 Standard Polymerasekettenreaktion (PCR)

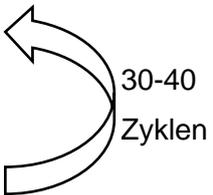
Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die *in-vitro* Amplifizierung spezifischer DNA-Abschnitte durch eine hitzestabile DNA-Polymerase unter der Verwendung synthetischer Oligonukleotide. Die PCR besteht aus drei Schritten, die sich zyklisch wiederholen. Zunächst wird die DNA denaturiert, es folgt die Bindung der Oligonukleotide an die DNA-Einzelstränge und die Synthese des jeweiligen Zweitstranges der DNA durch die DNA-Polymerase, die Elongation (Mullis et al. 1986; Saiki et al. 1988).

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene DNA-Polymerasen in der PCR eingesetzt, die *MolTaq*-DNA-Polymerase (Molzym) oder die *Pwo*-Polymerase (VWR), welche zusätzlich zu der 5'-3'-Polymeraseaktivität eine sogenannte *proofreading* Funktion besitzt, bedingt durch eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Als Ausgangsmaterial wurden 0,1-1 ng Plasmid-DNA oder 100-1.000 ng genomische DNA in einem PCR-Ansatz verwendet. Zusätzlich enthielten die

PCR-Ansätze den entsprechenden PCR-Puffer, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM ATP, CTP, GTP und TTP, je 100 nM der Oligonukleotide und 0,025 U/µl *MolTaq*-DNA-Polymerase bzw. 0,05 U/µl *Pwo*-DNA-Polymerase. Bei Verwendung der *MolTaq* DNA-Polymerase wurde den Ansätzen noch 1 % (v/v) *Enhancer* beigelegt. Bei Verwendung der *Pwo*-DNA-Polymerase wurden je 300 nM Oligonukleotid verwendet. Das verwendete Zyklusprofil der PCR ist der Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Zyklusprofil der Standard-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung des DNA-Doppelstrangs	94°C	2 min
Denaturierung	94°C	1 min
Oligonukleotid-Bindung	variabel	1 min
Elongation	72°C (<1 kbp)/ 68°C (>1 kbp oder bei Verwendung der <i>Pwo</i> -Polymerase)	1 min/1 kbp
Finale Elongation	72°C bzw. 68°C	10 min



2.3.11 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Das Prinzip der RT-PCR entspricht dem der Standard-PCR, allerdings wird hier RNA als Ausgangsmaterial verwendet, welche zunächst durch eine reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben wird. Diese cDNA dient dann als Matrize für die DNA-Synthese in der PCR-Reaktion. Um DNA-Kontaminationen auszuschließen, wurde die eingesetzte RNA zunächst mit DNaseI behandelt (2.3.18) und eine Standard-PCR (2.3.10) zur Kontrolle der DNaseI-Behandlung durchgeführt. Für die Amplifizierung von cDNA aus Gesamt-RNA, wurde das OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dieses Kit ermöglicht die cDNA-Synthese und cDNA-Amplifikation in einem Reaktionsansatz.

2.3.12 Quantitative reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Das Prinzip der quantitativen RT-PCR entspricht dem der RT-PCR, allerdings ermöglicht sie die Quantifizierung der eingesetzten RNA-Menge (Holzapfel and Wickert 2007). Dies beruht auf der Detektion eines Fluoreszenzfarbstoffes in Echtzeit, der während der Amplifikation in die PCR-Produkte eingebaut wird. Die Intensität der Fluoreszenz nimmt dabei proportional mit der Menge der synthetisierten PCR-Produkte zu. Die während des PCR-Laufs erfassten Fluoreszenzsignal-Daten ermöglichen die Quantifizierung der Ausgangsmenge der RNA.

Diese Auswertung ist allerdings nur mit den Daten die während der exponentiellen Phase der PCR erhalten wurden möglich (Arya et al. 2005). Zur Bestimmung der Menge eines bestimmten Transkriptes ist eine Normalisierung der Daten erforderlich. Dies erfolgt über einen Vergleich der Daten eines ebenfalls amplifizierten Haushaltsgens. Ein Haushaltsgen wird in der Regel konstant in allen Geweben transkribiert, sodass Variationen in der eingesetzten Ausgangsmenge ausgeglichen werden können.

Hier wurde das QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Allerdings wurde das Volumen eines Reaktionsansatzes abweichend zum Herstellerprotokoll auf 15 µl reduziert, wobei die Endkonzentration der Einzelkomponenten unverändert blieb. Als Ausgangsmaterial wurden je Ansatz 35 ng RNA (nach DNase-Behandlung, 2.3.18) eingesetzt. Das verwendete Zyklusprofil ist in Tabelle 9 aufgeführt. Die Reaktion wurde im „Rotor-Gene Q“ (Qiagen) durchgeführt und die Analyse der Daten erfolgte mithilfe des Programms „Rotor-Gene Q 2.3.1“ (Qiagen). Zur Berechnung der relativen Transkriptmenge wurde die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode verwendet (Livak und Schmittgen 2001).

Tabelle 9: Zyklusprofil der qRT-PCR

Schritt der PCR-Reaktion	Temperatur	Dauer
Reverse Transkription	50°C	30 min
Inaktivierung der reversen Transkriptase und Aktivierung der HotStar <i>Taq</i> DNA-Polymerase	95°C	15 min
Denaturierung	94°C	15 s
Oligonukleotid-Bindung	54-55°C	60 s
Elongation	72°C	20 s
Finale Elongation	50°C	5 min
Schmelzkurvenanalyse	50°C → 99°C (+0,2°C/s)	245 s


 40 Zyklen

2.3.13 Transkriptenden-Kartierung über cRT-PCR

Zur Untersuchung der 5'- und 3'-Enden mitochondrialer Transkripte, wurde die Methode der Transkriptenden-Kartierung nach Forner et al. (2007) verwendet. Es wurde die Gesamt-RNA aus Wildtyp und *dweorg1* Pflanzen des gleichen Alters isoliert, mit DNase behandelt (2.3.18) und die RNA über eine T4-RNA-Ligase zirkularisiert (cRNA). Hierfür wurden 10 µg RNA in einer 50 µl Reaktion mit 30 U T4-RNA-Ligase (New England Biolabs) im entsprechenden Reaktionspuffer und 20-50 µM ATP für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde

die Reaktion gestoppt, durch eine 15-minütige Inkubation der Proben bei 65 °C. Die RNA wurde durch die Zugabe von 5 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 100 µl kaltem EtOH abs. gefällt. Das RNA-Pellet wurde mit 70 %-igem EtOH gewaschen, anschließend in 70 µl TE-Puffer resuspendiert und die RNA bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die cRNA wurde anschließend als Matrize für die Synthese von cDNA verwendet. Dies wurde mithilfe der Maxima H Minus Reverse Transkriptase (Thermo Fisher) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für diese Reaktion wurden transkriptspezifische Oligonukleotide verwendet, die der Tabelle A 3 entnommen werden können. Die so erhaltene cDNA wurde zunächst aufgereinigt (2.3.9), in einer Standard-PCR (2.3.10) eingesetzt, die PCR-Produkte in pJet kloniert (2.3.6) und anschließend sequenziert.

2.3.14 Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der Länge von Nukleinsäure-Fragmenten sowie der Auftrennung von Nukleinsäure Gemischen wurde eine Agarosegelelektrophorese nach (Sambrook et al. 1989) durchgeführt. Je nach Agarosegehalt des Gels, liegen verschieden große Poren vor, die die Wandergeschwindigkeit der Nukleinsäuren bestimmt. Da Nukleinsäuren negativ geladen sind, wandern sie beim Anlegen einer Spannung von der Kathode in Richtung der Anode. Längere Fragmente wandern dabei langsamer als kurze Fragmente, wodurch diese der Größe nach aufgetrennt werden können. Als Vergleichstandard dienten der erweiterte 100-5.000 bp Marker bzw. der Lambda-*HindIII* Marker (MBBL, Bielefeld). In dieser Arbeit wurden 1-2 %ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde hierzu durch Erhitzen in der Mikrowelle in 1x TBE-Puffer aufgelöst, mit 0,01 % des DNA/RNA-Farbstoffs MIDORI^{Green} (nippon genetics, Düren) versetzt und in eine entsprechende Gelkammer gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde die Kammer mit 1x TBE-Puffer geflutet. Die mit Gelladepuffer versehenen Proben wurden in die Taschen gegeben und eine Spannung von 100 V für 1 h angelegt. Der Farbstoff MIDORI^{Green} ist ein fluoreszierender Farbstoff, der durch UV-Licht, blaue LEDs oder blau/grün LEDs angeregt werden kann. Für diese Arbeit wurde ein blau/grün LED-Transilluminator (nippon genetics, Düren) verwendet, um die Nukleinsäuren im Gel sichtbar zu machen.

TBE-Puffer

100 mM Tris
 100 mM Borsäure
 2 mM EDTA
 pH 8,3

6x DNA-Gelladepuffer

10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
 50 mM EDTA
 15 % (w/v) Ficoll 400
 0,03 % (w/v) Bromphenolblau
 0,03 % Xylencyanol FF
 0,4 % Orange G

2.3.15 Northern Blot

Isolierte Gesamt-RNA wurde mit 60 % (v/v) Formamid sowie 1x Probenpuffer versetzt und in einem 1,2 %-igen Agarosegel in 1x TAE-Puffer gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde bei 70 V für etwa 1-1 ½ Stunden durchgeführt. Da das Formamid denaturierend auf die RNA wirkt, kann das Gel direkt im Anschluss für den Transfer der RNA auf eine Nylonmembran (Perkin Elmer) verwendet werden, dies erfolgte nach Alwine et al. (1977). Für den Transfer wurde ein Filterpapier-Stapel in eine Wanne mit 20x SSPE-Puffer gelegt. Auf den Stapel wurden zwei in 20x SSPE-Puffer getränkte Whatman-Papier in Gelgröße (11x14 cm), das Gel, die Membran, zwei weitere Whatman-Papier und weiteres Filterpapier luftblasenfrei gestapelt. Über Nacht wurde die RNA mittels Kapillartransfer auf die Nylonmembran übertragen. Am darauffolgenden Tag wird die Membran auf ein mit 2x SSPE-Puffer getränktes Whatman-Papier gelegt und die RNA im UV Stratalinker™ 1800 (Stratagen) mit UV-Licht bestrahlt, sodass die RNA auf der Membran fixiert wird.

Die Sonden für die Hybridisierung des Northern-Blot wurden mit dem DECAprime II DNA Labeling Kit (Ambion®) nach Herstellerangaben hergestellt. Für die radioaktive Markierung wurde [α -³²P]-Desoxycytosin-5'-triphosphat verwendet. Die Sonden wurden mittels PCR (2.3.10) synthetisiert und vor der Markierung aufgereinigt (2.3.9). Zunächst wurde die Membran 2-3 Stunden bei 68 °C in Hybridisierungspuffer prähybridisiert. Im Anschluss folgten ein Pufferwechsel und die Zugabe der radioaktiven Sonde. Die Hybridisierungsreaktion erfolgte über Nacht bei 68 °C. Im Anschluss wurde die Membran in 68 °C warmen 2xSSC-Puffer gewaschen, getrocknet und ein Röntgenfilm aufgelegt. Je nach Signalstärke erfolgte die Autoradiographie für ein bis sieben Tage bei -80 °C.

10x TAE-Puffer

400 mM Tris
10 mM EDTA
1,14 % Essigsäure (v/v)

20x SSPE-Puffer

3,6 M NaCl
160 mM Na₂HPO₄
40 mM NaH₂PO₄
20 mM EDTA
pH 7,4 (NaOH)

Hybridisierungspuffer

1 M NaCl
5 % (w/v) Dextransulfat-Natriumsulfat
1 (v/v) SDS
frisch: 10 mg denaturierte Lachssperma-DNA
pH 7,0-7,5

Probenpuffer

50 % (w/v) Glycerin
1 mM EDTA
0,25 % (w/v) Bromphenolblau
0,25 % (w/v) Xylencyanol FF

2x SSC-Puffer

75 mM NaCl
7,5 mM Na-Citrat
0,1 % (v/v) SDS

2.3.16 RNA-Gelshift Analyse (REMSA)

Die für den REMSA verwendeten RNA-Fragmente wurden von Biomers.net (Ulm) synthetisiert. Die RNA wurde am 5'-Ende radioaktiv markiert. Hierfür wurden 50 pmol der RNA, 20 U T4 Polynukleotid-Kinase (PNK) (New England Biolabs), 40 U RNase Inhibitor (ThermoFisher) in 1x T4 PNK-Reaktionspuffer mit 50 pmol [γ -³²P]-ATP versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die nicht eingebauten Nukleotide unter Verwendung von Microspin™ G-50 Columns (Merck) entfernt und die RNA gefällt. Das RNA-Pellet wurde in 20 µl DEPC-Wasser aufgenommen und in der Bindereaktion eingesetzt.

Die in der Bindereaktion verwendeten 30 µl Ansätze waren wie folgt zusammengesetzt:

1x Bindepuffer, 10 % Glycerin, 1 µg/ml Hefe-tRNA, 0,5 mg/ml Heparin, 40 U RNase-Inhibitor, 5 pmol radioaktiv markierte RNA und 0/5/10 oder 15 µg aufgereinigtes Protein (2.4.7)

Zur Kontrolle wurde den Ansätzen 200 bzw. 500 pmol spezifische, unmarkierte kompetitive RNA hinzugefügt. Die Ansätze wurden 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann mit 1x Beladungspuffer versetzt. Die Proben wurden dann in einem nativen 12 %-igen Polyacrylamid/Bis-Acrylamid-Gel in 1x TBE-Puffer gelelektrophoretisch aufgetrennt, das Gel getrocknet und das Signal über einen Röntgenfilm detektiert.

10x Bindepuffer

1 M NaCl
 400 mM Tris-HCl pH 7,5
 40 mM DTT
 1 mg/ml BSA

10x Beladungspuffer

250 mM Tris-HCl pH 7,5
 0,2 % (w/v) Bromphenolblau
 40 % (v/v) Glycerin

2.3.17 RNA-Isolierung mit TRIZOL

Zur Isolierung von RNA mit TRIZOL wurden die Proben mit einem Volumen TRIZOL versetzt und 15-30 s gevortext. Anschließend wurden die Proben 15 min bei RT inkubiert und dann mit Chloroform (100 µl/500 µl TRIZOL) versetzt. Die Proben wurden erneut 15-30 s gevortext und 15 min bei RT inkubiert. Es folgt eine 15-minütige Zentrifugation bei 17.000 xg und 4 °C. Die obere, wässrige Phase enthält die RNA und wurde in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Wenn geringe Konzentrationen an RNA erwartet wurden, wurden die Proben nun mit 40 µg Glykogen versetzt. Hierbei handelt es sich um ein Polysaccharid, welches sich mit der RNA verbindet und deren Präzipitation erhöht. Es folgte die Zugabe von einem Volumen eiskaltem Isopropanol. Nachdem die Proben durch Invertieren gut gemischt wurden, wurden sie über Nacht bei -20 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde die RNA durch eine Zentrifugation für 20 min bei 17.000 xg und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde 1-2-mal mit 500-1.000 µl kaltem 70 %-igem EtOH gewaschen (Zentrifugation für 20 min bei 17.000 xg und 4 °C). Anschließend wurde das Pellet gut getrocknet und in 20-500 µl (je nach weiterer Verwendung) DEPC-Wasser resuspendiert und bei -20 °C (kurze Zeit) oder -80 °C (längere Lagerung) gelagert.

2.3.18 DNase-Behandlung von RNA-Proben

Für den Einsatz in RT- sowie qRT-PCR Reaktionen und die Erstellung von Sequenzier-*libraries* wurden ausschließlich RNA-Proben eingesetzt, die keine genomische DNA aufwiesen. Da bei jeder RNA-Isolierung auch immer genomische DNA mit isoliert wird, wurde die DNA mithilfe des Enzyms Desoxyribonuklease (DNase) abgebaut. Die DNase fragmentiert DNA, indem sie die 5'-Phosphatgruppe und 3'-Hydroxylgruppe zweier Nukleotide spaltet.

Die DNaseI-Behandlung von 1-4 µg RNA erfolgte mit der DNaseI (1 U/µl) (Thermo Fisher) nach Herstellerangaben. Die DNaseI-Behandlung wurde für 1-2 h bei 37 °C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 mM EDTA gestoppt bei 65 °C für 10 min. Anschließend wurden die RNA-Proben als Template in einer Standard-PCR (2.3.10) eingesetzt, um den Erfolg der DNase-Behandlung zu untersuchen.

Die RNA-Proben aus dem *ribosome profiling* (2.6) wurden mit der Turbo DNase (2 U/ μ l) (invitrogen) behandelt. Sie unterscheidet sich von der DNase I dahingehend, dass sie eine höhere Affinität zur DNA aufweist und somit auch sehr geringe Mengen DNA effizient spalten kann. Als Startmaterial wurden 6-12 μ g RNA verwendet, die mit 4 U der Turbo DNase sowie mit 50 U Ribolock RNase Inhibitor (40 U/ μ l; Thermo Fisher) versetzt wurden. Es wurden 50 μ l-Ansätze in 1 x Turbo DNase Puffer angesetzt und diese für 30 min bei 37 °C inkubiert. Um die DNase und die Salze aus dem Puffer zu entfernen wurden die Proben mit 450 μ l Extraktionspuffer RNase II (2.6.2) versetzt und die RNA mit TRIZOL aufgereinigt (2.3.17).

2.3.19 Entfernung von ribosomaler RNA für RNA-Sequenzierung

Zur Entfernung störender ribosomaler RNA bei der RNA-Sequenzierung und auch der *small* RNA-Sequenzierung wurde das RiboMinus™ Plant Kit for RNA-Seq (invitrogen) nach den Herstellerangaben verwendet. Hierfür wurden 5-8 μ g RNA als Startmaterial verwendet. Um die RNA nach der Behandlung zu konzentrieren, wurde die Präzipitation mit Ethanol ebenfalls nach Herstellerangaben durchgeführt. Die RNA wurde anschließend in 22 μ l DEPC-Wasser aufgenommen und ihre Konzentration mit dem Qubit® 2.0 Fluorometer (invitrogen) bestimmt (2.3.21).

2.3.20 Erstellung von *libraries* für die Sequenzierung

Zur Sequenzierung von RNA und *ribosome footprints* wurden cDNA-*libraries* angefertigt. Die *library* für die RNA-Sequenzierung wurde mit dem NEXTflex Rapid Directional RNA-Seq Kit (Bioo Scientific) nach den Herstellerangaben erstellt. Die *library* für die *ribosome footprints* wurde mit dem NEXTflex Small RNA-Seq Kit v3 (Bioo Scientific) ebenfalls nach den Herstellerangaben erstellt.

2.3.21 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren wurde der NanoDrop® ND-1000 (Peqlab) verwendet. Hierbei wird die Konzentration spektrophotometrisch bei monochromatischem Licht der Wellenlänge 260 nm durchgeführt. Eine Extinktionseinheit entspricht dabei einer Konzentration von 50 μ g/ml dsDNA bzw. 40 μ g/ml RNA (Sambrook et al. 1989). Zudem wurde das Qubit® 2.0 Fluorometer (invitrogen) verwendet, hierbei wird ein Fluoreszenzfarbstoff verwendet, der nur fluoresziert, wenn er an Nukleinsäuren gebunden ist. Dabei ist der Farbstoff jeweils spezifisch für die zu messende Nukleinsäure. Damit wird eine Unterscheidung von DNA und RNA in der gleichen Probe möglich. Zudem wird eine genauere Konzentrationsbestimmung erreicht, vor allem für geringe Nukleinsäurekonzentrationen.

2.3.22 Sanger-Sequenzierung

Die Sanger-Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden wurde durch das Institut für Klinische Molekularbiologie der CAU Kiel nach der Didesoxy-Methode (Sanger et al. 1977) durchgeführt.

2.3.23 Illumina-Sequenzierung

Das *Next-Generation Sequencing* (NGS) wurde in der Sequenzierabteilung des I2BC (Institut de Biologie Intégrative de la Cellule, Gif-sur-Yvette) durchgeführt. Es wurde die Illumina NextSeq Technologie, *single end*, 75 bp verwendet.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Heterologe Überexpression in *E. coli*

Die heterologe Überexpression in *E. coli* erfolgte nach Ke et al. (2013). Die Plasmide wurden in BL21 (DE3) pLysS Zellen transformiert (2.3.4) und die Zellen auf LB-Festmedium (2.2.6) (30 µg/ml Kanamycin) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden je 50 ml LB-Flüssigmedium (30 µg/ml Kanamycin) mit jeweils einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden jeweils 250 ml LB-Flüssigmedium (30 µg/ml Kanamycin) mit 4 ml der Übernacht-Kultur inokuliert und die Zellen bis zu einer OD_{600nm} von ca. 1,0 bei 37 °C und 180 rpm angezogen. Die Proteinüberexpression wurde mit 0,1 mM (Endkonzentration) IPTG induziert und die Zellen über Nacht bei 16 °C und 180 rpm inkubiert. Die Kulturen wurden anschließend auf Eis gehalten und die Zellen durch eine Zentrifugation im JLA 16.250 Rotor in der Beckmann Zentrifuge sedimentiert (7.000 xg, 15 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde entweder bei -20 °C gelagert oder direkt für die Proteinisolierung verwendet (2.4.2). Vor der Zugabe von IPTG wurde eine t₀-Probe (1 ml der Kultur) entnommen und vor der Sedimentation der Zellen eine t_E-Probe (500 µl der Kultur) um den Erfolg der Proteinüberexpression nachzuweisen.

2.4.2 Native Proteinisolierung aus *E. coli*

Um Proteine aus *E. coli* zu isolieren, mussten die Zellen zunächst aufgeschlossen werden. Hierzu wurden die Zellpellets (2.4.1) in 4 ml LEW-Puffer aufgenommen, mit 1 mg/ml Lysozym sowie 0,1 mM Proteaseinhibitor AEBSF versetzt und 30 min aus Eis gehalten. Das Lysozym sorgt für die Lyse der Zellmembran. Um die Bakterienzellen vollständig aufzuschließen, wurden sie Ultraschallwellen ausgesetzt (Sonotrode). Die Beschallung erfolgte sechs Mal für

20 s bei einer Intensität von 70 %. Um die löslichen Proteine von den unlöslichen zu trennen, wurden je 2 ml des Lysats für 30 min bei 10.000 xg zentrifugiert. Im Überstand befanden sich die löslichen Proteine und im Pellet die unlöslichen Bestandteile. Die Proteinproben wurden bei -20 °C gelagert oder direkt für eine SDS-PAGE (2.4.9) oder His-tag-Aufreinigung (2.4.7) verwendet.

LEW-Puffer

50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

pH 8,0 (mit NaOH)

2.4.3 Proteinisolierung aus *A. thaliana* Mitochondrien

Zur Isolierung von mitochondrialem Protein aus *A. thaliana* Mitochondrien wurden 4-6 mg isolierte Mitochondrien (2.5.1) verwendet. Die Mitochondrien wurden zunächst durch die Zugabe von 500 µl Waschpuffer und einer Zentrifugation für 10 min bei 10.000 rpm (4 °C) gewaschen. Das so erhaltene Mitochondrienpellet wurde dann in 100 µl kaltem Extraktionspuffer mit 10 mM AEBSF aufgenommen und 30 min auf Eis lysiert. Um die löslichen von den unlöslichen Proteinen zu trennen, wurde das Lysat 30 min bei 18.000 xg und 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet bildete die unlöslichen und der Überstand die löslichen mitochondrialen Proteine. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bradford-Reagenz bestimmt (2.4.8) und die Proteine bei -20 °C gelagert.

Waschpuffer

0,3 M Saccharose

10 mM TES-NaOH pH 7,5

Extraktionspuffer

30 mM HEPES-KOH pH 7,7

3 mM Mg-Acetat

2 M KCl

0,2 % (v/v) Triton X-100

1 mM Dithiothreitol

2.4.4 Isolierung mitochondrialer Proteine aus *Arabidopsis* Pflanzenmaterial

Zur Isolierung von mitochondrialen Proteinen aus Pflanzenmaterial wurden 2 g Pflanzenmaterial mit etwas Seesand in 10 ml CME-Puffer fein gemörsert. Die so entstandene Lösung wurde dann durch eine Lage Miracloth in ein SS34-Zentrifugenröhrchen filtriert und

5 min bei 3.240 rpm und 4 °C zentrifugiert, um grobe Zelltrümmer aus der Lösung zu entfernen. Der so erhaltene Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und die Mitochondrien durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 14.200 rpm und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Resuspensionspuffer resuspendiert und erneut 20 min bei 14.200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde nun entweder bei -80 °C gelagert oder direkt weiterverwendet werden. Wurde es bei -80 °C gelagert wurde es auf Eis aufgetaut und anschließend mit 200 µl Lysepuffer versetzt, vollständig resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Während der 30-minütigen Inkubation wurden die Proben zwischendurch gevortext. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Proben 10 min bei 4 °C und 14.800 rpm zentrifugiert. Im Überstand befanden sich die mitochondrialen Proteine, das Pellet wurde verworfen. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford bestimmt (2.4.8).

CME-Puffer	Resuspensionspuffer I	Lysepuffer
75 mM MOPS-KOH, pH 7,6	10 mM MOPS-KOH, pH 7,2	25 mM Tris-HCl, pH 7,5
0,6 M Saccharose	0,3 M Saccharose	75 mM NaCl
4 mM EDTA		0,5 mM EDTA
0,2 % (w/v) PVP-40		0,05 % (v/v) SDS
8 mM Cystein		0,5 % (v/v) Triton X-100
0,2 % (w/v) BSA		0,25 % (w/v) Na-Deoxychelat
		1 mM AEBSF

2.4.5 Isolierung mitochondrialer Proteine aus *Arabidopsis* Pflanzenmaterial für eine BN-PAGE

Die Proben wurden zunächst wie in 2.4.4 behandelt. Im Anschluss an den zweiten Zentrifugationsschritt wurden die Proben allerdings in 1 ml Resuspensionspuffer I resuspendiert und 3 ml steriles Wasser hinzugefügt. Die Proben wurden erneut zentrifugiert (14.200 rpm, 20 min, 4 °C). Das so erhaltene Pellet wurde in 470 µl Resuspensionspuffer II resuspendiert und mit 50 µl 20 % DDM versetzt. Die Proben wurden durch vortexen gemischt und auf Eis gehalten. Anschließend wurden die Proben bei 120.000 xg und 4 °C 20 min zentrifugiert (Beckman Coulter Optima Max-XP Ultrazentrifuge mit dem TLA 100.2 Rotor). Der so erhaltene Überstand wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und die Proteinkonzentration mit der Bradford-Methode bestimmt (2.4.8).

Resuspensionspuffer I

10 mM MOPS-KOH, pH 7,2

0,3 M Saccharose

Resuspensionspuffer II

10 mM Bis-Tris-HCl pH 7,5

0,5 M 6-Aminohexanoic-Säure

1 mM EDTA

0,3 M Saccharose

2.4.6 Co-Immunpräzipitation von Protein

Für die Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionspartnern von DWEORG1 wurde eine Co-Immunpräzipitation unter Verwendung des μ MACS™ GFP isolation“ Kits (Miltenyi Biotec) nach Herstellerangaben durchgeführt. Da kein Antikörper gegen DWEORG1 selbst zur Verfügung steht, wurde eine *Arabidopsis* Linie verwendet, die ein Gen für ein DWEORG1-eGFP Fusionsprotein exprimiert. Es wurden 3 μ g mitochondriales Protein mit 50 μ l der magnetischen Anti-GFP *microbeads* Lösung versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Währenddessen wurde die *μcolumn* des Kits in den μ MACS™ *separator* gesetzt, der ein magnetisches Feld erzeugt. Dort wurde die Säule mit 200 μ l des Lysepuffers equilibriert und im Anschluss das Protein-Antikörper-Gemisch auf die Säule gegeben. Nach fünfmaligem Waschen der Säule mit Waschpuffer, wurden die Protein-Komplexe mit 50 μ l des Elutionspuffers (95 °C) eluiert.

2.4.7 His-tag-Aufreinigung über Ni-Säule

Zur nativen Aufreinigung heterolog synthetisierter Polyhistidin-gekoppelter Proteine wurde das Protino® Ni-TED Kit (Macherey-Nagel) verwendet. Hierbei wird das Prinzip der Metall-Ionen-Affinitätschromatographie genutzt. Die verwendeten Säulen enthalten einen silikabasierten Harz, der mit Ni²⁺-Ionen bestückt ist, die durch den Metall-Chelator TED (tris-Carboxymethyl Ethylen Diamin) immobilisiert werden. Eines der an das Protein gekoppelten Histidine kann an die Ni²⁺-Ionen binden und erst die Zugabe eines Imidazol-haltigen Puffers löst diese Bindung wieder auf.

Die aus *E. coli* isolierten löslichen Proteine (2.4.2) wurden auf die mit 2 ml 1x LEW-Puffer äquilibrierten Ni-TED-Säulen aus dem Protino® Ni-TED Kit gegeben. Anschließend wurden die Säulen je zwei Mal mit je 2 ml 1x LEW-Puffer, je 2 ml 1x LEW-Puffer mit 10 mM Imidazol und je 2 ml 1x LEW-Puffer mit 30 mM Imidazol gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Dann wurde die Säule drei Mal mit je 1 ml Elutionspuffer versetzt um die spezifisch gebundenen Proteine von der Säule zu eluieren. Die Proteinkonzentration der Eluate wurde mittels Bradford bestimmt (2.4.8) und die Proteine in Aliquots bei -20 °C gelagert.

LEW-Puffer

50 mM NaH₂PO₄
 300 mM NaCl
 pH 8,0 (mit NaOH)

Elutionspuffer

50 mM NaH₂PO₄
 300 mM NaCl
 250 mM Imidazol
 pH 8,0 (mit NaOH)

2.4.8 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (1976). Die Methode basiert auf einer Farbreaktion, die in einem sauren Medium stattfindet. Das Bradford-Reagenz von Bio-Rad „Bio-Rad Protein Assay“ enthält neben Phosphorsäure und Methanol einen Triarylmethanfarbstoff, dessen Absorptionsmaximum sich bei Bindung an ein Protein von 465 nm zu 595 nm verschiebt. Dabei korreliert die Intensität des Farbkomplexes mit der Proteinkonzentration.

Die Messung der Absorption erfolgte mit dem Photometer Uvikon 930 (Kontron Instruments) bei 595 nm gegen eine Leerprobe. Um die Konzentration der zu untersuchenden Probe berechnen zu können, wurde eine Eichreihe mit BSA angefertigt. Die zu messenden Proben wurden wie folgt vorbereitet: 5 µl der Probe wurden mit 795 µl destilliertem Wasser und 200 µl des Bradford-Reagenz gemischt. Die Messung erfolgte nach 5 min.

2.4.9 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung isolierter Proteine nach ihrem Molekulargewicht, wurde eine denaturierende, diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt (abgewandelt nach Laemmli (1970)). Vor dem Auftrag der Proteine wurden diese mit DTT (1/10 Vol. der Probe) reduziert. Durch die Zugabe von 1 x SDS-Ladepuffer und das Erhitzen auf 95 °C für 10 min wurden die Proben denaturiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer für 1 ½-2 h bei 20 mA/Gel und Raumtemperatur. Im Anschluss an die SDS-PAGE folgte entweder ein Western Blot (2.4.15) oder die Proteine wurden im Gel mit Coomassie-Blau (2.4.12) oder SYPRO™ Ruby (Thermo Fisher) (2.4.13) für weitere Analysen angefärbt und fixiert.

Trenngel	Sammelgel	6x SDS-Probenpuffer
375 mM Tris-HCl, pH 8,8	125 mM Tris-HCl, pH 6,8	60 % (w/v) Glycerin
0,1 % (w/v) SDS	0,1 % (w/v) SDS	1 % (w/v) SDS
12 % AA/BA-Lösung (30 %, 37,5:1)	5 % AA/BA-Lösung (30 %, 37,5:1)	0,03 % (w/v) Bromphenolblau
0,04 % (v/v) TEMED	0,01 % (v/v) TEMED	0,03 % (w/v) Xylencyanol FF
0,1 % (w/v) APS	0,1 % (w/v) APS	100 mM EDTA
		pH 7,6

10x SDS-Laufpuffer

250 mM Tris
1,92 M Glycin
1 % (w/v) SDS

2.4.10 Blue-Native-PAGE (BN-PAGE)

Für die BN-PAGE wurden je 100 µg isolierte mitochondriale Proteine (2.4.5) mit 1/3 Volumen 4x *Sample Native PAGE Buffer* (Invitrogen) und Coomassie-Blau G-250 versetzt. Diese Proben wurden auf ein 4-16 % Nupage Bis/Tris native Gel (Life Technologies) aufgetragen. Der Gellauf erfolgte über Nacht bei 80 V und 4°C in NativePAGE™ Cathode Buffer und NativePAGE™ Anode Buffer (ThermoFisher). Zur Entfärbung des Gels, wurde es mindestens 30 min in 12 % TCA geschwenkt.

2.4.11 In-Gel-Aktivitätsfärbung

Für die In-Gel-Aktivitätsfärbung wurde das Gel aus 2.4.10 statt in 12 % TCA, 30 min in 0,1 M Tris-HCl pH 7,4 (Komplex I Färbung) bzw. in 50 mM KH₂PO₄ (Komplex IV Färbung) geschwenkt. Die Aktivitätsfärbung erfolgte mit der Komplex I- bzw. Komplex IV-Lösung. Die Gele wurden in diesen 40 min (Komplex I) bzw. 2-3 h (Komplex IV) geschwenkt. Gestoppt wurde die Reaktion jeweils durch Schwenken in 45 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure.

Komplex I-Lösung

2 mg/ml NBT
0,142 mg/ml NADH
0,1 M Tris-HCl pH 7,4

Komplex IV-Lösung

0,8 mg/ml Cytochrom-c
1 mg/ml DAB
50 mM KH₂PO₄ pH 7,4

2.4.12 Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blau

Für die Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blau wurde das SDS-Gel in etwa 40 ml Coomassie-Färbelösung über Nacht geschwenkt. Am darauffolgenden Tag wurde das Gel mit Entfärberlösung entfärbt. Hierzu wurde das Gel so lange in der Lösung geschwenkt, bis die angefärbten Proteinbanden gut zu erkennen waren. Zwischendurch wurde die Entfärberlösung gewechselt.

Coomassie-Färbelösung:

45 % (v/v) Methanol

10 % (v/v) Essigsäure

0,5 % (w/v) Coomassie Brilliant-Blue R-250

Entfärbelösung

45 % (v/v) Methanol

10 % (v/v) Essigsäure

2.4.13 Proteinfärbung mit SYPRO™ Ruby (Thermo Fisher)

Die Proteinfärbung mit SYPRO™ Ruby (Thermo Fisher) wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Gel wurde zunächst für 30 min in 100 ml Fixierlösung geschwenkt. Danach wurde die Lösung verworfen und das Gel in frischer Fixierlösung erneut 30 min geschwenkt. Für die nächsten Schritte musste das Gel abgedunkelt bleiben. Das Gel wurde über Nacht in 60 ml SYPRO™ Ruby (Thermo Fisher) inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gel 30 min in 100 ml Waschlösung geschwenkt und anschließend auf dem blau/grün LED-Transilluminator (nippon genetics, Düren) betrachtet.

Fixierlösung

50 % (v/v) Methanol

7 % (v/v) Essigsäure

Waschlösung

10 % Methanol

7 % Essigsäure

2.4.14 LC-MS Analyse

Zur Identifizierung co-immunpräzipitierter Proteine (2.4.5) wurden diese mit Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie analysiert. Hierzu wurden die präzipitierten Proteine auf ein 12 %-iges SDS-PA-Gel aufgetragen und 20-30 min elektrophoretisch aufgetrennt, sodass die blaue Lauffront des Gelladepuffers ca. 1-2 cm ins Gel eingelaufen war. Anschließend wurden die Proteine mit Coomassie-Brilliant Blau gefärbt (2.4.12), aus dem Gel ausgeschnitten und das Gelstück in ein sauberes 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die LC-MS-Analyse wurde in der Abteilung von Prof. Dr. Hans-

Peter Braun im Institut für Pflanzengenetik der Leibniz Universität Hannover durchgeführt. Die Analysen wurden dort mit einem Q-Exactive Massenspektrometer gekoppelt an die Dionex Ultimate3000 UPLC (Thermo Fisher Scientific) nach Fromm et al. (2016) durchgeführt. Die Proteinsequenzen wurden mit der Mascot Software (Matrix Science, London, UK) und der *Arabidopsis* TAIR10 Datenbank den entsprechenden Proteinen zugeordnet.

2.4.15 Western Blot

Nachdem die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden (2.4.9), wurden sie auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dies erfolgte *semi-dry* in einem kontinuierlichen Puffersystem nach Towbin et al. (1979). Hierfür wurden vier Schwammtücher und Whatman-Papier in Towbin-Puffer äquilibriert. Anschließend wurden zwei Schwammtücher, zwei Whatman-Papier, die Membran, das Gel, zwei Whatman-Papier und zwei weitere Schwammtücher frei von Luftblasen auf die Anode geschichtet und die Kathode aufgesetzt. Der Transfer erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur bei 3,5 mA/cm² Membranfläche. Der Proteintransfer wurde anschließend über eine Ponceau-Rot-Färbung (2.4.16) überprüft.

Für die Immundetektion wurde die Membran vier Mal je zwei Minuten mit etwa 40 ml TBS-Puffer gewaschen. Freie Bindungsstellen wurden durch eine zweistündige Inkubation der Membran in 1 % (w/v) Casein in TBS-Puffer blockiert. Nachfolgend wurde die Membran vier Mal je zwei Minuten mit TBS-T/T-Puffer gewaschen und anschließend über Nacht bei 4 °C mit dem entsprechenden primären Antikörper (in 1 % Casein-Lösung) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran erneut vier Mal mit TBS-T/T-Puffer und dann zwei Mal mit TBS-Puffer gewaschen. Danach folgte die einstündige Inkubation mit dem sekundären Peroxidasegekoppelten Antikörper (in 1 % Casein-Lösung). Nachdem die Membran erneut vier Mal mit TBS-T/T-Puffer gewaschen wurde, erfolgte die Immundetektion mithilfe der ECL-Lösung. Das in der Lösung enthaltene Luminol wird durch die an den Antikörper gekoppelte Peroxidase oxidiert. Dies erzeugt eine Chemielumineszenz, die mit einem Röntgenfilm detektiert werden kann.

Towbin-Puffer

25 mM Tris
192 mM Glycin
20 % (v/v) Methanol

TBS-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 7,5
150 mM NaCl

TBS-T/T-Puffer

20 mM Tris-HCl, pH 7,5
500 mM NaCl
0,05 % (v/v) Tween 20
0,2 % (v/v) Triton X-100

ECL-Detektionslösung

100 mM Tris-HCl pH 8,8

1,25 mM Luminol

2 mM 4-IPBA

5,3 mM H₂O₂

2.4.16 Proteinfärbung mit Ponceau-Rot

Der erfolgreiche Proteintransfer nach dem Western Blot auf die Nitrocellulosemembran wurde mittels Ponceau-Rot Färbung überprüft. Hierfür wurde der Diazo-Farbstoff Ponceau S verwendet, dieser enthält negativ geladene Gruppen, die an positiv geladene Aminosäurereste binden können. Die Membran wurde nach dem Transfer (2.4.15) für 10 min in der Ponceau-Rot-Lösung geschwenkt und anschließend mit ddH₂O entfärbt.

Ponceau-Rot-Lösung

2 % (w/v) Ponceau S

30 % (w/v) Trichloressigsäure

30 % (w/v) Sulfosalicylsäure

2.5 Arbeiten mit Mitochondrien aus *A. thaliana*

2.5.1 Isolierung von Mitochondrien aus Wurzelkulturen

Mitochondrien wurden aus ca. 6 Wochen alten hydroponischen Wurzelkulturen (2.2.4) isoliert, nach einer vereinfachten Methode nach Klein et al. (1998). Alle Schritte erfolgten bei 4 °C oder auf Eis. Es wurden ca. 200 g der Wurzelkulturen in ca. 500 ml frischem und kaltem Extraktionspuffer im Mixer homogenisiert. Anschließend wurde der Wurzelbrei durch vier Lagen Mull filtriert, um grobe Zelltrümmer zu entfernen. Das Filtrat wurde in 50 ml GSA Zentrifugenbecher überführt und 5 min bei 2.000 xg und 4 °C im JLA 16.250 Rotor in einer Beckmann Zentrifuge zentrifugiert, um restliche Zelltrümmer zu entfernen. Der erhaltene Überstand wurde erneut durch eine Lage Mull filtriert und wieder in 50 ml Zentrifugenbecher überführt. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 16.000 xg und 4 °C, um die Mitochondrien und andere Zellbestandteile zu sedimentieren. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig mit einem Pinsel in je 2 ml kaltem Waschpuffer resuspendiert. Je 2 ml der Suspension wurden auf einen kalten diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten (20 % (4 ml), 36 % (10 ml), 40 % (10 ml), 52 % (8 ml) (w/v) Saccharose in Mitogrundpuffer) gegeben

und in der Ultrazentrifuge in dem TST28.38 bzw. SW 32 Ti Rotor 2 h bei 24.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um die Zellbestandteile ihrer Dichte nach aufzutrennen. Die Mitochondrien lagern sich auf Grund ihrer Dichte an der Phasengrenze zwischen 40 % und 52 % Saccharose ab. Sie wurden mit einer Pasteurpipette vorsichtig abpipettiert und anschließend mit kaltem Resuspensionspuffer verdünnt und erneut zentrifugiert (14.000 xg, 10 min, 4 °C). Das Pellet wurde in 2 ml Resuspensionspuffer vorsichtig resuspendiert. Nach der Proteinbestimmung (2.4.8) wurden die Mitochondrien entweder direkt verwendet oder mit 10 % Glycerin (v/v) versetzt und bei -80 °C in 1 mg Aliquots gelagert. 1 mg Mitochondrienprotein entspricht 10 mg Mitochondrien (Eubel et al. 2004).

Extraktionspuffer

450 mM Saccharose
 15 mM MOPS
 1,5 mM EGTA
 10 mM Dithiothreitol
 6 g/l Polyvinylpyrrolidon
 pH 7,2 (mit KOH)

Waschpuffer

300 mM Saccharose
 10 mM MOPS
 1 mM EGTA
 pH 5,2 (mit KOH)

Resuspensionspuffer

400 mM Mannitol
 10 mM Tricine
 1 mM EGTA
 pH 7,2 (mit KOH)

Mitogrundpuffer

5 mM Tris
 0,5 mM EDTA
 0,1 % (w/v) BSA
 pH 7,5 (mit HCl)

2.5.2 Bestimmung der Atmungsrate isolierter Mitochondrien

Für die Bestimmung der Atmungsrate isolierter Mitochondrien wurde eine Clark-Elektrode (Oxytherm, Hansatech Instruments, England) verwendet. Die Mitochondrien wurden wie in 2.5.1 beschrieben isoliert, allerdings wurden sie am Ende in Atmungspuffer anstelle des Resuspensionspuffers aufgenommen. Die Messungen wurden mit 50 bzw. 100 µg isolierten Mitochondrien bei 20 °C durchgeführt. Die Messungen erfolgten nach Jacoby et al. (2015). In dieser Arbeit wurde zum einen die Atmungsrate bei gekoppelter Atmungskette, bei gekoppelter Atmungskette mit inhibierter Alternativer Oxidase und die Atmungsrate des Komplex IV gemessen. Die Atmungsrate wurde dabei in Relation zur Menge der eingesetzten Mitochondrien angegeben.

Atmungspuffer

300 mM Saccharose
 10 mM NaCl
 5 mM KH_2PO_4
 2 mM MgSO_4
 0,1 % (w/v) BSA
 10 mM TES
 pH 7,2

Waschpuffer

300 mM Saccharose
 10 mM TES
 pH 7,5

2.5.3 Polysomenanalyse

Zur Untersuchung der Translation und der daran beteiligten Proteine, wurde eine Polysomenanalyse durchgeführt. Hierbei werden Polysomen isoliert und über einen Saccharose-Gradienten können die an mRNA gebundenen, translativ-aktiven Ribosomen von den freien Ribosomen und mRNAs getrennt werden. Der Ablauf ist zusätzlich in Abbildung 3 schematisch abgebildet.

Zunächst wurden Polysomen nach Barkan (1993) isoliert. 3-6 mg Mitochondrien aus einer vorangegangenen Mitochondrien Isolierung (2.5.1) wurden zunächst auf Eis aufgetaut und durch eine Zentrifugation in der Beckmann Zentrifuge bei 14.000 xg und 4 °C für 10 min pelletiert. Das Pellet wurde dann in 800-1.000 µl PEB-Minus oder -Plus resuspendiert und die Mitochondrien 5 min auf Eis lysiert. Zu dem PEB-Plus Ansatz wurden anschließend 244 mM KCl (Endkonzentration) und 0,6 mM Puromycin (Endkonzentration) hinzugegeben, um die Ribosomen von der mRNA zu lösen, dies dient als Negativ-Kontrolle. Die mit Puromycin versetzten Proben wurden 10 min bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 17,8 mM EDTA (Endkonzentration) versetzt. Im Anschluss wurden alle Proben mit 1/10 Vol frisch angesetztem 10 % Na-Desoxycholat zur Solubilisierung von Proteinen versetzt, für 5 min auf Eis inkubiert und 15 min bei 4 °C und 13.000 xg zentrifugiert. 800-1.000 µl des Überstandes wurden auf einen Saccharose-Gradienten (55 %; 45 %; 35 %; 25 %; 15 %) in 14x95 mm Polyallomer Zentrifugenröhrchen für die Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA) geschichtet und 2 h bei 40.000 rpm und 4 °C im SW 40 Ti Rotor zentrifugiert. Im Anschluss an die Zentrifugation wurden acht Fraktionen á 1.300 µl von dem Saccharose-Gradienten abgenommen. Die Fraktionen wurden dabei auf jeweils drei 1,5 ml Eppendorfgefäße aufgeteilt.

Aus diesen Fraktionen wurden nun die enthaltenen Proteine nach Zuccotti und Modelska (2016) isoliert. Hierfür wurden jeder Probe 1/10 Vol 100 % TCA und 1/10 Vol eiskaltes Aceton hinzugefügt und die Proteine über Nacht bei -80 °C gefällt. Am nächsten Tag wurden die

Proben auf Eis aufgetaut und bei 16.000 xg und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Im Pellet befinden sich die Proteine, daher wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet drei Mal mit Aceton gewaschen. Hierfür wurde das Pellet jeweils in 1 ml kaltem Aceton gründlich resuspendiert und 5 min bei 16.000 xg und 4 °C zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand entfernt und das Pellet 10 min getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 20-50 µl 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert und die Proteine 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Proben wurden dann entweder bei -20 °C gelagert oder direkt in einer SDS-PAGE (2.4.9) eingesetzt.

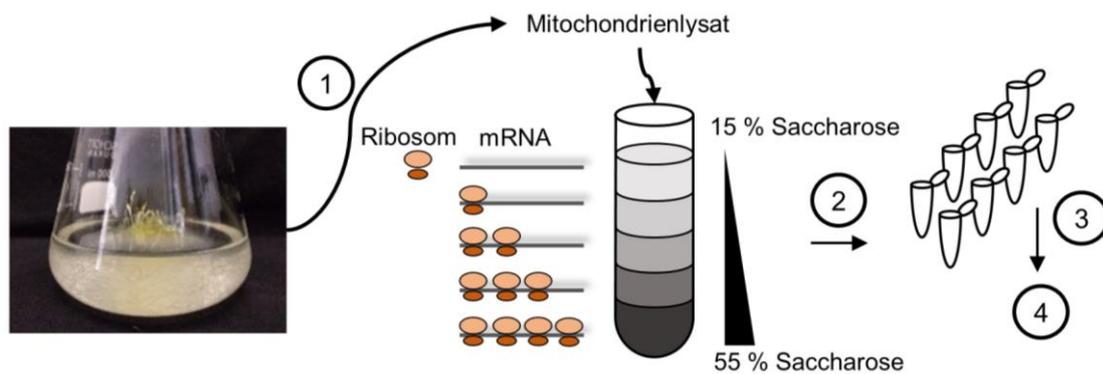


Abbildung 3: Schematischer Ablauf der Saccharosegradientenanalyse. 1: Aus hydroponischen Wurzelkulturen isolierte Mitochondrien werden in einem Polysomen-Extraktions-Puffer lysiert und das Lysat auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten geschichtet. 2: Im Anschluss an eine Zentrifugation wird der gesamte Gradient auf acht Fraktionen aufgeteilt. 3: Es folgt die Extraktion der in den acht Fraktionen enthaltenen Proteinen. 4: Die extrahierten Proteine werden über einen Western Blot analysiert.

PEB-Minus	PEB-Plus	Saccharosegradient
0,2 M Tris-HCl pH 9,0	0,2 M Tris-HCl pH 9,0	x % (w/v) Saccharose
0,2 M KCl	0,2 M KCl	40 mM Tris-HCl pH 8,0
35 mM MgCl ₂	50 mM EDTA	0,2 M KCl
25 mM EGTA	25 mM EGTA	100 mM MgCl ₂
0,2 M Saccharose	0,2 M Saccharose	1 mg/ml Heparin
1 % (v/v) Triton X-100	1 % (v/v) Triton X-100	100 µg/ml Chloramphenicol
2 % (v/v) Polyoxyethylen-10-Tridecylether	2 % (v/v) Polyoxyethylen-10-Tridecylether	
1 mg/ml Heparin	1 mg/ml Heparin	
0,1 M β-Mercaptoethanol	0,1 M β-Mercaptoethanol	
100 µg/ml Chloramphenicol	100 µg/ml Chloramphenicol	
25 µg/ml Cycloheximid	25 µg/ml Cycloheximid	

2.6 Ribosome profiling

Um die Translation in den Mitochondrien zu untersuchen wurde ein *ribosome profiling* durchgeführt nach dem Protokoll von Planchard et al. (2018). Hierfür wurden *Arabidopsis* Pflanzen des Wildtyps und der *dweorg1* Mutante im Gewächshaus unter Langtagbedingungen angezogen.

2.6.1 Ribosomenextraktion aus *Arabidopsis* Blüten

Die Blüten der *Arabidopsis* Pflanzen wurden geerntet, da sie viele Mitochondrien enthalten. Die Blüten wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend in einem in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser zu sehr feinem Pulver zerrieben. 3-4 g des Pulvers wurden in einem neuen vorgekühlten Mörser mit 15 ml Ribosomenextraktionspuffer gemischt, welcher direkt gefror. Das gefrorene Gemisch wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und die Flüssigkeit dann in je zwei 13 ml Sarstedtröhrchen pro Probe überführt. Die Proben wurden zunächst 7-10 min auf Eis gehalten, damit die Chemikalien wirken können. Dann wurden die Proben im SM24-Rotor bei 12.700 rpm für 15 min bei 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge: Sorvall RC 6 Plus von ThermoFisher). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die aufgeteilten Proben wurden in einem 50 ml Sarstedtröhrchen wieder zu einer Probe vereint. Von dieser Probe wurden jeweils 500 µl entnommen für eine spätere gesamt-RNA-Isolierung mit TRIZOL (2.3.17), die RNA-Konzentration wurde mit dem NanoDrop® bestimmt (2.3.21). Anschließend wurde die Gesamt-RNA DNase-behandelt (2.3.18), die ribosomale RNA entfernt (2.3.19), erneut die RNA-Konzentration bestimmt, mit dem Qubit® 2.0 Fluorometer und dem Qubit

microRNA Assay Kit (invitrogen) (2.3.21) und 100 ng der RNA für die Herstellung einer RNA-Sequenzier-*library* verwendet (2.3.20). Der restliche Überstand wurde bei -80 °C über Nacht gelagert.

Am nächsten Tag wurden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut. Mithilfe der Konzentration der isolierten Gesamt-RNA und dem Proben-Volumen, wurde dann berechnet wieviel RNaseI eingesetzt werden muss, um die *ribosome footprints* zu erhalten. Dabei werden 10 U Enzym pro 1 OD₂₆₀ pro ml Probe benötigt. Die verwendete RNaseI wies eine Aktivität von 100 U/μl auf. Daher wurde folgende Formel zur Berechnung der zu verwendenden Menge an RNaseI benutzt:

$$10 \text{ U} \cdot \text{OD}_{260} \cdot \text{Probenvolumen [ml]} = x \text{ U RNaseI}$$
$$x \text{ U RNaseI} / 100 = \mu\text{l die eingesetzt werden müssen}$$

Die errechnete Menge an RNaseI wurde zu den Proben gegeben, diese wurden durch Schwenken gut gemischt und dann 1 h im Wasserbad bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurden die einzelnen Ribosomen über ein Saccharosekissen aufgereinigt. Hierzu wurden 2 ml des Saccharosekissens in ein 10 ml Ultrazentrifugengefäß (passend für den Rotor TFT 65-13) gegeben und die aufgetauten Proben wurden darauf geschichtet. Hierfür wurde jede Probe gleichmäßig auf drei Röhrchen aufgeteilt. Die Zentrifugation erfolgte in der Ultrazentrifuge für 3 h bei 55.000 xg und 4 °C. Nach der Zentrifugation befinden sich die Ribosomen in dem leicht grünlichen Pellet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in je 600 μl Extraktionspuffer RNase I aufgenommen und die Lösung wurde in 2 ml Eppendorfgefäße überführt (weiterhin drei Gefäße für eine Probe!). Aus diesen Proben wurde die RNA mit TRIZOL (2.3.17) isoliert und die einzelnen Proben wieder zu einer Probe zusammengeführt, die RNA-Konzentration wurde mit dem NanoDrop® bestimmt (2.3.21). Für die weitere Verwendung der RNA zur Aufreinigung der *footprints* (2.6.2) werden insgesamt 600 μg RNA benötigt.

Ribosomenextraktionspuffer	Saccharosekissen	Extraktionspuffer RNase I
0,2 M Saccharose	1 M Saccharose	0,1 M EGTA pH 8
0,2 M KCl	0,1 M KCl	0,1 M NaCl
40 mM Tris-Acetat pH 8	40 mM Tris-Acetat pH 8	1 % SDS (v/v)
10 mM MgCl ₂	15 mM MgCl ₂	10 mM Tris-Acetat pH 8
2 % (v/v) Polyoxyethylene-(10)-Tridecyl-Ether	5 mM 2-Mercaptoethanol	1 mM EDTA
1 % Triton X-100	100 µg/ml Chloramphenicol	
10 mM 2-Mercaptoethanol	100 µg/ml Cycloheximid)	
100 µg/ml Chloramphenicol		
100 µg/ml Cycloheximid		

2.6.2 Aufreinigung der *ribosome footprints* über eine Harnstoff-Acrylamid-Gelelektrophorese

Um die *ribosome footprints* isolieren zu können, müssen sie von den restlichen RNA-Fragmenten die bei der RNaseI-Behandlung (2.6.1) entstanden sind getrennt werden. Hierfür wurde ein 50 ml Harnstoff-Acrylamid-Gel verwendet. Für jede Probe wurden zwei Gele benötigt. Das Gel lief zunächst 30 min bei 90 V in 1 x TAE Puffer vor um es zu equilibrieren. Der Puffer wurde dabei durch eine Wasseranlage auf 50 °C gehalten, dies garantiert später eine Denaturierung der RNA während des Gellaufs. Die RNA aus 2.6.1 wird mit 150 µl Barkan-Blau je 450 µl Probe versetzt und vorsichtig auf das Gel aufgetragen, dabei wurde ein Kamm verwendet, der links und rechts eine kleine Tasche für den Marker besitzt und eine große Tasche über fast die gesamte Länge des Gels für die Probe. Der Marker bestand aus einem 1:1 Gemisch eines 27mer RNA-Oligonukleotids und eines 33mer RNA-Oligonukleotids. Die mitochondrialen *footprints* befinden sich genau zwischen diesen beiden Oligonukleotiden auf dem Gel. Das Gel lief über Nacht für 13 h bei 90 V und ca. 40 mA/Gel bei 50 °C.

Nach dem Gellauf wurden die Gele 30 min mit SYBR-Gold inkubiert und die RNA-Banden zwischen den beiden Marker-RNA-Oligonukleotiden ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden zunächst bei -20 °C tiefgefroren und dann in kleine Stücke geschnitten. Die kleinen Stücke wurden auf mehrere 250 µl Reaktionsgefäße aufgeteilt, in welche zuvor ein Loch in den Boden gestochen wurde (Nadel: 22G x 1 1/4"). Diese Gefäße wurden in 2 ml Eppendorfgefäße gesetzt und 7 min bei 13.800 xg zentrifugiert, sodass die Gelstücke in feine Teile geschreddert wurden. Das geschredderte Gel wurde mit 1 ml Extraktionspuffer RNase II je Eppendorfgefäß gemischt und über Nacht auf einem Rotator mit der Geschwindigkeit 10 bei 4 °C inkubiert um die RNA aus dem Gel zu eluieren. Anschließend wurden die Proben auf Costar Spin-X Filter

Gefäße (0,22 µm Porengröße, Sigma-Aldrich) verteilt und 7 min bei 17.000 xg zentrifugiert, um die Gelstücke herauszufiltern. Der Durchfluss wurde in 800 µl Aliquots auf 2 ml Eppendorfgefäße verteilt und die RNA mit TRIZOL isoliert (2.3.17). Die RNA-Pellets einer Probe wurden jeweils in insgesamt 40 µl DEPC-Wasser resuspendiert und die Konzentration mit dem NanoDrop® bestimmt (2.3.21).

Anschließend wurde die RNA mit DNase-behandelt (2.3.18) und die rRNA entfernt (2.3.19). Da die RNA nach der RNaseI-Behandlung (2.6.1) an dem 5'-Ende eine OH-Gruppe und an dem 3'-Ende eine Phosphatgruppe aufweist, musste die RNA zunächst dephosphoryliert (2.3.7) werden. Hierfür wurden 100 ng der isolierten RNA verwendet. Für die Adapter-Ligation während der Sequenzier-*library*-Erstellung muss am 5'-Ende der RNA ein Phosphat vorhanden sein, sodass die 100 ng RNA dann wieder phosphoryliert werden mussten (2.3.8). Um die Enzyme und Salze des Puffers zu entfernen, wurde die RNA mithilfe einiger Komponenten des RNeasy Plant Mini Kits (Qiagen) aufgereinigt.

Nach der Phosphorylierung (2.3.8) lagen die Proben in einem Volumen von 50 µl vor. Dieses wurde mit 50 µl Nuklease-freiem Wasser auf 100 µl aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben erst mit 350 µl RLT Puffer aus dem Kit gemischt und dann mit 675 µl EtOH abs. und wurden dann auf die pinken Säulen des Kits überführt. Die Proben wurden bei RT 1 min bei 8.000 xg zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dann wurden die Proben mit 500 µl RPE-Puffer des Kits versetzt und erneut zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und die Proben mit 750 µl 80 % EtOH gewaschen. Es folgte eine zweiminütige Zentrifugation bei RT und 8.000 xg. Die Säulen wurden auf ein frisches 2 ml Auffanggefäß gesetzt und 5 min bei RT und 11.600 xg zentrifugiert, um alle Reste des Alkohols zu entfernen. Anschließend wurden die Säulen auf ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gesetzt und mit 19 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert. Das Probenvolumen wurde dann mithilfe der SpeedVac auf 10 µl gebracht. Die Proben wurden nun für die Herstellung einer *small* RNA-Sequenzier-*library* verwendet (2.3.20).

Harnstoff-Acrylamid-Gel

1 x TAE Puffer (50X TAE von Thermo Fisher)
0,42 g/ml Harnstoff
17 % (v/v) Acrylamid:Bisacrylamid (19:1)
1 µl/ml TEMED
5 µl/ml 10 % APS

Barkan-Blau

90 % (v/v) deionisiertes Formamid
0,04 % (w/v) Bromphenolblau
0,04 % (w/v) Xylen Cyanol
20 mM EDTA pH 8
20 mM Tris-HCl pH 8

Extraktionspuffer RNase II

0,1 M NaCl

0,2 % (v/v) SDS

10 mM Tris-Acetat pH 8

1 mM EDTA

2.7 Verwendete Software und Datenbanken

Sequenzanalysen, Entwürfe von Oligonukleotiden und die Planung von Klonierungen wurden mit den Programmen *Clone Manager 9 Professional Edition* (Version 9.0, Scientific & Educational Software) sowie *SnapGene Viewer* (GSL Biotech LLC, <https://www.snapgene.com/snapgene-viewer/>) durchgeführt. Gen- und Proteininformationen wurden über folgende Datenbanken abgerufen: *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), *Universal Protein Resource* (UniProt, <https://www.uniprot.org/>) und *Arabidopsis Information Resource* (TAIR, <https://www.arabidopsis.org/>). Zur Analyse von Proteinkomplexen in *Arabidopsis* Mitochondrien wurde die Datenbank des Instituts für Pflanzengenetik der Leibniz-Universität Hannover (https://complexomemap.de/at_mito_leaves) verwendet. Zur Vorhersage der zellulären Lokalisierung einzelner Proteine wurde das Online-Werkzeug SUBAcon (<https://suba.live/>) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von DWEORG1 auf mitochondriale RNA-Reifungsprozesse des *cox2* Transkripts

In einer vorangegangenen Arbeit (Bruhs 2012) wurde gezeigt, dass die Translation von *cox2* Transkripten in *dweorg1* Pflanzen beeinträchtigt ist. Um auszuschließen, dass es sich hierbei um einen sekundären Effekt handelt, der dadurch bedingt ist, dass die Prozessierung der *cox2* mRNA beeinträchtigt ist, wurde zunächst der diesbezügliche Einfluss von DWEORG1 untersucht. Die Transkriptmenge und Edierung des Transkripts wurde bereits untersucht und es wurde keine Beeinträchtigung festgestellt (Bruhs 2012). Daher wurden diese Prozesse nicht weiter untersucht. Die *cox2* Transkriptmenge in *dweorg1* Pflanzen unterscheidet sich nicht von der im Wildtyp (Bruhs 2012). Dies deutet darauf hin, dass die Transkript-Stabilität in *dweorg1* nicht beeinträchtigt ist und sich somit nicht negativ auf die Translation der *cox2* mRNA auswirkt.

3.1.1 Die Prozessierung der 5'- und 3'-Enden des *cox2* Transkripts ist in *dweorg1* nicht beeinträchtigt

Die 5'- und 3'- Enden des *cox2* Transkripts wurden in *dweorg1* bisher noch nicht untersucht. Die falsche Prozessierung von 5'- und 3'- Enden eines Transkripts kann die Translation negativ beeinflussen (Jonietz et al. 2011; Manavski et al. 2012). Für das *cox2* Transkript in *Arabidopsis* Mitochondrien sind zwei verschiedene 5'-Enden beschrieben, die -205 nt und -151 nt vom Startcodon entfernt sind. Das 3'-Ende des Transkripts endet +316 nt vom Stopcodon entfernt (Forner et al. 2007).

Zur Bestimmung von Unterschieden in den 5'- und 3'-Enden des *cox2* Transkripts zwischen dem Wildtyp und *dweorg1*, wurde die Methode der Transkriptenden-Kartierung verwendet, die in Abbildung 4 schematisch am Beispiel des *cox2* Transkripts dargestellt ist. Hierzu wurden die Transkripte mit der T4-RNA-Ligase zirkularisiert um cRNA (*circular RNA*) zu erzeugen. Diese cRNA wurde als Vorlage in einer reverse Transkriptase Reaktion mit dem spezifischen Oligonukleotid SG3176 zur Synthese von cDNA eingesetzt. Nach der Aufreinigung der cDNA, wurde diese in einer PCR-Reaktion mit den spezifischen Oligonukleotiden SG3177 und SG3178 verwendet, die den Bereich der 5'- und 3'-Enden des *cox2* Transkripts amplifizieren. Anschließend wurden die PCR-Produkte in pJet kloniert, sequenziert und miteinander verglichen.

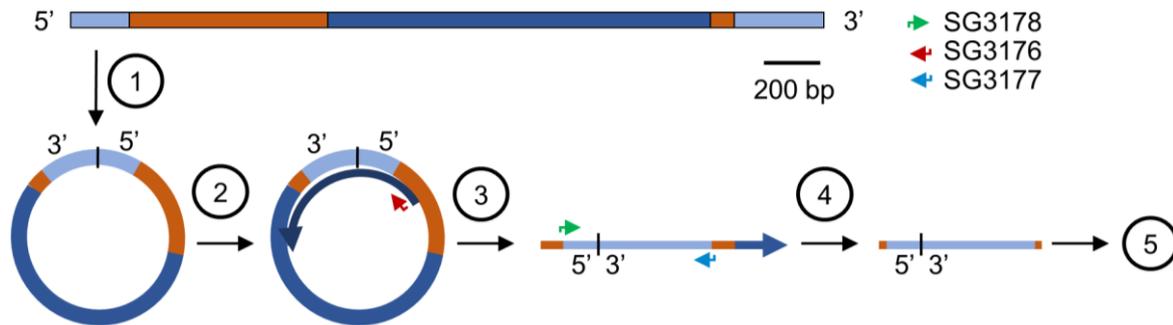


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Transkriptenden-Kartierung am Beispiel des *cox2* Transkripts. 1: Isolierte RNA wird mithilfe der T4-RNA-Ligase zirkularisiert, es entsteht cRNA. 2: Die cRNA dient als Matrize für die Synthese von cDNA in einer reverse Transkriptase Reaktion unter Verwendung eines für *cox2* spezifischen Oligonukleotids (SG3176). 3: Über eine PCR-Reinigung wird die cRNA von der neu synthetisierten cDNA getrennt. 4: Die cDNA wird in einer PCR als Matrize verwendet um die 5'- und 3'-Enden des Transkripts mit spezifischen Oligonukleotiden (SG3178 und SG3177) zu amplifizieren. 5: Das PCR-Produkt wird in einen Zwischenvektor (z. B. pJet) kloniert und sequenziert. Die Sequenz kann dann bioinformatisch mit der bekannten Sequenz der 5'- und 3'-Enden des entsprechenden Transkripts verglichen werden.

Bei einer Beeinträchtigung der Prozessierung der Transkriptenden kann es zur Amplifizierung unterschiedlich langer PCR-Produkte des Wildtyps und der Mutante kommen. Um diesen Größenunterschied zu analysieren, wurden die PCR-Produkte vor der Klonierung zunächst gelelektrophoretisch in einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Abbildung 5A zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese. Es ist kein Größenunterschied zwischen den PCR-Produkten des Wildtyps und der *dweorg1* Mutante zu erkennen, der auf defekte 5'- oder 3'-Enden hinweist. In beiden Fällen wurde ein etwa 700 bp langes Amplifikat in der PCR erzeugt. Im Sequenzvergleich der beiden PCR-Produkte mit den annotierten 5'- und 3'-Enden des *cox2* Transkripts wurden ebenfalls keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der Mutante beobachtet. In beiden Fällen wurde das komplette 3'-Ende sowie die kürzere Variante des 5'-Endes, -151 nt vom Startcodon entfernt, nachgewiesen (siehe 8.1, Abbildung A 1).

Da über die Transkriptenden-Kartierung sowohl im Wildtyp als auch in *dweorg1* lediglich das 5'-Ende -151 nt vom Startcodon entfernt identifiziert wurde, sollte die längere Variante, die -205 nt vom Startcodon entfernt ist, über eine qRT-PCR nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Oligonukleotide SG3236 und SG3237 (3'-Ende) bzw. SG3238 und SG3239 (5'-Ende) verwendet, die den Bereich -203 bis -34 vom Startcodon und den Bereich +147 bis +316 vom Stopcodon des *cox2* Transkripts amplifizieren. Um die Ergebnisse zu normalisieren, wurde die Transkriptmenge des Haushaltsgens *act2* verwendet (Oligonukleotide: RS3133 und RS3134).

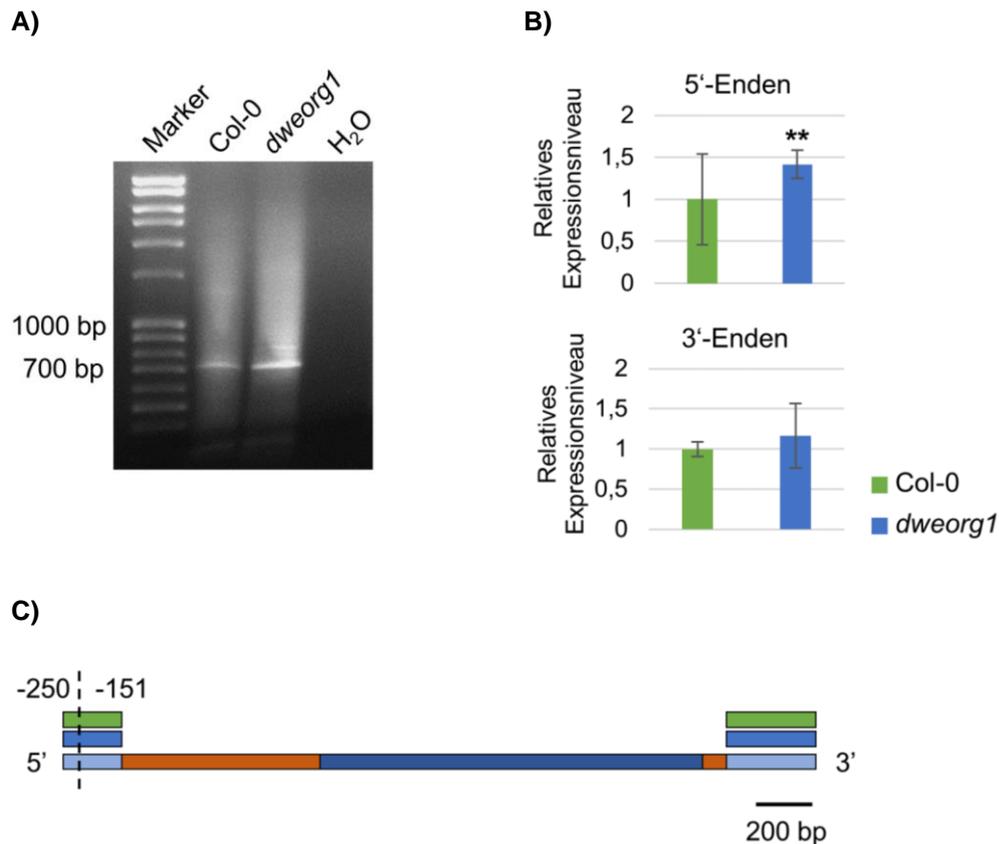


Abbildung 5: Analyse der 5'/3'-Enden des *cox2* Transkripts im Wildtyp und *dweorg1*. **A:** Analyse der PCR-Produkte der Wildtyp und *dweorg1* cDNA. **B:** Auswertung der Ergebnisse der qRT-PCR Analyse zur Untersuchung der Menge des -205 nt vom Startcodon entfernt liegenden 5'-Endes des *cox2* Transkripts in drei unabhängigen *dweorg1*-Proben. Die 5'-Enden im Wildtyp wurden gleich eins gesetzt und die Werte für die *dweorg1*-Proben auf diesen Wert normiert. Mögliche Variationen der Ausgangsmenge an Matrize wurden über einen Abgleich mit den Werten für die Transkriptmenge des Haushaltsgens *act2* ausgeglichen. Mit ** markierte Daten sind nach Durchführung eines t-Tests signifikant unterschiedlich zum Wildtyp ($p \leq 0,01$) **C:** Schematische Darstellung der hier identifizierten *cox2* Transkriptenden des Wildtyps (grün) und der Mutante *dweorg1* (blau). Hellblau: *cox2* 5'- bzw. 3'-Ende; orange: *cox2* Exon1 und Exon2; dunkelblau: *cox2* Intron.

Die Ergebnisse der qRT-PCR sind in der Abbildung 5B als relatives Expressionsniveau zum Wildtyp dargestellt. Das Expressionsniveau des Wildtyps wurde auf eins gesetzt und die Werte der Mutante jeweils gegen diesen Wert normiert. Werte <1 entsprechen demnach einem geringeren RNA-Niveau als im Wildtyp und Werte >1 einem höheren. Im Bereich der 3'-Enden wurde kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp und der Mutante festgestellt. Bei Betrachtung des Ergebnisses der 5'-Enden ist hingegen ein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp und *dweorg1* zu beobachten. Mit einem relativen Expressionsniveau der 5'-Enden in *dweorg1* von etwa 1,5 liegen deutlich mehr „-205 5'-Enden“ des *cox2* Transkripts in *dweorg1* vor als im Wildtyp. Abbildung 5C fasst die hier detektierten 5'- und 3'-Enden des *cox2* Transkripts im Wildtyp und *dweorg1* schematisch zusammen. Sowohl im

Wildtyp als auch in der Mutante wurden die für *cox2* beschriebenen Transkriptenden komplett nachgewiesen.

3.1.2 Das Spleißen des *cox2* Transkripts ist in *dweorg1* nicht beeinträchtigt

Das Spleißverhalten der *cox2* mRNA in *dweorg1* wurde mit dem im Wildtyp über eine qRT-PCR Analyse miteinander verglichen, um einen Einfluss des Spleißens auf die Translation des Transkripts bzw. der Menge an korrekt synthetisiertem COX2 Protein auszuschließen.

Um eine quantitative Aussage über die Menge an gespleißter und nicht-gespleißter *cox2* mRNA treffen zu können, wurde eine qRT-PCR unter der Verwendung der in Abbildung 6A abgebildeten Oligonukleotide (SG3233, SG3234 und SG3235) durchgeführt. Die Oligonukleotide SG3234 und SG3233 amplifizieren, bei einer entsprechend kurz gewählten Elongationszeit von 20 s, gezielt Fragmente gespleißter *cox2* Transkripte. Die Oligonukleotide SG3235 und SG3233 amplifizieren spezifisch Fragmente nicht-gespleißter *cox2* Transkripte, da SG3235 im 3'-Bereich des Introns bindet.

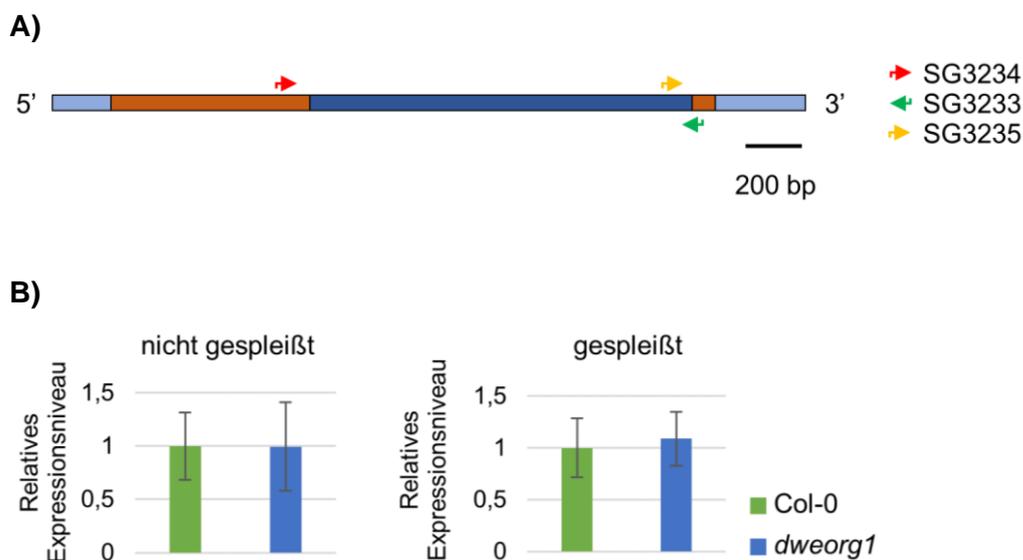


Abbildung 6: Untersuchung des Spleißens der *cox2* Transkripte im Wildtyp und *dweorg1*. Ergebnisse der Untersuchung des Spleißens der *cox2* Transkripte im Wildtyp und *dweorg1* über eine quantitative RT-PCR. **A:** Schematische Darstellung des *cox2* Transkripts mit Kennzeichnung der Positionen der für die verschiedenen PCRs verwendeten Oligonukleotide. **B:** Auswertung der Ergebnisse der qRT-PCR Analyse zur Untersuchung der Menge an gespleißtem und nicht-gespleißtem *cox2* Transkript in drei unabhängigen *dweorg1*-Proben. Die Werte für den Wildtyp wurden jeweils gleich eins gesetzt und die Werte für die *dweorg1*-Proben auf diesen Wert normiert. Mögliche Variationen der Ausgangsmenge an Matrize wurden über einen Abgleich mit den Werten für die Transkriptmenge des Haushaltsgens *act2* ausgeglichen.

Zur Normalisierung der Werte, wurde die Transkriptmenge des Haushaltsgens *act2* verwendet. Die Ergebnisse der qRT-PCR Analyse sind in Abbildung 6B als relatives Expressionsniveau abgebildet. Das Expressionsniveau des Wildtyps wurde dabei auf eins gesetzt und die Werte der Mutante wurden jeweils gegen diesen Wert normiert. Werte <1 entsprechen demnach einem geringeren Niveau an gespleißtem bzw. nicht-gespleißtem *cox2* Transkript als im Wildtyp und Werte >1 einem höheren. Es wurde weder ein signifikanter Unterschied in der Menge der nicht-gespleißten noch der gespleißten *cox2* Transkripte zwischen dem Wildtyp und der Mutante festgestellt.

3.2 Heterologe Überexpression von DWEORG1 in *E. coli*

Für die Analyse der RNA-Bindung durch DWEORG1 (siehe 3.3), wurde dieses heterolog in *E. coli* synthetisiert. Um hierfür verwendet werden zu können, muss DWEORG1 in seiner nativen Form vorliegen. Daher sollte die Bildung von Inklusionskörpern bei der Proteinsynthese in *E. coli* verhindert werden. Die heterologe Überexpression pflanzlicher PPR-Proteine in *E. coli* gestaltet sich allerdings oft sehr schwierig (Lurin et al. 2004; Andrés-Colás und Van Der Straeten 2017), sodass zunächst die optimalen Bedingungen zur Proteinsynthese experimentell bestimmt werden mussten. Die hier getesteten Bedingungen sind in Tabelle 10 aufgelistet. Die Plasmidkarten, der in diesem Abschnitt verwendeten Plasmide, befinden sich unter 8.4.

Tabelle 10: Zusammenfassung der getesteten Expressionsbedingungen

Expressionskonstrukt	Expressionsbedingungen
pAB719 in Kombination mit molekularen Chaperonen	50 µM IPTG, 20 °C über Nacht
pAB719; pSG819; pSG858	0,1 mM IPTG, 16 °C über Nacht
pKA763	0,3 mM IPTG, 20 °C für 2 h

3.2.1 Heterologe Überexpression von DWEORG1-His-tag in *E. coli*

Zunächst wurde das Plasmid pAB719 für die heterologe Überexpression in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen verwendet. pAB719 codiert für DWEORG1 inklusive dem N-terminalen Transitpeptid und einem C-terminalen His-tag. Somit wird ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 69 kDa gebildet. Das DWEORG1-Konstrukt ist in Abbildung 7A schematisch dargestellt. Die Induktion der Überexpression in den *E. coli* Zellen erfolgte durch die Zugabe von 0,1 mM IPTG zum Medium. Nach der Induktion wurden die Zellen über Nacht, schüttelnd bei 16 °C inkubiert.

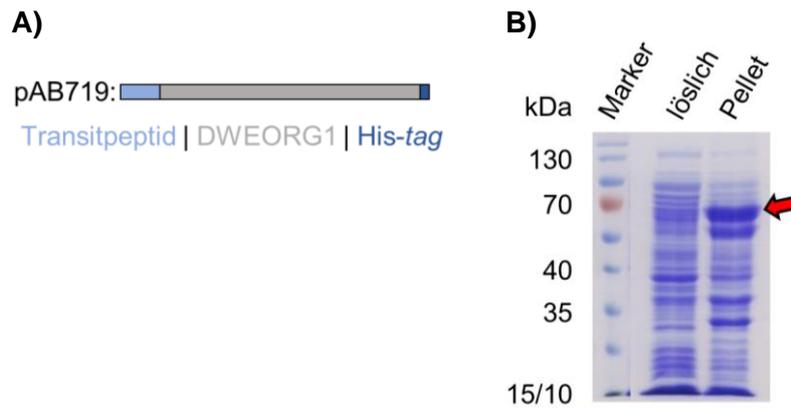


Abbildung 7: Analyse der Synthese von DWEORG1 in *E. coli*. **A:** Schematische Darstellung des durch pAB719 codierten Proteins. **B:** Ergebnis der Analyse der Synthese von DWEORG1 in *E. coli* über eine SDS-PAGE. Aufgetragen wurden die gesamten löslichen und unlöslichen extrahierten Proteine.

Die niedrige Inkubationstemperatur wurde gewählt, um die Bildung von Inklusionskörpern zu vermeiden. Diese entstehen dadurch, dass fehlerhaft oder unvollständig gefaltete Proteine Aggregate bilden und im Cytoplasma der Zellen akkumulieren. Eine niedrigere Inkubationstemperatur hat zur Folge, dass die Proteinsynthese verlangsamt abläuft. Somit hat die Proteinfaltungsmaschinerie mehr Zeit für die korrekte Faltung der Proteine, wodurch die Akkumulation in Inklusionskörpern verringert werden kann (Vera et al. 2007).

Im Anschluss wurde der Gesamtproteinextrakt aus den *E. coli* Zellen isoliert und die lösliche (Überstand) von der unlöslichen (Pellet) Fraktion durch Zentrifugation voneinander getrennt. Anschließend wurde eine SDS-PAGE durchgeführt, um die Synthese von DWEORG1 zu analysieren. Abbildung 7B zeigt das Ergebnis dieser Analyse. Im Pellet ist eine deutliche Proteinbande von etwa 70 kDa erkennbar, die auf eine Überexpression hinweist (markiert mit rotem Pfeil). In der löslichen Fraktion ist diese kaum sichtbar. Das hier synthetisierte DWEORG1 akkumuliert demnach vor allem in Inklusionskörpern.

3.2.2 Co-Expression von DWEORG1-His-tag mit molekularen Chaperonen in *E. coli*

Die Bildung von Inklusionskörpern durch falsch gefaltete Proteine kann neben einer niedrigen Inkubationstemperatur auch durch die Anwesenheit verschiedener molekularer Chaperone verhindert werden (de Marco et al. 2007). Das sogenannte KJE-System besteht aus den Chaperonen DnaK, DnaJ und GrpE. Es verhindert die Aggregation falsch gefalteter Proteine, indem die Chaperone bei der Faltung neu synthetisierter Proteine im Cytoplasma von *E. coli* unterstützend wirken. Das gilt ebenfalls für das ELS-System, welches aus den Chaperonen GroEL und GroES besteht. In Kombination mit ClpB, werden aggregierte Proteine gelöst und

in ihre native Form überführt. Die kleinen Hitzeschock-Proteine IbpA und IbpB können hierbei unterstützend wirken (zusammengefasst in Kolaj et al. (2009)).

Zunächst wurden BL21 (DE3) Zellen mit Plasmiden transformiert, die die Co-Expression der verschiedenen Chaperone ermöglichen. Die verwendeten Plasmide und die entsprechenden Genprodukte können der Tabelle 11 entnommen werden.

Tabelle 11: Auflistung der für die Co-Expression von DWEORG1 und Chaperonen verwendeten Plasmide. Angegeben sind die entsprechenden Genprodukte der Plasmide, das Molekulargewicht der Genprodukte, die Kopienzahl der Plasmide sowie die Promotoren, die die Expression der Chaperone regulieren.

Plasmid	Genprodukt	Molekulargewicht des Genprodukts	Kopienzahl des Plasmids	Promotor
pBB530	GrpE	21,8 kDa	3-4	PA1
pBB535	DnaK	69 kDa	20-30	PA1
	DnaJ	41,11 kDa		
pBB540	ClpB	95,6 kDa	3-4	PA1
	GrpE	21,8 kDa		
pBB541	GroEL	57,34 kDa	20-30	PA1
	GroES	14 kDa		
pBB550	DnaK	69 kDa	20-30	PA1
	DnaJ	41,11 kDa		<i>P_{lac}</i>
	GroEL	57,34 kDa		
	GroES	14 kDa		
pBB572	IbpA/B	18 kDa	300-500	PA1

Die Expression der Chaperone wird über einen starken (PA1) bzw. schwachen Promotor (*P_{lac}*) reguliert. Zusammen mit dem ebenfalls von dem jeweiligen Plasmid codierten lacO1-Operator kann die Expression der Chaperone durch die Zugabe von IPTG zum Medium induziert werden (Lutz und Bujard 1997). Die Kopienzahl der für die Chaperone codierenden Plasmide, in Kombination mit der Promotorstärke, erlaubt die Synthese der Chaperone in einer Stöchiometrie (ähnlich der unter Stressbedingungen in *E. coli* Zellen), die eine optimale Faltungsaktivität der jeweiligen Chaperone ermöglicht (Tomoyasu et al. 2001; de Marco et al. 2007). Insgesamt wurden sechs verschiedene Chaperon-Kombinationen getestet, die in Tabelle 12 aufgelistet sind.

Tabelle 12: Verwendete Chaperon-Kombinationen

Kombination	Plasmide	Gene
1	pBB540 + pBB550	<i>dnaK, dnaJ, grpE, clpB, groESL</i>
2	pBB541	<i>groESL</i>
3	pBB530 + pBB535	<i>dnaK, dnaJ, grpE</i>
4	pBB572	<i>ibpAB</i>
5	pBB540 + pBB535	<i>dnaK, dnaJ, grpE, clpB</i>
6	pBB541 + pBB572	<i>ibpAB, groESL</i>

Die erfolgreiche Transformation der Plasmid-Kombinationen in die BL21 (DE3) Zellen wurde durch Kolonie-PCRs überprüft, in denen entsprechende spezifische DNA-Abschnitte der jeweiligen Plasmide amplifiziert wurden (Ergebnis nicht gezeigt). Nachdem das Vorhandensein der Plasmide überprüft wurde, wurden die Zellen zusätzlich mit dem Plasmid pAB719 transformiert, um die Co-Expression von DWEORG1 mit den Chaperon-Kombinationen zu ermöglichen. Die Überexpression wurde mit 50 μ M IPTG induziert und die Zellen dann über Nacht bei 20 °C schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurde der Gesamtproteinextrakt aus den *E. coli* Zellen isoliert und die lösliche (Überstand) von der unlöslichen (Pellet) Fraktion durch Zentrifugation voneinander getrennt. Anschließend wurde eine SDS-PAGE durchgeführt, um die Synthese von DWEORG1 zu analysieren.

Abbildung 8 zeigt das Ergebnis der Analyse. Die gebildeten Chaperone sind hier mit verschiedenen farbigen Sternen markiert, der Farbcode kann der Abbildung entnommen werden. Die Analyse der Synthese von DWEORG1 wurde anhand einer Coomassie-Blau-Färbung durchgeführt. Bei den mit sieben beschrifteten Proben handelt es sich um die lösliche und unlösliche Fraktion von *E. coli* Zellen, die nur mit pAB719 transformiert wurden, also keine zusätzlichen molekularen Chaperone synthetisieren. Hier kann weder in der löslichen noch der unlöslichen Fraktion eine Proteinbande beobachtet werden, die auf eine erhöhte Synthese von DWEORG1 hinweist. Bei den Kombinationen zwei, drei, vier, fünf und sechs kann ebenfalls keine ca. 69 kDa Proteinbande beobachtet werden, die DWEORG1 entspräche. Lediglich für die Kombination eins ist eine intensiver gefärbte Proteinbande von etwa 69 kDa sowohl in der löslichen als auch der unlöslichen Fraktion erkennbar. Da hier aber auch DnaK in den Zellen synthetisiert wird und dieses etwa das gleiche Molekulargewicht aufweist wie DWEORG1 kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob eine intensivere Blau-Färbung durch Coomassie-Blau für eine erhöhte Menge von DWEORG1 spricht oder ob es sich dabei um DnaK handelt. Lediglich der Vergleich mit dem Bandenmuster der Kombinationen drei und fünf, in denen auch DnaK synthetisiert wird, könnte auf eine erhöhte Synthese von DWEORG1 hinweisen, da hier eine schwächere Färbung dieser Proteinbande zu beobachten ist.

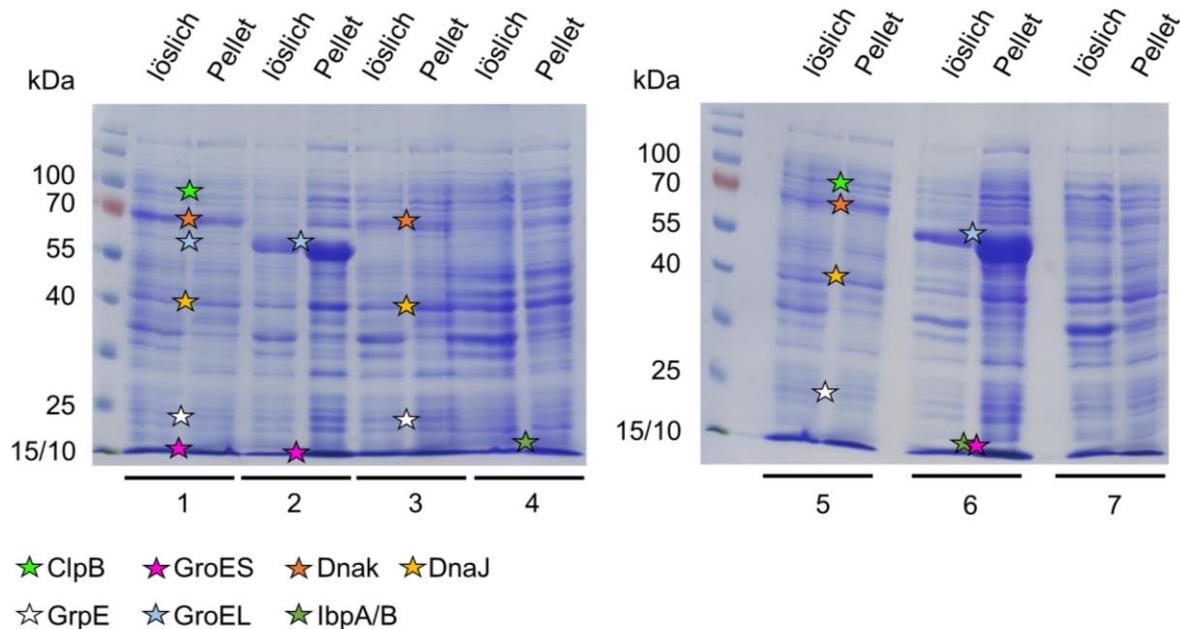


Abbildung 8: Analyse der Synthese von DWEORG1 in Kombination mit verschiedenen molekularen Chaperonen. Gezeigt ist das Ergebnis der SDS-PAGE **1-6**: Lösliche und unlösliche (Pellet) Proteinfractionen, isoliert aus induzierten Zellen, die die Chaperon-Kombinationen 1-6 aus der Tabelle 12 und DWEORG1 co-synthetisieren. **7**: Lösliche und unlösliche (Pellet) Proteinfractionen, isoliert aus induzierten Zellen, die nur mit pAB719 transformiert wurden.

In einer Western Blot Analyse der Proben, bei der die Detektion von DWEORG1 über das His-tag erfolgt, wurde für keine der verwendeten Kombinationen DWEORG1 nachgewiesen (Ergebnis nicht gezeigt).

3.2.3 Heterologe Überexpression von MBP-DWEORG1 in *E. coli*

Eine weitere Möglichkeit die Löslichkeit eines rekombinanten Proteins zu erhöhen besteht in der Verwendung des Maltose-Binde-Protein-tags (MBP-tag). Die verbesserte Löslichkeit vermittelt das MBP-tag vermutlich über seine intrinsische Chaperon-Aktivität (Kapust und Waugh 1999; Raran-Kurussi und Waugh 2012). Daher wurde das Plasmid pKA763 für die heterologe Überexpression in *E. coli* konstruiert. Das Plasmid codiert für DWEORG1 inklusive N-terminalem MBP-tag (siehe Abbildung 9A) unter der Kontrolle des *tac*-Promotors, sodass es zur Bildung eines etwa 110 kDa Proteins kommt. Da das Plasmid zusätzlich für das *lacI*-Gen codiert, ist hier ebenfalls eine Induktion der Genexpression durch die Zugabe von IPTG ins Medium möglich. Dies wurde durch die Zugabe von 0,3 mM IPTG zum Medium erzielt und die Zellen für 2 h bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurde der Gesamtproteinextrakt aus den *E. coli* Zellen isoliert und die lösliche (Überstand) von der unlöslichen (Pellet) Fraktion durch Zentrifugation voneinander getrennt. Anschließend wurde eine SDS-PAGE durchgeführt, um die Synthese von DWEORG1 zu analysieren.

Abbildung 9B zeigt das Ergebnis der Analyse. In der unlöslichen Fraktion ist eine deutliche Proteinbande mit einem Molekulargewicht von etwa 100 kDa zu erkennen. Dies entspricht etwa dem erwarteten Molekulargewicht des Proteins MBP-DWEORG1. In der löslichen Fraktion ist auf dieser Höhe lediglich eine sehr schwache Proteinbande erkennbar. Dies spricht dafür, dass das MBP-tag nicht zu einer verbesserten Löslichkeit des DWEORG1 Proteins in den *E. coli* Zellen geführt hat. Ob es sich bei der Proteinbande tatsächlich um DWEORG1 handelt konnte nicht über eine Western Blot Analyse bestimmt werden, da weder Antikörper gegen DWEORG1 noch gegen das MBP-tag zur Verfügung standen.

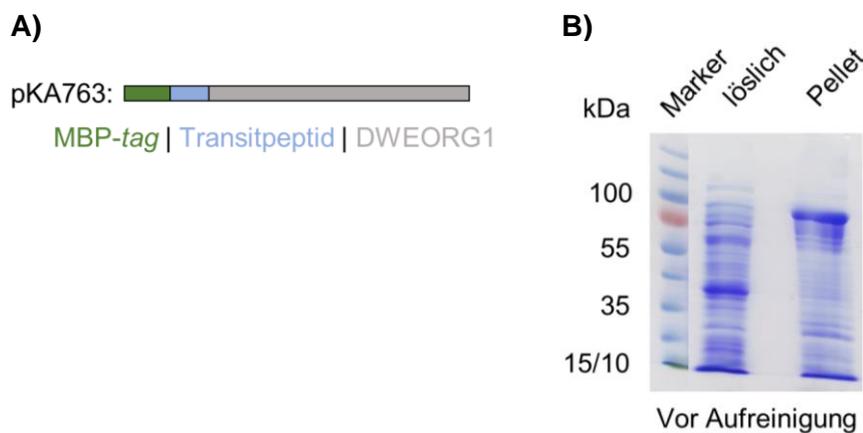


Abbildung 9: Analyse der Synthese von DWEORG1 mit MBP-tag. **A:** Schematische Darstellung des durch pKA763 codierten Genprodukts. **B:** Ergebnis der Analyse der Synthese von MBP-DWEORG1 über SDS-PAGE.

3.2.4 Heterologe Überexpression von DWEORG1 ohne Transitpeptidsequenz in *E. coli*

Da *E. coli* im Gegensatz zu pflanzlichen Zellen keine Organellen besitzt, kann die Transitpeptidsequenz von DWEORG1 zu Problemen bei der Proteinsynthese führen. Die Transitpeptidsequenz wird in *E. coli* nicht abgespalten. Daher könnte es zu einer fehlerhaften Faltung von DWEORG1 kommen. Die Transitpeptidsequenz kann problemlos entfernt werden, da die gereifte, funktionsfähige Form von DWEORG1 in den Mitochondrien keine Transitpeptidsequenz mehr besitzt. Daher wurde das Plasmid pSG819 erstellt, welches für DWEORG1 ohne Transitpeptidsequenz codiert (siehe Abbildung 10A). Das C-terminale His-tag wurde nicht entfernt, sodass ein Protein mit einem Molekulargewicht etwas unter 69 kDa synthetisiert wird. Die Überexpression des Gens des DWEORG1-Konstrukts wurde durch die Zugabe von 0,1 mM IPTG zum Medium induziert und die Zellen über Nacht schüttelnd bei 16 °C inkubiert. Im Anschluss wurde der Gesamtproteinextrakt aus den *E. coli* Zellen isoliert und die lösliche (Überstand) von der unlöslichen (Pellet) Fraktion durch

Zentrifugation voneinander getrennt. Anschließend wurde eine SDS-PAGE durchgeführt, um die Synthese von DWEORG1 zu analysieren.

Abbildung 10B zeigt das Ergebnis der Analyse. In der löslichen Fraktion ist keine markante Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 69 kDa zu erkennen. In der unlöslichen Fraktion ist hier hingegen eine sehr deutliche Proteinbande zu erkennen, die auf eine erhöhte Synthese des Proteins schließen lässt. Diese ist stärker als bei der Synthese von DWEORG1 mit Transitpeptidsequenz (siehe Abbildung 7B). Die Entfernung des Transitpeptids allein scheint die Löslichkeit von DWEORG1 demnach nicht zu erhöhen, aber die Menge an gebildetem DWEORG1.

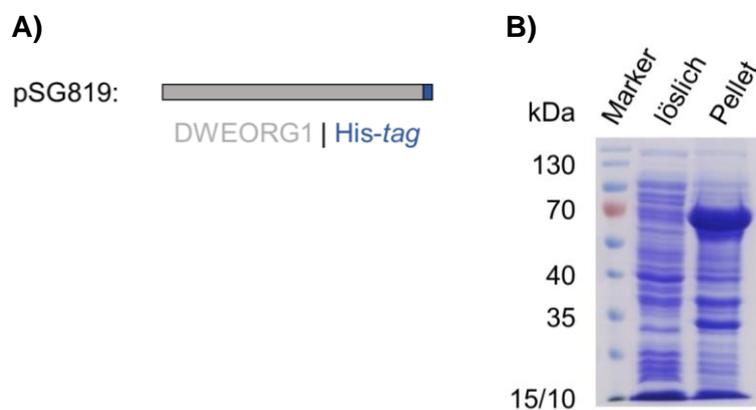


Abbildung 10: Analyse der Synthese von DWEORG1 ohne Transitpeptidsequenz in *E. coli*. **A:** Schematische Darstellung des durch pSG819 codierten Proteins. **B:** Ergebnis der Analyse der Synthese von DWEORG1 ohne Transitpeptidsequenz über SDS-PAGE.

3.2.5 Heterologe Überexpression von SUMO3-DWEORG1 in *E. coli*

Ein weiteres *tag*, das die Löslichkeit rekombinanter Proteine in *E. coli* nachweislich erhöht, ist das SUMO3-*tag* (Ke et al. 2013). Daher wurde das Plasmid pSG858 erstellt. Es trägt ein Gen für ein SUMO3-DWEORG1 Fusionsprotein mit einem N-terminalen His-*tag* (siehe Abbildung 11A). Das Fusionsprotein hat ein Molekulargewicht von etwa 75 kDa. Die Überexpression des Gens für SUMO3-DWEORG1 wurde durch die Zugabe von 0,1 mM IPTG zum Medium induziert und die Zellen über Nacht bei 16 °C inkubiert. Die Zellen wurden lysiert, der Gesamtproteinextrakt isoliert und die löslichen von den unlöslichen Proteinen durch eine Zentrifugation voneinander getrennt. Der Erfolg der Synthese wurde über eine SDS-PAGE analysiert.

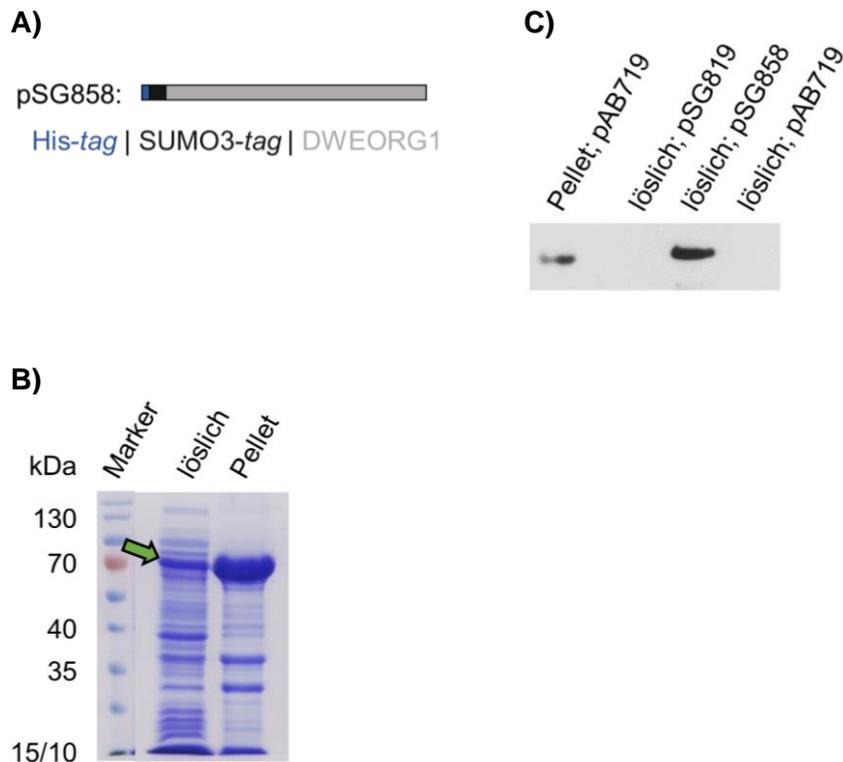


Abbildung 11: Analyse der Synthese von SUMO3-DWEORG1 in *E. coli*. **A:** Schematische Darstellung des durch pSG858 codierten Proteins. **B:** Ergebnis der Analyse der Synthese von SUMO3-DWEORG1 über SDS-PAGE. Der grüne Pfeil kennzeichnet DWEORG1, das erfolgreich in der löslichen Form gebildet wurde. **C:** Ergebnis der Western Blot Analyse. Es wurden die unlöslichen Proteine von mit pAB719 transformierten und induzierten Zellen, sowie die löslichen Proteine der mit pAB719, pSG819 und pSG858 transformierten und induzierten Zellen gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und DWEORG1 mithilfe eines Antikörpers gegen das an DWEORG1 gekoppelte His-tag in einer Chemielumineszenz-Reaktion detektiert.

Abbildung 11B zeigt das Ergebnis. Auch hier ist eine prägnante Proteinbande, die einem Molekulargewicht von etwa 75 kDa entspricht, in der unlöslichen (Pellet) Fraktion zu erkennen. Allerdings ist hier auch in der löslichen Fraktion eine Proteinbande des gleichen Molekulargewichts zu beobachten, die auf eine erhöhte Proteinsynthese des Proteins hinweist (markiert durch einen grünen Pfeil). Um zu überprüfen, ob es sich hierbei um DWEORG1 handelt, wurde eine Western Blot Analyse mit einem Antikörper gegen das verwendete His-tag durchgeführt.

Abbildung 11C zeigt das Ergebnis dieser Analyse. Zum Vergleich wurden zusätzlich zu den löslichen Proteinen der mit pSG858 transformierten *E. coli* Zellen, die unlöslichen Proteine der mit pAB719 transformierten Zellen sowie die löslichen Proteine der mit pAB719 und pSG819 transformierten Zellen hierfür verwendet. Die Western Blot Analyse bestätigt, dass es sich bei der deutlichen Proteinbande in der unlöslichen pAB719-Fraktion mit einem Molekulargewicht von etwa 70 kDa (siehe Abbildung 7B) um DWEORG1 handelt. In der löslichen pAB719-Fraktion wurde über den Western Blot kein DWEORG1 nachgewiesen. Dies gilt auch für die

lösliche pSG819-Fraktion. In der löslichen pSG858-Fraktion wurde hingegen DWEORG1 detektiert. Somit wurde nachgewiesen, dass es sich bei der in Abbildung 11B mit einem grünen Pfeil markierten Proteinbande tatsächlich um DWEORG1 handelt und das SUMO3-tag die Löslichkeit von DWEORG1 in *E. coli* erhöht.

3.2.6 Aufreinigung des rekombinanten SUMO3-DWEORG1 über eine Ni-TED-Säule

Für den Einsatz in RNA-Bindestudien musste das DWEORG1 Protein aufgereinigt werden. Dies erfolgte durch eine Ni-TED-Säule über das His-tag und wurde wie in 2.4.7 beschrieben durchgeführt. Um den Erfolg der Aufreinigung zu überprüfen, wurde eine SDS-PAGE mit den als Ausgangsmaterial verwendeten löslichen Proteinen und dem nach der Aufreinigung erhaltenen Eluat durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine mit Coomassie-Blau angefärbt. Als Kontrolle auf Kontaminationen, wurde ebenfalls ein Lysat aus *E. coli* Zellen ohne DWEORG1 auf das Gel aufgetragen. Diese Zellen wurden vorher genauso behandelt wie die Zellen zur Überexpression.

Abbildung 12 zeigt das Ergebnis. Betrachtet man die Elutionsproben direkt nach der Aufreinigung, wurde für das DWEORG1 enthaltende Lysat eine einzelne Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 75 kDa und für das reine *E. coli*-Lysat keine Proteinbande durch die Coomassie-Blau-Färbung nachgewiesen.

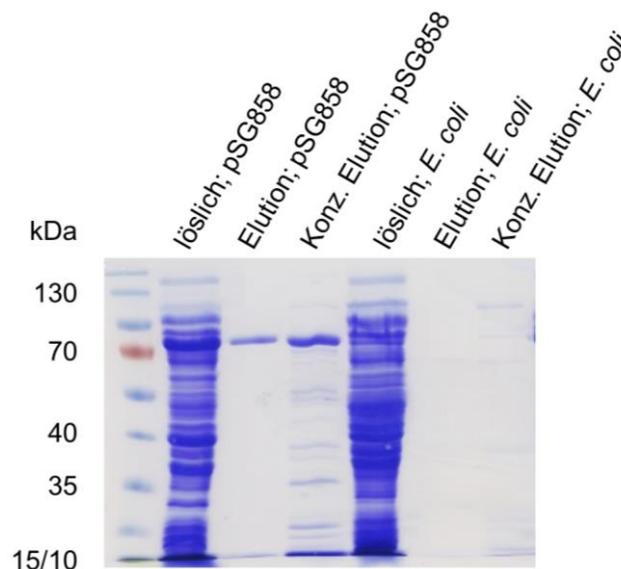


Abbildung 12: Aufreinigung des in *E. coli* gebildeten DWEORG1s. Coomassie-Blau-Färbung gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine. Aufgetragen wurden die lösliche pSG858-Fraktion, das Eluat der über eine Ni-TED-Säule aufgereinigten pSG858-Fraktion, sowie das Eluat nach Konzentrierung. Des Weiteren die lösliche Fraktion des reinen *E. coli*-Lysats, das Eluat dieser Fraktion, sowie das Eluat nach Konzentrierung

Die Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 75 kDa entspricht dem Molekulargewicht für das von pSG858 codierte DWEORG1. Nachdem die aufgereinigten Proben über einen Amicon Ultra-2 zentrifugal Filter (Merck) konzentriert wurden, wurden Kontaminationen des Eluats mit weiteren Proteinen beobachtet. Dies gilt sowohl für das DWEORG1-Lysat als auch für das reine *E. coli*-Lysat. Im letzteren Fall ist aber nur eine geringe Intensität der Blaufärbung der Proteine durch Coomassie-Blau zu erkennen, was auf eine geringe Konzentration der Proteine hindeutet.

3.3 Untersuchung der RNA-Bindung von DWEORG1 an *cox2* mRNA

Aufgrund ihrer Struktur, die eine Superhelix mit zentraler Furche bildet, sind PPR-Proteine dazu in der Lage an RNA zu binden. Dies wird über die Aminosäuren an den Positionen 5 und 35 eines jeden PPR-Motivs – dem PPR-Code – vermittelt (Yin et al. 2013). Mithilfe dieses PPR-Codes lassen sich Zielsequenzen der verschiedenen PPR-Proteine vorhersagen, sofern die entsprechende Aminosäurekombination bereits im bekannten PPR-Code berücksichtigt wird (Yagi et al. 2013). Um zu bestätigen, dass es sich bei dem 40 Nukleotid langen RNA-Fragment des ersten *cox2* Exons, welches zur Identifizierung von DWEORG1 verwendet wurde (Bolle 2008), tatsächlich um die Ziel-Sequenz von DWEORG1 handelt, wurde der PPR-Code zur Sequenz-Vorhersage verwendet und eine RNA-Bindestudie durchgeführt.

3.3.1 Vorhersage der Ziel-RNA-Sequenz des PPR-Proteins DWEORG1

Zur Vorhersage des PPR-Codes des PPR-Proteins DWEORG1 wurde der in Yan et al. (2019) veröffentlichte PPR-Code verwendet. Unter 8.2 sind die einzelnen Aminosäurekombinationen und ihre präferiert gebundenen RNA-Basen in Tabelle A 1 aufgelistet. Die Aminosäurekombinationen jedes einzelnen PPR-Motivs des DWEORG1 Proteins wurden bestimmt und mit dem PPR-Code in Tabelle A 1 verglichen.

In Abbildung 13 ist die Aminosäuresequenz der neun PPR-Motive aus DWEORG1 sowie der PPR-Code und die auf ihm beruhende Ziel-RNA-Sequenz dargestellt. Aus den einzelnen PPR-Motiven ergibt sich folgender PPR-Code für DWEORG1: RS-NS-HD-RR-ST-IP-FG-HM-MQ. Dieser PPR-Code weist auf die RNA-Sequenz (C)-(C>U>A)-(G)-(?)-(A)-(?)-(?)-(?)-(?) hin. Die unterstrichenen Basen wurden als nur schwach gebundene Basen in Yan et al. (2019) identifiziert. Für den PPR-Code RR, IP, FG, HM und MQ wurde noch keine präferiert gebundene RNA-Base identifiziert. Daher wurden die Positionen mit einem Fragezeichen versehen. Die unbekanntenen RNA-Basen überwiegen in diesem Fall, daher kann keine eindeutige Aussage über die Ziel-RNA-Sequenz von DWEORG1 getroffen werden.

PPR-Motiv	PPR-Code	Base
1 EVVY <u>R</u> TLLANCVLKHHVNKAEDIFNKMKELKFPT <u>S</u>	R/S	<u>C</u>
2 VFAC <u>N</u> QLLLLLYSMHDRKKISDVLLLLMERENIK <u>P</u> <u>S</u>	N/S	C>U>A
3 RATY <u>H</u> FLINSKGLAGDITGMEKIVETIKEEGIEL <u>D</u>	H/D	<u>G</u>
4 PWVC <u>R</u> SLLPLYADIGSDNVRRLSRFVDQN <u>P</u> <u>R</u>	R/R	?
5 PELQ <u>S</u> ILAKYYIRAGLKERAQDLMKEIEGKGLQQT <u>T</u>	S/T	A
6 YDNC <u>I</u> SAIKAWGKLKEVEEAEAVFERLVEKYKIF <u>P</u>	I/P	?
7 MMPY <u>F</u> ALMEIYTENKMLAKGRDLVKRMGNAGIAI <u>G</u>	F/G	?
8 PSTW <u>H</u> ALVKLYIKAGEVGKAELILNRATKDNKMR <u>P</u> <u>M</u>	H/M	?
9 FTTY <u>M</u> AILEEYAKRGDVBHNTKVFMKMKRASAAA <u>Q</u>	M/Q	?

Abbildung 13: Analyse des PPR-Codes von DWEORG1. Abgebildet sind die Sequenzen der neun PPR-Motive in DWEORG1. In Rot sind die Aminosäuren hervorgehoben, welche den PPR-Code bilden. Rechts ist die RNA-Base angegeben, die präferiert von der Aminosäurekombination des entsprechenden PPR-Motivs gebunden wird. Für unterstrichene Basen wurde eine schwache Bindung nachgewiesen (Yan et al. 2019). Fragezeichen weisen auf Aminosäurekombinationen hin, für die noch keine Basenpräferenz nachgewiesen wurde.

3.3.2 Die *cox2* RNA-Bindung von DWEORG1 wurde nicht nachgewiesen

Die Interaktion eines Proteins mit einer Nukleinsäure wird häufig mithilfe eines EMSAs (*electrophoretic mobility shift assay*) untersucht (Hellman und Fried 2007). Hierbei macht man sich die unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitätseigenschaften gebundener und freier Nukleinsäure-Moleküle innerhalb eines Polyacrylamid-Gels unter nativen Bedingungen zunutze. In der Regel wandern freie Nukleinsäure-Moleküle schneller durch das Gel als Nukleinsäure-Protein-Komplexe. Die radioaktive Markierung des Nukleinsäure-Moleküls erlaubt die Visualisierung der im Gel gewanderten Moleküle über Autoradiographie.

In dieser Arbeit wurde die RNA-Bindung von DWEORG1 an ein 40 nt langes RNA-Fragment des *cox2* Transkripts aus *A. thaliana* untersucht. Die Sequenz des Fragments und dessen Lage innerhalb des *cox2* Fragments kann der Abbildung 14A entnommen werden. Für die Analyse der RNA-Bindung von DWEORG1 an das dargestellte RNA-Fragment wurde die zu untersuchende RNA radioaktiv markiert und mit DWEORG1 inkubiert. Die Ansätze wurden nach der Inkubation in einem 12 %-igen Polyacrylamid-Gel gelelektrophoretisch aufgetrennt und das Ergebnis über ein Autoradiogramm analysiert.

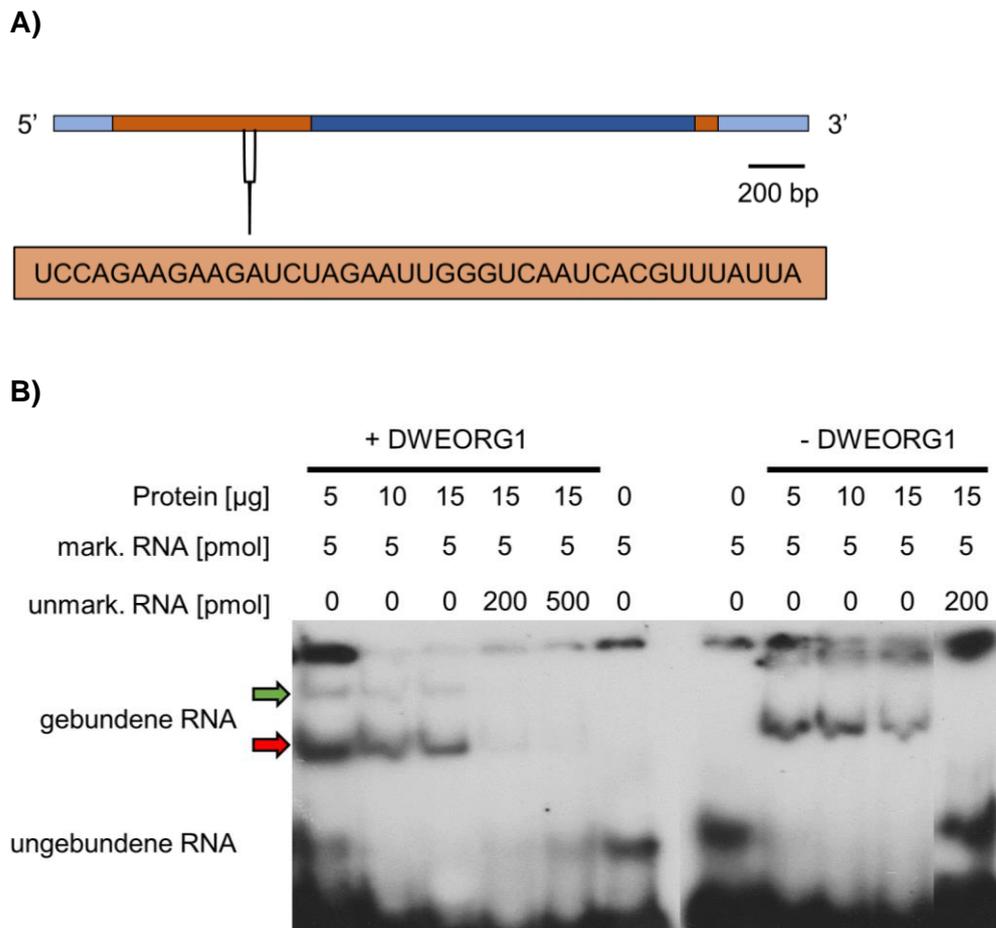


Abbildung 14: Analyse der RNA-Bindung von DWEORG1. Die Abbildung zeigt das Ergebnis der Autoradiographie verschiedener RNA-Bindeansätze **A**: Schematische Darstellung der *cox2* mRNA mit Angabe der Lage und Sequenz des verwendeten 40 nt RNA-Fragments. **B**: Das radioaktiv-markierte 40 nt *cox2* mRNA-Fragment wurde mit verschiedenen Konzentrationen des DWEORG1 bzw. des reinen *E. coli*-Lysats inkubiert. Zu einigen Proben wurde nicht-markierte kompetitive mRNA hinzugegeben. Der rote Pfeil markiert eine Verschiebung des markierten mRNA-Fragments, die sowohl mit DWEORG1 als auch mit dem *E. coli* Protein zu beobachten ist. Der grüne Pfeil markiert eine Verschiebung des markierten Fragments, die nur bei Anwesenheit von DWEORG1 zu beobachten ist.

Abbildung 14B zeigt das Ergebnis dieser Analyse. Jeder Ansatz enthält 5 pmol des radioaktiv markierten *cox2* RNA-Fragments. Ein Ansatz ohne Protein wurde verwendet, um das gebundene RNA-Fragment von ungebundenem unterscheiden zu können. Die anderen Ansätze wurden mit verschiedenen Mengen des aufgereinigten DWEORG1-Proteins bzw. des reinen *E. coli*-Lysats ohne DWEORG1 versetzt (5-15 µg Protein). Die Zugabe des Proteins sollte bei einer RNA-Bindung zu einer Änderung der Laufeigenschaften des RNA-Moleküls und zu einer Verschiebung der RNA-Fragmente innerhalb des Gels führen. Sowohl die Zugabe des reinen *E. coli*-Lysats als auch die Zugabe von DWEORG1 führt zu einer Verschiebung des RNA-Moleküls im Gel (mit rotem Pfeil markiert). In den Proben, die mit DWEORG1

inkubiert wurden, ist eine weitere Verschiebung des RNA-Moleküls zu erkennen (mit grünem Pfeil markiert).

Um die Spezifität der Bindung sicher zu stellen wurden als Kontrolle zu einigen Ansätzen unmarkierte *cox2* RNA-Fragmente (200 und 500 pmol) hinzugegeben. Die Zugabe unmarkierter kompetitiver RNA sorgt bei einer spezifischen Bindung dafür, dass die Verschiebung der markierten RNA im Autoradiogramm nicht mehr zu erkennen ist. Die Konzentration der unmarkierten RNA übersteigt die der markierten RNA weit, sodass unmarkierte RNA mit einer höheren Wahrscheinlichkeit von dem Protein gebunden wird als markierte. Das Signal der verschobenen markierten RNA geht dadurch im Autoradiogramm verloren. Dies ist auch in Abbildung 14B zu erkennen. Die mit einem roten bzw. grünen Pfeil markierten RNA-Signale sind in Anwesenheit der unmarkierten *cox2* RNA-Fragmente nicht mehr nachweisbar. Dies gilt sowohl für die mit DWEORG1 als auch für die mit dem reinen *E. coli*-Lysat inkubierten Ansätze. Eine Spezifität der RNA-Bindung wurde somit nicht eindeutig nachgewiesen.

3.4 *dweorg1s* Expressionsprofil gleicht dem von rPPR-Protein Genen

Die meisten Gene der PPR-Proteine weisen ein geringes Expressionsniveau auf und das Proteinprodukt ist dementsprechend in nur geringer Menge in den Mitochondrien nachzuweisen. Dies liegt daran, dass sie transkriptspezifisch agieren und regulierende Funktionen aufweisen. Lediglich PPR-Proteine, die eine generellere Funktion besitzen, z. B. als Teil des Editosoms oder des Mitoribosoms, liegen in größerer Menge vor und weisen dementsprechend ein höheres Expressionsniveau auf (Fuchs et al. 2020). Funktionell verwandte Gene weisen oft ein ähnliches Expressionsprofil auf und werden z. B. unter denselben Bedingungen hoch bzw. herunter reguliert oder nur in bestimmten Geweben bzw. Entwicklungsstadien exprimiert. Das Programm GENEVESTIGATOR ermöglicht einen Vergleich von Expressionsprofilen verschiedener Gene auf der Basis einer Sammlung gut beschriebener, öffentlich verfügbarer *Microarray-Analysen* und RNA-Experimente. Diese Experimente spiegeln unter anderem die Expression der Gene aus *Arabidopsis* unter verschiedenen Bedingungen und Entwicklungsstadien wider (Hruz et al. 2008).

Das Expressionsprofil des *dweorg1* Gens wurde mit verschiedenen Genen von PPR-Proteinen der P-Klasse (NUWA, POCO1, PPR596, MTSF1 und EMB2217) sowie mit dem Profil von Genen der rPPR-Proteine, die nachweislich ein Bestandteil der Mitoribosomen sind, verglichen. Dies soll als ein Hinweis auf DWEORG1s Funktion dienen. In Abbildung 15 ist das Ergebnis des Vergleichs der Expressionsprofile dargestellt. Oben sieht man den Vergleich des *dweorg1* Gens (in lila) mit anderen P-Klasse PPR-Protein Genen. Unten den Vergleich mit

rPPR-Protein Genen. Es ist deutlich zu erkennen, dass das Expressionsniveau von *dweorg1* in allen Entwicklungsstadien der Pflanze höher ist als das der Gene anderer P-Klasse PPR-Proteine. Betrachtet man hingegen den Vergleich des Expressionsniveaus von *dweorg1* mit den rPPR-Protein Genen, wird deutlich, dass sich die Expressionsprofile kaum voneinander unterscheiden.

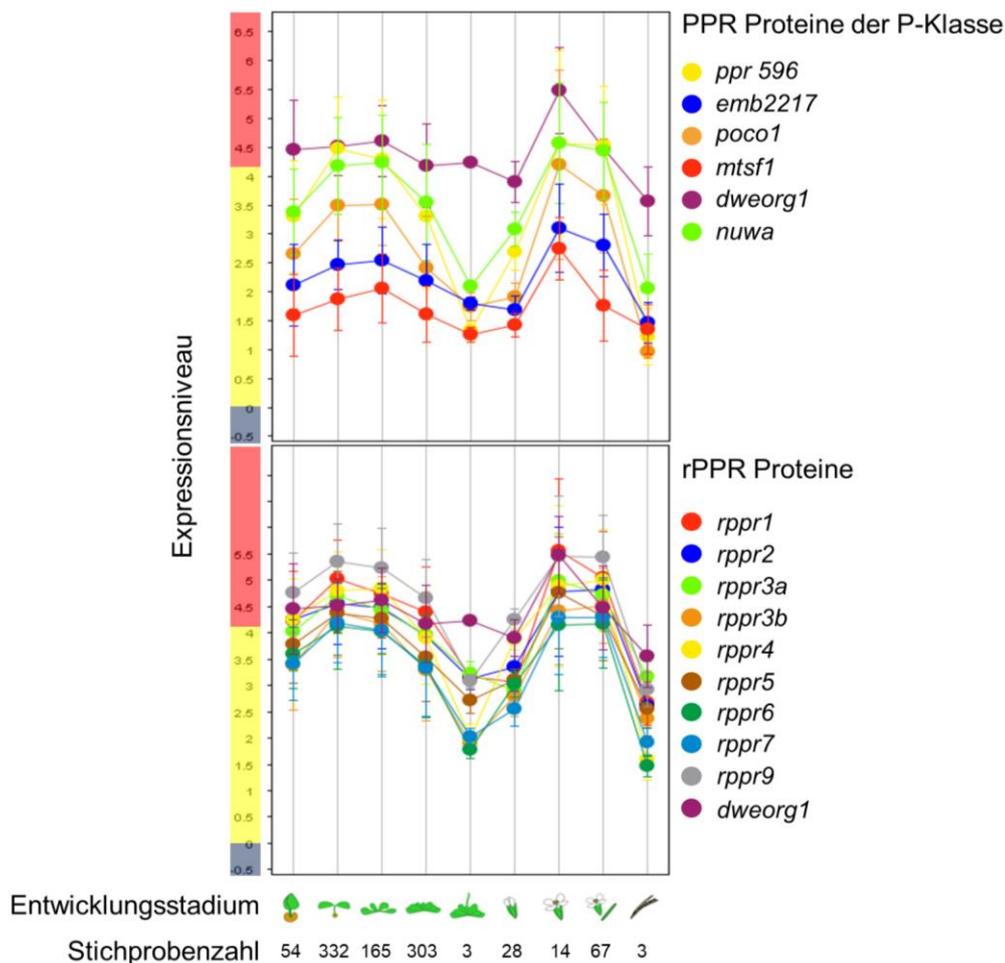


Abbildung 15: Vergleich der Expressionsniveaus des *dweorg1* Gens mit anderen PPR-Protein Genen durch GENEVESTIGATOR. Ein hohes Expressionsniveau ist rot, ein mittleres gelb und ein niedriges in grau markiert.

3.5 *dweorg1s* und *rppr1s* Phänotyp sind miteinander vergleichbar

In einer vorangegangenen Arbeit wurde gezeigt, dass *dweorg1* im Vergleich zum Wildtyp ein verzögertes vegetatives Wachstum aufweist (Bruhs 2012). Dies wurde auch in dieser Arbeit beobachtet (siehe Abbildung 16).

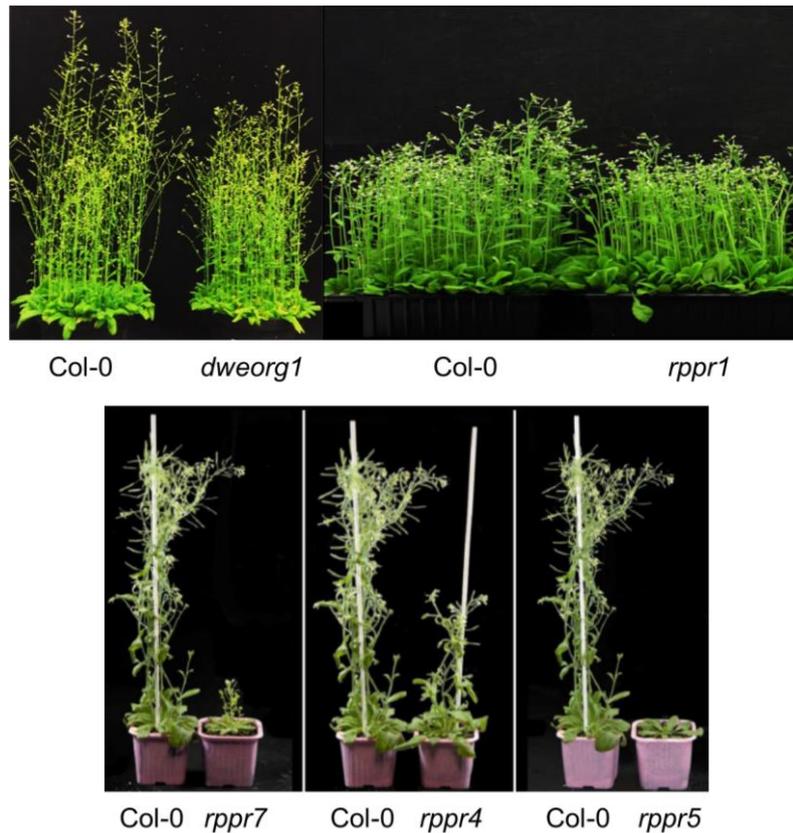


Abbildung 16: Makroskopischer Vergleich von *dweorg1* und rPPR-Protein Mutanten. Gezeigt ist der Wachstumsvergleich von gleichaltrigen Wildtyp (Col-0) Pflanzen und *dweorg1* bzw. rPPR-Protein Mutanten. Der Wachstumsvergleich der rPPR-Protein Mutanten mit dem Wildtyp wurde Waltz et al. (2019) entnommen. Es handelt sich in allen Fällen um T-DNA-Insertions-Mutanten, die einen milden (*dweorg1* und *rppr1*) bzw. starken (*rppr7*, *rppr4* und *rppr5*) Wachstumsdefekt aufweisen.

Aufgrund der Ähnlichkeit des *dweorg1* Expressionsprofils zu rPPR-Protein Genen, wurden auch die verschiedenen Phänotypen der rPPR-Protein Mutanten mit *dweorg1* verglichen. Hierzu wurden *dweorg1* und Wildtyp Pflanzen unter den in 2.2.2 beschriebenen Bedingungen angezogen. Der in Abbildung 16 dargestellte Wachstumsvergleich der rPPR-Protein Mutanten (*rppr1*, *rppr4*, *rppr5* und *rppr7*) mit dem Wildtyp wurde Waltz et al. (2019) entnommen. Die Mutanten *rppr7*, *rppr4* und *rppr5* weisen ein stark verringertes vegetatives Wachstum auf im Vergleich zum Wildtyp. Die Mutante *rppr1* weist dagegen einen milderen Wachstumsdefekt auf, der mit dem von *dweorg1* vergleichbar ist.

3.6 Die mitochondriale Translation ist in *dweorg1* beeinträchtigt

Um zu bestimmen, ob DWEORG1 eine Rolle in der Translation der Mitochondrien spielt, wurde ein sogenanntes *ribosome profiling* durchgeführt. Dies erfolgte in Kollaboration mit dem Labor von Hakim Mireau (Institut Jean-Pierre Bourgin INRA, AgroParisTech, CNRS, Université Paris-

Saclay, Versailles, Frankreich). Das *ribosome profiling* erlaubt eine quantitative Analyse der Translation des gesamten mitochondrialen Genoms (Ingolia et al. 2009). Hierbei macht man sich zunutze, dass Ribosomen die mRNA-Abschnitte, an die sie gebunden sind, vor dem Abbau durch Nukleasen schützen. Diese geschützten mRNA-Bereiche bilden einen sogenannten *ribosome footprint*. In *Arabidopsis* Mitochondrien sind diese *ribosome footprints* 27-28 nt lang (Planchard et al. 2018). Die Sequenzen dieser *footprints* können mittels *next-generation-sequencing* (NGS) bestimmt werden und spiegeln die Position und Anzahl der an eine mRNA gebundenen Ribosomen wider. Die Menge der *footprints* wird durch die Menge der entsprechenden mRNA normalisiert, welche ebenfalls durch NGS bestimmt wird. Dies erlaubt die Bestimmung einer relativen Translationseffizienz einzelner mRNAs. Je mehr Ribosomen an eine mRNA gebunden sind, desto höher ist die Translationseffizienz dieser mRNA (Ingolia et al. 2009).

In Abbildung 17 ist der Ablauf des *ribosome profilings* zum besseren Verständnis schematisch dargestellt. Zunächst werden *A. thaliana* Blüten geerntet und ein Zellextrakt aus diesen isoliert. Von diesem Extrakt wird ein Teil für die Gesamt-RNA-Isolierung abgenommen. Die Gesamt-RNA wird ebenfalls sequenziert, um die relative Transkriptmenge bestimmen zu können. Der restliche Zellextrakt wird mit RNaseI behandelt. Dadurch erhält man die *ribosome footprints*. Diese müssen über ein Harnstoff-Polyacrylamid-Gel gelelektrophoretisch aufgetrennt werden, um sie von anderen RNA-Fragmenten zu trennen. Die so aufgereinigten *ribosome footprints* werden dann für das NGS aufbereitet und die Sequenzen später ausgewertet.

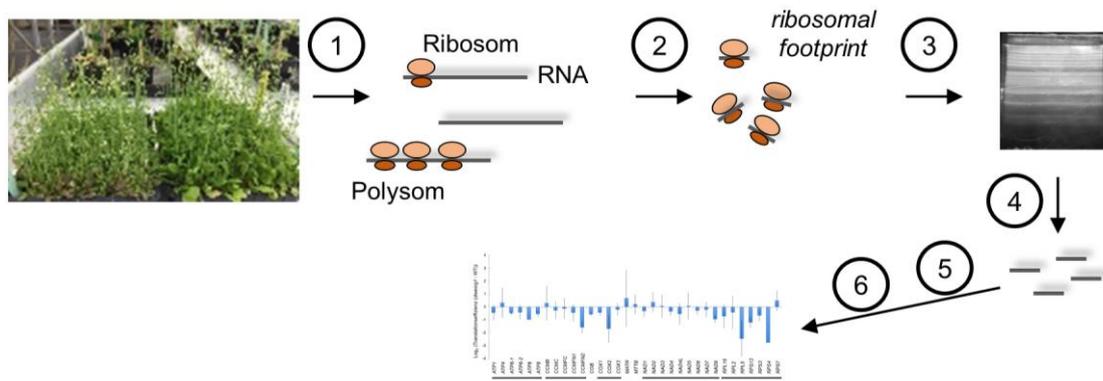


Abbildung 17: Schematischer Ablauf des *ribosome profilings*. 1: Zellextrakt-Isolierung aus *Arabidopsis* Blüten. 2: RNaseI-Behandlung. 3: Aufreinigung der *ribosome footprints* über ein Harnstoff-Polyacrylamid-Gel. 4: Entfernung von rRNAs. 5: Erstellung einer RNA-Sequenzier-library. 6: RNA-Sequenzierung und Auswertung der Sequenzen.

Um die Translationseffizienz in *dweorg1* Mitochondrien in Relation zum Wildtyp bestimmen zu können, wurden jeweils zwei biologische Replikate verwendet. Mittels der Gesamt-RNA des Wildtyps und der Mutante wurde zunächst die Menge an mitochondrialen Transkripten über eine quantitative RNA-Sequenzierung bestimmt. Die mitochondriale Transkriptmenge des Wildtyps und der Mutante sind als RPKM (*reads per kilobase million*) Werte in Abbildung 18 dargestellt. In grün sind die Werte für den Wildtyp und in blau die für *dweorg1* dargestellt. Im Vergleich zum Wildtyp weisen die *dweorg1* Pflanzen generell eine leicht erhöhte Transkriptmenge der mitochondrial codierten Transkripte auf. Dieser Unterschied ist allerdings nicht signifikant.

Im nächsten Schritt wurde die Dichte der Mitoribosomen (Anzahl der *ribosome footprints*), die an ein Transkript binden über die Sequenzdaten der sequenzierten *ribosome footprints* bestimmt. Die Dichte der Mitoribosomen ist als RPKM-Wert in der Abbildung 18 dargestellt. Die Werte des Wildtyps sind in grün und die der Mutante in blau aufgeführt. Die Dichte der Mitoribosomen der einzelnen Transkripte in *dweorg1* scheint leicht reduziert zu sein im Vergleich zum Wildtyp. Jedoch kann der Unterschied nicht als signifikant bezeichnet werden.

Mithilfe der RPKM-Werte der mRNA-Menge und der RPKM-Werte der Dichte der Mitoribosomen wurde die relative Translationseffizienz aller mitochondrialer Transkripte für *dweorg1* im Vergleich zum Wildtyp bestimmt. Hierzu wurde der Log_2 des Verhältnisses der *dweorg1*-Translationseffizienz zur Wildtyp-Translationseffizienz verwendet. Dies ist in Abbildung 18 grafisch dargestellt. Die Translationseffizienz der meisten Transkripte in *dweorg1* ist nur um einen Faktor ≤ 1 gesenkt und damit nur leicht beeinträchtigt. Transkripte mit einer um einen Faktor zwischen 1 und 1,5 gesenkten Translationseffizienz – wie die Transkripte *atp8*, *rpl16*, *rpl2* und *rps12* – sind bereits stärker beeinträchtigt. Die signifikanteste Änderung in der Translationseffizienz in *dweorg1* ist für die Transkripte *ccmF_{N2}* (Faktor -1,6), *cox2* (Faktor -2,0), *rps4* (Faktor -2,7) und *rpl5* (Faktor -2,9) zu beobachten. Eine Involvierung von DWEORG1 in der mitochondrialen Translation ist demnach sehr wahrscheinlich.

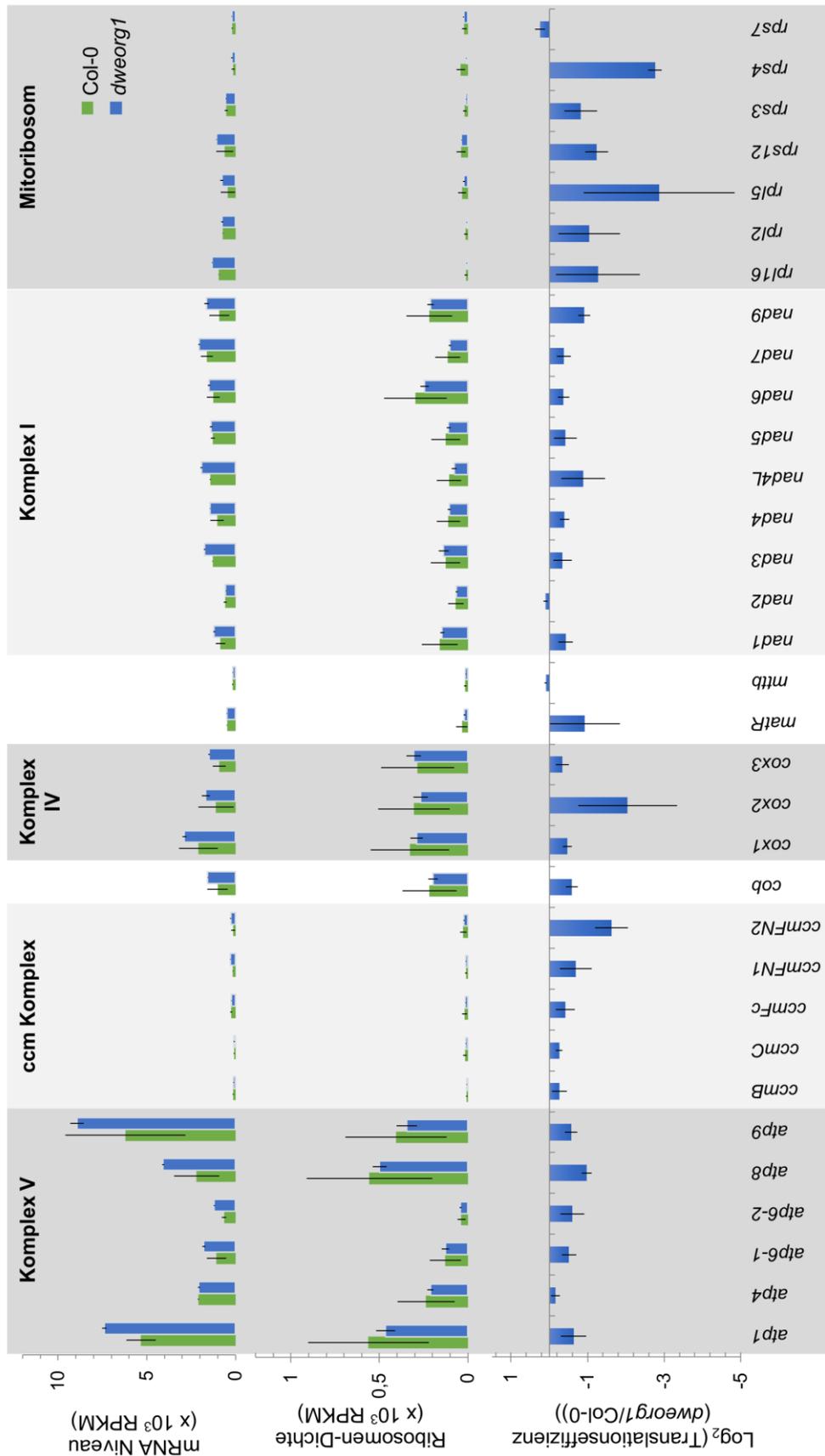


Abbildung 18: Mitochondriales mRNA Niveau und Ribosomen-Dichte in Wildtyp und *dweorg1*, sowie die mitochondriale Translationseffizienz in *dweorg1*. Beschreibung folgt auf der nächsten Seite

Beschreibung der Abbildung 18: Dargestellt ist der Vergleich der mitochondrialen mRNA-Menge des Wildtyps und *dweorg1*, als RPKM-Wert. Zudem ist hier der Vergleich der Mitoribosomen-Dichte aller mitochondrialer mRNAs des Wildtyps und *dweorg1* als RPKM-Wert gezeigt. Grüne Werte entsprechen dem Wildtyp und blaue der *dweorg1* Mutante. Ganz unten ist die relative Translationseffizienz aller mitochondrialer mRNAs in der *dweorg1* Mutante als Log₂-Wert der normalisierten *ribosome footprint*-Menge aller mitochondrialer Transkripte der *dweorg1* Mutante relativ zum Wildtyp abgebildet.

3.7 Untersuchung der RNA-Reifungsprozesse der Transkripte *ccmF_{N2}*, *rps4* und *rpl5*

Neben der Translation des *cox2* Transkripts, sind auch die Transkripte *ccmF_{N2}*, *rps4* und *rpl5* stark in ihrer Translation beeinträchtigt. Wie unter 3.1 für *cox2*, wurden daher auch die RNA-Reifungsprozesse dieser drei Transkripte näher untersucht. Wie in Abbildung 18 gezeigt wurde, ist das mitochondriale mRNA-Niveau in *dweorg1* Pflanzen vergleichbar mit dem des Wildtyps. Die Transkription und Stabilität der Transkripte in *dweorg1* unterscheidet sich damit nicht gegenüber dem Wildtyp. Keines der drei Transkripte beinhaltet ein Intron, sodass der Prozess des Spleißens nicht untersucht werden kann. Zudem wurde bereits gezeigt, dass in *dweorg1* Pflanzen alle mitochondrialen Transkripte korrekt ediert werden (Bruhs 2012). Daher wurden in dieser Arbeit die 5'- und 3'-Enden der Transkripte *ccmF_{N2}*, *rps4* und *rpl5* untersucht.

3.7.1 Untersuchung der 5'- und 3'-Enden der Transkripte *ccmF_{N2}*, *rps4* und *rpl5-cob*

Die Untersuchung der 5'- und 3'-Enden erfolgte mit der gleichen Methode wie für das *cox2* Transkript, der Transkriptenden-Kartierung (siehe 3.1.1). Für die Synthese der cDNA wurden folgende Oligonukleotide verwendet SG3280 für *rps4*, SG3283 für *ccmF_{N2}* und SG3286 für das di-cistronische Transkript *rpl5-cob*. Zur Amplifizierung der 5'- und 3'-Enden wurden jeweils die Oligonukleotid-Kombinationen SG3281/SG3282, SG3284/SG3285 und SG3287/SG3288 verwendet, die für *rps4* ein 677 bp, für *ccmF_{N2}* ein 459 bzw. 437 bp und für *rpl5-cob* ein 637 bzw. 584 bp Amplifikat erzeugen (Forner et al. 2007).

Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden zunächst gelelektrophoretisch in einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt und visuell miteinander verglichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 19A gezeigt. In den ersten beiden Spuren sind die PCR-Produkte für die *rps4* 5'- und 3'-Enden aufgetragen. Sowohl für den Wildtyp als auch für *dweorg1* ist ein Amplifikat von ca. 670 bp zu erkennen. In den Proben der Mutante sind noch weitere Amplifikate zu beobachten – bei etwa 450 bp, 700 bp ca. 800 bp – die nicht im Wildtyp detektiert wurden. Die Amplifizierung größerer DNA-Fragmente in der cRT-PCR des mitochondrialen *rps4* Transkripts wurde bereits vorher beobachtet (Forner et al. 2007). Für die Sequenzierung wurde lediglich das ca. 670 bp große DNA-Amplifikat ausgewählt.

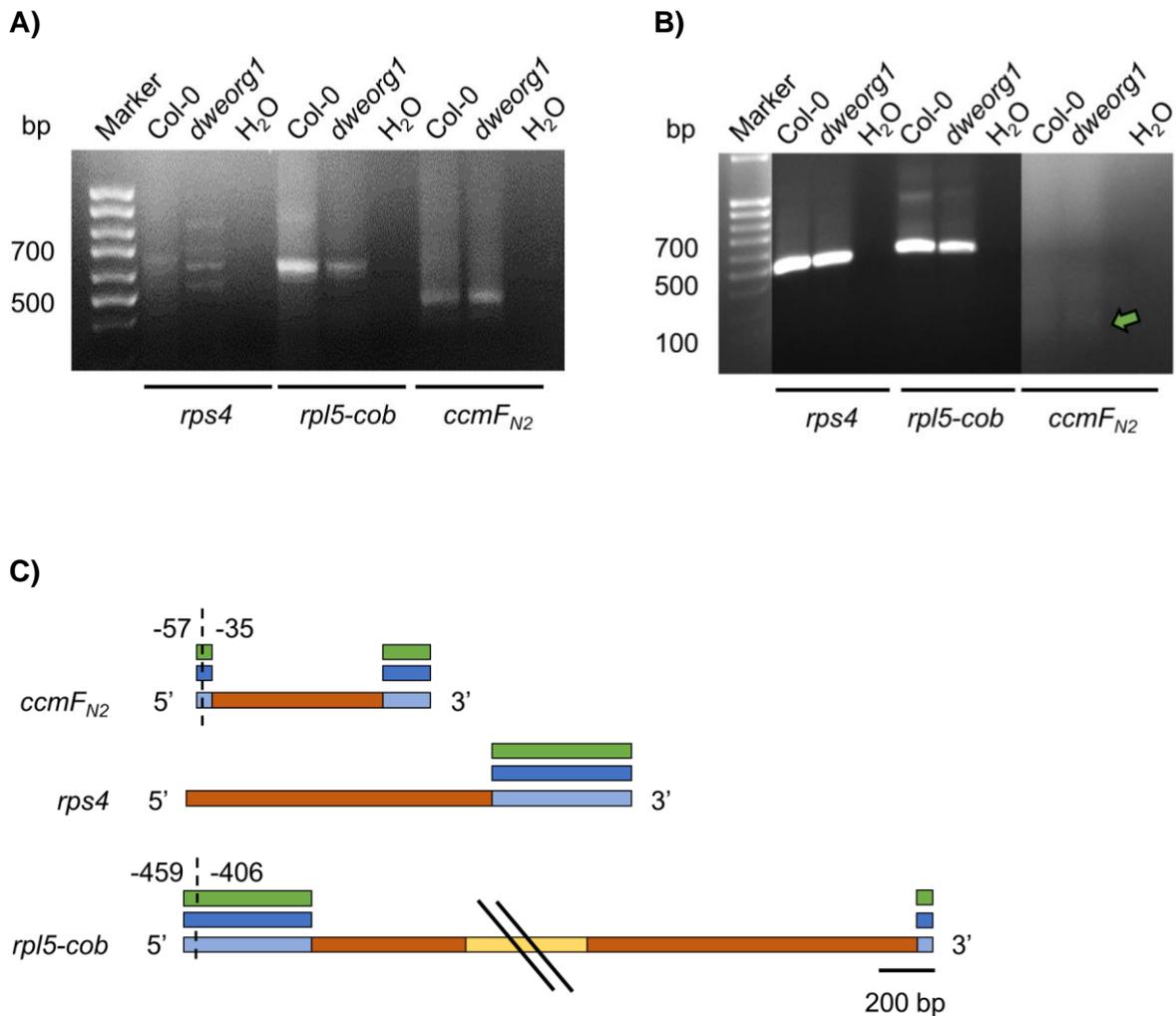


Abbildung 19: Analyse der 5'-/3'-Enden der *rps4*, *rpl5-cob* und *ccmF_{N2}* Transkripte. In der Abbildung sind die Ergebnisse der Transkriptenden-Kartierung und der RT-PCR der *rps4*, *rpl5-cob* und *ccmF_{N2}* Transkriptenden dargestellt. **A:** Analyse der PCR-Produkte der Wildtyp und *dweorg1* cDNA. **B:** Ergebnis der RT-PCR Analyse zur Untersuchung des „-57 5'-Endes“ des *ccmF_{N2}* Transkripts, des *rps4* 3'-Endes und des „-459 5'-Endes“ des *rpl5-cob* Transkriptes. **C:** Schematische Darstellung der hier identifizierten *rps4*, *rpl5-cob* und *ccmF_{N2}* Transkriptenden des Wildtyps (grün) und der Mutante *dweorg1* (blau). Hellblau: 5'- bzw. 3'-Ende; orange: Exons; gelb: intergenische Region (nicht maßstabsgetreu).

Die Amplifikate der *rpl5-cob* 5'- und 3'-Enden des Wildtyps und der Mutante weisen beide eine Länge von etwa 650 bp auf. Auch das entspricht dem erwarteten Amplifikat. Dies gilt ebenso für die Amplifikate der *ccmF_{N2}* 5'- und 3'-Enden des Wildtyps und der Mutante mit einer Länge von ca. 500 bp. Die durch die Sequenzierung der PCR-Produkte erhaltenen Sequenzen wurden mit den annotierten Sequenzen der 5'- und 3'-Enden der Transkripte *ccmF_{N2}*, *rps4* und *rpl5-cob* verglichen (siehe 8.1, Abbildung A 1). Die beschriebenen 5'-Enden der untersuchten Transkripte beginnen für *rps4* +2 Nukleotide vom Startcodon ausgehend, für *rpl5* -459 bzw. -406 Nukleotide vom Startcodon ausgehend und für *ccmF_{N2}* -57 bzw. -35 Nukleotide vom Startcodon ausgehend (Forner et al. 2007). Mit dem Vergleich der Sequenzen wurden für das *ccmF_{N2}* Transkript sowohl im Wildtyp als auch in *dweorg1* das „-35 5'-Ende“ nachgewiesen.

Für *rps4* wurde im Wildtyp das „+2 5'-Ende“ nachgewiesen. In der Mutante beginnt das 5'-Ende allerdings bei +1. Für *rpl5* Transkripte wurde im Wildtyp ein 5'-Ende -405 Nukleotide vom Startcodon entfernt nachgewiesen und in der Mutante ein 5'-Ende -457 Nukleotide vom Startcodon entfernt.

Die beschriebenen 3'-Enden der untersuchten Transkripte enden für *rps4* +498 Nukleotide vom Stopcodon entfernt, für *rpl5-cob* +58 Nukleotide vom Stopcodon entfernt und für *ccmF_{N2}* +170 Nukleotide vom Stopcodon entfernt (Forner et al. 2007). Der Sequenzvergleich ergab komplette 3'-Enden sowohl für den Wildtyp als auch die Mutante im Fall der Transkripte *rpl5-cob* und *ccmF_{N2}*. Für *rps4* wurde nur in der Mutante ein intaktes 3'-Ende nachgewiesen, für den Wildtyp nicht.

Um die Transkriptenden, die nicht durch den Sequenzvergleich nachgewiesen wurden, zu analysieren, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Hierfür wurden die Oligonukleotide SG3301 und SG3302 zur Amplifizierung des „-57 5'-Endes“ des *ccmF_{N2}* Transkripts, SG3303 und SG3304 zur Amplifizierung des *rps4* 3'-Endes und SG3305 und SG3306 zur Amplifizierung des „-459 5'-Endes“ des *rpl5-cob* Transkriptes verwendet. Wenn die Enden nicht vollständig vorliegen, kann kein PCR-Produkt amplifiziert werden, da die Oligonukleotide direkt am Beginn bzw. Ende der 5'- bzw. 3'-Enden der Transkripte binden. Vor der PCR-Reaktion wurde die RNA des Wildtyps und der Mutante mit DNaseI behandelt, um eine Kontamination mit DNA zu verhindern. Die in der PCR-Reaktion amplifizierten DNA-Fragmente wurden in einem 1 %-igen Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Ergebnis ist in Abbildung 19B dargestellt. Bei erfolgreicher Amplifizierung der 5'- bzw. 3'-Enden werden DNA-Fragmente einer Länge von 498 bp für *rps4*, 538bp für *rpl5-cob* und 132 bp für *ccmF_{N2}* erwartet. Sowohl für das 3'-Ende des *rps4* Transkripts als auch für das 5'-Ende des *rpl5-cob* Transkripts des Wildtyps und der Mutante wurden PCR-Produkte synthetisiert, die der erwarteten Länge entsprechen. Das 5'-Ende des *ccmF_{N2}* Transkripts wurde unter den gewählten PCR-Bedingungen sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante nur sehr schwach amplifiziert. Allerdings besitzt das Amplifikat die erwartete Länge von 132 bp. Abbildung 19C fasst die für den Wildtyp und *dweorg1* nachgewiesenen Transkriptenden der mitochondrialen Transkripte *rps4*, *rpl5-cob* und *ccmF_{N2}* schematisch zusammen.

3.8 Analyse der mitochondrialen Proteinmenge

Ist die Translationseffizienz eines Transkripts beeinträchtigt, so erwartet man, dass sich dies auch negativ auf die entsprechende Proteinmenge auswirkt. In *dweorg1* ist die Translationseffizienz der Transkripte *cox2*, *rps4*, *rpl5* und *ccmF_{N2}* am stärksten beeinträchtigt (siehe Abbildung 18). Für das Protein COX2, die Untereinheit zwei der Cytochrom-c Oxidase

(Komplex IV), wurde bereits über einen Western Blot gezeigt, dass die Proteinmenge in *dweorg1* geringer ist als im Wildtyp. Die Menge der mitochondrialen Proteine der Adenosintri-phosphatsynthase ATP- β und ATP9 (dritte und neunte Untereinheit des Komplex V) und NAD9, die neunte Untereinheit der NADH-Dehydrogenase (Komplex I), ist hingegen unverändert (Bruhs 2012). In dieser Arbeit wurden weitere mitochondriale Proteine in *dweorg1* und dem Wildtyp über einen Western Blot analysiert.

Zur Untersuchung der mitochondrialen Proteinmenge im Wildtyp und der *dweorg1* Mutante wurden Proteine aus hoch bzw. grob aufgereinigten Mitochondrien der entsprechenden Pflanzen isoliert. Das Ergebnis des Western Blots ist in Abbildung 20 dargestellt. Analysiert wurden Untereinheiten der verschiedenen Komplexe der mitochondrialen Atmungskette sowie Proteine der Mitoribosomen. Dabei wurden mitochondrial codierte Proteine wie NAD6 und NAD9 (sechste und neunte Untereinheit der NADH-Dehydrogenase), COB (Teil der Cytochrom-c Reduktase), COX2 (Teil der Cytochrom-c Oxidase) sowie RPS4 und RPL16 (Proteine des Mitoribosoms) untersucht sowie im Zellkern codierte Proteine wie RISP (Teil der Cytochrom-c Reduktase), ATP- β (Teil der Adenosintri-phosphatsynthase) und Cyt-c. Dabei wurde PORIN als Ladekontrolle verwendet. Eine Analyse der Proteine RPL5 und CcmF_{N2} war nicht möglich, da keine entsprechenden Antikörper zur Verfügung standen.

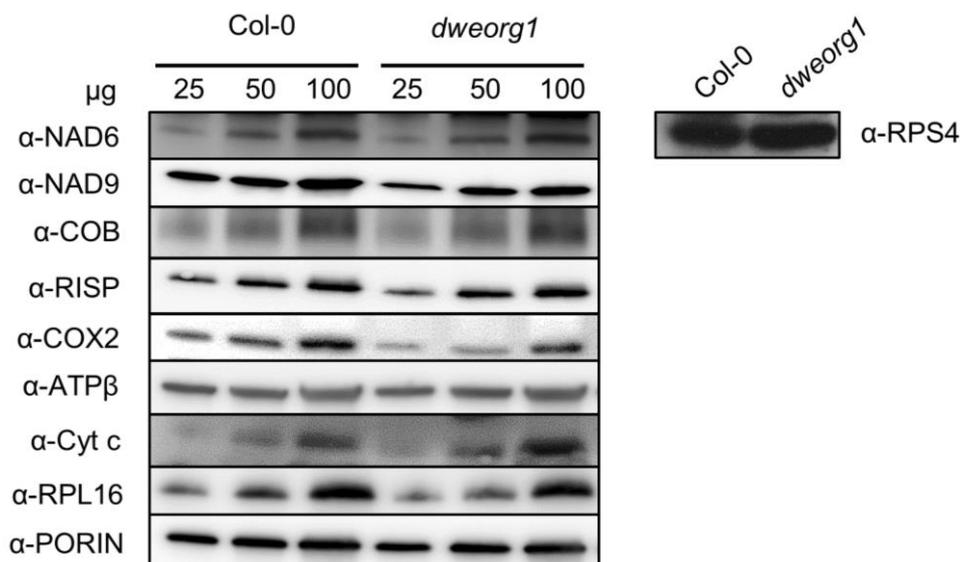


Abbildung 20: Western Blot Analyse mitochondrialer Proteine in *dweorg1* und dem Wildtyp. Für die Analyse der mitochondrialen Proteinmenge in *dweorg1* wurden die Gesamtproteine des Wildtyps und der *dweorg1* Mutante isolierter Mitochondrien über eine SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und eine Western Blot Analyse mit den angegebenen spezifischen Antikörpern durchgeführt. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte über einen an *horseradisch peroxidase* (HRP) gekoppelten sekundären Antikörper und eine Chemielumineszenzreaktion. Die Stärke des Lumineszenz Signals spiegelt dabei die Menge an detektiertem Protein wider. Zur Detektion von RPS4 wurden 50 μ g mitochondriale Proteine aufgetragen.

Die isolierten Proteine wurden in einer SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt, anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit den entsprechenden Antikörpern über eine Chemilumineszenzreaktion nachgewiesen. Je höher die Proteinkonzentration ist, desto intensiver ist das Chemilumineszenzsignal auf dem Röntgenfilm zu erkennen. Es wurden Verdünnungsreihen der isolierten Proteine aufgetragen. Dies erlaubt eine genauere Bestimmung der Unterschiede in der Proteinmenge des Wildtyps und der Mutante. Die Abbildung 20 zeigt das Ergebnis des Western Blots. Für die meisten der untersuchten mitochondrialen Proteine ist kein Unterschied in der Signalstärke zu erkennen. Die Signalstärke des COX2 und NAD9 Proteins ist in *dweorg1* im Vergleich zum Wildtyp jedoch etwas verringert. Dies bestätigt die vorherigen Ergebnisse der Reduktion des COX2 Proteins in *dweorg1* (Bruhs 2012). Eine geringere Menge an RPS4 Protein wurde hier nicht nachgewiesen.

3.9 DWEORG1 ist mit den Mitoribosomen assoziiert

PPR-Proteine sind ein fester Bestandteil pflanzlicher Mitoribosomen und können hierdurch Einfluss auf die Translation einzelner oder auch aller mitochondrialer Transkripte haben (Waltz et al. 2019; Rugen et al. 2019). Um die Assoziation von DWEORG1 mit Mitoribosomen zu überprüfen, wurde eine Saccharose-Gradienten-Analyse mit isolierten Polysomen wie in 2.5.3 beschrieben durchgeführt.

Da keine Antikörper gegen DWEORG1 selbst zur Verfügung standen, wurden *dweorg1* Pflanzen verwendet, die ein DWEORG1-eGFP Fusionsprotein unter der Kontrolle des CaMV-Promotors exprimieren (Knittler 2011). Dies erlaubt den indirekten Nachweis von DWEORG1 über die Verwendung eines eGFP-Antikörpers. Für die Analyse wurden Mitochondrien aus hydroponisch gewachsenen Wurzelkulturen der *dweorg1::DWEORG1-eGFP* Pflanzen isoliert (beschrieben in 2.5.1). Der Polysomen-Extraktions-Puffer zur Lyse der Mitochondrien, enthält Chloramphenicol. Dieser Translationshemmer sorgt dafür, dass die Proteinsynthese gestoppt wird. Durch die Zugabe des Translationshemmers wird verhindert, dass sich die Ribosomen von der RNA lösen und man erhält somit eine Momentaufnahme der Translation zum Zeitpunkt der Polysomenisolation. Das Lysat wurde auf einen diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten geschichtet, welcher im Anschluss an eine Ultrazentrifugation in acht Fraktionen aufgeteilt wurde, die den gesamten Gradienten repräsentieren. Die Fraktionen spiegeln verschiedene Translationszustände wider. Die obersten Fraktionen enthalten nicht translationsaktive Komponenten wie freie Ribosomen und freie mRNA. Je mehr Ribosomen an einer mRNA gebunden sind, desto höher ist die Translationseffizienz für diese mRNA und desto weiter wandert diese im Gradienten aufgrund ihrer Dichte nach unten. Die unteren Fraktionen enthalten demnach translationsaktive Komponenten.

Die Proteine der verschiedenen Fraktionen wurden isoliert und mithilfe eines Western Blots analysiert. Zum Nachweis von Ribosomen wurden Antikörper gegen RPS4, ein mitoribosomales Protein der kleinen Untereinheit und RPL16, ein mitoribosomales Protein der großen Untereinheit gewählt. Die Proteine der acht Fraktionen wurden über eine SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. DWEORG1, RPS4 und RPL16 wurden mit den entsprechenden Antikörpern über eine Chemielumineszenzreaktion nachgewiesen. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 21 dargestellt, die roten Sterne markieren sehr schwache Signale. DWEORG1 wurde in den Fraktionen eins bis sechs nachgewiesen, in Fraktion sechs ist das Signal aber nur noch schwach zu erkennen. Das Signal für RPL16 wurde ebenfalls in diesen Fraktionen nachgewiesen. Dabei ist das Signal in der ersten Fraktion nur sehr schwach erkennbar. RPS4 wurde hingegen nur in den Fraktionen zwei bis fünf nachgewiesen. DWEORG1 kann demnach in den gleichen Fraktionen wie die ribosomalen Proteine nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis lässt eine Assoziation von DWEORG1 an die Ribosomen vermuten.

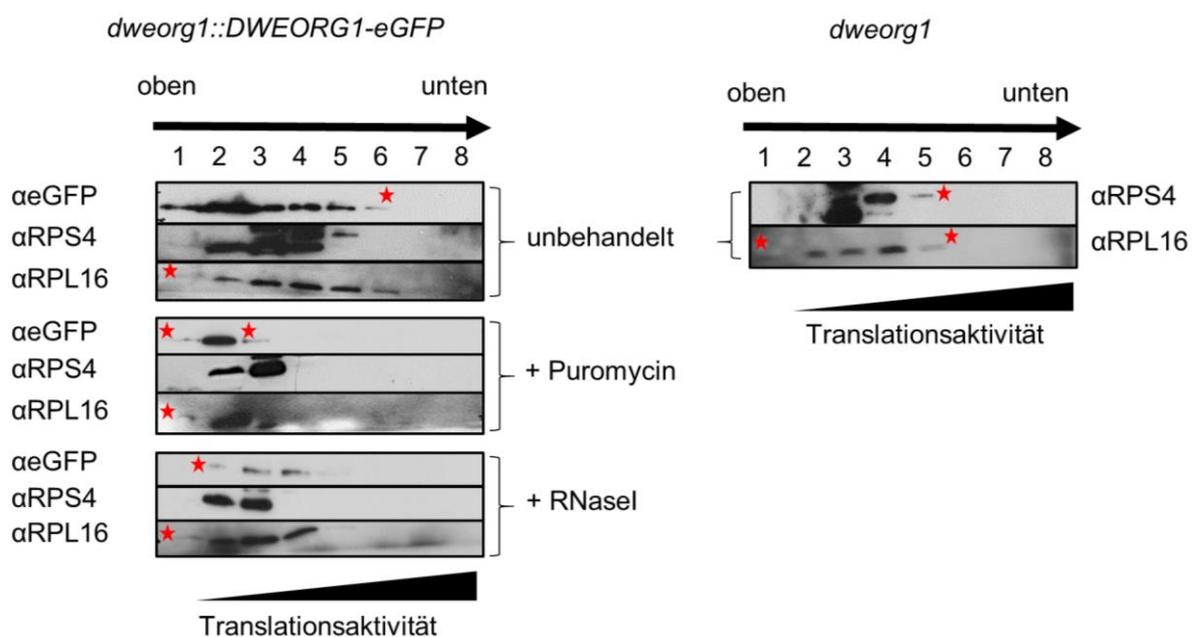


Abbildung 21: Ergebnis der Saccharose-Gradienten-Analyse von *dweorg1::DWEORG1-eGFP* und *dweorg1* Mitochondrien. Ergebnis der Western Blot Analyse der aus den Fraktionen (eins bis acht) isolierten Proteine. DWEORG1 wurde über das GFP-Fusionsprotein mit einem Antikörper gegen GFP detektiert. Das r-Protein RPS4 repräsentiert die SSU und das r-Protein RPL16 die LSU der Mitoribosomen. Die Zugabe von Puromycin bzw. RNaseI zu den Proben führt zu einer Destabilisierung der Ribosomen und diente als Kontrolle auf eine echte Assoziation von DWEORG1 mit den Ribosomen. In den *dweorg1* Proben wurden nur die ribosomalen Proteine analysiert, um einen Eindruck über die Translationsaktivität in den Mitochondrien der Mutante zu erhalten.

Um sicherzustellen, dass es sich nicht um eine zufällige Co-Migration von DWEORG1 und den ribosomalen Proteinen handelt wurden Kontrollen unter Ribosomen-destabilisierenden Bedingungen durchgeführt. Dies führt zu einer Verschiebung der ribosomalen Proteine in die oberen Fraktionen des Gradienten. Ist DWEORG1 an die Ribosomen selbst und nicht die mRNA bzw. an andere Proteinkomplexe gebunden, tritt diese Verschiebung auch für DWEORG1 auf. Die Destabilisierung der Ribosomen erfolgte durch die Zugabe von Puromycin bzw. RNaseI bevor die Proben auf den Saccharose-Gradienten geschichtet wurden. Puromycin destabilisiert die Ribosomen direkt. Es bindet direkt an die Ribosomen und führt zu einer verfrühten Termination der Peptidsynthese, was wiederum zur Dissoziation der Ribosomen von der mRNA führt (Lu und Draper 1994). Die RNaseI-Behandlung wirkt hingegen indirekt destabilisierend auf die Ribosomen, da sie zum Abbau von rRNAs führt, die für die Integrität der Ribosomen wichtig sind (Ott et al. 2006).

Das Ergebnis dieses Kontrollexperiments ist ebenfalls in Abbildung 21 zu sehen. Die Zugabe von Puromycin verschiebt die ribosomalen Proteine RPL16 und RPS4 in die Fraktionen eins bis drei bzw. zwei und drei, wobei die Signalstärke in der ersten Fraktion sehr gering ist. Auch das Signal für DWEORG1 kann nur noch in den Fraktionen eins bis drei nachgewiesen werden. Auch hier ist die Signalstärke in Fraktion eins sowie in Fraktion drei sehr schwach. Die Zugabe der RNaseI verschiebt die Signale für DWEORG1 in die Fraktionen zwei bis vier wobei das Signal in Fraktion zwei nur schwach zu erkennen ist. Die Signale für RPS4 werden in die Fraktionen zwei und drei und die Signale für RPL16 in die Fraktionen eins bis vier verschoben. Auch hier ist das Signal der ersten Fraktion wieder sehr gering. DWEORG1 co-migriert demnach auch unter Ribosomen-destabilisierenden Bedingungen mit den r-Proteinen, sodass von einer echten Assoziation von DWEORG1 mit den Ribosomen ausgegangen werden kann.

Diese Analyse wurde ebenfalls mit hydroponisch gewachsenen Wurzelkulturen von *dweorg1* durchgeführt, um die Translationsaktivität in den Mutanten zu analysieren. Hier wurden nur die ribosomalen Proteine RPS4 und RPL16 untersucht. Die Proben wurden weder mit Puromycin noch RNaseI behandelt. In Abbildung 21 ist das Ergebnis der Gradienten-Analyse der *dweorg1* Mitochondrien abgebildet. RPL16 wurde in den Fraktionen eins bis fünf, RPS4 in den Fraktionen zwei bis fünf nachgewiesen. In beiden Fällen ist das Signal in der fünften Fraktion nur sehr schwach. Dies spricht für eine geringe Konzentration an Ribosomen in dieser Fraktion. Dies bestätigt das Ergebnis der erniedrigten Translationseffizienz aus 3.6.

3.10 DWEORG1 befindet sich in einem Komplex mit rPPR-Proteinen

Senkler et al. (2017) haben eine Komplexom-Datenbank für *Arabidopsis* Mitochondrien erstellt (https://complexomemap.de/at_mito_leaves). Über die online zur Verfügung stehenden *heat maps* der Komplexom-Datenbank lassen sich Proteine identifizieren, die zusammen in einem Komplex vorliegen. Diese Datenbank wurde genutzt um zu untersuchen ob DWEORG1 in einem Komplex mit rPPR-Proteinen vorliegt. Hierzu wurden die *heat map* Daten der einzelnen Proteine miteinander verglichen. Die Abbildung 22 zeigt das Ergebnis dieser Analyse. Die verschiedenen Blautöne geben die Menge an Protein im Komplex an. Dabei stellt dunkelblau hohe Mengen und hellblau kleinere Mengen dar. DWEORG1 kommt in hohen Mengen in einem Komplex (etwas unter 150 kDa) mit rPPR5 und rPPR8 vor. In geringeren Mengen liegt es in einem etwas leichteren Komplex zusammen mit rPPR2 vor. Zudem liegen rPPR3a, rPPR7 und rPPR9 in geringeren Mengen in dem DWEORG1-rPPR5-rPPR8-Komplex vor.

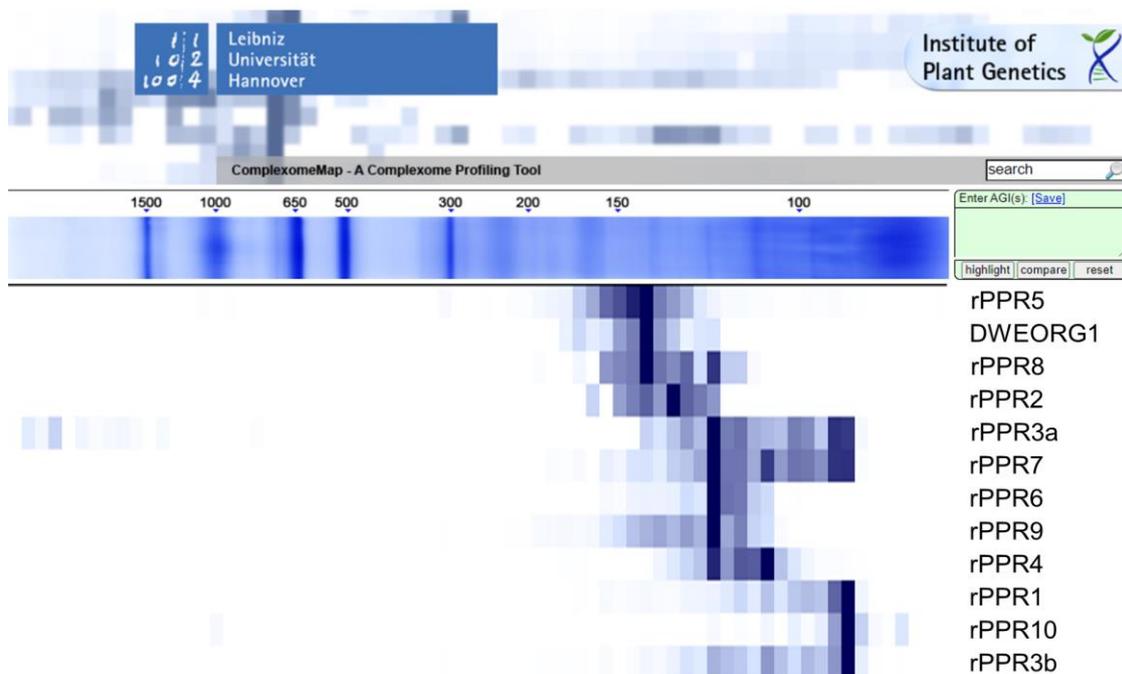


Abbildung 22: DWEORG1 befindet sich in einem Komplex mit rPPR-Proteinen. Unter Verwendung der mitochondrialen Komplexom-Datenbank (https://complexomemap.de/at_mito_leaves) (Senkler et al. 2017) (Senkler et al. 2017) (Senkler et al. 2017) wurde gezeigt, dass DWEORG1 in einem Komplex mit verschiedenen rPPR-Proteinen vorliegt. Hierzu wurden die verschiedenen *heat maps* der bekannten rPPR-Proteine mit der von DWEORG1 verglichen. Dunkelblau: hohe Mengen des Proteins, hellblau: geringe Mengen des Proteins.

3.11 Identifizierung putativer Protein-Interaktionspartner von DWEORG1

Neben der Fähigkeit zur RNA-Bindung (Delannoy et al. 2007) wurde für einige PPR-Proteine auch eine physische Assoziation mit anderen Proteinen bestätigt (Takenaka et al. 2012; Bentolila et al. 2012). Um putative Protein-Interaktionspartner von DWEORG1 zu identifizieren und so ein klareres Bild von DWEORG1s Funktion zu erhalten, wurde in dieser Arbeit eine Co-Immunpräzipitation von Proteinen mit anschließender LC-MS-Analyse durchgeführt.

Die Co-Immunpräzipitation erfolgte mithilfe des μ MACS-GFP *isolation*-Kits von Miltenyi Biotec. Für die Co-Immunpräzipitation von mit DWEORG1 assoziierten Proteinen wurden mitochondriale Proteine hydroponischer Wurzelkulturen der *dweorg1::DWEORG1-eGFP*-Linie verwendet, da keine Antikörper gegen DWEORG1 selbst zur Verfügung standen. Als Kontrolle und zur Identifizierung unspezifischer Bindungspartner wurde die Co-Immunpräzipitation zusätzlich mit mitochondrialen Proteinen des Wildtyps durchgeführt. Da man auch in Pflanzen von einer Assoziation der Mitochondrien an die innere mitochondriale Membran ausgeht (Waltz et al. 2019) und eine Assoziation von DWEORG1 an Ribosomen vermutet wird, wurden sowohl lösliche als auch unlösliche Proteine für die Co-Immunpräzipitation verwendet. Im Anschluss an die native Proteinisolierung aus den entsprechenden Mitochondrien wurde das Protein LySAT mit GFP-Antikörpern inkubiert, die an magnetische Kügelchen gekoppelt sind. Die Antikörper binden das an DWEORG1 gekoppelte GFP und erlauben somit die Immunpräzipitation von DWEORG1 aus dem ProteinlySAT (siehe 2.4.6).

Das so erhaltene Eluat sollte DWEORG1 und die putativen Interaktionspartner enthalten. Zunächst wurden das Eluat der Kontroll-Probe und der DWEORG1-Probe über eine SDS-PAGE analysiert. Das Ergebnis der Analyse ist in Abbildung 23A gezeigt. Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinproben des Wildtyps und der *dweorg1::DWEORG1-eGFP* Mitochondrien wurden mit SYPRO™ Ruby (Thermo Fisher) angefärbt. Hierbei handelt es sich um einen fluoreszierenden Proteinfarbstoff, der im Gegensatz zu Coomassie-Blau (Detektionsgrenze von 100 ng) die Detektion bereits sehr geringer Proteinmengen von nur 0.25–1 ng erlaubt. In den ersten beiden Spuren sind die Eluate der löslichen und unlöslichen *dweorg1::DWEORG1-eGFP* Proben aufgetragen. In beiden Fällen sind einige Proteinbanden zu erkennen, die putative Interaktionspartner von DWEORG1 darstellen können. Auf Höhe von etwa 100 kDa ist in beiden Proben eine Proteinbande zu erkennen (mit grünem Pfeil markiert), bei der es sich um DWEORG1 selbst handeln könnte. In den letzten beiden Spuren wurden die Eluate der löslichen und unlöslichen Wildtyp Proben aufgetragen. Die Anzahl der hier nachgewiesenen Proteine ist geringer als in den anderen Proben. Hierbei handelt es sich um unspezifisch an die Antikörper gebundene Proteine, die im Anschluss an die LC-MS-Analyse mit den anderen Proben abgeglichen werden und gegebenenfalls rausgefiltert werden können.

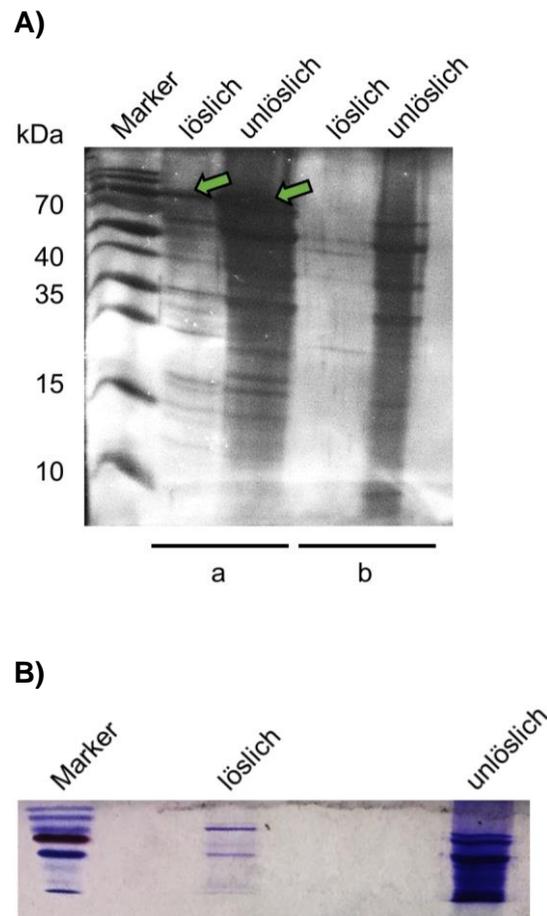


Abbildung 23: Analyse der co-immunpräzipitierten Proteine über SDS-PAGE und die beispielhafte Darstellung der Probenvorbereitung für die LC-MS-Analyse. A: Ergebnis des mit SYPRO™ Ruby gefärbten SDS-Gels. Es wurden die Eluate der löslichen und unlöslichen *dweorg1::DWEORG1-eGFP* Proben (a) und des Wildtyps (b) aufgetragen. Die grünen Pfeile markieren Proteinbanden, die dem Molekulargewicht von DWEORG1-eGFP entsprechen. **B:** Ergebnis einer SDS-PAGE der Eluate von löslichen und unlöslichen *dweorg1::DWEORG1-eGFP* Proben, die für die LC-MS-Analyse verwendet wurden.

Für die LC-MS-Analyse wurden die oben genannten Proben ebenfalls über eine SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Allerdings wurde die Laufzeit stark verkürzt, sodass die Proben nicht vollständig aufgetrennt wurden. Anschließend wurden die Proben mit Coomassie-Blau im Gel angefärbt, ausgeschnitten und die LC-MS-Analyse durchgeführt. In der Abbildung 23B ist dies beispielhaft für die Eluate von *dweorg1::DWEORG1-eGFP* gezeigt. Normalerweise werden Proteine für eine LC-MS-Analyse komplett gelelektrophoretisch aufgetrennt und die einzelnen Proteinbanden für die Analyse ausgeschnitten. Dies wurde hier in abgeänderter Form durchgeführt, damit die gesamten eluierten Proteine in einer Probe analysiert werden können. Dies stellt sicher, dass auch Proteine analysiert werden, die nur in geringer Konzentration vorliegen.

Eine komplette Liste, der durch die LC-MS-Analyse identifizierten Proteine, ist in der Tabelle A 2 unter 8.3 zu finden. Als häufigstes Protein wurde DWEORG1 identifiziert. Da es sich hierbei um das Köder-Protein handelt, war dies zu erwarten. Die unspezifisch gebundenen Proteine wurden herausgefiltert und die verbliebenen putativen Interaktionspartner von DWEORG1 in der Tabelle 13 aufgelistet. Die zelluläre Lokalisierung der einzelnen Proteine wurde über das Online-Werkzeug SUBAcon (<https://suba.live/>) vorhergesagt (Hooper et al. 2014). Entgegen der SUBAcon Vorhersage, wurden außer DUF1262, PIP1 und JAL31 alle in Tabelle 13 aufgelisteten Proteine im mitochondrialen Proteom nachgewiesen (Fuchs et al. 2020).

Einige der putativen Interaktionspartner sind nachfolgend hervorgehoben. Unter den Ergebnissen der LC-MS-Analyse befindet sich das mitochondriale Protein RPS2, ein Teil der kleinen mitoribosomalen Untereinheit. Dieses wurde als Kernbestandteil des Mitoribosoms identifiziert (Waltz et al. 2019; Rugen et al. 2019). Zudem wurde das PPR-Protein PPR596 co-immunpräzipitiert, welches unter stabilen jedoch nicht unter destabilisierenden Bedingungen als Teil des Mitoribosoms bzw. als mit dem Mitoribosom assoziiert beschrieben wurde (Waltz et al. 2019; Rugen et al. 2019). PPR596 ist ein P-Klasse PPR-Protein, welches an der partiellen Edierung der Edierungsposition rps3eU1344SS des *rps3* Transkripts in Mitochondrien beteiligt ist (Doniwa et al. 2010). Auch der mitochondriale Phosphat-Transporter MPT3 wurde durch die LC-MS-Analyse als putativer Interaktionspartner von DWEORG1 identifiziert. Hierbei handelt es sich nicht um ein ribosomales Protein sondern um ein Protein, welches unter anderem an der Regulierung der Salzstress-Antwort in *A. thaliana* beteiligt ist (Zhu et al. 2012).

Tabelle 13: Zusammengefasste Liste der durch die LC-MS-Analyse identifizierten putativen Interaktionspartner von DWEORG1. Die Liste fasst die Proteine zusammen, die als spezifisch gebundene Proteine identifiziert wurden. Die zelluläre Lokalisation der Proteine wurde über das SUBAcon-Werkzeug (<https://suba.live/>) vorhergesagt.

Accession Nr.	Beschreibung	Lokalisierung
AT3G15590.1	DWEORG1	Mitochondrien
AT3G03600.1	ribosomal protein S2 (RPS2)	Mitochondrien
AT1G80270.1	PENTATRICOPEPTIDE REPEAT 596 (PPR596)	Mitochondrien
AT5G14040.1	phosphate transporter 3;1 (MPT3)	Mitochondrien
AT5G09590.1	mitochondrial HSO70 2 (MTHSC70-2, HSC70-5)	Mitochondrien
AT4G37910.1	mitochondrial heat shock protein 70-1 (mtHsc70-1)	Mitochondrien
AT3G08580.1	ADP/ATP carrier 1 (AAC1)	Mitochondrien
AT3G02090.1	Insulinase (Peptidase family M16) protein (MPPBETA)	Mitochondrien
AT5G62390.1	BCL-2-associated athanogene 7 (ATBAG7, BAG7)	Endoplasmatisches Retikulum
AT5G60390.2	GTP binding Elongation factor Tu family protein	Cytosol
AT1G20620.2	catalase 3 (CAT3, SEN2, ATCAT3)	Peroxisom
AT1G07890.6	ascorbate peroxidase 1 (APX1, MEE6, CS1, ATAPX1, ATAPX01)	Cytosol
AT3G23990.1	heat shock protein 60 (HSP60, HSP60-3B)	Mitochondrien
AT3G62530.1	ARM repeat superfamily protein	Mitochondrien
ATMG00070.1	NADH dehydrogenase subunit 9 (NAD9)	Mitochondrien
AT5G08670.1	ATP synthase alpha/beta family protein	Mitochondrien
AT2G33040.1	gamma subunit of Mt ATP synthase (ATP3)	Mitochondrien
AT5G07440.3	glutamate dehydrogenase 2 (GDH2)	Mitochondrien
AT5G66760.1	succinate dehydrogenase 1-1 (SDH1-1)	Mitochondrien
AT5G14780.1	formate dehydrogenase (FDH)	Mitochondrien
AT3G20370.1	TRAF-like family protein	Extrazellulär
AT1G54010.1	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	Vakuole
AT4G02520.1	glutathione S-transferase PHI 2 (ATGSTF2, ATPM24.1, ATPM24, GST2, GSTF2)	Cytosol
AT1G61600.1	Protein of unknown function (DUF1262)	Cytosol
AT3G61430.1	plasma membrane intrinsic protein 1A (PIP1A, ATPIP1, PIP1, PIP1;1)	Plasmamembran
AT3G16430.1	jacalin-related lectin 31 (JAL31)	Cytosol

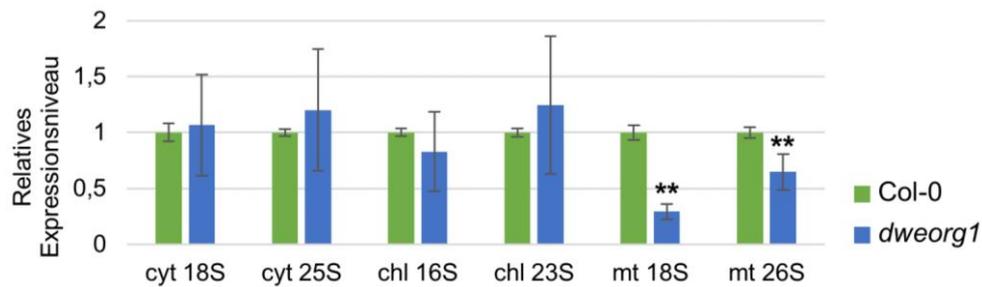
3.12 In *dweorg1* ist die mitochondriale rRNA Menge im Vergleich zum Wildtyp verringert

Instabile Ribosomen können indirekt über die Menge der rRNAs der entsprechenden Ribosomen-Untereinheiten nachgewiesen werden. Nicht in Ribosomen eingebaute rRNAs sind äußerst instabil und werden schnell abgebaut, sodass ihre relative Menge als ein Maß der Akkumulation von ribosomalen Untereinheiten verwendet werden kann (Walter et al. 2010). Hierfür wird das Expressionsniveau der rRNAs über eine qRT-PCR-Analyse bestimmt.

Um das Expressionsniveau der verschiedenen rRNAs im Wildtyp und *dweorg1* bestimmen zu können, wurde zunächst Gesamt-RNA aus drei Wildtyp und drei *dweorg1* Pflanzen gleichen Alters isoliert. Diese RNA wurde durch eine DNase-Behandlung von DNA befreit und jeweils die gleiche Menge an RNA (35 ng) in einer quantitativen RT-PCR eingesetzt. Hierfür wurden Oligonukleotidpaare verwendet, die Teile folgender rRNAs amplifizieren: cytosolische (cyt) 18S und 25S rRNA, plastidäre (chl) 16S und 23S rRNA sowie mitochondriale (mt) 18S und 26S rRNA (die verwendeten Oligonukleotide sind der Tabelle A 3 zu entnehmen). Zur Normalisierung der Daten wurde das Haushaltsgen *act2* verwendet.

Die Abbildung 24A zeigt das Ergebnis der qRT-PCR-Analyse. Das Expressionsniveau der *dweorg1* rRNAs wird als relatives Expressionsniveau zum Wildtyp dargestellt. Das Expressionsniveau des Wildtyps wurde dabei auf eins gesetzt und die einzelnen Werte für die *dweorg1* rRNAs wurden gegen diesen Wert normiert. Werte <1 entsprechen demnach einem geringeren rRNA-Niveau als im Wildtyp und Werte >1 einem höheren. Die Menge an cytosolischen und plastidären rRNAs weist keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wildtyp und *dweorg1* auf. Bei Betrachtung der Menge der mitochondrialen rRNAs ist sowohl für die 18S als auch die 26S rRNA eine signifikante Reduzierung im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten. Das relative Expressionsniveau der 18S rRNA in *dweorg1* entspricht ca. 30 % des Expressionsniveaus im Wildtyp und ist damit deutlich stärker betroffen als die 26S rRNA. Das relative Expressionsniveau der 26S rRNA entspricht ca. 60 % des Expressionsniveaus im Wildtyp. Dieser Unterschied in der Menge der 18S und 26S rRNA in der Mutante wird noch einmal deutlicher, wenn man die Verhältnisse dieser rRNAs untereinander betrachtet. In Abbildung 24B sind die relativen Verhältnisse von cytosolischer 25S zu 18S rRNA, mitochondrialer 26S zu 18S rRNA und plastidärer 23S zu 16S rRNA dargestellt. Die Werte des Wildtyps wurden auf eins gesetzt und die Werte für *dweorg1* dagegen normiert. Die Verhältnisse der cytosolischen und plastidären rRNAs untereinander weisen keinen Unterschied im Vergleich zum Wildtyp auf. Dies war zu erwarten, da sich die relative Menge der einzelnen rRNAs in *dweorg1* nicht vom Wildtyp unterscheiden. Das Verhältnis der mitochondrialen 26S zur 18S rRNA ist deutlich höher als im Wildtyp. Dies spricht für ein Ungleichgewicht der großen und kleinen mitoribosomalen Untereinheiten in der Mutante.

A)



B)

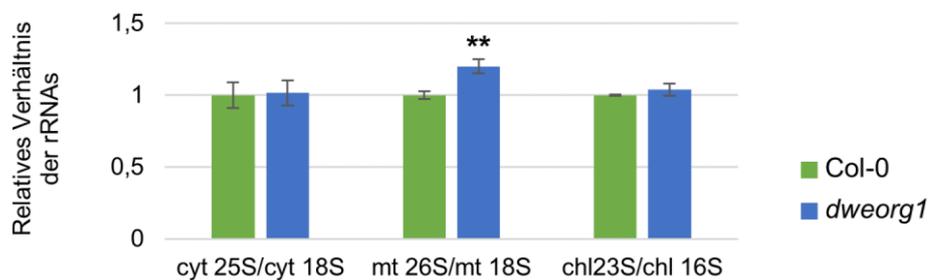


Abbildung 24: Analyse der relativen rRNA-Menge im Wildtyp und *dweorg1*. **A:** Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse zur Untersuchung der cytosolischen (cyt), plastidären (chl) und mitochondrialen (mt) rRNA-Menge in *dweorg1* in Relation zum Wildtyp. Die Werte für den Wildtyp wurden jeweils gleich eins gesetzt und die Werte für die *dweorg1*-Proben auf diesen Wert normiert. Mögliche Variationen der Ausgangsmenge an Matrize wurden über einen Abgleich mit den Werten für die Transkriptmenge des Haushaltsgens *act2* ausgeglichen. Die gezeigten Werte sind gemittelt aus drei biologischen und zwei technischen Wiederholungen unter Angabe der Standardabweichung (** entspricht $p \leq 0,01$; nach Durchführung eines t-Tests). **B:** Verhältnis der cyt 25S und 18S rRNA, mt 26S und 18S rRNA sowie der chl 23S und 16S rRNA zueinander, für den Wildtyp und *dweorg1*. Die gezeigten Werte sind gemittelt aus drei biologischen und zwei technischen Wiederholungen unter Angabe der Standardabweichung (** entspricht $p \leq 0,01$; nach Durchführung eines t-Tests).

Die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR sollten mittels einer Northern Blot Analyse bestätigt werden. Die Gesamt-RNA aus *dweorg1* und Wildtyp Pflanzen wurde isoliert und für einen Northern Blot verwendet. Hierzu wurden jeweils verschiedene Mengen der isolierten RNAs (10 μg , 6 μg , 2 μg und 1 μg) gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit spezifischen Sonden für die mitochondriale 26S, 18S und 5S rRNA hybridisiert. Die für die Synthese der Sonden verwendeten Oligonukleotide können der Tabelle A 3 unter 8.5 entnommen werden. Die verwendeten Sonden wurden radioaktiv markiert, und erlauben somit eine Detektion über Autoradiographie.

Die Ergebnisse dieser Northern Blot Analyse sind in Abbildung 25 gezeigt. Um sicherzustellen, dass die RNA-Proben gleichmäßig aufgetragen wurden, wurde das Agarosegel mit MIDORI^{Green}, einem Farbstoff zur Visualisierung von Nukleinsäuren, versetzt, sodass die RNA-Proben im Anschluss an die gelelektrophoretische Auftrennung und nach Anregung durch eine

blau/grüne LED im Gel sichtbar sind. Die Intensität des Farbstoffes nimmt proportional mit der Konzentration der RNA ab. Es ist zu erkennen, dass die Konzentrationen der Wildtyp und *dweorg1* RNAs vergleichbar zueinander sind. Zudem ist hier bereits sichtbar, dass die Intensität der RNA-Bande, die der 18S rRNA entspricht, im Wildtyp deutlich stärker ist als in *dweorg1*. In der Northern Blot Analyse ist die Signalstärke der 18S rRNA in den *dweorg1*-Proben deutlich geringer als im Wildtyp. Dies gilt ebenfalls für das 26S rRNA Signal, jedoch nicht für das Signal der 5S rRNA, welches sich in den *dweorg1* Proben nicht von den Signalen der 5S rRNA im Wildtyp unterscheidet. Die Signalstärke der 5S rRNA sinkt gleichmäßig mit absteigender RNA-Konzentration ab. Dies spricht für einen gleichmäßigen Auftrag der Proben auf das Agarosegel und die Vergleichbarkeit der Wildtyp und *dweorg1* Proben.

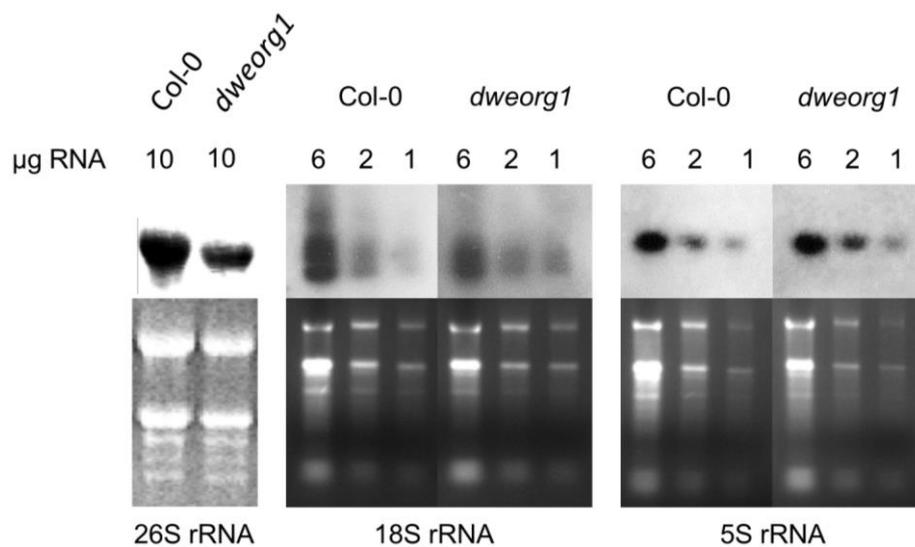


Abbildung 25: Ergebnis der Northern Blot Analyse der rRNAs im Wildtyp und in *dweorg1*. Es wurden jeweils 10, 6, 2 und 1 µg Gesamt-RNA des Wildtyps (Col-0) und der Mutante (*dweorg1*) auf ein Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Über den Farbstoff MIDORI^{Green} wurde der Erfolg der Gelelektrophorese überprüft. Anschließend wurde die RNA auf eine Nylonmembran transferiert und mit radioaktiv markierten Sonden für die mitochondriale 26S, 18S und 5S rRNA hybridisiert. Die Analyse der Proben erfolgte über ein Autoradiogramm und ist hier dargestellt.

3.13 Überprüfung der Funktionalität der *dweorg1* Mitochondrien

Die Daten aus 3.6 zeigen eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Translation im Allgemeinen, was zu einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion führen kann. Eine der Hauptfunktionen der Mitochondrien ist die Atmung über die mitochondriale Atmungskette, welche einen Protonengradienten aufbaut und die ATP-Bildung in den Mitochondrien ermöglicht (Saraste 1999). Um Rückschlüsse auf die Funktionalität der Mitochondrien führen

zu können, wurden die Atmungsrate der Mitochondrien über eine Sauerstoffmessung und die Aktivität der Komplexe I und IV über eine In-Gel-Aktivitäts-Färbung bestimmt.

3.13.1 Die Atmungsrate in *dweorg1* Mitochondrien ist nicht beeinträchtigt

Die mitochondriale Atmungskette (ETC) besteht aus den Komplexen I-IV. Unter NADH- und Sauerstoffverbrauch leitet sie Elektronen weiter und erzeugt einen elektrochemischen Protonengradienten zwischen der Matrix und dem Intermembranraum. Mithilfe dieses Protonengradienten kann die ATP-Synthase Energie in Form von ATP für die Zelle generieren (Hatefi 1985). Dabei kommt es zu einem Sauerstoffverbrauch am Komplex IV bzw. durch die alternative Oxidase. Hier wird jeweils Sauerstoff zu Wasser reduziert. Dieser Prozess ist in Abbildung 26 schematisch dargestellt. Der Sauerstoffverbrauch durch die mitochondriale Atmung kann über die elektrische Spannung an einer Platinelektrode, der Clark-Elektrode, gemessen werden und spiegelt die Atmungsrate der Mitochondrien wider (Jacoby et al. 2015).

Für die Messung der mitochondrialen Atmungsrate wurden isolierte Mitochondrien (100 µg mitochondriale Proteine) in 1 ml eines Respirations-Puffers verwendet. Dieser enthält unter anderem Kaliumhydrogenphosphat, welches als Phosphorquelle für die Phosphorylierung von ADP zu ATP durch die ATP-Synthase dient. Zunächst wurde die Integrität der isolierten Mitochondrien über die Komplex IV-Aktivität der mitochondrialen Atmungskette, der Cytochrom-c-Oxidase, bestimmt. Wie in Abbildung 26 dargestellt, werden Elektronen im mitochondrialen Intermembranraum bei der Oxidation von reduziertem Cytochrom-c auf den Komplex IV übertragen. Dabei werden Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum gepumpt und O₂ wird zu H₂O reduziert. Es kommt also zum Sauerstoffverbrauch. Exogen zugegebenes Cytochrom-c ist nicht in der Lage die äußere mitochondriale Membran zu passieren, sodass die Zugabe von reduziertem Cytochrom-c zu intakten Mitochondrien keinen Einfluss auf die Atmungsrate dieser hat. Werden die Mitochondrien bei der Isolierung beschädigt oder die Mitochondrien mit einem Detergens wie Triton X-100 behandelt, entstehen Mitoplasten (Mitochondrien ohne äußere Membran). In diesem Fall können Elektronen von exogenem, reduziertem Cytochrom-c auf den Komplex IV übertragen werden und die Atmungsrate der Mitochondrien erhöht sich.

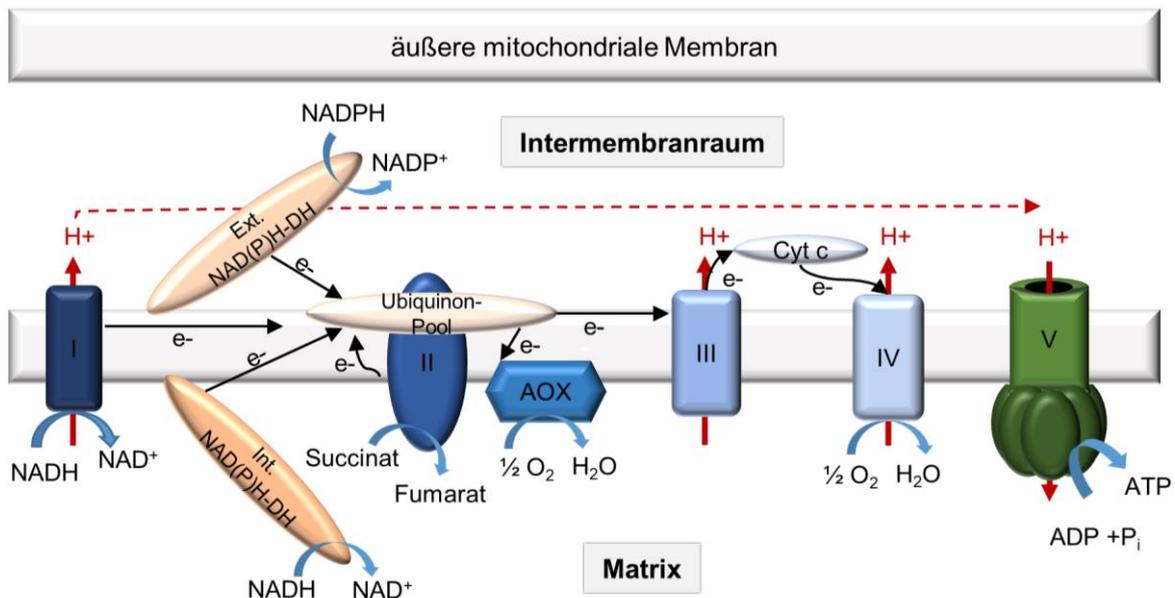


Abbildung 26: Schematische Darstellung der mitochondrialen Atmungskette. Schematische Darstellung der mitochondrialen Atmungskette mit den Komplexen I-V, der alternativen NAD(P)H-Dehydrogenase und der alternativen Oxidase (AOX). Durch die Oxidation von NADH zu NAD⁺ durch die NADH-Dehydrogenase (Komplex I) werden die Elektronen (e⁻) in die Elektronentransportkette eingespeist. Zusätzlich werden durch die Succinatdehydrogenase (Komplex II) Elektronen über die Oxidation von Succinat zu Fumarat eingespeist. Diese Elektronen werden über den Ubiquinon-Pool zur Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III) und weiter über Cytochrom-c zur Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) geleitet. Hier wird Sauerstoff zu Wasser reduziert. Während des Transports der Elektronen, pumpen die Komplexe I, III und IV Protonen (H⁺) aus der Matrix in den Intermembranraum, wodurch ein elektrochemischer Protonengradient erzeugt wird, der von der ATP-Synthase (Komplex V) zur Synthese von ATP aus ADP genutzt wird (Hatefi 1985).

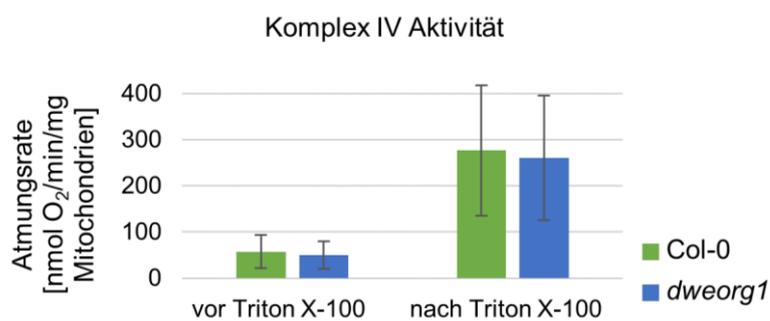
Die Integrität der Mitochondrien wird durch das Verhältnis der gemessenen Atmungsrate vor und nach Zugabe eines Detergens bestimmen. Mit dieser Methode wurde eine Integrität der Wildtyp und *dweorg1* Mitochondrien von 79,7 % bzw. 80,8 % bestimmt. Die hierbei gemessene Atmungsrate spiegelt zudem die Komplex IV-Aktivität der isolierten Mitochondrien wider. In Abbildung 27A ist die Atmungsrate der Wildtyp und *dweorg1* Mitochondrien vor und nach Zugabe von Triton X-100 als nmol O₂ pro Minute und mg mitochondrialen Proteins aufgeführt. Die Atmungsrate nach Zugabe von Triton X-100 spiegelt dabei die Komplex IV-Aktivität wider. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen der Komplex IV-Aktivität in Wildtyp und *dweorg1* Mitochondrien zu beobachten.

Zusätzlich zur Komplex IV-Aktivität wurde die allgemeine Atmungsrate der isolierten Mitochondrien bei gekoppelter Elektronentransportkette gemessen. Da in der *dweorg1* Mutante eine stark erhöhte Menge der alternativen Oxidase (AOX) sowie eine verringerte Menge des COX2 Proteins nachgewiesen wurde (Schmidt 2010; Bruhs 2012), wurde die Atmungsrate zusätzlich mit inhibierter AOX gemessen, um einen eventuellen Ausgleich durch

die AOX identifizieren zu können. Die Zugabe von n-Propylgallat inhibiert die alternative Oxidase, sodass der Elektronenfluss nur noch über den Cytochrom-c Weg stattfinden kann.

Man unterscheidet bei der Messung der Atmungsrate verschiedene Stadien der Atmung. Stadium 1 dient dabei als Referenzniveau des Sauerstoffverbrauchs. Hierbei befinden sich in der Kammer der Clark-Elektrode nur die Mitochondrien im Respirationspuffer ohne Substrat, welches von der Atmungskette verbraucht werden kann. Es findet demnach kein Elektronentransport statt und es wird kein Sauerstoff durch die Atmungskette verbraucht.

A)



B)

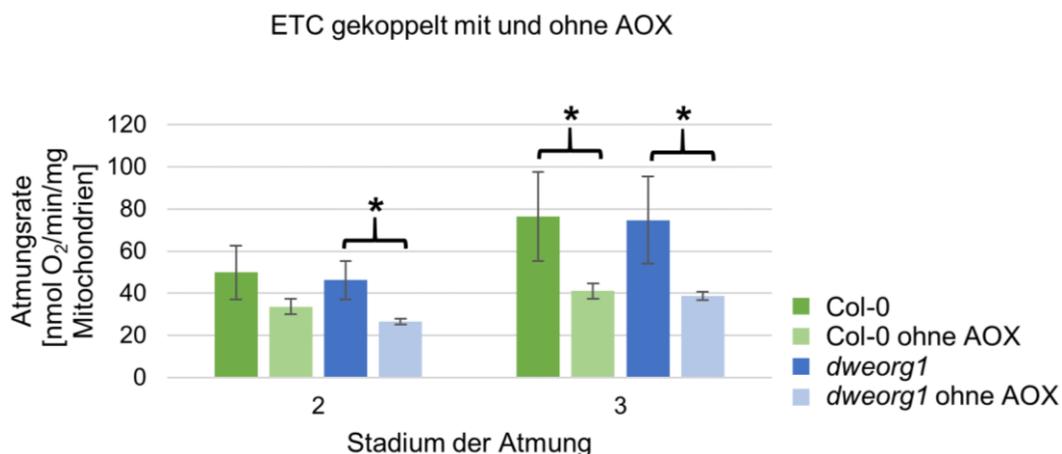


Abbildung 27: Messung der Atmungsrate isolierter Mitochondrien aus dem Wildtyp und *dweorg1*. **A:** Messung der Komplex IV-Aktivität in Wildtyp und *dweorg1* Mitochondrien vor und nach Zugabe von Triton X-100. Die Werte wurden aus vier Messungen mit Angabe der Standardabweichung gemittelt. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp und der Mutante zu beobachten. **B:** Messung der mitochondrialen Atmungsrate des Wildtyps und der Mutante mit aktiver und inhibierter AOX. Gezeigt sind die gemittelten Werte des Atmungsstadiums 2 und 3 (n= 5 bzw. 3). Es wurde die Standardabweichung angegeben. * steht für $P \leq 0,05$ nach Anwendung eines t-Tests.

Im zweiten Schritt wird ATP zu den Mitochondrien gegeben, dies führt zur Aktivierung der Succinat-Dehydrogenase (Komplex II). Zudem werden NADH und Succinat als Substrat hinzugegeben. Dies setzt die ETC in Gang und der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien erhöht sich. Die hier gemessene Atmungsrate wird als Stadium 2 bezeichnet. Diese Atmungsrate ist sowohl für Mitochondrien des Wildtyps als auch der *dweorg1* Mutante mit aktiver und inhibierter AOX in Abbildung 27B dargestellt. Die Atmungsrate der *dweorg1* Mutante mit aktiver AOX von 46,3 nmol O₂/min/mg zeigt keinen signifikanten Unterschied zu der Atmungsrate der Wildtyp Mitochondrien mit aktiver AOX von 49,8 nmol O₂/min/mg. Dies gilt auch für die bei inhibierter AOX gemessene Atmungsrate des Wildtyps von 33,7 nmol O₂/min/mg und den 26,5 nmol O₂/min/mg der Mutante. Auch beim Vergleich zwischen der Atmungsrate des Wildtyps mit aktiver und inhibierter AOX ist kein signifikanter Unterschied zu beobachten. Der Vergleich zwischen der Atmungsrate der Mutante mit aktiver und inhibierter AOX hingegen weist eine signifikant gesunkene Atmungsrate bei inhibierter AOX auf.

Im Stadium 3 der Atmung wird den Mitochondrien ADP zugefügt. Dies hebt die limitierende Wirkung des Protonengradienten auf die Atmungsrate auf und führt zu einer maximalen Steigerung der Atmungsrate. Abbildung 27B zeigt die gemessene Atmungsrate der Wildtyp und *dweorg1* Mitochondrien bei aktiver und inhibierter AOX. Für alle Bedingungen zeigt sich eine generell erhöhte Atmungsrate im Vergleich zum Stadium 2 der Atmung von 49,8 auf 76,4 nmol O₂/min/mg, bzw. 33,7 auf 41,1 nmol O₂/min/mg für den Wildtyp bei aktiver und inhibierter AOX. Sowie von 46,3 auf 74,7 nmol O₂/min/mg bzw. 26,5 auf 38,7 nmol O₂/min/mg für *dweorg1* bei aktiver und inhibierter AOX. Die Atmungsrate der Mitochondrien mit aktiver und inhibierter AOX unterscheidet sich sowohl im Wildtyp als auch *dweorg1* signifikant voneinander.

3.13.2 Die Komplexe I und IV der mitochondrialen Atmungskette weisen keine verminderte Aktivität in *dweorg1* auf

Die Aktivität der Komplexe I und IV der mitochondrialen Atmungskette wurde über eine In-Gel-Aktivitätsfärbung untersucht. Hierbei werden Proteinkomplexe in ihrer nativen Konformation der Masse nach in einem graduellen Polyacrylamid-Gel (4-16 %) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Unter diesen Bedingungen bleibt die Enzymaktivität der einzelnen Proteine erhalten, wodurch eine Messung dieser innerhalb des Gels ermöglicht wird (Sabar et al. 2005).

Die Aktivität des Komplex I wurde durch die Inkubation des Gels in einem Puffer mit 214 µM NADH als Substrat für Komplex I und 2,45 mM Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) als Substrat für die Farbreaktion bestimmt. Liegt der Komplex I funktional vor, wird das NADH zu

NAD⁺ oxidiert und das NBT zu dem blau/lila erscheinenden Formazan reduziert, welches in Kristallform innerhalb des Proteinkomplexes präzipitiert. Die Farbintensität gibt dabei Aufschluss über die Aktivität des Komplex I. Die Abbildung 28 zeigt das Ergebnis der In-Gel-Aktivitätsfärbung. Zwischen dem Wildtyp und der *dweorg1* Mutante ist kein Unterschied in der Intensität der Färbung und somit der Aktivität des Komplex I zu beobachten.

Zur Aktivitätsmessung des Komplex IV wurde das Gel in einem Puffer mit 0,8 mg Cytochrom-c als Substrat für den Komplex IV und 4,67 mM 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) als Substrat für die Farbreaktion inkubiert. Liegt der Komplex IV funktional vor, wird das Cytochrom-c durch den Komplex IV oxidiert. Die oxidierte Form des Cytochrom-c kann durch das DAB wieder reduziert werden. Dabei wird dieses selbst oxidiert und akkumuliert als bräunliches Präzipitat innerhalb des Proteinkomplexes. Auch in diesem Fall ist zwischen dem Wildtyp und der *dweorg1* Mutante kein Unterschied in der Intensität der Färbung und somit der Aktivität des Komplex IV zu beobachten (siehe Abbildung 28).

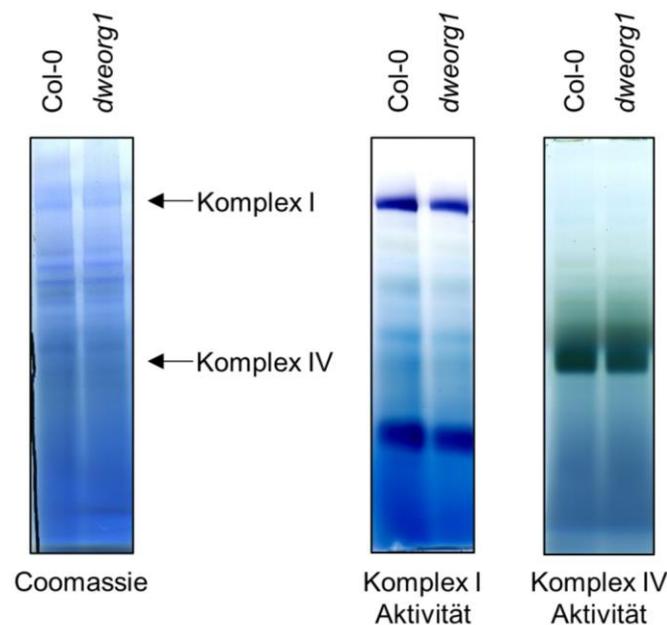


Abbildung 28: In-Gel-Aktivitätsfärbung der Komplexe I und IV der mitochondrialen Atmungskette in Wildtyp und *dweorg1* Mitochondrien. 100 µg eines Mitochondrienextrakts aus *Arabidopsis* Blüten wurden in einem nativen Polyacrylamidgel (Gradient von 4-16 %) gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Aktivität der Komplexe I und IV über eine In-Gel-Aktivitätsfärbung nachgewiesen.

3.14 Einfluss von hohem Salzgehalt auf *dweorg1* Pflanzen

Neben ihrer Rolle in der Prozessierung und Reifung mitochondrialer Transkripte (Barkan und Small 2014) spielen PPR-Proteine auch eine Rolle in der Regulierung von Stressantworten der Pflanzen auf abiotischen Stress wie z. B. Salzstress (Zsigmond et al. 2008). Unter den in 3.11 identifizierten putativen Interaktionspartnern des DWEORG1 Proteins befindet sich das Protein MPT3, welches eine Rolle in der Regulierung der Salzstress-Antwort spielt (Zhu et al. 2012). Um einen Einfluss von DWEORG1 auf diese zu analysieren, wurden die Keimungsrate und das Wurzelwachstum von *dweorg1* und dem Wildtyp bei verschiedenen Salzkonzentrationen miteinander verglichen. Salzstress wirkt sich in der Regel negativ auf die Keimungsrate und das Wurzelwachstum der Pflanzen aus (Jacoby et al. 2011).

Um den Einfluss von Salz auf die Keimungsrate des Wildtyps und der Mutante zu untersuchen, wurden jeweils 100 Samen der entsprechenden Pflanze steril auf MS-Agar-Platten ausgebracht die 100 mM, 150 mM oder 200 mM NaCl enthielten. Als Kontrolle wurden die Samen zusätzlich auf MS-Agar-Platten ohne NaCl ausgebracht. Nach einer zweitägigen Vernalisation der Samen im Dunkeln bei 4 °C wurden die Platten in die Klimakammer – mit den unter 2.2.2 beschriebenen Einstellungen – überführt und die Anzahl der gekeimten Samen für acht Tage dokumentiert.

In Abbildung 29A ist die Keimungsrate des Wildtyps und der Mutante unter den verschiedenen Salzkonzentrationen graphisch dargestellt. Ohne NaCl keimen bereits nach einem Tag 100 % der Wildtyp-Samen und 97 % der *dweorg1*-Samen. Nach zwei Tagen liegt die Keimungsrate der *dweorg1*-Samen auch bei 100 %. Enthält das Medium 100 mM NaCl verschlechtert sich die Keimungsrate sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante. Nach einem Tag sind 85 % der Wildtyp-Samen und 57 % der *dweorg1*-Samen gekeimt. Während die Keimungsrate des Wildtyps am zweiten Tag 100 % erreicht, liegt sie in der Mutante bei 95 %. Nach vier Tagen erreicht *dweorg1* ein Maximum der Keimungsrate von 98 %. Bei Zugabe von 150 mM NaCl zum Medium sind am ersten Tag nur 30 % der Wildtyp- und 26 % der *dweorg1*-Samen gekeimt. Während die Keimungsrate des Wildtyps am dritten Tag auf 98 % und am fünften Tag auf 100 % steigt, erhöht sich die Keimungsrate der Mutante am dritten Tag nur auf 84 % und übersteigt diesen Wert nicht weiter. Am deutlichsten wird der Unterschied in der Keimungsrate zwischen *dweorg1* und dem Wildtyp bei 200 mM NaCl im Medium. Nach einem Tag liegt die Keimungsrate des Wildtyps und der Mutante noch in beiden Fällen bei ca. 6 %. Am zweiten Tag steigt diese im Wildtyp auf 42 % und in *dweorg1* nur auf 16 % an. Nach drei Tagen liegt die Keimungsrate des Wildtyps bereits bei 68 % und für *dweorg1* nur bei 25 %. Das Maximum einer Keimungsrate von 88 % erreicht der Wildtyp nach sieben Tagen, während die Keimungsrate in *dweorg1* selbst nach sieben Tagen nicht über 30 % steigt. Dies zeigt, dass die Keimung der *dweorg1*-Samen stärker gehemmt wird als die der Wildtyp-Samen.

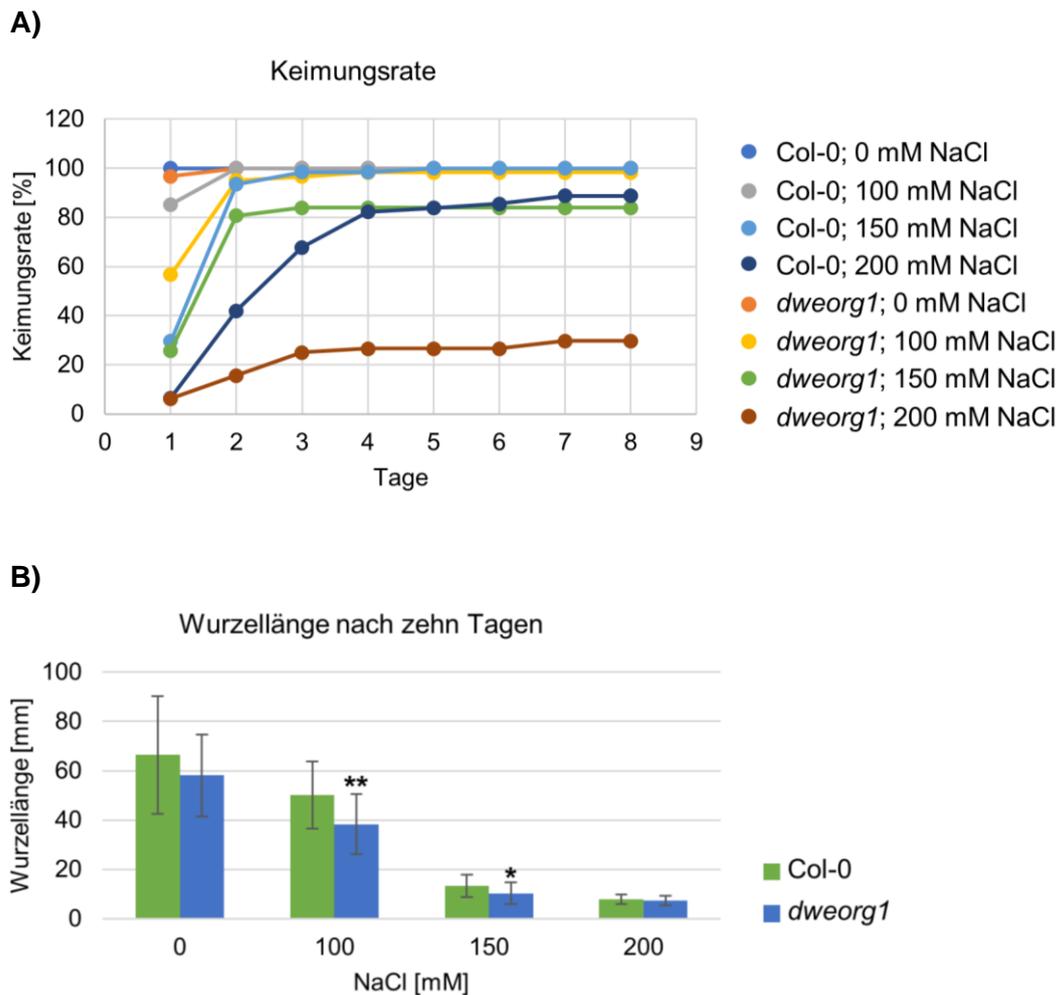


Abbildung 29: Keimungsrate und Wurzelwachstum von *dweorg1* und dem Wildtyp bei verschiedenen Salzkonzentrationen. **A:** Keimungsrate der Wildtyp und *dweorg1* Samen auf NaCl-haltigem MS-Medium (0, 100, 150 und 200 mM NaCl) über einen Zeitraum von acht Tagen. Die Keimungsrate wurde in % der gekeimten Samen angegeben (n=100). **B:** Gemittelte Werte der Gesamtlänge der Wildtyp und *dweorg1* Wurzeln nach zehn Tagen auf NaCl-haltigem MS-Medium (0, 100, 150 und 200 mM NaCl) (n=30). Die Standardabweichung wurde angegeben und ein t-Test durchgeführt (** = $p \leq 0,001$; * = $p \leq 0,05$).

Für die Untersuchung des Wurzelwachstums von *dweorg1* und Wildtyp Pflanzen unter erhöhtem Salzgehalt wurden diese zunächst auf sterilem MS-Medium ohne Zugabe von NaCl in der Klimakammer angezogen (n= 30). Nach fünf Tagen wurden die Keimlinge auf MS-Medium welches 100 mM, 150 mM oder 200 mM NaCl enthielt umgesetzt, die Platten vertikal in der Klimakammer positioniert und die Wurzellänge nach zehn Tagen gemessen. Als Kontrolle wurden die Samen zusätzlich auf MS-Agar-Platten ohne NaCl umgesetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 29B graphisch dargestellt.

Ohne NaCl-Zugabe erreichen die Wurzeln des Wildtyps im Durchschnitt eine Länge von 66,4 mm, während die Wurzeln der Mutante nur 58,1 mm lang werden. Dieser Unterschied

erwies sich in der statistischen Analyse durch einen t-Test allerdings als nicht signifikant. Werden die Pflanzen auf MS-Medium mit 100 mM NaCl gehalten, verringert sich die Länge der Wurzeln auf 50,1 mm im Wildtyp und 38,3 mm in *dweorg1*. Damit sind die Wurzeln der Mutante signifikant kürzer als die des Wildtyps. Die Zugabe von 150 mM NaCl zum Medium inhibiert das Wurzelwachstum noch stärker. So werden die Wurzeln des Wildtyps im Durchschnitt nur noch 13,4 mm lang und die der Mutante 10,3 mm. Dieser Unterschied zwischen *dweorg1* und dem Wildtyp ist signifikant, jedoch weniger signifikant als der Unterschied bei 100 mM NaCl. Bei einer Konzentration von 200 mM im Medium ist das Wurzelwachstum so stark gehemmt, dass zwischen dem Wildtyp und *dweorg1* kein Unterschied in der Wurzellänge festgestellt werden kann. Im Wildtyp liegt die Wurzellänge bei 7,8 mm, in der Mutante bei 7,3 mm. Diese Ergebnisse zeigen, dass *dweorg1* sensitiver auf Salzstress reagiert als der Wildtyp.

4 Diskussion

Die *pentatricopeptide repeat* Proteine bilden eine der größten Proteinfamilien in Landpflanzen (Lurin et al. 2004). Sie sind an einer Vielzahl verschiedener Prozesse der RNA-Reifung in den Mitochondrien und Chloroplasten beteiligt. Dort wirken sie als transkriptspezifische Faktoren in der Transkription, RNA-Edierung, dem Spleißen, der RNA-Stabilität, der 5′-/3′-Enden Prozessierung und der Translation (Delannoy et al. 2007; Colcombet et al. 2013). Dadurch spielen sie eine wichtige Rolle in der Regulierung der Genexpression in Mitochondrien und Chloroplasten. Defekte in diesen Proteinen führen daher meist zu stark ausgeprägten Phänotypen, die von einem reduzierten Wachstum, einer geringeren Keimungsrate bis hin zur Embryoletalität reichen (Andrés et al. 2007; Barkan und Small 2014). Die RNA-Edierung ist dabei einer der am besten untersuchten Prozesse in Bezug auf die Funktion von PPR-Proteinen. Über die Hälfte aller bisher beschriebenen PPR-Proteine sind an der RNA-Edierung beteiligt (Rovira und Smith 2019). Am wenigsten ist über die Beteiligung der PPR-Proteine an der mitochondrialen und plastidären Translation bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion des P-Klasse PPR-Proteins DWEORG1 in Mitochondrien von *A. thaliana* näher untersucht. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde ein 40 Nukleotid langes Fragment der *cox2* mRNA, welches eine Edierungsstelle enthält, als Köder-RNA verwendet, um Proteine der RNA-Edierungsmaschinerie zu identifizieren. Hierbei wurde DWEORG1 als RNA-bindendes Protein identifiziert (Bolle 2008). Weitere Untersuchungen im Vorfeld dieser Arbeit ergaben, dass DWEORG1 nicht an der *cox2* RNA-Edierung beteiligt ist aber einen Einfluss auf die Translation des *cox2* Transkripts hat (Bruhs 2012). Daher wurde zu Beginn der Arbeit davon ausgegangen, dass DWEORG1 ein *cox2*-spezifischer Translationsfaktor ist. Eine Involvierung an der *cox2* Translation wurde zwar bestätigt, eine *cox2*-spezifische Funktion bestätigte sich allerdings nicht. Damit wurde der Fokus dieser Arbeit nach ersten *cox2*-spezifischen Analysen auf die Untersuchung der Funktion von DWEORG1 in Bezug auf die mitochondriale Translation im Allgemeinen gelegt.

4.1 DWEORG1 kann erfolgreich in *E. coli* synthetisiert werden

Als eine der größten Proteinfamilien in Landpflanzen mit einer Vielzahl verschiedener Funktionen, bilden die PPR-Proteine ein breitgefächertes Forschungsgebiet. Rund die Hälfte aller bisher charakterisierten PPR-Proteine (108 Proteine) wurden in *A. thaliana* untersucht, wobei die meisten mit dem Prozess der RNA-Edierung in Verbindung gebracht wurden (Rovira und Smith 2019). Das Interesse an der Charakterisierung von PPR-Proteinen mit anderen Funktionen ist daher groß. Um die Rolle der PPR-Proteine in biologischen Prozessen besser verstehen zu können, ist es wichtig ihre molekulare Funktion zu charakterisieren. Die

Untersuchung der nativen Proteininteraktionen mit Nukleinsäuren ist dabei eine hilfreiche Methode. In dieser Arbeit wurde die RNA-Bindung DWEORG1s genauer untersucht. Diese Interaktion zwischen DWEORG1 und Nukleinsäuren erfolgte über *electromobility shift assay* (EMSA) Analysen. Für diese Analysen benötigt man das Protein in ausreichender Menge in seiner nativen, funktionsfähigen Form. Dazu bedient man sich häufig der heterologen Überexpression in *E. coli*, was allerdings oft mit Schwierigkeiten verbunden ist. Dies war auch in dieser Arbeit der Fall. Besondere Probleme bereitete es, DWEORG1 in seiner löslichen Form in *E. coli* zu synthetisieren. DWEORG1 liegt unter den Expressionsbedingungen, die in dieser Arbeit getestet wurden, meist in Inklusionskörpern vor.

E. coli stellt ein beliebtes Expressionssystem für rekombinante Proteine dar. Die Vorteile liegen darin, dass *E. coli* einfach zu handhaben ist und kostengünstig eine große Menge an rekombinantem Protein synthetisiert werden kann. Allerdings gibt es auch einige Nachteile, insbesondere wenn eukaryotische Proteine synthetisiert werden sollen. Die Bedingungen in *E. coli* sind nicht immer optimal für die Synthese eukaryotischer Proteine. Es herrscht eventuell ein anderer pH-Wert, eine andere Osmolarität, ein anderes Redox-Potential, die benötigten Co-Faktoren fehlen oder der benötigte Faltmechanismus ist nicht vorhanden. All dies kann dazu führen, dass das gebildete Protein instabil ist. Es aggregiert und es kommt zur Bildung von Inklusionskörpern (Hartley und Kane 1988; Carrió und Villaverde 2002). Diese Problematik beobachtet man besonders häufig im Fall der pflanzlichen PPR-Proteine (Schmitz-Linneweber et al. 2005; Uyttewaal et al. 2008b). Grund dafür sind vermutlich die biochemischen Eigenschaften der PPR-Proteine, die zu einer hohen Instabilität und Unlöslichkeit in heterologen Expressionssystemen führen (Coquille et al. 2014). Zudem liegen PPR-Proteine oft als Teil eines Proteinkomplexes und/oder Protein-RNA-Komplexes vor (Uyttewaal et al. 2008a). Bei der heterologen Expression in *E. coli* fehlen diese Interaktionspartner, was zur Instabilität des Zielproteins führen kann.

In manchen Fällen ist es möglich, Proteine aus Inklusionskörpern zu isolieren und sie in ihre native Form zu bringen. Dies geschieht durch die Verwendung von chaotropen Agenzien wie Harnstoff oder Guanidin-HCl und Detergenzien, wodurch die Inklusionskörper aufgeschlossen werden. Im Anschluss werden diese Agenzien über eine Dialyse entfernt, sodass die Rückfaltung der Proteine erfolgen kann. Der Prozess der Rückfaltung gelingt allerdings oft nicht und das Protein präzipitiert stattdessen (Burgess 2009). Daher bedient man sich vorzugsweise verschiedener Methoden, die die Bildung von Inklusionskörpern verhindern können. Hierzu zählen z. B. eine niedrige Inkubationstemperatur zwischen 16-25 °C, die Co-Expression molekularer Chaperone und die Fusion des Zielproteins an ein *tag*, das die Löslichkeit erhöht (Schein und Noteborn 1988; Vasina et al. 1998; Kapust und Waugh 1999; Hartl und Hayer-Hartl 2002; Vera et al. 2007; Raran-Kurussi und Waugh 2012). In dieser Arbeit

wurden verschiedene Methoden zur Verbesserung der heterologen Expression von DWEORG1 in *E. coli* getestet.

Für gewöhnlich werden die *E. coli* Zellen, die das Zielprotein synthetisieren im Anschluss an die Induktion der Genexpression durch IPTG für einige Stunden bei 37 °C inkubiert. Wird DWEORG1 auf diese Weise in *E. coli* synthetisiert, liegt es vor allem in Inklusionskörpern vor (Knittler 2011). Die erhöhte Synthese des heterologen Proteins kann dazu führen, dass die Proteinmenge in der Zelle so hoch ist, dass die Kontrollmechanismen der Zelle überfordert sind und es zu falsch gefalteten Proteinen kommt (Carrió und Villaverde 2002). Wählt man eine niedrigere Inkubationstemperatur, wird die Proteinsyntheserate verlangsamt, was der Zelle mehr Zeit für die korrekte Faltung der Proteine lässt (Schein und Noteborn 1988; Vasina et al. 1998; Vera et al. 2007). Daher wurde in dieser Arbeit zunächst eine Temperatur von 16 °C zur Inkubation der induzierten Zellen verwendet, um die Bildung von Inklusionskörpern zu verhindern. Die Bildung dieser wurde allerdings nicht durch die geringere Temperatur allein verhindert, sodass weitere Methoden untersucht wurden.

Molekulare Chaperone können bei der Faltung der Proteine behilflich sein und so die Aggregation falsch-gefalteter Proteine verhindern (Hartl und Hayer-Hartl 2002). Im Cytoplasma von *E. coli* helfen verschiedene Chaperon-Systeme dabei, dass neu synthetisierte Proteine in ihre native Form gebracht werden (Kolaj et al. 2009). Diese Chaperon-Kombinationen können über Plasmide zusätzlich in die Zellen eingebracht werden, sodass sie in einer Stöchiometrie synthetisiert werden, die eine optimale Faltungsaktivität erlaubt. Dadurch kann die Bildung von Inklusionskörpern verhindert werden (de Marco et al. 2007). Diese Methode wurde ebenfalls für DWEORG1 getestet. Es wurden verschiedene Kombinationen der Chaperone verwendet, die sich bei der heterologen Synthese anderer Proteine in *E. coli* als förderlich erwiesen haben (de Marco et al. 2007). Im Fall von DWEORG1 wurde keine verbesserte Synthese durch die Co-Expression der molekularen Chaperone beobachtet. Aus diesem Grund wurden darüber hinaus verschiedene *tags* getestet, die die Löslichkeit heterolog synthetisierter Proteine nachweislich erhöhen.

Man vermutet, dass diese *tags* das Zielprotein so lange in Lösung halten, bis die Faltungsmaschinerie der Zelle das Protein in seine native Konformation gebracht hat. Eines der am häufigsten für diesen Zweck verwendeten *tags* ist das MBP-*tag* (Maltose-Binde-Protein). Dieses besitzt eine intrinsische Chaperon-Aktivität und erhöht nachgewiesenermaßen die Löslichkeit heterolog in *E. coli* synthetisierter Proteine (Kapust und Waugh 1999; Raran-Kurussi und Waugh 2012). Daher wurde DWEORG1 in dieser Arbeit als Fusionsprotein mit MBP in *E. coli* heterolog synthetisiert. Allerdings war auch dies erfolglos, denn DWEORG1 wurde zum einen nur in sehr geringen Mengen gebildet und lag trotz MBP-*tag* in Inklusionskörpern vor. Das MBP-*tag* wurde N-terminal mit DWEORG1 fusioniert. In

einigen Fällen wurde bereits beobachtet, dass eine N-terminale Fusion des MBP-tags zu einer Abnahme der Translationseffizienz des zu synthetisierenden Proteins führen kann (Hamilton et al. 2002; Podmore und Reynolds 2002). Dies könnte die geringe Menge von MBP-DWEORG1 in *E. coli* erklären. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit der *E. coli* Stamm BL21 (DE3) für die heterologe Expression von DWEORG1 verwendet. Dies kann sich zusätzlich negativ auf die Synthese des MBP-DWEORG1 Proteins ausgewirkt haben. Das MBP-tag wurde bereits erfolgreich zur heterologen Synthese von schwer löslichen PPR-Proteinen in *E. coli* eingesetzt. Sowohl das PPR-Protein RF1A (*restorer of fertility 1A*) aus Reis als auch die PPR-Proteine CRP1 (*chloroplast RNA processing 1*) und PPR5 aus Mais wurden auf diese Weise synthetisiert und für weitere Analysen verwendet (Williams-Carrier et al. 2008; Kun et al. 2011). Dabei zeigte sich allerdings, dass die Synthese des Proteins in BL21 Zellen schlechter funktioniert als bei der Verwendung des *E. coli* Stamms Rosetta. Im Vorfeld dieser Arbeit wurden bereits erste Versuche der Synthese von MBP-DWEORG1 in Rosetta Zellen durchgeführt. Aber auch in diesem Fall wurde DWEORG1 nur in geringen Mengen gebildet (Knittler 2011), sodass eine Abnahme der Translationseffizienz aufgrund der N-terminalen Fusion wahrscheinlicher ist.

Schließlich wurde ein SUMO3-DWEORG1 Fusionsprotein verwendet. Diese Variante erlaubte eine hohe Proteinsynthese DWEORG1s in *E. coli*. Zwar befand sich auch hier der größte Teil DWEORG1s in Inklusionskörpern, allerdings wurde eine ausreichende Menge löslichen DWEORG1s von den Zellen synthetisiert. Bei dem SUMO3-tag (*small ubiquitin-related modifier*) handelt es sich ebenfalls um ein tag, das nachweislich die Löslichkeit heterolog in *E. coli* synthetisierter Proteine erhöht (Malakhov et al. 2004; Butt et al. 2005; Zuo et al. 2005; Marblestone 2006). SUMO ist ein etwa 100 Aminosäuren langes Protein einer Ubiquitin-ähnlichen Proteinfamilie und reguliert durch eine kovalente Modifizierung die Funktion verschiedenster Zielproteine in Eukaryoten (Melchior 2000). Diese Sumoylierung der Proteine führt unter anderem zu einer erhöhten Proteininstabilität (Tanaka et al.; Melchior 2000; Yeh et al. 2000; Hochstrasser 2000; Müller et al. 2001). Daher vermutet man, dass das SUMO3-tag eine Chaperon-ähnliche Funktion aufweist und so die korrekte Faltung des Zielproteins unterstützt (Kuo et al. 2014). Auch das SUMO3-tag wurde bereits erfolgreich für die heterologe Synthese eines PPR-Proteins in *E. coli* verwendet. Es handelt sich dabei um das PPR-Protein THA8 (*thylakoid assembly 8*) aus Mais Chloroplasten (Ke et al. 2013). Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen zusätzlich darauf hin, dass sich das SUMO3-tag gut dafür eignet, die Schwierigkeiten der heterologen Synthese von pflanzlichen PPR-Proteinen in *E. coli* zu überwinden.

4.2 DWEORG1 ist ein Teil der Translationsmaschinerie in *A. thaliana* Mitochondrien

Während in Mitochondrien von Tieren und Hefe bereits Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren der Translationsmaschinerie identifiziert wurden (Ling et al. 1997; Frolova et al. 1999; Hammarsund et al. 2001; Gaur et al. 2008; Richter et al. 2010a; Atkinson et al. 2012; Kuzmenko et al. 2014), sind Komponenten der mitochondrialen Translationsmaschinerie in Pflanzen bisher kaum beschrieben. Alle bisher identifizierten Proteine, die an der Regulierung bzw. der Kontrolle der pflanzlichen mitochondrialen Translation beteiligt sind, gehören zu den P-Klasse PPR-Proteinen (Uyttewaal et al. 2008a; Manavski et al. 2012; Haili et al. 2016; Waltz et al. 2019). Auch bei dem in dieser Arbeit untersuchten PPR-Protein DWEORG1 handelt es sich um ein P-Klasse Protein. Die hier durchgeführte Analyse der mitochondrialen *ribosome footprints* aus *dweorg1* Pflanzen weist auf eine verringerte Translationseffizienz aller mitochondrialer Transkripte hin, wobei die Transkripte *cox2*, *rps4*, *rpl5* und *ccmF_{N2}* am stärksten beeinflusst werden. Daher kann von einer Beteiligung DWEORG1s am mitochondrialen Translationsprozess ausgegangen werden. Inwiefern DWEORG1 Einfluss auf die Translation nimmt, wurde in dieser Arbeit näher untersucht.

Ist DWEORG1 ähnlich wie andere P-Klasse Proteine an einem Prozess der RNA-Reifung beteiligt, könnte sich eine Mutation von DWEORG1 indirekt negativ auf die Translation der mitochondrialen Transkripte auswirken. In den Mitochondrien mancher Farne werden bei zwei Drittel der Transkripte zunächst durch RNA-Edierung die Startcodons wieder hergestellt bzw. Stopcodons entfernt (Li et al. 2018). Man vermutet, dass dies als ein Regulationsmechanismus der Translation dient. In Höheren Pflanzen ist dies zwar nicht in diesem Ausmaß zu beobachten, allerdings muss das Startcodon des mitochondrialen *cox1* Transkripts der Tomate sowie des plastidären *ndhD* Transkripts in *Arabidopsis* ebenfalls durch RNA-Edierung wiederhergestellt werden (Kadowaki et al. 1995; Kotera et al. 2005). Vermutlich soll so verhindert werden, dass unvollständig edierte Transkripte translatiert werden. (Kotera et al. 2005). Eine Beteiligung von DWEORG1 an dem Prozess der RNA-Edierung mitochondrialer Transkripte wurde allerdings im Vorfeld dieser Arbeit ausgeschlossen (Bruhs 2012). Neben der RNA-Edierung kann auch die 5'- bzw. 3'-Enden Prozessierung einen Einfluss auf die Translation eines bestimmten Transkripts haben. Sowohl in *mppr6* Mutanten von *Zea mays* als auch in *Arabidopsis rpf3* Mutanten wird die Translationsrate der Transkripte *rps3* (*Z. mays*) bzw. *ccm_C* (*A. thaliana*) aufgrund unreifer 5'-Enden negativ beeinflusst (Jonietz et al. 2011; Manavski et al. 2012). Da die Translationseffizienz der mitochondrialen Transkripte *cox2*, *rps4*, *rpl5* und *ccmF_{N2}* in *dweorg1* am stärksten beeinträchtigt ist, wurde die 5'-/3'-Enden Prozessierung dieser Transkripte näher untersucht. Es wurde jedoch keine signifikante

Beeinträchtigung dieses Prozesses in *dweorg1* beobachtet. Auch die Analysen der Transkriptstabilität und des Spleißens der mitochondrialen Transkripte in *dweorg1* lassen nicht auf eine Beeinträchtigung dieser Prozesse schließen. Aufgrund dieser Ergebnisse wird eine direkte Beteiligung DWEORG1s an der mitochondrialen Translation angenommen.

Da sich die Beeinträchtigung der mitochondrialen Translationseffizienz vor allem auf die Translation der Transkripte *cox2*, *rps4*, *rpl5* und *ccmF_{N2}* auswirkt, könnte es sich bei DWEORG1 – ähnlich wie bei MTL1 – um einen transkriptspezifischen Translations-Initiations-Faktor handeln. (Haili et al. 2016). In *mtl1* Mutanten ist die Translation der *nad7* mRNA in *Arabidopsis* Mitochondrien gestört. Die Transkriptmenge unterscheidet sich in den Mutanten dabei nicht vom Wildtyp und auch die 5'- und 3'-Enden des *nad7* Transkripts sind nicht beeinträchtigt. Somit geht man von einer transkriptspezifischen Beeinflussung der Translation durch MTL1 aus. Auch in *dweorg1* scheinen sich weder die Transkriptmenge noch die Bildung der 5'- und 3'-Enden der Transkripte *cox2*, *rps4*, *rpl5* und *ccmF_{N2}* auf die Translation dieser auszuwirken. Zudem zeigen die in dieser Arbeit durchgeführten Saccharose-Gradient-Analysen, dass DWEORG1 mit den Mitoribosomen co-sedimentiert. Auch diese Co-Sedimentation mit den Mitoribosomen wurde für MTL1 nachgewiesen (Haili et al. 2016). Während in *mtl1* nur das *nad7* Transkript schwächer translatiert wird, sind in *dweorg1* Mutanten alle mitochondrialen Transkripte in ihrer Translation beeinträchtigt. Hierbei könnte es sich um einen sekundären Effekt handeln, in Folge der geringeren Translationsrate der *rps4* und *rpl5* mRNAs.

Bei RPS4 und RPL5 handelt es sich um Proteine der Mitoribosomen (Waltz et al. 2019; Rugen et al. 2019). Werden diese nicht mehr in ausreichender Menge translatiert, könnte dies einen generellen Effekt auf die mitochondriale Translation nach sich ziehen. Eine *rps3* Mutation in Mais Mitochondrien bewirkt beispielsweise eine generelle Störung der mitochondrialen Proteinsynthese (Manavski et al. 2012). Für gewöhnlich hat eine geringere Proteinmenge der r-Proteine allerdings einen Anstieg der Translationseffizienz anderer r-Proteine zur Folge, wie z. B. in *rps10* Mutanten gezeigt wurde (Kwasniak et al. 2013). Dies wurde in *dweorg1* Mitochondrien allerdings nicht beobachtet. Bei der Untersuchung der 5'-Enden in *dweorg1* stellte sich heraus, dass das 5'-Ende des *rps4* Transkripts nicht korrekt prozessiert wird. Im Wildtyp wird die erste Base des annotierten Startcodons entfernt, während dieses in *dweorg1* nicht der Fall ist. Eine Auswirkung dessen auf die Translation von *rps4* wird hier allerdings ausgeschlossen, da sich das eigentliche Startcodon von *rps4* weiter abwärts des annotierten Startcodons befindet. Zunächst vermutete man, dass es sich bei dem Codon UUG, 39 nt abwärts des annotierten Startcodons, um das eigentliche Startcodon des *rps4* Transkripts handelt (Ruwe et al. 2016). Spätere Analysen zeigten aber, dass es sich 14 nt abwärts des annotierten Startcodons befindet (Planchard et al. 2018). Zudem wurde trotz der verringerten

Translationseffizienz keine Verringerung der RPS4 Menge in *dweorg1* nachgewiesen. Eine Analyse der RPL5 Proteinmenge war nicht möglich, da kein entsprechender Antikörper zur Verfügung stand. Damit kann ein sekundärer Effekt auf die allgemeine mitochondriale Translation durch eine geringere Menge an RPS4 ausgeschlossen werden.

Allerdings könnte die gestörte *ccmF_{N2}* Translation in *dweorg1* für die ebenfalls reduzierte Translationseffizienz von *cox2* verantwortlich sein. Das Transkript *ccmF_{N2}* codiert für eine Untereinheit der Cytochrom-c-Häm Lyase, diese wird aus CCMF_{N2}, CCMF_{N1} und CCMF_C gebildet. Zusammen mit CCMH sorgen sie für die kovalente Bindung zwischen dem Häm und Cytochrom-c (CYT c) (Rayapuram et al. 2008). Eine Mutation der *ccmF* Gene kann zu einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmungsaktivität führen. In Hefen und tierischen Mitochondrien wurde gezeigt, dass die Anwesenheit von Holo-Cytochrom-c eine Voraussetzung für die Assemblierung und Akkumulierung des Komplex IV ist (Barrientos et al. 2003; Vempati et al. 2009). Ein Defekt in der Edierung der Position *ccmF_{N2}-344* führt zwar zu einem milden Wachstumsdefekt in *Arabidopsis mef11* Mutanten, aber die Komplexe III und IV der Atmungskette werden dabei nicht destabilisiert (Sechet et al. 2015). In *wtf9* Mutanten von *Arabidopsis*, die einen Spleißdefekt des *ccmF_C* Transkripts aufweisen, ist hingegen eine Destabilisierung der Komplexe III und IV, sowie eine verringerte Menge an CYTc zu beobachten (Colas des Francs-Small et al. 2012). Da aber keine Verringerung der CYTc Menge in *dweorg1* beobachtet wurde, ist die gestörte *ccmF_{N2}* Translation vermutlich nicht für die geringere *cox2* Translation verantwortlich.

Demnach ist nicht von einem sekundären Effekt auf die Translation durch eine gestörte *rps4*, *rpl5* bzw. *ccmF_{N2}* Translation auszugehen. Zudem zeigten Sequenzvergleiche der 5'-Enden der *cox2*, *rps4*, *rpl5* und *ccmF_{N2}* Transkripte, dass keinerlei Sequenzähnlichkeiten zwischen diesen vorliegen (Ergebnis nicht gezeigt). Daher wird ein transkriptspezifischer Wirkmechanismus DWEORG1s ausgeschlossen und davon ausgegangen, dass es sich bei *dweorg1* – ähnlich wie bei rPPR1 – um einen Faktor handelt, der die Translation im Allgemeinen beeinflusst. rPPR1 ist ein mitoribosomales Protein, dessen Assoziation mit Mitoribosomen zum einen über eine Saccharose-Gradienten-Analyse und zum anderen über eine Komplexom-Analyse bestätigt wurde (Uyttewaal et al. 2008b; Waltz et al. 2019; Rugen et al. 2019). In *rppr1* Mutanten beobachtet man ebenfalls eine verringerte Translationseffizienz aller mitochondrialen Transkripte (Waltz et al. 2019). Die RNA-abhängige Assoziation mit Mitoribosomen und die allgemein beeinträchtigte Translationseffizienz der mitochondrialen Transkripte bekräftigen die Vermutung, dass es sich bei DWEORG1 um einen allgemeinen Translationsfaktor handelt.

4.3 DWEORG1 ist ein rPPR-Protein

Aktuelle Studien haben insgesamt elf PPR-Proteine als Teil des Mitoribosoms identifiziert (rPPR1, 2, 3a und 3b, 4-10) (Waltz et al. 2019, 2020b; Rugen et al. 2019). Das pflanzliche Mitoribosom besteht aus 82 r-Proteinen, von denen 19 spezifisch für Pflanzen sind. Damit machen die rPPR-Proteine mehr als die Hälfte der für Pflanzen spezifischen r-Proteine aus. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass DWEORG1 einige Gemeinsamkeiten zu rPPR-Proteinen aufweist, die auf eine verwandte Funktion von DWEORG1 hinweisen.

Das *dweorg1* Gen weist im Vergleich zu anderen P-Klasse PPR-Protein Genen ein höheres Expressionsniveau auf. Zudem zeigte sich, dass *dweorg1s* Expressionsniveau dem der anderen rPPR-Protein Gene stark ähnelt. Generell ist das Expressionsniveau von rPPR-Protein Genen im Vergleich zu anderen PPR-Protein Genen relativ hoch. Dies spiegelt sich in der hohen Proteinmenge der rPPR-Proteine mit 442-2.189 Molekülen/Mitochondrion wider (Fuchs et al. 2020). Damit bilden diese zusammen mit PPR-Proteinen, die ein Teil des mitochondrialen Editosoms darstellen, eine Ausnahme innerhalb der PPR-Proteine. Die Proteinmenge der meisten PPR-Proteine liegt im Durchschnitt nur bei einem bis 20 Molekülen/Mitochondrion. Zudem wurde in einer Analyse des mitochondrialen Proteoms festgestellt, dass die Proteinmenge von DWEORG1 bei 926 Molekülen/Mitochondrion liegt (Fuchs et al. 2020). Des Weiteren ähnelt DWEORG1s Aufbau dem anderer rPPR-Proteine. Dies gilt besonders für die Gruppe der rPPR1-ähnlichen Proteine, die lediglich bis zu zehn PPR-Motive aufweisen. Zu diesen zählen rPPR1, rPPR3a, rPPR3b und rPPR7. Die anderen rPPR-Proteine weisen hingegen bis zu 19 PPR-Motive auf und sind dementsprechend größer (Waltz et al. 2019). DWEORG1 ist mit neun PPR-Motiven ebenfalls ein relativ kleines PPR-Protein und ähnelt so den rPPR1-ähnlichen Proteinen.

Zudem besitzen die hier untersuchten *dweorg1* Pflanzen einen uncharakteristischen Phänotyp für ein PPR-Protein, das nicht an der RNA-Edierung beteiligt ist. Sie weisen einen zu *rppr1* Pflanzen vergleichbaren milden Wachstumsdefekt auf. Derart milde Phänotypen beobachtet man oft bei Mutanten von PPR-Proteinen, die an der RNA-Edierung beteiligt sind (Zehrmann et al. 2009; Verbitskiy et al. 2010; Takenaka et al. 2010; Zhu et al. 2014). Sind diese jedoch an anderen Prozessen beteiligt wirkt sich eine Mutation dagegen häufig stärker aus. Es treten unter anderem Embryoletalität, starke Wachstumsdefekte und stark reduzierte Keimungsraten auf (Schmitz-Linneweber und Small 2008). Mutationen in rPPR-Proteinen wirken sich hingegen unterschiedlich auf die Pflanzen aus. Während homozygote Mutationen der *rppr2* und *rppr9* Genen embryoletal sind und *rppr4*, *rppr5* und *rppr7* Mutanten ein stark verlangsamtes Wachstum aufweisen, führen andere rPPR-Mutationen lediglich zu milden Wachstumsdefekten (*rppr1*) oder weisen überhaupt keinen makroskopischen Phänotyp auf (*rppr3a*, *rppr3b* und *rppr8*) (Portereiko et al. 2006; Hammani et al. 2011; Waltz et al. 2019).

Diese zahlreichen Ähnlichkeiten zu rPPR-Proteinen, bekräftigen die Vermutung, dass DWEORG1 ein rPPR-Protein in *A. thaliana* Mitochondrien und somit ein Teil des Mitoribosoms ist.

Diese Vermutung wird zudem durch die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Identifizierung putativer DWEORG1-Interaktionspartner untermauert. Über eine Co-Immunpräzipitation mit DWEORG1-eGFP, wurden die Proteine RPS2 und PPR596 als putative Interaktionspartner von DWEORG1 identifiziert. Diese Proteine sind Bestandteile des Mitoribosoms. RPS2 ist ein fester Bestandteil des Mitoribosoms in *A. thaliana* (Waltz et al. 2019). PPR596 wird in derselben Studie unter stabilisierenden Bedingungen aber nicht unter destabilisierenden Bedingungen als Teil des Mitoribosoms beschrieben. In einer anderen Studie wird PPR596 über eine Saccharose-Gradienten-Analyse in einer Fraktion identifiziert, in der verstärkt Ribosomen vorliegen (Rugen et al. 2019). Diese Ergebnisse legen eine instabile/lose Assoziation von PPR596 mit Mitoribosomen nahe. In den gleichen Studien wird DWEORG1 unter denselben Bedingungen wie PPR596 als instabil/lose mit dem Mitoribosom assoziiert beschrieben.

Weitere Hinweise, dass DWEORG1 ein Teil der Mitoribosomen ist, liefert eine Analyse mitochondrialer Komplexe. Hier wurde DWEORG1 in einem Komplex mit RPS3 und NUWA gefunden (Klodmann et al. 2011). Auch RPS3 ist ein fester Bestandteil des Mitoribosoms. NUWA ist ein an der RNA-Edierung beteiligtes PPR-Protein, welches – wie PPR596 und DWEORG1 – ebenfalls als instabil/lose mit dem Mitoribosom assoziiert beschrieben wird (Andrés-Colás et al. 2017; Waltz et al. 2019; Rugen et al. 2019). Demnach könnte es sich bei DWEORG1 um einen Faktor handeln der als Teil eines RNA-Reifungs-Komplexes indirekt an die Mitoribosomen gebunden ist, wie NUWA und PPR596. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass DWEORG1 direkt mit den Mitoribosomen interagiert. Hierfür spricht, dass in dieser Arbeit mithilfe einer mitochondrialen Komplexom-Datenbank (https://complexomemap.de/at_mito_leaves (Senkler et al. 2017)) gezeigt wurde, dass DWEORG1 in einem etwa 140 kDa großen Komplex zusammen mit einigen rPPR-Proteinen vorliegt. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit über eine Saccharose-Gradienten-Analyse nachgewiesen, dass DWEORG1 mit den Mitoribosomen assoziiert ist. Mit der gleichen Methode wurde bereits die Assoziation von PPR336 und PNM1 mit den Mitoribosomen nachgewiesen, die später als rPPR1 und rPPR9 als Teil des Mitoribosoms beschrieben wurden (Uyttewaal et al. 2008b; Hammani et al. 2011; Waltz et al. 2019; Rugen et al. 2019). In Zusammenhang mit den Ähnlichkeiten zu den bisher beschriebenen rPPR-Proteinen und der beeinträchtigten mitochondrialen Translationseffizienz lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass es sich bei DWEORG1 ebenfalls um ein rPPR-Protein handelt.

4.4 Eine RNA-Bindung von DWEORG1 wurde nicht nachgewiesen

In einer vorangegangenen Arbeit wurde ein 40 nt langes *cox2* RNA-Fragment, das eine Edierungsposition beinhaltet, zur Identifizierung von RNA-bindenden Proteinen aus *A. thaliana* Mitochondrien verwendet (Bolle 2008). Damit sollten Teile der RNA-Edierungsmaschinerie identifiziert werden. Neben DWEORG1 wurden in der Studie zwei weitere PPR-Proteine identifiziert, POCO1 und PPR596, für die später eine Beteiligung an der RNA-Edierung nachgewiesen wurde (Doniwa et al. 2010; Emami und Kempken 2019). Eine Beteiligung DWEORG1s an der RNA-Edierung wurde nicht bestätigt (Bruhs 2012). In dieser Arbeit wurde das oben erwähnte RNA-Fragment verwendet, um die RNA-Bindung DWEORG1s hieran zu bestätigen und im weiteren DWEORG1s Ziel-RNA-Sequenz zu bestimmen.

Die RNA-Bindung von DWEORG1 an das *cox2* mRNA-Fragment ist in dieser Arbeit nicht eindeutig nachgewiesen worden. In der Regel findet die Bindung zwischen einer RNA und einem PPR-Protein über die Furche der PPR-Superhelix und die ungepaarten Basen der RNA statt. Die beiden Aminosäuren an Position 5 und 35 bilden dabei eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem jeweiligen Nukleotid aus (Yin et al. 2013; Shen et al. 2016). Der RNA-Bindungs-Mechanismus der rPPR-Proteine scheint sich allerdings von anderen PPR-Proteinen zu unterscheiden. Sie folgen nicht dem bekannten PPR-Code. Die kryo-elektronenmikroskopische Strukturanalyse der Mitoribosomen zeigt, dass rPPR-Proteine überwiegend die konvexe Seite gepaarter RNA-Helices der rRNAs binden. Vermutlich handelt es sich um eine rein elektrostatische Bindung, bei der die positiv geladene Innenseite des rPPR-Proteins an das negativ geladene Phosphatgerüst der RNA-Helix bindet (Waltz et al. 2020b). Die Daten dieser Arbeit weisen darauf hin, dass es sich bei DWEORG1 ebenfalls um ein rPPR-Protein handelt, dies könnte die Schwierigkeiten der DWEORG1 RNA-Bindestudie erklären.

Zudem ist es nicht ausgeschlossen, dass es sich bei dem verwendeten RNA-Fragment gar nicht um DWEORG1s Ziel-Sequenz handelt. Wie bereits erwähnt, wurden neben DWEORG1 auch POCO1 und PPR596 in der vorangegangenen RNA-Bindestudie über massenspektrometrische Analysen identifiziert. Hierbei handelt es sich um Paraloge zu DWEORG1. Sequenzvergleiche zwischen DWEORG1 und POCO1 bzw. PPR596, zeigten in beiden Fällen eine Sequenz-Ähnlichkeit von 43 % und eine Sequenz-Identität von 66 % (Emami and Kempken 2019). DWEORG1 und POCO1 wurden beide im gleichen RNA-Binde-Experiment identifiziert, während PPR596 separat identifiziert wurde. POCO1 wurde dabei mit acht Massen, DWEORG1 nur mit einer Masse identifiziert. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit zwischen POCO1 und DWEORG1 ist es daher nicht auszuschließen, dass es sich im Fall von DWEORG1 um eine Fehlbestimmung handelt.

Da es mithilfe des derzeitig bekannten PPR-Codes nicht möglich war die Ziel-RNA-Sequenz von DWEORG1 vorherzusagen, wurde die RNA-Bindestudie nicht mit einem anderen RNA-Fragment wiederholt. Die Vorhersage der Ziel-RNA-Sequenz von rPPR-Proteinen gestaltet sich besonders schwierig, da sie nicht dem bekannten PPR-Code folgen, nach dem die Aminosäuren an den Positionen 5 und 35 eines jeden PPR-Motivs bestimmen, welche RNA-Base von dem jeweiligen Motiv gebunden wird (Yin et al. 2013; Cheng et al. 2016). Zusätzlich wird die Vorhersage der RNA-Zielsequenz von PPR-Proteinen im Allgemeinen dadurch erschwert, dass nicht alle PPR-Motive für die Bindung bzw. die Funktionalität der PPR-Proteine von Bedeutung sind. Kristallstrukturanalysen von THA8 und PPR10 zeigten, dass nur sechs der 19 PPR-Motive (PPR10) bzw. eines der fünf PPR-Motive (THA8) an die RNA-gebunden vorliegen (Ke et al. 2013; Yin et al. 2013). Zudem zeigten Studien an PGR3, dass nicht jedes PPR-Motiv für dessen Funktion wichtig ist (Fujii et al. 2013).

4.5 DWEORG1 besitzt eine rRNA-stabilisierende Funktion

Da es sich bei DWEORG1 vermutlich ebenfalls um ein rPPR-Protein handelt, wird eine Funktion DWEORG1s in der rRNA-Stabilisierung und damit auch der Stabilisierung der Mitoribosomen vermutet. Eine Analyse der mitochondrialen rRNA-Niveaus in *dweorg1* zeigte, dass diese geringer sind als im Wildtyp.

Im Laufe der eukaryotischen Evolution hat sich der rRNA-Gehalt mitochondrialer Ribosomen innerhalb der Pflanzen im Vergleich zu dem rRNA-Gehalt des prokaryotischen Vorläufers der Mitochondrien stark erhöht (Waltz et al. 2020b). Diese Erhöhung ist auf Insertionen faltungsfähiger RNA-Fragmente (Erweiterungssegmente (ES)) innerhalb der ursprünglichen rRNA während der eukaryotischen Evolution zurückzuführen (Petrov et al. 2015). Diese finden sich sowohl in der mitochondrialen 18S rRNA der Pflanzen sowie der 26S rRNA (Waltz et al. 2020b). Mit Ausnahme von rPPR10, das sich im Ausgangstunnel der SSU der Mitoribosomen befindet, liegen alle bisher identifizierten rPPR-Proteine gebunden an rRNA Erweiterungssegmente vor und stabilisieren diese (Waltz et al. 2020b). rPPR9 bindet beispielsweise ein ES der 26S rRNA. Dabei ummantelt es die Spitze der Helix H10 und stabilisiert das Ende der Helix H59. rPPR9 hat dabei direkten Kontakt zu rPPR4, welches ein einzelsträngiges ES der 26S rRNA bindet und die Helices H55 und H57 berührt. Hingegen stabilisieren die Proteine rPPR1, rPPR3a und rPPR3b in einer nicht bekannten Kombination das ES der 18S rRNA, das den charakteristischen Fuß der pflanzlichen Mitoribosomen bildet. Das verringerte rRNA-Niveau in *dweorg1* weist daher auf eine ähnliche Funktionsweise hin.

Die stabilisierende Wirkung von DWEORG1 auf die Mitoribosomen wird zum einen durch die verringerte Dichte der Mitoribosomen pro mRNA und der damit einhergehenden

Beeinträchtigung der Translationseffizienz deutlich. Zum anderen wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass sich die Mitoribosomen in *dweorg1* Mitochondrien vor allem in den oberen Fraktionen des Saccharose-Gradienten befinden. Diese Verschiebung der Mitoribosomen beobachtete man ebenfalls in *ppr336* (jetzt: *rppr1*) Mutanten (Uyttewaal et al. 2008b). Dies kann ein Zeichen für eine geringere Anzahl funktionsfähiger Mitoribosomen sein und deutet auf instabile Mitoribosomen hin.

Zur Untersuchung der rRNA- bzw. Mitoribosomen-Stabilität in *dweorg1* wurde die Menge an rRNA innerhalb der Mitochondrien über eine quantitative RT-PCR bestimmt. Sowohl die Menge an 18S rRNA als auch an 26S rRNA ist in *dweorg1* im Vergleich zum Wildtyp verringert. Dies wurde zusätzlich durch einen Northern Blot bestätigt. Das rRNA-Niveau dient dabei zusätzlich als ein Proxy der Akkumulierung der einzelnen Untereinheiten (Walter et al. 2010). Dies ist möglich, da die rRNAs äußerst instabil sind, sofern die ribosomalen Untereinheiten nicht assembliert vorliegen. Somit kann die Menge der großen und kleinen Untereinheit der Mitoribosomen anhand des rRNA-Niveaus innerhalb der Mitochondrien bestimmt werden. Ein Unterschied im LSU/SSU Verhältnis deutet dabei auf ein Ungleichgewicht zwischen den Untereinheiten hin. Solch ein Ungleichgewicht der ribosomalen Untereinheiten wurde auch in *dweorg1* festgestellt. Die LSU liegt hier im Überschuss vor.

Ein Ungleichgewicht der mitochondrialen ribosomalen Untereinheiten in *Arabidopsis* beobachtet man auch in *rps10* RNAi Mutanten sowie in *grs1* (*growing slowly 1*) Mutanten, in denen die Position *rps4-377* nicht ediert wird (Kwasniak et al. 2013; Xie et al. 2016). In beiden Fällen ist eine gestörte Biogenese der Ribosomen, gekennzeichnet durch einen Überschuss an LSU im Vergleich zur SSU, zu beobachten. Dies könnte in allen drei Fällen daran liegen, dass die LSU-Proteine eine geringere Abbaurate aufweisen als die SSU-Proteine und die LSU somit im nicht assemblierten Zustand stabiler ist als die SSU (Li et al. 2017).

Eine rRNA/Mitoribosomen stabilisierende Wirkung DWEORG1s scheint daher wahrscheinlich und bekräftigt die Annahme, dass es sich bei dem in dieser Arbeit verwendeten 40 Nukleotid langen *cox2* mRNA-Fragment nicht um DWEORG1s Ziel-RNA handelt. Diese Bindung DWEORG1s an die rRNA sollte durch RNA-Bindestudien mit der 18S bzw. 26S rRNA genauer untersucht werden. Dabei sollte man sich zunächst auf die Erweiterungssegmente der entsprechenden rRNAs konzentrieren. Dies würde DWEORG1s rRNA stabilisierende Funktion weiter bekräftigen. Ergänzend könnten RIP-Chip (RNA-Immunpräzipitation) Analysen durchgeführt werden, die die Erstellung eines Profils der an DWEORG1 gebundenen RNAs ermöglichen (Jain et al. 2011). Dies würde weitere Charakterisierungen der DWEORG1 Funktion innerhalb der Mitoribosomen und/oder der Mitochondrien allgemein erlauben.

4.6 Ribosomales DWEORG1 spricht für die Heterogenität von Mitoribosomen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen in *dweorg1* Pflanzen zeigen, dass es sich bei DWEORG1 um ein rPPR-Protein und somit um einen Teil der Mitoribosomen in *Arabidopsis* handelt. Die Tatsache, dass DWEORG1 in früheren Studien trotzdem nicht als ein Hauptbestandteil des Mitoribosoms identifiziert wurde, spricht für die Existenz heterogen zusammengesetzter Mitoribosomen in Pflanzen. Für bakterielle und cytoplasmatische Ribosomen der Eukaryoten wurde bereits eine Heterogenität in der Proteinzusammensetzung nachgewiesen. Diese hat eine regulierende Wirkung auf die Genexpression (Genuth und Barna 2018; Lilleorg et al. 2019). Die Gene der cytoplasmatischen r-Proteine RPS5A und RPS5B werden in *Arabidopsis* Zellen je nach Entwicklungszustand der Zelle unterschiedlich exprimiert (Weijers et al. 2001). *rps5a* wird vor allem in sich teilenden Zellen exprimiert, während die Expression von *rps5b* in sich differenzierenden und wachsenden Zellen höher ist.

Auch für die Mitoribosomen wird solch eine Heterogenität in Zusammenhang mit der mitoribosomalen Proteinzusammensetzung vermutet (Robles und Quesada 2017). Dafür sprechen die folgenden Beobachtungen:

- Viele der LSU-Proteine in Hefen sind nicht essentiell für funktionale Mitoribosomen (Zeng et al. 2018).
- Obwohl jeweils nur ein Molekül eines r-Proteins in den Mitoribosomen vorliegt, codiert das *Arabidopsis* Genom verschiedene Paraloge einiger mitochondrialer r-Proteine (Tomal et al. 2019).
- Für RPL12 liegen z. B. vier paraloge Gene im *Arabidopsis* Genom vor, deren Proteinprodukte alle in Mitoribosomen nachgewiesen wurden (Delage et al. 2007).
- Zudem beobachtet man eine unterschiedliche Regulierung der paralogen mitochondrialen r-Proteine HUELLENLOS (HLL) und HUELLENLOS PARALOG (HLP) je nach Entwicklungsstadium und Gewebe in *A. thaliana* (Skinner et al. 2001).

Eine Funktionsvariabilität der heterogenen Mitoribosomen wurde allerdings noch nicht beobachtet bzw. nachgewiesen.

Die Theorie der Heterogenität erklärt auch die unterschiedlichen Auswirkungen der Mutationen der verschiedenen r-Proteine. Wie in 4.3 erwähnt, wirken sich Mutationen der rPPR-Proteine ganz unterschiedlich auf die jeweiligen Pflanzen aus. Dies kann man ebenso bei Mutationen anderer r-Proteine beobachten. Während in *rppr1* Mutanten die Translationseffizienz aller mitochondrialer Transkripte negativ beeinflusst wird (Waltz et al. 2019), zeigt sich in *rps10* RNAi Mutanten ein anderes Bild. Hier wird eine geringere Translationseffizienz der Transkripte der OXPHOS-Komponenten beobachtet, während die Translationseffizienz der Transkripte der r-Proteine erhöht ist (Kwasniak et al. 2013; Kwasniak-Owczarek et al. 2019). Eine gestörte

Transkription des *rp16* Transkripts führt wiederum zu einem starken Wachstumsdefekt in *Arabidopsis* (Sakamoto et al. 1996). Während *rp1* Mutanten lediglich einen geringen Wachstumsdefekt einhergehend mit einer geringen COX2 Menge aufweisen (Wang und Auwerx 2017). Eine Mutation von *rps3* – verursacht durch falsche 5'-Enden Prozessierung in *mppr6* Mais Mutanten – führt zu einer generell reduzierten Proteinsynthese in Mitochondrien und dadurch zu einem stark ausgeprägten Wachstumsdefekt (Manavski et al. 2012). In *wtf9* Mutanten wird das mitochondrial codierte *rp12* nicht mehr gespleißt. Trotzdem ist kein starker Effekt auf die mitochondriale Translation zu beobachten. Mit Ausnahme von CYTc, CYTc₁ und COX2, akkumulieren mitochondriale Proteine normal. Die verringerte Proteinmenge an CYTc, CYTc₁ und COX2 ist durch den zusätzlichen Spleißdefekt des *ccmF_C* Transkripts bedingt (Colas des Francs-Small et al. 2012).

Auch die *dweorg1* Mutanten scheinen trotz einer Verringerung der mitochondrialen Translation nicht stark beeinträchtigt zu sein. Diese milde Auswirkung diverser r-Protein Mutationen sowie die Heterogenität der Proteinzusammensetzung der Mitoribosomen spricht für eine regulierende Funktion einiger r-Proteine in der Translation spezifischer mRNAs. Man spricht hier auch von der ribosomalen Filter Hypothese. Diese besagt, dass Ribosomen nicht einfach nur den Prozess der Translation durchführen sondern dass sie als regulierende Elemente wirken, indem sie verschiedene mRNAs unterschiedlich translatieren (Mauro und Edelman 2007; Robles und Quesada 2017). Für eine Regulierung der Translation durch Ribosomen spricht, dass die Translationseffizienz bzw. die Beladung der mRNAs mit Ribosomen der Stöchiometrie der einzelnen Untereinheiten der OXPHOS-Komplexe zu entsprechen scheint. ATP1, ein Trimer, wird stärker translatiert als ATP6, welches als einzelnes Molekül im Komplex V vorliegt (Guo und Rubinstein 2018). Zudem erscheint es sinnvoll, dass nicht alle r-Proteine gleichermaßen wichtig für die Translation sind. Es handelt sich hierbei um einen sehr wichtigen Prozess, der über „Not-Systeme“ verfügen sollte.

Auch die Tatsache, dass nur acht der elf bisher identifizierten rPPR-Proteine in der Analyse der pflanzlichen Mitoribosomenstruktur über Kryo-Elektronenmikroskopie identifiziert wurden, spricht für eine Heterogenität der Mitoribosomen (Waltz et al. 2020b). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass rPPR-Proteine teilweise redundante Funktionen besitzen, wie rPPR3a und rPPR3b, und/oder spezifische Teilpopulationen an Mitoribosomen verschiedener Zusammensetzung nebeneinander existieren. Zudem ist es möglich, dass rPPR-Proteine mobil und/oder flexibel sind, was eine Visualisierung dieser durch die Kryo-Elektronenmikroskopie verhindern würde. Insbesondere dann, wenn sie an hoch flexible rRNA Erweiterungssegmente gebunden vorliegen (Waltz et al. 2020b).

Das Vorliegen spezifischer Teilpopulationen an Mitoribosomen verschiedener Zusammensetzung könnte auch erklären, warum DWEORG1 bisher noch nicht als Teil des

Mitoribosoms identifiziert wurde. Die Analysen zur Bestimmung der Zusammensetzung pflanzlicher Mitoribosomen wurden mit Blättern bzw. Blüten von *A. thaliana* durchgeführt (Waltz et al. 2019; Rugen et al. 2019). DWEORG1 wird aber am höchsten in Wurzeln exprimiert, etwa um das Zweifache im Vergleich zu der Transkription im Blatt. Gefolgt von Blüten mit dem 1,5 fachen (Bruhs 2012). Es wäre daher möglich, dass es sich bei DWEORG1 um einen variablen Teil des Mitoribosoms handelt, der vor allem in den Mitochondrien der Wurzeln eine wichtige Rolle spielt. Um diese Vermutung zu bestätigen sind weitere Untersuchungen notwendig. Hierzu könnten etwa weiterführende Analysen der Zusammensetzung der Mitoribosomen in Wurzeln hilfreich sein.

4.7 Gibt es weitere Funktionen von DWEORG1?

dweorg1 Mutanten weisen sowohl eine geringere Keimungsrate als auch ein geringeres Wurzelwachstum auf NaCl-haltigem Medium auf. Solch eine Salz-Sensibilität wurde bereits für einige *A. thaliana* PPR-Protein Mutanten gezeigt. So zeigen beispielsweise *pgn* (*PPR protein for germination on NaCl*), *ppr40*, *ahg11* (*ABA hypersensitive germination 11*), *slg1* (*slow growth 1*) und *slo2* (*slow growth 2*) Mutanten das gleiche Verhalten wie *dweorg1* Mutanten in Anwesenheit von hohen Salzkonzentrationen (Zsigmond et al. 2008; Laluk et al. 2011; Yuan und Liu 2012; Murayama et al. 2012; Zhu et al. 2014). In den oben genannten Beispielen geht die Salz-Sensibilität meist mit einer erhöhten Sensibilität gegenüber Abscisinsäure (ABA) einher. In all diesen Mutanten wurde zudem eine gestörte Aktivität der mitochondrialen Atmungskette beobachtet, die vermutlich zu einer erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führt. ROS ist ein bekanntes Signalmolekül für abiotischen und biotischen Stress und wird in den Mitochondrien vor allem an den Komplexen I und III der mitochondrialen Atmungskette generiert (Moller 2001; Navrot et al. 2007). Als Signalmolekül kontrolliert ROS die Expression von Stressantwort-Genen (Laloi et al. 2004; Gechev et al. 2006). Die erhöhte ROS-Menge innerhalb der oben genannten Mutanten führt somit wahrscheinlich zu der erhöhten Salz- und ABA-Sensibilität dieser.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Translationseffizienz des *cox2* Transkripts beeinflusst ist und eine geringere Menge an COX2 in den Mitochondrien vorliegt. COX2 ist ein Teil des katalytischen Kerns der Cytochrom c Oxidase (Komplex IV) der mitochondrialen Atmungskette (Soto und Barrientos 2016). Es enthält ein di-Kupfer Zentrum (Cu_A) welches als Elektronen-Akzeptor dient. Die Elektronen werden von reduziertem CYTc auf das Kupferzentrum von COX2 übertragen, innerhalb des Komplex IV weitergeleitet und auf Sauerstoff übertragen, wodurch dieser zu Wasser reduziert wird (Soto et al. 2012). Bei einer reduzierten COX2 Menge, wie es in *dweorg1* der Fall ist, würde man demnach eine Beeinträchtigung der

Komplex IV-Aktivität erwarten. Dies könnte wiederum die Salz-Sensibilität der *dweorg1* Pflanzen beeinflussen.

Im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführte spektrophotometrische Untersuchungen der Komplex IV-Aktivität in *dweorg1* Mitochondrien wiesen auf eine Beeinträchtigung der Aktivität hin (Bruhs 2012). Diese Beeinträchtigung wurde in dieser Arbeit allerdings weder über eine In-Gel-Aktivitätsfärbung noch durch die Aktivitätsbestimmung über die Atmungsrate bestätigt. Bei der In-Gel-Aktivitätsfärbung wird die Aktivität der assemblierten Cytochrom-c-Oxidase analysiert. Es besteht die Möglichkeit, dass die Menge des COX2 Proteins in *dweorg1* ausreichend ist um die Komplex IV-Abundanz und -Stabilität soweit aufrechtzuerhalten, dass die Aktivität des Komplexes im Gel nachgewiesen werden kann, obwohl sie *in vivo* eine reduzierte Aktivität aufweist. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit eine unveränderte Komplex IV-Aktivität über eine Sauerstoffmessung mit isolierten Mitochondrien nachgewiesen. Möglicherweise ist diese Methode aber im Gegensatz zu spektrophotometrischen Untersuchungen nicht sensitiv genug, um den Abfall der Aktivität nachzuweisen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen demnach nicht die Vermutung, dass die Salz-Sensibilität der *dweorg1* Pflanzen durch eine Störung der mitochondrialen Atmungskette bedingt ist. Dabei spricht die Beobachtung, dass die Proteinmenge der alternativen Oxidase (AOX) in *dweorg1* Mutanten stark erhöht ist (Schmidt 2010) in Kombination mit der erhöhten Salz-Sensibilität durchaus für eine gestörte mitochondriale Atmungskette. Eine erhöhte AOX-Menge in Kombination mit einem Wachstumsdefekt, wie es in *dweorg1* der Fall ist, geht häufig mit einer Störung des Cytochrom-c-Wegs einher. Dies wurde sowohl in *Arabidopsis pgn* und *ppr40* Mutanten als auch *Podospira anserina* Mutanten gezeigt, die eine Beeinträchtigung des Cytochrom-c-Wegs aufwiesen (Zsigmond et al. 2008; Scheckhuber et al. 2011; Laluk et al. 2011). Im Gegensatz dazu beobachtet man in *Arabidopsis* keinerlei Einfluss auf den Phänotyp, wenn die AOX-Menge unabhängig von der Funktionalität des Komplex IV steigt (Fiorani et al. 2005).

Die Co-Immunpräzipitations Analysen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, lieferten unter anderem MPT3 als einen putativen Interaktionspartner DWEORG1s. Bei MPT3 handelt es sich um einen mitochondrialen Phosphat Transporter der inneren mitochondrialen Membran, der in die Regulierung der Salz-Stressantwort in *Arabidopsis* involviert ist (Zhu et al. 2012). Sollte es sich dabei um einen echten Interaktionspartner handeln, wäre die Sensibilität gegenüber Salzstress kein sekundärer Effekt in *dweorg1* Pflanzen durch eine Störung der Atmungskette, sondern eine direkte Folge der Mutation und ließe eine Beteiligung DWEORG1s an der Salzstress-Regulierung vermuten. Dies würde weiterhin bedeuten, dass DWEORG1 mehr als nur eine Funktion in den Mitochondrien besitzen würde.

Mehr als eine Funktion zu besitzen ist für PPR-Proteine nicht ungewöhnlich. Für das rPPR-Protein rPPR9 (PNM1) wurde dies bereits nachgewiesen. Neben der Funktion in den Mitoribosomen, liegt rPPR9 assoziiert mit dem nuklearen Transkriptionsfaktor TCP8 vor (Hammani et al. 2011). Man vermutet, dass es sich bei rPPR9 um ein Protein handelt, das die nukleare und mitochondriale Genexpression aufeinander abstimmt. Ein weiteres Beispiel eines PPR-Proteins mit zwei unterschiedlichen, voneinander unabhängigen Funktionen stellt Ccm1p aus *Saccharomyces cerevisiae* dar. Zum einen ist es am Spleißvorgang des vierten *cob* und des vierten *cox1* Introns beteiligt und zum anderen stabilisiert es die 15S rRNA der kleinen mitoribosomalen Untereinheit der Hefe (Moreno et al. 2012).

Dementsprechend wäre eine zweite Funktion DWEORG1s nicht auszuschließen, sollte es sich bei MPT3 um einen echten Interaktionspartner von DWEORG1 handeln. Dies bedarf aber noch weiterer Untersuchungen. Eine Bestätigung der Interaktion könnte etwa über eine bimolekulare Fluoreszenzkomplementation durchgeführt werden. Zudem muss ausgeschlossen werden, dass es sich bei der Salz-Sensibilität nicht um einen sekundären Effekt handelt. Es sollten weitere Untersuchungen bezüglich der ABA-Sensibilität und des endogenen ABA-Niveaus der *dweorg1* Mutanten durchgeführt werden, da andere PPR-Protein Mutanten, die eine erhöhte Salz-Sensibilität aufweisen, wie bereits erwähnt ebenfalls eine erhöhte ABA-Sensibilität zeigen. Zudem sollte die Aktivität der anderen Komplexe der mitochondrialen Atmungskette, besonders die des Komplex III, näher untersucht werden, da eine gestörte Funktion des Komplex III zu erhöhter ROS-Produktion führen kann (Moller 2001; Navrot et al. 2007). Damit könnte die erhöhte AOX Menge trotz funktionalem Komplex IV erklärt werden.

5 Zusammenfassung

Die Regulierung der mitochondrialen Genexpression erfolgt durch im Zellkern codierte Proteine. Viele dieser Proteine gehören zur Familie der *pentatricopeptide repeat* (PPR) Proteine, eine der größten Proteinfamilien in Landpflanzen, mit versatilen Funktionen in der Transkription, RNA-Stabilisierung/-Degradierung, Edierung, Bildung von 5'- und 3'-Enden, dem Spleißen und der Translation mitochondrialer und plastidärer Transkripte (Lurin et al. 2004; Barkan und Small 2014). Der Prozess der mitochondrialen Translation in Pflanzen ist bisher kaum verstanden und Gegenstand aktueller Forschung. Die wenigen bisher identifizierten Faktoren, die die Translation in pflanzlichen Mitochondrien beeinflussen, gehören vor allem zu den PPR-Proteinen (Manavski et al. 2012; Haili et al. 2016; Waltz et al. 2020a). Zudem wurden einige PPR-Proteine als Teil des pflanzlichen mitochondrialen Ribosoms (Mitoribosom) beschrieben (Waltz et al. 2019; Rugen et al. 2019) (im weiteren als rPPR-Proteine bezeichnet). Im Vorfeld dieser Arbeit wurde ein weiteres PPR-Protein – DWEORG1 – charakterisiert, für das eine Funktion in der Translation des *cox2* Transkripts festgestellt wurde (Bruhs 2012).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte sowohl die heterologe Überexpression DWEORG1s in *E. coli* etabliert werden als auch eine Funktionsanalyse hinsichtlich der mitochondrialen Translation durchgeführt werden. Die heterologe Überexpression der PPR-Proteine in *E. coli* gestaltet sich allgemein als sehr schwierig (Andrés-Colás und Van Der Straeten 2017). Hier wurde ein System mit dem SUMO3-*tag* etabliert und erfolgreich für die Synthese DWEORG1s in *E. coli* verwendet.

Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse in Bruhs (2012) wurde zunächst eine transkriptspezifische Funktion DWEORG1s angenommen. Sodass der Fokus anfangs auf das *cox2* Transkript gelegt wurde. Die Untersuchung des Spleißens und der Bildung der 5'- und 3'-Enden des Transkripts ergaben, dass diese Prozesse in *dweorg1* Pflanzen nicht beeinträchtigt sind. Ein sekundärer Effekt auf die Translation durch diese Prozesse wurde demnach ausgeschlossen.

Analysen der mitochondrialen Translationseffizienz in *dweorg1* durch ein *ribosome profiling* ergaben, dass die Translationseffizienz aller mitochondrialer Transkripte negativ beeinträchtigt ist. Am stärksten sind hierbei die Transkripte *cox2*, *rps4*, *rpl5* und *ccmF_{N2}* betroffen. Die nähere Charakterisierung DWEORG1s zeigte, dass es sich um ein noch nicht beschriebenes rPPR-Protein handelt und somit einen Teil des Mitoribosoms bildet. Dies wurde sowohl über Saccharose-Gradienten- als auch Co-Immunpräzipitations-Analysen bestätigt. Das Sedimentationsverhalten der mitoribosomalen Proteine RPS4 und RPL16 aus *dweorg1* in einem Saccharose-Gradienten ließ darauf schließen, dass die Mitoribosomen in *dweorg1*

destabilisiert sind. Dies wurde über die Analyse des rRNA-Niveaus durch eine quantitative RT-PCR bestätigt. Vermutlich bindet DWEORG1 ebenso an rRNA-Erweiterungssegmente wie die bisher beschriebenen rPPR-Proteine. Dies würde erklären, warum die RNA-Bindung DWEORG1s an ein *cox2* RNA-Fragment nicht nachgewiesen wurde.

Zudem lassen die Ergebnisse dieser Arbeit eine Beteiligung DWEORG1s an der Salz-Stress-Antwort in *A. thaliana* vermuten. Der molekulare Mechanismus, der dem zugrunde liegt, konnte jedoch nicht näher bestimmt werden.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit eine allgemeine Funktion DWEORG1s in der mitochondrialen Translation als Teil des Mitoribosoms nachgewiesen. Dabei wird eine Rolle DWEORG1s als Stabilitätsfaktor der mitochondrialen rRNA bzw. Mitoribosomen vermutet. Zudem ist eine zusätzliche Funktion DWEORG1s in der Regulierung der Salz-Stress-Antwort in *A. thaliana* nicht auszuschließen.

6 Summary

The mitochondrial gene expression is regulated by nuclear encoded proteins. Most of them belong to the pentatricopeptide repeat (PPR) protein family. This is one of the largest protein families in land plants with versatile functions in transcription, RNA stabilization/destabilisation, editing, 5'- and 3'-end processing, splicing and the translation of mitochondrial and plastid transcripts (Lurin et al. 2004; Barkan and Small 2014). In plants the process of translation is barely understood, hence it is a part of recent research. The few factors identified up to now involved in plant mitochondrial translation belong to the PPR protein family (Manavski et al. 2012; Haili et al. 2016; Waltz et al. 2020a). Additionally, some PPR proteins were found to be part of the mitochondrial ribosomes (mitoribosomes) in plants (further referred to as rPPR proteins) (Waltz et al. 2019; Rugen et al. 2019). Proceeding this work, another PPR protein – DWEORG1 – was described as functioning in *cox2* mRNA translation (Bruhs 2012).

Part of this work focused on establishing the heterologous overexpression of DWEORG1 in *E. coli*. Another part focused on the functional analysis of DWEORG1 regarding mitochondrial translation. The heterologous overexpression of PPR proteins in *E. coli* has proven to be very difficult (Andrés-Colás and Van Der Straeten 2017). A system using the SUMO3-tag was established and successfully used to overexpress DWEORG1 in *E. coli* in the context of this work.

Due to earlier results in Bruhs (2012), a transcript specific function of DWEORG1 was assumed. Hence, this work initially focused on the *cox2* transcript. It was shown that the splicing and 5'- and 3'-end processing of *cox2* were not affected in *dweorg1*. Excluding a secondary effect of those processes on *cox2* translation.

A ribosome profiling analysis performed in this work showed, that the overall translation of mitochondrial transcripts was decreased in *dweorg1*. With the transcripts *cox2*, *rps4*, *rpl5* and *ccmF_{N2}* being affected the most. Further characterization of DWEORG1 showed, that DWEORG1 is a novel rPPR protein, hence being a part of the mitoribosome. This was confirmed by sucrose gradient and co-immunoprecipitation analyses. The mitoribosomal proteins RPS4 and RPL16 are migrating differently in *dweorg1* leading to the assumption that mitoribosomes are destabilized in *dweorg1* mitochondria. This could be confirmed by a quantitative RT-PCR analysis of the rRNA level in *dweorg1*. Presumably DWEORG1 binds to rRNA extension segments, as other rPPR proteins do. This would also explain why the RNA binding of DWEORG1 to a *cox2* RNA fragment could not be shown here.

Furthermore, the results of this work lead to the assumption, that DWEORG1 might have an additional function in regulating the salt stress response in *A. thaliana*. Though the underlying molecular mechanism could not be identified yet.

In summary it can be said that this work shows a general role of DWEORG1 in the mitochondrial translation as part of the mitoribosome. Thereby it is assumed, that DWEORG1 is a stabilizing factor of the mitochondrial rRNA or the mitoribosome. In addition, a secondary function in regulating the salt stress response of the plant cannot be excluded.

7 Literaturverzeichnis

- Adamo A, Pinney JW, Kunova A, et al (2008) Heat stress enhances the accumulation of polyadenylated mitochondrial transcripts in *Arabidopsis thaliana*. PLoS One 3:e2889. doi: 10.1371/journal.pone.0002889
- Adams KL, Palmer JD (2003) Evolution of mitochondrial gene content: Gene loss and transfer to the nucleus. Mol Phylogenet Evol 29:380–395. doi: 10.1016/S1055-7903(03)00194-5
- Alverson AJ, Wei X, Rice DW, et al (2010) Insights into the evolution of mitochondrial genome size from complete sequences of *Citrullus lanatus* and *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). Mol Biol Evol 27:1436–1448. doi: 10.1093/molbev/msq029
- Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. Proc Natl Acad Sci U S A 74:5350–5354. doi: 10.1073/pnas.74.12.5350
- Amunts A, Brown A, Bai XC, et al (2014) Structure of the yeast mitochondrial large ribosomal subunit. Science (80-) 343:1485–1489. doi: 10.1126/science.1249410
- Amunts A, Brown A, Toots J, et al (2015) The structure of the human mitochondrial ribosome. Science (80-) 348:95–98. doi: 10.1126/science.aaa1193
- Anderson S, Bankier a T, Barrell BG, et al (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 290:457–465. doi: 10.1038/290457a0
- Andrés-Colás N, Van Der Straeten D (2017) Optimization of non-denaturing protein extraction conditions for plant PPR proteins. PLoS One 12:e0187753. doi: 10.1371/journal.pone.0187753
- Andrés-Colás N, Zhu Q, Takenaka M, et al (2017) Multiple PPR protein interactions are involved in the RNA editing system in *Arabidopsis* mitochondria and plastids. Proc Natl Acad Sci U S A 114:8883–8888. doi: 10.1073/pnas.1705815114
- Andrés C, Lurin C, Small ID (2007) The multifarious roles of PPR proteins in plant mitochondrial gene expression. Physiol Plant 129:14–22. doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00766.x
- Archibald JM (2015) Endosymbiosis and eukaryotic cell evolution. Curr Biol 25:911–921. doi: 10.1016/j.cub.2015.07.055
- Arnal N, Quadrado M, Simon M, Mireau H (2014) A restorer-of-fertility like pentatricopeptide repeat gene directs ribonucleolytic processing within the coding sequence of *rps3 - rpl16* and *orf240a* mitochondrial transcripts in *Arabidopsis thaliana*. Plant J 78:134–145. doi: 10.1111/tbj.12463
- Arya M, Shergill IS, Williamson M, et al (2005) Basic principles of real-time quantitative PCR. Expert Rev. Mol. Diagn. 5:209–219
- Atkinson GC, Kuzmenko A, Kamenski P, et al (2012) Evolutionary and genetic analyses of mitochondrial translation initiation factors identify the missing mitochondrial IF3 in *S. cerevisiae*. Nucleic Acids Res 40:6122–6134. doi: 10.1093/nar/gks272
- Babushok D V., Ostertag EM, Kazazian HH (2007) Current topics in genome evolution: Molecular mechanisms of new gene formation. Cell. Mol. Life Sci. 64:542–554
- Ban N, Nissen P, Hansen J, et al (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. Science (80-) 289:905–920. doi: 10.1126/science.289.5481.905
- Bar-Yaacov D, Pilpel Y, Dahan O (2018) RNA editing in bacteria: occurrence, regulation and significance. RNA Biol 15:863–867. doi: 10.1080/15476286.2018.1481698

- Barkan A (1993) Nuclear mutants of maize with defects in chloroplast polysome assembly have altered chloroplast RNA metabolism. *Plant Cell* 5:389–402. doi: 10.1105/tpc.5.4.389
- Barkan A, Rojas M, Fujii S, et al (2012) A combinatorial amino acid code for RNA recognition by pentatricopeptide repeat proteins. *PLoS Genet* 8:e1002910. doi: 10.1371/journal.pgen.1002910
- Barkan A, Small I (2014) Pentatricopeptide repeat proteins in plants. *Annu Rev Plant Biol* 65:415–442. doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-040159
- Barrientos A, Pierre D, Lee J, Tzagoloff A (2003) Cytochrome oxidase assembly does not require catalytically active cytochrome c. *J Biol Chem* 278:8881–8887. doi: 10.1074/jbc.M212427200
- Bégu D, Castandet B, Araya A (2011) RNA editing restores critical domains of a group I intron in fern mitochondria. *Curr Genet* 57:317–325. doi: 10.1007/s00294-011-0349-z
- Bégu D, Graves P V, Domec C, et al (1990) RNA editing of wheat mitochondrial ATP synthase subunit 9: direct protein and cDNA sequencing. *Plant Cell* 2:1283–1290. doi: 10.1105/tpc.2.12.1283
- Ben-Shem A, De Loubresse NG, Melnikov S, et al (2011) The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science* (80-) 334:1524–1529. doi: 10.1126/science.1212642
- Benne R (1989) RNA-editing in trypanosome mitochondria. *BBA - Gene Struct. Expr.* 1007:131–139
- Bentolila S, Heller WP, Sun T, et al (2012) RIP1, a member of an *Arabidopsis* protein family, interacts with the protein RARE1 and broadly affects RNA editing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:E1453–E1461. doi: 10.1073/pnas.1121465109
- Bentolila S, Oh J, Hanson MR, Bukowski R (2013) Comprehensive High-Resolution Analysis of the Role of an *Arabidopsis* Gene Family in RNA Editing. *PLoS Genet* 9:e1003584. doi: 10.1371/journal.pgen.1003584
- Binder S, Brennicke A (2003) Gene expression in plant mitochondria: transcriptional and post-transcriptional control. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:181–189. doi: 10.1098/rstb.2002.1179
- Binder S, Kühn K (2015) Determining mitochondrial transcript termini for the study of transcription start sites and transcript 5' end maturation. *Methods Mol Biol* 1305:13–30. doi: 10.1007/978-1-4939-2639-8_2
- Binder S, Marchfelder A, Brennicke A (1996) Regulation of gene expression in plant mitochondria. *Plant Mol Biol* 32:303–314. doi: 10.1007/BF00039387
- Binder S, Stoll K, Stoll B (2013) P-class pentatricopeptide repeat proteins are required for efficient 5' end formation of plant mitochondrial transcripts. *RNA Biol* 10:1511–1519. doi: 10.4161/rna.26129
- Binder S, Stoll K, Stoll B (2016) Maturation of 5' ends of plant mitochondrial RNAs. *Physiol Plant* 157:280–288. doi: 10.1111/ppl.12423
- Bobrowicz AJ, Lightowers RN, Chrzanowska-Lightowers Z (2008) Polyadenylation and degradation of mRNA in mammalian mitochondria: A missing link? *Biochem. Soc. Trans.* 36:517–519
- Bock H, Brennicke A, Schuster W (1994) *Rps3* and *rpl16* genes do not overlap in *Oenothera* mitochondria: GTG as a potential translation initiation codon in plant mitochondria? *Plant Mol Biol* 24:811–818. doi: 10.1007/BF00029863
- Bock R, Hagemann R, Kössel H, Kudla J (1993) Tissue- and stage-specific modulation of RNA

- editing of the *psbF* and *psbL* transcript from spinach plastids - a new regulatory mechanism? *MGG Mol Gen Genet* 240:238–244. doi: 10.1007/BF00277062
- Bohne A V., Schwenkert S, Grimm B, Nickelsen J (2016) Roles of tetratricopeptide repeat proteins in biogenesis of the photosynthetic apparatus. In: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier Inc., pp 187–227
- Bolle N (2008) RNA-Edierung in Mitochondrien Höherer Pflanzen. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- Bonen L (2008) Cis- and trans-splicing of group II introns in plant mitochondria. *Mitochondrion* 8:26–34. doi: 10.1016/j.mito.2007.09.005
- Bonen L (2004) Translational machinery in plant organelles. In: *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 323–345
- Bonen L, Vogel J (2001) The ins and outs of group II introns. *Trends Genet.* 17:322–331
- Boussardon C, Salone V, Avon A, et al (2012) Two interacting proteins are necessary for the editing of the *ndhD-1* site in *Arabidopsis* plastids. *Plant Cell* 24:3684–3694. doi: 10.1105/tpc.112.099507
- Bowsher CG, Tobin AK (2001) Compartmentation of metabolism within mitochondria and plastids. *J Exp Bot* 52:513–527. doi: 10.1093/jexbot/52.356.513
- 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. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brennicke A, Leaver CJ (2007) Mitochondrial genome organization and expression in plants. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, pp 1–6
- Brown GG, Colas des Francs-Small C, Ostersetzer-Biran O (2014) Group II intron splicing factors in plant mitochondria. *Front Plant Sci* 5:1–13. doi: 10.3389/fpls.2014.00035
- Bruhs A (2012) Charakterisierung mitochondrialer PPR-Proteine aus *Arabidopsis thaliana*. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- Bullock W, Fernandez J, Short J (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* *E. coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5:376–378
- Burger G, Gray MW, Forget L, Lang BF (2013) Strikingly bacteria-like and gene-rich mitochondrial genomes throughout jakobid protists. *Genome Biol Evol* 5:418–438. doi: 10.1093/gbe/evt008
- Burgess RR (2009) Refolding solubilized inclusion body proteins. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc., pp 259–282
- Butt TR, Edavettal SC, Hall JP, Mattern MR (2005) SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr. Purif.* 43:1–9
- Canino G, Bocian E, Barbezier N, et al (2009) *Arabidopsis* encodes four tRNase Z enzymes. *Plant Physiol* 150:1494–1502. doi: 10.1104/pp.109.137950
- Carrió MM, Villaverde A (2002) Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. In: *Journal of Biotechnology*. *J Biotechnol*, pp 3–12
- Cazalet C, Gomez-Valero L, Rusniok C, et al (2010) Analysis of the *Legionella longbeachae* genome and transcriptome uncovers unique strategies to cause Legionnaires' disease. *PLoS Genet* 6:e1000851. doi: 10.1371/journal.pgen.1000851
- Chateigner-Boutin A-L, Hanson MR (2003) Developmental co-variation of RNA editing extent of plastid editing sites exhibiting similar *cis*-elements. *Nucleic Acids Res* 31:2586–2594. doi: 10.1093/nar/gkg354

- Chateigner-Boutin AL, Des Francs-Small CC, Delannoy E, et al (2011) OTP70 is a pentatricopeptide repeat protein of the e subgroup involved in splicing of the plastid transcript *rpoC1*. *Plant J* 65:532–542. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04441.x
- Chen SH, Habib G, Yang CY, et al (1987) Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. *Science* (80-) 238:363–366. doi: 10.1126/science.3659919
- Cheng S, Gutmann B, Zhong X, et al (2016) Redefining the structural motifs that determine RNA binding and RNA editing by pentatricopeptide repeat proteins in land plants. *Plant J* 85:532–547. doi: 10.1111/tpj.13121
- Choi B, Acero MM, Bonen L (2012) Mapping of wheat mitochondrial mRNA termini and comparison with breakpoints in DNA homology among plants. *Plant Mol Biol* 80:539–552. doi: 10.1007/s11103-012-9966-2
- Choudhary M, Zanhua X, Fu YX, Kaplan S (2007) Genome analyses of three strains of *Rhodobacter sphaeroides*: Evidence of rapid evolution of chromosome II. *J Bacteriol* 189:1914–1921. doi: 10.1128/JB.01498-06
- Clemons WM, May JLC, Wimberly BT, et al (1999) Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution. *Nature* 400:833–840. doi: 10.1038/23631
- Clifton SW, Minx P, Fauron CM-R, et al (2004) Sequence and comparative analysis of the maize NB mitochondrial genome. *Plant Physiol* 136:3486–3503. doi: 10.1104/pp.104.044602
- Cohen S, Zmudjak M, Colas des Francs-Small C, et al (2014) nMAT4, a maturase factor required for *nad1* pre-mRNA processing and maturation, is essential for holocomplex I biogenesis in *Arabidopsis* mitochondria. *Plant J* 78:253–268. doi: 10.1111/tpj.12466
- Colas des Francs-Small C, Kroeger T, Zmudjak M, et al (2012) A PORR domain protein required for *rpl2* and *ccmFC* intron splicing and for the biogenesis of c-type cytochromes in *Arabidopsis* mitochondria. *Plant J* 69:996–1005. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04849.x
- Colas des Francs-Small C, Vincis Pereira Sanglard L, Small I (2018) Targeted cleavage of *nad6* mRNA induced by a modified pentatricopeptide repeat protein in plant mitochondria. *Commun Biol* 1:1–7. doi: 10.1038/s42003-018-0166-8
- Colcombet J, Lopez-Obando M, Heurtevin L, et al (2013) Systematic study of subcellular localization of *Arabidopsis* PPR proteins confirms a massive targeting to organelles. *RNA Biol* 10:1557–1575. doi: 10.4161/rna.26128
- Coquille S, Filipovska A, Chia T, et al (2014) An artificial PPR scaffold for programmable RNA recognition. *Nat Commun* 5:1–9. doi: 10.1038/ncomms6729
- Covello PS, Gray MW (1989) RNA editing in plant mitochondria. *Nature* 341:662–666. doi: 10.1038/341662a0
- Czakó M, Wilson J, Yu X, Márton L (1993) Sustained root culture for generation and vegetative propagation of transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* 12:603–606. doi: 10.1007/BF00232807
- De Longevialle AF, Meyer EH, Andrés C, et al (2007) The pentatricopeptide repeat gene *OTP43* is required for *trans*-splicing of the mitochondrial *nad1* intron 1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19:3256–3265. doi: 10.1105/tpc.107.054841
- de Marco A, Deuerling E, Mogk A, et al (2007) Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *E. coli*. *BMC Biotechnol* 7:32. doi: 10.1186/1472-6750-7-32
- del Campo EM (2009) Post-transcriptional control of chloroplast gene expression. *Gene Regul*

Syst Bio 3:31–47

- Delage L, Giegé P, Sakamoto M, Maréchal-Drouard L (2007) Four paralogues of RPL12 are differentially associated to ribosome in plant mitochondria. *Biochimie* 89:658–668. doi: 10.1016/j.biochi.2007.02.002
- Delannoy E, Stanley WA, Bond CS, Small ID (2007) Pentatricopeptide repeat (PPR) proteins as sequence-specificity factors in post-transcriptional processes in organelles. In: *Biochemical Society Transactions*. *Biochem Soc Trans*, pp 1643–1647
- Derbikova KS, Levitsky SA, Chicherin I V., et al (2018) Activation of yeast mitochondrial translation: Who is in charge? *Biochem.* 83:87–97
- Desai N, Brown A, Amunts A, Ramakrishnan V (2017) The structure of the yeast mitochondrial ribosome. *Science* (80-) 355:528–531. doi: 10.1126/science.aal2415
- Desmond E, Brochier-Armanet C, Forterre P, Gribaldo S (2011) On the last common ancestor and early evolution of eukaryotes: Reconstructing the history of mitochondrial ribosomes. *Res Microbiol* 162:53–70. doi: 10.1016/j.resmic.2010.10.004
- Dombrowski S, Brennicke A, Binder S (1997) 3'-Inverted repeats in plant mitochondrial mRNAs are processing signals rather than transcription terminators. *EMBO J* 16:5069–5076. doi: 10.1093/emboj/16.16.5069
- Dombrowski S, Hoffmann M, Guha C, Binder S (1999) Continuous primary sequence requirements in the 18-nucleotide promoter of dicot plant mitochondria. *J Biol Chem* 274:10094–10099. doi: 10.1074/jbc.274.15.10094
- Dong FG, Wilson KG, Makaroff CA (1998) The radish (*Raphanus sativus* L.) mitochondrial *cox2* gene contains an ACG at the predicted translation initiation site. *Curr Genet* 34:79–87. doi: 10.1007/s002940050369
- Doniwa Y, Ueda M, Ueta M, et al (2010) The involvement of a PPR protein of the P subfamily in partial RNA editing of an *Arabidopsis* mitochondrial transcript. *Gene* 454:39–46. doi: 10.1016/j.gene.2010.01.008
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16:6127–6145. doi: 10.1002/cbic.200700325
- Emami H, Kempken F (2019) <sc>PRECOCIOUS</sc> 1 (<sc>POCO</sc> 1), a mitochondrial pentatricopeptide repeat protein affects flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 100:265–278. doi: 10.1111/tbj.14441
- Englmeier R, Pfeffer S, Förster F (2017) Structure of the human mitochondrial ribosome studied *in situ* by cryoelectron tomography. *Structure* 25:1574–1581. doi: 10.1016/j.str.2017.07.011
- Etheridge RD, Aphasizheva I, Gershon PD, Aphasizhev R (2008) 3' adenylation determines mRNA abundance and monitors completion of RNA editing in *T. brucei* mitochondria. *EMBO J* 27:1596–1608. doi: 10.1038/emboj.2008.87
- Eubel H, Heinemeyer J, Braun H (2004) Identification and characterization of respirasomes. *Plant Physiol* 134:1450–1459. doi: 10.1104/pp.103.038018.tions
- Farré J-C, Araya A (2001) Gene expression in isolated plant mitochondria: high fidelity of transcription, splicing and editing of a transgene product in electroporated organelles
- Feagin JE, Harrell MI, Lee JC, et al (2012) The fragmented mitochondrial ribosomal RNAs of *Plasmodium falciparum*. *PLoS One* 7:e38320. doi: 10.1371/journal.pone.0038320
- Fernandez-Silva P, Martinez-Azorin F, Micol of mitochondrial DNA Gelfand V, Attardi G (1997) The human mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is a multizipper protein but binds to DNA as a monomer, with evidence pointing to intramolecular leucine zipper

interactions expression of the rRNA gene region relative to the downstream gen

- Fey J, Maréchal-Drouard L (1999) Compilation and analysis of plant mitochondrial promoter sequences: An illustration of a divergent evolution between monocot and dicot mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 256:409–414. doi: 10.1006/bbrc.1999.0349
- Fiorani F, Umbach AL, Siedow JN (2005) The alternative oxidase of plant mitochondria is involved in the acclimation of shoot growth at low temperature. A study of *Arabidopsis AOX1a* transgenic plants. *Plant Physiol* 139:1795–1805. doi: 10.1104/pp.105.070789
- Fisk D. G, Walker MB, 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. doi: 10.1093/emboj/18.9.2621
- Forner J, Weber B, Thuss S, et al (2007) Mapping of mitochondrial mRNA termini in *Arabidopsis thaliana*: T-elements contribute to 5' and 3' end formation. *Nucleic Acids Res* 35:3676–3692. doi: 10.1093/nar/gkm270
- Foury F, Roganti T, Lecrenier N, Purnelle B (1998) The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 440:325–331. doi: 10.1016/S0014-5793(98)01467-7
- Frolova LY, Tsivkovskii RY, Sivolobova GF, et al (1999) Mutations in the highly conserved GGQ motif of class I polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis. *RNA* 5:1014–1020. doi: 10.1017/S135583829999043X
- Fromm S, Senkler J, Eubel H, et al (2016) Life without complex I: proteome analyses of an *Arabidopsis* mutant lacking the mitochondrial NADH dehydrogenase complex. *J Exp Bot* 67:3079–93. doi: 10.1093/jxb/erw165
- Fuchs P, Rugen N, Carrie C, et al (2020) Single organelle function and organization as estimated from *Arabidopsis* mitochondrial proteomics. *Plant J* 101:420–441. doi: 10.1111/tpj.14534
- Fujii S, Sato N, Shikanai T (2013) Mutagenesis of individual pentatricopeptide repeat motifs affects RNA binding activity and reveals functional partitioning of *Arabidopsis* PROTON GRADIENT REGULATION3. *Plant Cell* 25:3079–3088. doi: 10.1105/tpc.113.112193
- Fujii S, Small I (2011) The evolution of RNA editing and pentatricopeptide repeat genes. *New Phytol.* 191:37–47
- Gagliardi D, Binder S (2007) Expression of the Plant Mitochondrial Genome. In: *Plant Mitochondria*. Wiley-Blackwell Publishing Ltd, pp 50–96
- Gaur R, Grasso D, Datta PP, et al (2008) A single mammalian mitochondrial translation initiation factor functionally replaces two bacterial factors. *Mol Cell* 29:180–190. doi: 10.1016/j.molcel.2007.11.021
- Gechev TS, Van Breusegem F, Stone JM, et al (2006) Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays* 28:1091–1101. doi: 10.1002/bies.20493
- Genuth NR, Barna M (2018) The discovery of ribosome heterogeneity and its implications for gene regulation and organismal life. *Mol. Cell* 71:364–374
- Giege P, Brennicke A (1999) RNA editing in *Arabidopsis* mitochondria effects 441 C to U changes in ORFs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:15324–15329. doi: 10.1073/pnas.96.26.15324
- Giegé P, Brennicke A (2001) From gene to protein in higher plant mitochondria. *Comptes Rendus l'Academie des Sci. - Ser. III* 324:209–217

- Giegé P, Hoffmann M, Binder S, Brennicke A (2000) RNA degradation buffers asymmetries of transcription in *Arabidopsis* mitochondria. *EMBO Rep* 1:164–70. doi: 10.1038/sj.embor.embor613
- Giege P, Sweetlove LJ, Cognat V, Leaver CJ (2005) Coordination of nuclear and mitochondrial genome expression during mitochondrial biogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:1497–1512. doi: 10.1105/tpc.104.030254.1
- Glass F, Härtel B, Zehrmann A, et al (2015) MEF13 requires MORF3 and MORF8 for RNA editing at eight targets in mitochondrial mRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* 8:1466–1477. doi: 10.1016/j.molp.2015.05.008
- Gobert A, Gutmann B, Taschner A, et al (2010) A single *Arabidopsis* organellar protein has RNase P activity. *Nat Struct Mol Biol* 17:740–744. doi: 10.1038/nsmb.1812
- Gray MW (1999) Mitochondrial Evolution. *Science* (80-) 283:1476–1481. doi: 10.1126/science.283.5407.1476
- Gray MW (2015) Mosaic nature of the mitochondrial proteome: Implications for the origin and evolution of mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:10133–10138. doi: 10.1073/pnas.1421379112
- Greber BJ, Bieri P, Leibundgut M, et al (2015) The complete structure of the 55S mammalian mitochondrial ribosome. *Science* (80-) 348:303–308. doi: 10.1126/science.aaa3872
- Grewe F, Herres S, Viehöver P, et al (2011) A unique transcriptome: 1782 positions of RNA editing alter 1406 codon identities in mitochondrial mRNAs of the lycophyte *Isoetes engelmannii*. *Nucleic Acids Res* 39:2890–2902. doi: 10.1093/nar/gkq1227
- Grohmann L, Thieck O, Herz U, et al (1994) Translation of *nad9* mRNAs in mitochondria from *Solanum tuberosum* is restricted to completely edited transcripts
- Groth-Malonek M, Wahrmund U, Polsakiewicz M, Knoop V (2007) Evolution of a pseudogene: Exclusive survival of a functional mitochondrial *nad7* gene supports *Haplomitrium* as the earliest liverwort lineage and proposes a secondary loss of RNA editing in Marchantiidae. *Mol Biol Evol* 24:1068–1074. doi: 10.1093/molbev/msm026
- Grüttner S, Hopf C, Kumar A, Kempken F (2013) Deletions in *cox2* mRNA result in loss of splicing and RNA editing and gain of novel RNA editing sites. *PLoS One* 8:e82067. doi: 10.1371/journal.pone.0082067
- Gualberto JM, Bonnard G, Lamattina L, Grienemberger JM (1991) Expression of the wheat mitochondrial *nad3-rps12* transcription unit: correlation between editing and mRNA maturation. *Plant Cell* 3:1109–1120. doi: 10.1105/tpc.3.10.1109
- Gualberto JM, Lamattina L, Bonnard G, et al (1989) RNA editing in wheat mitochondria results in the conservation of protein sequences. *Nature* 341:660–662. doi: 10.1038/341660a0
- Gualberto JM, Newton KJ (2017) Plant mitochondrial genomes: Dynamics and mechanisms of mutation. *Annu Rev Plant Biol* 68:225–252. doi: 10.1146/annurev-arplant-043015-112232
- Guillaumot D, Lopez-Obando M, Baudry K, et al (2017) Two interacting PPR proteins are major *Arabidopsis* editing factors in plastid and mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:8877–8882. doi: 10.1073/pnas.1705780114
- Guo H, Rubinstein JL (2018) Cryo-EM of ATP synthases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 52:71–79
- Gutmann B, Gobert A, Giegé P (2012) PRORP proteins support RNase P activity in both organelles and the nucleus in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 26:1022–1027. doi: 10.1101/gad.189514.112
- Haïli N, Arnal N, Quadrado M, et al (2013) The pentatricopeptide repeat MTSF1 protein stabilizes the *nad4* mRNA in *Arabidopsis* mitochondria. *Nucleic Acids Res* 41:6650–6663.

doi: 10.1093/nar/gkt337

- Haili N, Planchard N, Arnal N, et al (2016) The MTL1 pentatricopeptide repeat protein is required for both translation and splicing of the mitochondrial *NADH DEHYDROGENASE SUBUNIT7* mRNA in Arabidopsis. *Plant Physiol* 170:354–366. doi: 10.1104/pp.15.01591
- Hallam SJ, Putnam N, Preston CM, et al (2004) Reverse methanogenesis: Testing the hypothesis with environmental genomics. *Science* (80-) 305:1457–1462. doi: 10.1126/science.1100025
- Hamilton SR, O'Donnell JB, Hammet A, et al (2002) AMP-activated protein kinase kinase: Detection with recombinant AMPK α 1 subunit. *Biochem Biophys Res Commun* 293:892–898. doi: 10.1016/S0006-291X(02)00312-1
- Hammani K, Giegé P (2014) RNA metabolism in plant mitochondria. *Trends Plant Sci* 19:380–389. doi: 10.1016/j.tplants.2013.12.008
- Hammani K, Gobert A, Hleibieh K, et al (2011) An *Arabidopsis* dual-localized pentatricopeptide repeat protein interacts with nuclear proteins involved in gene expression regulation. *Plant Cell* 23:730–740. doi: 10.1105/tpc.110.081638
- Hammarstrand M, Wilson W, Corcoran M, et al (2001) Identification and characterization of two novel human mitochondrial elongation factor genes, *hEFG2* and *hEFG1*, phylogenetically conserved through evolution. *Hum Genet* 109:542–550. doi: 10.1007/s00439-001-0610-5
- Handa H (2003) The complete nucleotide sequence and RNA editing content of the mitochondrial genome of rapeseed (*Brassica napus* L.): comparative analysis of the mitochondrial genomes of rapeseed and *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* 31:5907–5916
- Hartl FU, Hayer-Hartl M (2002) Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein. *Science* (80-). 295:1852–1858
- Hartley DL, Kane JF (1988) Properties of inclusion bodies from recombinant *Escherichia coli*. *Biochem Soc Trans* 16:101–102. doi: 10.1042/bst0160101
- Hatefi Y (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem* 54:1015–1069. doi: 10.1146/annurev.bi.54.070185.005055
- Hauler A, Jonietz C, Stoll B, et al (2013) RNA PROCESSING FACTOR 5 is required for efficient 5' cleavage at a processing site conserved in RNAs of three different mitochondrial genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 74:593–604. doi: 10.1111/tpj.12143
- Hayes ML, Santibanez PI (2020) A plant pentatricopeptide repeat protein with a DYW-deaminase domain is sufficient for catalyzing C-to-U RNA editing *in vitro*. *J Biol Chem* 295:3497–3505. doi: 10.1074/jbc.RA119.011790
- Hazle T, Bonen L (2007) Comparative analysis of sequences preceding protein-coding mitochondrial genes in flowering plants. *Mol Biol Evol* 24:1101–1112. doi: 10.1093/molbev/msm030
- Heazlewood JL, Tonti-Filippini JS, Gout AM, et al (2004) Experimental analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins. *Plant Cell* 16:241–256. doi: 10.1105/tpc.016055
- Hellman LM, Fried MG (2007) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat Protoc* 2:1849–1861. doi: 10.1038/nprot.2007.249
- Hiesel R, Wissinger B, Schuster W, Brennicke A (1989) RNA editing in plant mitochondria. *Science* (80-) 246:1632–1634. doi: 10.1126/science.2480644

- Hirayama T, Matsuura T, Ushiyama S, et al (2013) A poly(A)-specific ribonuclease directly regulates the poly(A) status of mitochondrial mRNA in *Arabidopsis*. *Nat Commun* 4:1–9. doi: 10.1038/ncomms3247
- Hirose T, Fan Hao, Suzuki JY, et al (1996) Occurrence of silent RNA editing in chloroplasts: Its species specificity and the influence of environmental and developmental conditions. *Plant Mol Biol* 30:667–672. doi: 10.1007/BF00049342
- Hoch B, Maier RM, Appel K, et al (1991) Editing of a chloroplast mRNA by creation of an initiation codon. *Nature* 353:178–180. doi: 10.1038/353178a0
- Hochstrasser M (2000) Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems. *Nat. Cell Biol.* 2:E153–E157
- Holec S, Lange H, Canaday J, Gagliardi D (2008a) Coping with cryptic and defective transcripts in plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1779:566–573
- Holec S, Lange H, Dietrich A, Gagliardi D (2008b) Polyadenylation-mediated RNA degradation in plant mitochondria. *Methods Enzymol* 447:439–461. doi: 10.1016/S0076-6879(08)02221-0
- Holec S, Lange H, Kuhn K, et al (2006) Relaxed transcription in *Arabidopsis* mitochondria is counterbalanced by RNA stability control mediated by polyadenylation and polynucleotide phosphorylase. *Mol Cell Biol* 26:2869–2876. doi: 10.1128/MCB.26.7.2869-2876.2006
- Holzappel B, Wickert L (2007) Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Biol unserer Zeit* 37:120–126. doi: 10.1002/biuz.200610332
- Hölzle A, Jonietz C, Törjek O, et al (2011) A RESTORER OF FERTILITY-like PPR gene is required for 5'-end processing of the *nad4* mRNA in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 65:737–744. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04460.x
- Hooper CM, Tanz SK, Castleden IR, et al (2014) SUBAcon: a consensus algorithm for unifying the subcellular localization data of the *Arabidopsis* proteome. *Bioinformatics* 30:3356–3364. doi: 10.1093/bioinformatics/btu550
- Hruz T, Laule O, Szabo G, et al (2008) Genevestigator V3: A reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv Bioinformatics* 2008:1–5. doi: 10.1155/2008/420747
- Ichinose M, Tasaki E, Sugita C, Sugita M (2012) A PPR-DYW protein is required for splicing of a group II intron of *cox1* pre-mRNA in *Physcomitrella patens*. *Plant J* 70:271–278. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04869.x
- Ikeda TM, Gray MW (1999) Characterization of a DNA-binding protein implicated in transcription in wheat mitochondria. *Mol Cell Biol* 19:8113–8122. doi: 10.1128/mcb.19.12.8113
- Ingolia NT, Ghaemmaghami S, Newman JRS, Weissman JS (2009) Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* (80-) 324:218–223. doi: 10.1126/science.1168978
- Jacoby RP, Millar AH, Taylor NL (2015) Assessment of respiration in isolated plant mitochondria using Clark-type electrodes. *Methods Mol Biol* 1305:165–185. doi: 10.1007/978-1-4939-2639-8_12
- Jacoby RP, Taylor NL, Millar AH (2011) The role of mitochondrial respiration in salinity tolerance. *Trends Plant Sci* 16:614–623. doi: 10.1016/j.tplants.2011.08.002
- Jain R, Devine T, George AD, et al (2011) RIP-Chip analysis: RNA-binding protein immunoprecipitation-microarray (Chip) profiling. *Methods Mol Biol* 703:247–263. doi: 10.1007/978-1-59745-248-9_17

- Jenni S, Ban N (2003) The chemistry of protein synthesis and voyage through the ribosomal tunnel. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13:212–219
- Jones AR (2000) Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? *Trends Plant Sci* 5:225–230. doi: 10.1016/S1360-1385(00)01605-8
- Jonietz C, Forner J, Hildebrandt T, Binder S (2011) RNA PROCESSING FACTOR3 is crucial for the accumulation of mature *ccmC* transcripts in mitochondria of *Arabidopsis* accession Columbia. *Plant Physiol* 157:1430–1439. doi: 10.1104/pp.111.181552
- Jonietz C, Forner J, Hölzle A, et al (2010) RNA PROCESSING FACTOR2 is required for 5' end processing of *nad9* and *cox3* mRNAs in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 22:443–453. doi: 10.1105/tpc.109.066944
- Kadowaki K ichi, Ozawa K, Kazama S, et al (1995) Creation of an initiation codon by RNA editing in the *coxI* transcript from tomato mitochondria. *Curr Genet* 28:415–422. doi: 10.1007/BF00310809
- Kao C-Y, Read LK (2005) Opposing effects of polyadenylation on the stability of edited and unedited mitochondrial RNAs in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol* 25:1634–1644. doi: 10.1128/mcb.25.5.1634-1644.2005
- Kapust RB, Waugh DS (1999) *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci* 8:1668–1674. doi: 10.1110/ps.8.8.1668
- Ke J, Chen RZ, Ban T, et al (2013) Structural basis for RNA recognition by a dimeric PPR-protein complex. *Nat Struct Mol Biol* 20:1377–1382. doi: 10.1038/nsmb.2710
- Kempken F, Bolle N, Forner J, Binder S (2007) Transcript end mapping and analysis of RNA editing in plant mitochondria. *Methods Mol Biol* 372:177–192. doi: 10.1007/978-1-59745-365-3_13
- Keren I, Bezawork-Geleta A, Kolton M, et al (2009) AtnMat2, a nuclear-encoded maturase required for splicing of group-II introns in *Arabidopsis* mitochondria. *Rna* 15:2299–2311. doi: 10.1261/rna.1776409
- Keren I, Tal L, des Francs-Small CC, et al (2012) nMAT1, a nuclear-encoded maturase involved in the *trans*-splicing of *nad1* intron 1, is essential for mitochondrial complex I assembly and function. *Plant J* 71:413–426. doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.04998.x
- Khrouchtchova A, Monde RA, Barkan A (2012) A short PPR protein required for the splicing of specific group II introns in angiosperm chloroplasts. *RNA* 18:1197–1209. doi: 10.1261/rna.032623.112
- Kindgren P, Yap A, Bond CS, Small I (2015) Predictable alteration of sequence recognition by RNA editing factors from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 27:403–416. doi: 10.1105/tpc.114.134189
- Klein M, Binder S, Brennicke A (1998) Purification of mitochondria from *Arabidopsis*. *Methods Mol Biol* 82:49–53. doi: 10.1385/0-89603-391-0:49
- Klodmann J, Senkler M, Rode C, Braun HP (2011) Defining the protein complex proteome of plant mitochondria. *Plant Physiol* 157:587–598. doi: 10.1104/pp.111.182352
- Knie N, Grewe F, Fischer S, Knoop V (2016) Reverse U-to-C editing exceeds C-to-U RNA editing in some ferns - A monilophyte-wide comparison of chloroplast and mitochondrial RNA editing suggests independent evolution of the two processes in both organelles. *BMC Evol Biol* 16:1–12. doi: 10.1186/s12862-016-0707-z
- Knittler K (2011) Funktionelle Analyse von mitochondrialen PPR-Proteinen und ihrer Interaktionspartner. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

- Knoop V (2011) When you can't trust the DNA: RNA editing changes transcript sequences. *Cell. Mol. Life Sci.* 68:567–586
- Köhler D, Schmidt-Gattung S, Binder S (2010) The DEAD-box protein PMH2 is required for efficient group II intron splicing in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 72:459–467. doi: 10.1007/s11103-009-9584-9
- Kolaj O, Spada S, Robin S, Gerard JG (2009) Use of folding modulators to improve heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* 8:9
- Kolodziejczak M, Gibala M, Urantowka A, Hanna J (2007) The significance of *Arabidopsis* AAA proteases for activity and assembly/stability of mitochondrial OXPHOS complexes. *Physiol Plant* 129:135–142. doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00835.x
- Koprivova A, Francs-Small CC Des, Calder G, et al (2010) Identification of a pentatricopeptide repeat protein implicated in splicing of intron 1 of mitochondrial *nad7* transcripts. *J Biol Chem* 285:32192–32199. doi: 10.1074/jbc.M110.147603
- Kotera E, Tasaka M, Shikanai T (2005) A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts. *Nature* 433:326–330. doi: 10.1038/nature03229
- Kramer G, Boehringer D, Ban N, Bukau B (2009) The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16:589–597
- Krebs HA, Johnson WA (1937) Metabolism of ketonic acids in animal tissues. *Biochem J* 31:645–660. doi: 10.1042/bj0310645
- Kubo T, Nishizawa S, Sugawara A, et al (2000) The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNA(Cys)(GCA). *Nucleic Acids Res* 28:2571–2576. doi: 10.1093/nar/28.13.2571
- Kuhn J, Tengler U, Binder S (2001) Transcript lifetime is balanced between stabilizing stem-loop structures and degradation-promoting polyadenylation in plant mitochondria. *Mol Cell Biol* 21:731–742. doi: 10.1128/MCB.21.3.731-742.2001
- Kühn K, Bohne A-V, Liere K, et al (2007) *Arabidopsis* phage-type RNA polymerases: accurate in vitro transcription of organellar genes. *Plant Cell* 19:959–971. doi: 10.1105/tpc.106.046839
- Kühn K, Carrie C, Giraud E, et al (2011) The RCC1 family protein RUG3 is required for splicing of *nad2* and complex I biogenesis in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 67:1067–1080. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04658.x
- Kühn K, Richter U, Meyer EH, et al (2009) Phage-type RNA polymerase RPOTmp performs gene-specific transcription in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21:2762–2779. doi: 10.1105/tpc.109.068536
- Kühn K, Weihe A, Börner T (2005) Multiple promoters are a common feature of mitochondrial genes in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res* 33:337–346. doi: 10.1093/nar/gki179
- Kummer E, Leibundgut M, Rackham O, et al (2018) Unique features of mammalian mitochondrial translation initiation revealed by cryo-EM. *Nature* 560:263–267. doi: 10.1038/s41586-018-0373-y
- Kun W, Feng G, Renshan Z, et al (2011) Expression, purification, and secondary structure prediction of pentatricopeptide repeat protein RF1A from rice. *Plant Mol Biol Report* 29:739–744. doi: 10.1007/s11105-010-0260-7
- Kuo D, Nie M, Courey AJ (2014) SUMO as a solubility tag and in vivo cleavage of SUMO fusion proteins with Ulp1. *Methods Mol Biol* 1177:71–80. doi: 10.1007/978-1-4939-1034-2_6
- Kuzmenko A, Atkinson GC, Levitskii S, et al (2014) Mitochondrial translation initiation

- machinery: Conservation and diversification. *Biochimie* 100:132–140
- Kwasniak-Owczarek M, Kazmierczak U, Tomal A, et al (2019) Deficiency of mitoribosomal S10 protein affects translation and splicing in *Arabidopsis* mitochondria. *Nucleic Acids Res* 47:11790–11806. doi: 10.1093/nar/gkz1069
- Kwasniak M, Majewski P, Skibior R, et al (2013) Silencing of the nuclear RPS10 gene encoding mitochondrial ribosomal protein alters translation in arabidopsis mitochondria. *Plant Cell* 25:1855–1867. doi: 10.1105/tpc.113.111294
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685. doi: 10.1038/227680a0
- Laforest MJ, Roewer I, Lang BF (1997) Mitochondrial tRNAs in the lower fungus *Spizellomyces punctatus*: tRNA editing and UAG “stop” codons recognized as leucine. *Nucleic Acids Res* 25:626–632. doi: 10.1093/nar/25.3.626
- Laloi C, Apel K, Danon A (2004) Reactive oxygen signalling: the latest news. *Curr Opin Plant Biol* 7:323–328. doi: 10.1016/j.pbi.2004.03.005
- Laluk K, Abuqamar S, Mengiste T (2011) The *Arabidopsis* mitochondria-localized pentatricopeptide repeat protein PGN functions in defense against necrotrophic fungi and abiotic stress tolerance. *Plant Physiol* 156:2053–2068. doi: 10.1104/pp.111.177501
- Lang BF, Burger G, O’Kelly CJ, et al (1997) An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* 387:493–497. doi: 10.1038/387493a0
- Lange H, Sement FM, Canaday J, Gagliardi D (2009) Polyadenylation-assisted RNA degradation processes in plants. *Trends Plant Sci* 14:497–504. doi: 10.1016/j.tplants.2009.06.007
- Leidhold C, Voos W (2007) Chaperones and proteases guardians of protein integrity in eukaryotic organelles. *Ann N Y Acad Sci* 1113:72–86. doi: 10.1196/annals.1391.011
- Leino M, Landgren M, Glimelius K (2005) Alloplasmic effects on mitochondrial transcriptional activity and RNA turnover result in accumulated transcripts of *Arabidopsis orfs* in cytoplasmic male-sterile *Brassica napus*. *Plant J* 42:469–80. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02389.x
- Leu KC, Hsieh MH, Wang HJ, et al (2016) Distinct role of *Arabidopsis* mitochondrial P-type pentatricopeptide repeat protein-modulating editing protein, PPME, in *nad1* RNA editing. *RNA Biol* 13:593–604. doi: 10.1080/15476286.2016.1184384
- Li-Pook-Than J, Bonen L (2006) Multiple physical forms of excised group II intron RNAs in wheat mitochondria. *Nucleic Acids Res* 34:2782–2790. doi: 10.1093/nar/gkl328
- Li FW, Brouwer P, Carretero-Paulet L, et al (2018) Fern genomes elucidate land plant evolution and cyanobacterial symbioses. *Nat Plants* 4:460–472. doi: 10.1038/s41477-018-0188-8
- Li L, Nelson C, Fenske R, et al (2017) Changes in specific protein degradation rates in *Arabidopsis thaliana* reveal multiple roles of Lon1 in mitochondrial protein homeostasis. *Plant J* 89:458–471. doi: 10.1111/tpj.13392
- Li Y, Rosso MG, Viehoveer P, Weisshaar B (2007) GABI-Kat SimpleSearch: an *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database with detailed information for confirmed insertions. *Nucleic Acids Res* 35:874–878. doi: 10.1093/nar/gkl753
- Liere K, Weihe A, Börner T (2011) The transcription machineries of plant mitochondria and chloroplasts: Composition, function, and regulation. *J Plant Physiol* 168:1345–1360. doi: 10.1016/j.jplph.2011.01.005
- Lightowlers RN, Chrzanowska-Lightowlers ZM (2013) Human pentatricopeptide proteins: only a few and what do they do? *RNA Biol* 10:1433–1438. doi: 10.4161/rna.24770

- Lill R, Diekert K, Kaut A, et al (1999) The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Biol Chem* 380:1157–1166. doi: 10.1515/BC.1999.147
- Lilleorg S, Reier K, Pulk A, et al (2019) Bacterial ribosome heterogeneity: Changes in ribosomal protein composition during transition into stationary growth phase. *Biochimie* 156:169–180. doi: 10.1016/j.biochi.2018.10.013
- Lin S, Zhang H, Spencer DF, et al (2002) Widespread and extensive editing of mitochondrial mRNAs in dinoflagellates. *J Mol Biol* 320:727–739. doi: 10.1016/S0022-2836(02)00468-0
- Ling M, Merante F, Chen HS, et al (1997) The human mitochondrial elongation factor tu (*EF-Tu*) gene: CDNA sequence, genomic localization, genomic structure, and identification of a pseudogene. *Gene* 197:325–336. doi: 10.1016/S0378-1119(97)00279-5
- Lipinski KA, Puchta O, Surendranath V, et al (2011) Revisiting the Yeast PPR proteins- Application of an iterative hidden markov model algorithm reveals new members of the rapidly evolving family. *Mol Biol Evol* 28:2935–2948. doi: 10.1093/molbev/msr120
- Liu H, Wang Q, He Y, et al (2016) Genome-wide A-to-I RNA editing in fungi independent of ADAR enzymes. *Genome Res* 26:499–509. doi: 10.1101/gr.199877.115
- Liu S, Melonek J, Boykin LM, et al (2013a) PPR-SMRs. *RNA Biol* 10:1501–1510. doi: 10.4161/rna.26172
- Liu S, Melonek J, Boykin LM, et al (2013b) PPR-SMRs. *RNA Biol* 10:1501–1510. doi: 10.4161/rna.26172
- Liu Y, He J, Chen Z, et al (2010) *ABA overly-sensitive 5 (ABO5)*, encoding a pentatricopeptide repeat protein required for *cis*splicing of mitochondrial *nad2* intron 3, is involved in the abscisic acid response in Arabidopsis. *Plant J* 63:749–765. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04280.x
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Logan DC, Knight MR (2003) Mitochondrial and cytosolic calcium dynamics are differentially regulated in plants. *Plant Physiol* 133:21–24. doi: 10.1104/pp.103.026047
- Lonergan KM, Gray MW (1993) Editing of transfer RNAs in *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. *Science* (80-) 259:812–816. doi: 10.1126/science.8430334
- Lu B, Hanson MR (1994) A single homogeneous form of ATP6 protein accumulates in petunia mitochondria despite the presence of differentially edited atp6 transcripts. *Plant Cell* 6:1955–1968. doi: 10.1105/tpc.6.12.1955
- Lu B, Wilson RK, Phreaner CG, et al (1996) Protein polymorphism generated by differential RNA editing of a plant mitochondrial *rps12* gene. *Mol Cell Biol* 16:1543–1549. doi: 10.1128/mcb.16.4.1543
- Lu M, Draper DE (1994) Bases defining an ammonium and magnesium ion-dependent tertiary structure within the large subunit ribosomal RNA. *J Mol Biol* 244:572–585. doi: 10.1006/jmbi.1994.1753
- Lurin C, Andre C, Caboche M, et al (2004) Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* 16:2089–2103. doi: 10.1105/tpc.104.022236.discover
- Lutz R, Bujard H (1997) Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Res* 25:1203–1210. doi: 10.1093/nar/25.6.1203

- Mackenzie S a., McIntosh L (1999) Higher plant mitochondria. *Plant Cell* 11:571–586. doi: 10.1105/tpc.11.4.571
- Mahendran R, Spottswood MR, Miller DL (1991) RNA editing by cytidine insertion in mitochondria of *Physarum polycephalum*. *Nature* 349:434–438. doi: 10.1038/349434a0
- Malakhov MP, Mattern MR, Malakhova OA, et al (2004) SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *J Struct Funct Genomics* 5:75–86. doi: 10.1023/B:JSFG.0000029237.70316.52
- Manavski N, Guyon V, Meurer J, et al (2012) An essential pentatricopeptide repeat protein facilitates 5' maturation and translation initiation of *rps3* mRNA in maize mitochondria. *Plant Cell* 24:3087–3105. doi: 10.1105/tpc.112.099051
- Manna S (2015) An overview of pentatricopeptide repeat proteins and their applications. *Biochimie* 113:93–99
- Marblestone JG (2006) Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: Enhanced expression and solubility with SUMO. *Protein Sci* 15:182–189. doi: 10.1110/ps.051812706
- Martijn J, Vosseberg J, Guy L, et al (2018) Deep mitochondrial origin outside the sampled alphaproteobacteria. *Nature* 557:101–105. doi: 10.1038/s41586-018-0059-5
- Matthes A, Schmidt-Gattung S, Köhler D, et al (2007) Two DEAD-box proteins may be part of RNA-dependent high-molecular-mass protein complexes in arabidopsis mitochondria. *Plant Physiol* 145:1637–1646. doi: 10.1104/pp.107.108076
- Mauro VP, Edelman GM (2007) The ribosome filter redux. *Cell Cycle* 6:2246–2251. doi: 10.4161/cc.6.18.4739
- McCulloch V, Seidel-Rogol BL, Shadel GS (2002) A human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds S-adenosylmethionine. *Mol Cell Biol* 22:1116–1125. doi: 10.1128/mcb.22.4.1116-1125.2002
- Melchior F (2000) SUMO - Nonclassical ubiquitin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:591–626
- Michel F, Ferat J-L (1995) Structure and activities of group II introns. *Annu Rev Biochem* 64:435–461. doi: 10.1146/annurev.bi.64.070195.002251
- Michel F, Lang BF (1985) Mitochondrial class II introns encode proteins related to the reverse transcriptases of retroviruses. *Nature* 316:641–643. doi: 10.1038/316641a0
- Millar AH, Sweetlove LJ, Giege P, Leaver CJ (2001) Analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome. *Plant Physiol* 127:1711–1727. doi: 10.1104/pp.010387.The
- Millar AH, Whelan J, Soole KL, Day DA (2011) Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. *Annu Rev Plant Biol* 62:79–104. doi: 10.1146/annurev-arplant-042110-103857
- Mitchell P (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191:144–148. doi: 10.1038/191144a0
- Miyata Y, Sugita M (2004) Tissue- and stage-specific RNA editing of *rps 14* transcripts in moss (*Physcomitrella patens*) chloroplasts. *J Plant Physiol* 161:113–115. doi: 10.1078/0176-1617-01220
- Mohr G, Lambowitz AM (2003) Putative proteins related to group II intron reverse transcriptase/maturases are encoded by nuclear genes in higher plants. *Nucleic Acids Res* 31:647–652. doi: 10.1093/nar/gkg153
- Moller IM (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52:561–591. doi: 10.1146/annurev.arplant.52.1.561

- Moreno JI, Patlolla B, Belton KR, et al (2012) Two independent activities define Ccm1p as a moonlighting protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Rep* 32:549–557. doi: 10.1042/BSR20120066
- Mulero JJ, Fox TD (1993) *PET111* acts in the 5'-leader of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial *COX2* mRNA to promote its translation. *Genetics* 133:509–516
- Müller S, Hoegge C, Pyrowolakis G, Jentsch S (2001) Sumo, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:202–210
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, et al (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51:263–273
- Muralla R, Lloyd J, Meinke D (2011) Molecular foundations of reproductive lethality in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 6:e28398. doi: 10.1371/journal.pone.0028398
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Murayama M, Hayashi S, Nishimura N, et al (2012) Isolation of *Arabidopsis ahg11*, a weak ABA hypersensitive mutant defective in *nad4* RNA editing. *J Exp Bot* 63:5301–5310. doi: 10.1093/jxb/ers188
- Nathans D, Smith HO (1975) Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of dna molecules. *Annu Rev Biochem* 44:273–293. doi: 10.1146/annurev.bi.44.070175.001421
- Navrot N, Rouhier N, Gelhaye E, Jacquot J-P (2007) Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiol Plant* 129:185–195. doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00777.x
- Nissen P, Hansen J, Ban N, et al (2000) The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* (80-) 289:920–930. doi: 10.1126/science.289.5481.920
- O'Toole N, Hattori M, Andres C, et al (2008) On the expansion of the pentatricopeptide repeat gene family in plants. *Mol Biol Evol* 25:1120–1128. doi: 10.1093/molbev/msn057
- Oda K, Kohchi T, Ohyama K (1992) Mitochondrial DNA of *Marchantia polymorpha* as a single circular form with no incorporation of foreign DNA. *Biosci Biotechnol Biochem* 56:132–135. doi: 10.1271/bbb.56.132
- Ogura T, Wilkinson AJ (2001) AAA+ superfamily ATPases: Common structure-diverse function. *Genes to Cells* 6:575–597
- Ohyama K, Takemura M, Oda K, et al (2009) Gene content, organization and molecular evolution of plant organellar genomes and sex chromosomes: insights from the case of the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85:108–124. doi: 10.2183/pjab.85.108
- Okuda K, Shoki H, Arai M, et al (2014) Quantitative analysis of motifs contributing to the interaction between PLS-subfamily members and their target RNA sequences in plastid RNA editing. *Plant J* 80:870–882. doi: 10.1111/tpj.12687
- Oldenkott B, Yamaguchi K, Tsuji-Tsukinoki S, et al (2014) Chloroplast RNA editing going extreme: More than 3400 events of C-to-U editing in the chloroplast transcriptome of the lycophyte *Selaginella uncinata*. *RNA* 20:1499–1506. doi: 10.1261/rna.045575.114
- Oldenkott B, Yang Y, Lesch E, et al (2019) Plant-type pentatricopeptide repeat proteins with a DYW domain drive C-to-U RNA editing in *Escherichia coli*. *Commun Biol* 2:1–8. doi: 10.1038/s42003-019-0328-3
- Ott M, Prestele M, Bauerschmitt H, et al (2006) Mba1, a membrane-associated ribosome receptor in mitochondria. *EMBO J* 25:1603–1610. doi: 10.1038/sj.emboj.7601070

- Perrin R, Lange H, Grienenberger J-M, Gagliardi D (2004a) AtmtPNPase is required for multiple aspects of the 18S rRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana* mitochondria. *Nucleic Acids Res* 32:5174–5182. doi: 10.1093/nar/gkh852
- Perrin R, Meyer EH, Zaepfel M, et al (2004b) Two exoribonucleases act sequentially to process mature 3'-ends of *atp9* mRNAs in *Arabidopsis* mitochondria. *J Biol Chem* 279:25440–25446. doi: 10.1074/jbc.M401182200
- Petrov AS, Gulen B, Norris AM, et al (2015) History of the ribosome and the origin of translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:15396–15401. doi: 10.1073/pnas.1509761112
- Pfalz J, Liere K, Kandlbinder A, et al (2006) pTAC2, -6, and -12 are components of the transcriptionally active plastid chromosome that are required for plastid gene expression. *Plant Cell* 18:176–197. doi: 10.1105/tpc.105.036392
- Pfeffer S, Woellhaf MW, Herrmann JM, Förster F (2015) Organization of the mitochondrial translation machinery studied in situ by cryoelectron tomography. *Nat Commun* 6:1–8. doi: 10.1038/ncomms7019
- Phreaner CG, Williams MA, Mulligan RM (1996) Incomplete editing of *rps12* transcripts results in the synthesis of polymorphic polypeptides in plant mitochondria. *Plant Cell* 8:107–117
- Planchard N, Bertin P, Quadrado M, et al (2018) The translational landscape of *Arabidopsis* mitochondria. *Nucleic Acids Res* 46:6218–6228. doi: 10.1093/nar/gky489
- Podmore AHB, Reynolds PE (2002) Purification and characterization of VanXYc, a D,D-dipeptidase/D,D-carboxypeptidase in vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Eur J Biochem* 269:2740–2746. doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.02946.x
- Polikanov YS, Steitz TA, Innis CA (2014) A proton wire to couple aminoacyl-tRNA accommodation and peptide-bond formation on the ribosome. *Nat Struct Mol Biol* 21:787–793. doi: 10.1038/nsmb.2871
- Portereiko MF, Sandaklie-Nikolova L, Lloyd A, et al (2006) NUCLEAR FUSION DEFECTIVE1 encodes the *Arabidopsis* RPL21M protein and is required for karyogamy during female gametophyte development and fertilization. *Plant Physiol* 141:957–965. doi: 10.1104/pp.106.079319
- Powell LM, Wallis SC, Pease RJ, et al (1987) A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell* 50:831–840. doi: 10.1016/0092-8674(87)90510-1
- Prikryl J, Rojas M, Schuster G, 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. doi: 10.1073/pnas.1012076108
- Qin PZ, Pyle AM (1998) The architectural organization and mechanistic function of group II intron structural elements. *Curr Opin Struct Biol* 8:301–308. doi: 10.1016/S0959-440X(98)80062-6
- Raczynska KD, Le Ret M, Rurek M, et al (2006) Plant mitochondrial genes can be expressed from mRNAs lacking stop codons. *FEBS Lett* 580:5641–5646. doi: 10.1016/j.febslet.2006.09.010
- Rahire M, Laroche F, Cerutti L, Rochaix JD (2012) Identification of an OPR protein involved in the translation initiation of the PsaB subunit of photosystem I. *Plant J* 72:652–661. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2012.05111.x
- Rahman A, Amakawa T, Goto N, Tsurumi S (2001) Auxin is a positive regulator for ethylene-mediated response in the growth of *Arabidopsis* roots. *Plant Cell Physiol* 42:301–307
- Ramrath DJF, Niemann M, Leibundgut M, et al (2018) Evolutionary shift toward protein-based architecture in trypanosomal mitochondrial ribosomes. *Science* (80-) 362:7735. doi:

10.1126/science.aau7735

- Randau L, Stanley BJ, Kohlway A, et al (2009) A cytidine deaminase edits c to u in transfer RNAs in archaea. *Science* (80-) 324:657–659. doi: 10.1126/science.1170123
- Raran-Kurussi S, Waugh DS (2012) The ability to enhance the solubility of its fusion partners is an intrinsic property of maltose-binding protein but their folding is either spontaneous or chaperone-mediated. *PLoS One* 7:e49589. doi: 10.1371/journal.pone.0049589
- Rayapuram N, Hagenmuller J, Grienenberger JM, et al (2008) The three mitochondrial encoded CcmF proteins form a complex that interacts with CCMH and c -type apocytochromes in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 283:25200–25208. doi: 10.1074/jbc.M802621200
- Richter R, Rorbach J, Pajak A, et al (2010a) A functional peptidyl-tRNA hydrolase, ICT1, has been recruited into the human mitochondrial ribosome. *EMBO J* 29:1116–1125. doi: 10.1038/emboj.2010.14
- Richter U, Kühn K, Okada S, et al (2010b) A mitochondrial rRNA dimethyladenosine methyltransferase in *Arabidopsis*. *Plant J* 61:558–569. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.04079.x
- Rivals E, Bruyère C, Toffano-Nioche C, Lecharny A (2006a) Formation of the *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat family. *Plant Physiol* 141:825–839. doi: 10.1104/pp.106.077826
- Rivals E, Bruyère C, Toffano-Nioche C, Lecharny A (2006b) Formation of the *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat family. *Plant Physiol* 141:825–839. doi: 10.1104/pp.106.077826
- Robles P, Quesada V (2017) Emerging roles of mitochondrial ribosomal proteins in plant development. *Int J Mol Sci* 18:1–12. doi: 10.3390/ijms18122595
- Roloff GA, Henry MF (2015) Mam33 promotes cytochrome c oxidase subunit i translation in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Mol Biol Cell* 26:2885–2894. doi: 10.1091/mbc.E15-04-0222
- Rovira AG, Smith AG (2019) PPR proteins – orchestrators of organelle RNA metabolism. *Physiol Plant* 166:451–459. doi: 10.1111/ppl.12950
- Rüdinger M, Funk HT, Rensing SA, et al (2009) RNA editing: Only eleven sites are present in the *Physcomitrella patens* mitochondrial transcriptome and a universal nomenclature proposal. *Mol Genet Genomics* 281:473–481. doi: 10.1007/s00438-009-0424-z
- Rüdinger M, Volkmar U, Lenz H, et al (2012) Nuclear DYW-type PPR gene families diversify with increasing RNA editing frequencies in liverwort and moss mitochondria. *J Mol Evol* 74:37–51. doi: 10.1007/s00239-012-9486-3
- Rugen N, Straube H, Franken LE, et al (2019) Complexome profiling reveals association of PPR proteins with ribosomes in the mitochondria of plants. *Mol Cell Proteomics* 18:1345–1362. doi: 10.1074/MCP.RA119.001396
- Ruwe H, Gutmann B, Schmitz-Linneweber C, et al (2019) The E domain of CRR2 participates in sequence-specific recognition of RNA in plastids. *New Phytol* 222:218–229. doi: 10.1111/nph.15578
- Ruwe H, Wang G, Gusewski S, Schmitz-Linneweber C (2016) Systematic analysis of plant mitochondrial and chloroplast small RNAs suggests organelle-specific mRNA stabilization mechanisms. *Nucleic Acids Res* 44:7406–7417. doi: 10.1093/nar/gkw466
- Sabar M, Balk J, Leaver CJ (2005) Histochemical staining and quantification of plant mitochondrial respiratory chain complexes using blue-native polyacrylamide gel electrophoresis. *Plant J* 44:893–901. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02577.x
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA

- with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487–491. doi: 10.1126/science.2448875
- Sakamoto W, Kondo H, Murata M, Motoyoshi F (1996) Altered mitochondrial gene expression in a maternal distorted leaf mutant of *Arabidopsis* induced by *chloroplast mutator*. *Plant Cell* 8:1377–1390
- Sakamoto W, Zaltsman A, Adam Z, Takahashi Y (2003) Coordinated regulation and complex formation of yellow variegated1 and yellow variegated2, chloroplastic FtsH metalloproteases involved in the repair cycle of photosystem II in *Arabidopsis* thylakoid membranes. *Plant Cell* 15:2843–2855. doi: 10.1105/tpc.017319
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanchez-Puerta M V., Cho Y, Mower JP, et al (2008) Frequent, phylogenetically local horizontal transfer of the *cox1* group I intron in flowering plant mitochondria. *Mol Biol Evol* 25:1762–1777. doi: 10.1093/molbev/msn129
- Sanger F, Nicklen S, Coulson R (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463–5467. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463
- Saraste M (1999) Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 283:1488–1493. doi: 10.1126/science.283.5407.1488
- Schäfer B (2005) RNA maturation in mitochondria of *S. cerevisiae* and *S. pombe*. In: *Gene*. Elsevier, pp 80–85
- Schallenberg-Rüdinger M, Knoop V (2016) Coevolution of organelle RNA editing and nuclear specificity factors in early land plants. *Adv Bot Res* 78:37–93. doi: 10.1016/bs.abr.2016.01.002
- Schallenberg-Rüdinger M, Lenz H, Polsakiewicz M, et al (2013) A survey of PPR proteins identifies DYW domains like those of land plant RNA editing factors in diverse eukaryotes. *RNA Biol* 10:1549–1556. doi: 10.4161/rna.25755
- Scheckhuber CQ, Houthoofd K, Weil AC, et al (2011) Alternative oxidase dependent respiration leads to an increased mitochondrial content in two long-lived mutants of the ageing model *Podospira anserina*. *PLoS One* 6:e16620. doi: 10.1371/journal.pone.0016620
- Schein CH, Noteborn MHM (1988) Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Nat Biotechnol* 6:291–294. doi: 10.1038/nbt0388-291
- Schmeing TM, Ramakrishnan V (2009) What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature* 461:1234–1242
- Schmidt TM (2010) Funktionelle Charakterisierung zweier mitochondrialer PPR-Proteine aus *Arabidopsis thaliana*
- Schmitz-Linneweber C, Small I (2008) Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends Plant Sci* 13:663–670. doi: 10.1016/j.tplants.2008.10.001
- Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier R, 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. doi: 10.1105/tpc.105.034454.2
- Sechet J, Roux C, Plessis A, et al (2015) The ABA-deficiency suppressor locus HAS2 encodes the PPR protein LOI1/MEF11 involved in mitochondrial RNA editing. *Mol Plant* 8:644–656. doi: 10.1016/j.molp.2014.12.005

- Senkler J, Senkler M, Eubel H, et al (2017) The mitochondrial complexome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 89:1079–1092. doi: 10.1111/tpj.13448
- Shen C, Zhang D, Guan Z, et al (2016) Structural basis for specific single-stranded RNA recognition by designer pentatricopeptide repeat proteins. *Nat Commun* 7:1–8. doi: 10.1038/ncomms11285
- Shevtsov S, Nevo-Dinur K, Faigon L, et al (2018) Control of organelle gene expression by the mitochondrial transcription termination factor mTERF22 in *Arabidopsis thaliana* plants. *PLoS One* 13:e0201631. doi: 10.1371/journal.pone.0201631
- Shi X, Bentolila S, Hanson MR (2016a) Organelle RNA recognition motif-containing (ORRM) proteins are plastid and mitochondrial editing factors in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* 11:e1167299. doi: 10.1080/15592324.2016.1167299
- Shi X, Germain A, Hanson MR, Bentolila S (2016b) RNA recognition motif-containing protein ORRM4 broadly affects mitochondrial RNA editing and impacts plant development and flowering. *Plant Physiol* 170:294–309. doi: 10.1104/pp.15.01280
- Shi X, Hanson MR, St´ S, Bentolila S (2015) Two RNA recognition motif-containing proteins are plant mitochondrial editing factors. *Nucleic Acids Res* 43:3814–3825. doi: 10.1093/nar/gkv245
- Singh R, Singh S, Parihar P, et al (2015) Retrograde signaling between plastid and nucleus: A review. *J Plant Physiol* 181:55–66. doi: 10.1016/j.jplph.2015.04.001
- Skinner DJ, Baker SC, Meister RJ, et al (2001) The *Arabidopsis* *HUELLENLOS* gene, which is essential for normal ovule development, encodes a mitochondrial ribosomal protein. *Plant Cell* 13:2719–2730. doi: 10.1105/tpc.010323
- Sloan DB, Alverson AJ, Chuckalovcak JP, et al (2012) Rapid evolution of enormous, multichromosomal genomes in flowering plant mitochondria with exceptionally high mutation rates. *PLoS Biol* 10:e1001241. doi: 10.1371/journal.pbio.1001241
- Sloan DB, Warren JM, Williams AM, et al (2018a) Cytonuclear integration and co-evolution. *Nat Rev Genet* 19:635–648. doi: 10.1038/s41576-018-0035-9
- Sloan DB, Wu Z, Sharbrough J (2018b) Correction of persistent errors in *Arabidopsis* reference mitochondrial genomes. *Plant Cell* 30:525–527
- Sloof P, de Haan A, Eier W, et al (1992) The nucleotide sequence of the variable region in *Trypanosoma brucei* completes the sequence analysis of the maxicircle component of mitochondrial kinetoplast DNA. *Mol Biochem Parasitol* 56:289–299. doi: 10.1016/0166-6851(92)90178-M
- Small I, Peeters D (2000) The PPR motif – a TPR-related motif. *Trends Biochem Sci* 0004:45–47
- Small ID, Schallenberg-Rüdinger M, Takenaka M, et al (2020) Plant organellar RNA editing: what 30 years of research has revealed. *Plant J* 101:1040–1056. doi: 10.1111/tpj.14578
- Soto IC, Barrientos A (2016) Mitochondrial cytochrome c oxidase biogenesis is regulated by the redox state of a heme-binding translational activator. *Antioxidants Redox Signal* 24:281–298. doi: 10.1089/ars.2015.6429
- Soto IC, Fontanesi F, Liu J, Barrientos A (2012) Biogenesis and assembly of eukaryotic cytochrome c oxidase catalytic core. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1817:883–897
- Spinelli JB, Haigis MC (2018) The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat Cell Biol* 20:745–754. doi: 10.1038/s41556-018-0124-1
- Staudinger M, Bolle N, Kempken F (2005) Mitochondrial electroporation and in organello RNA editing of chimeric *atp6* transcripts. *Mol Genet Genomics* 273:130–136. doi:

10.1007/s00438-005-1117-x

- Staudinger M, Kempken F (2003) Electroporation of isolated higher-plant mitochondria: Transcripts of an introduced *cox2* gene, but not an *atp6* gene, are edited *in organello*. *Mol Genet Genomics* 269:553–561. doi: 10.1007/s00438-003-0863-x
- Steitz TA (2008) A structural understanding of the dynamic ribosome machine. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:242–253
- Stern DB, Goldschmidt-Clermont M, Hanson MR (2010) Chloroplast RNA metabolism. *Annu Rev Plant Biol* 61:125–155. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112242
- Stoll B, Zandler D, Binder S (2014) RNA processing factor 7 and polynucleotide phosphorylase are necessary for processing and stability of *nad2* mRNA in Arabidopsis mitochondria. *RNA Biol* 11:968–976. doi: 10.4161/rna.29781
- Stoll K, Jonietz C, Binder S (2015) In *Arabidopsis thaliana* two co-adapted cyto-nuclear systems correlate with distinct *ccmC* transcript sizes. *Plant J* 81:247–257. doi: 10.1111/tpj.12724
- Studier FW, Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189:113–130. doi: 10.1016/0022-2836(86)90385-2
- Sultan LD, Mileshina D, Grewe F, et al (2016) The reverse transcriptase/RNA maturase protein MatR is required for the splicing of various group ii introns in Brassicaceae mitochondria. *Plant Cell* 28:2805–2829. doi: 10.1105/tpc.16.00398
- Sun T, Bentolila S, Hanson MR (2016) The unexpected diversity of plant organelle RNA editosomes. *Trends Plant Sci.* 21:962–973
- Sun T, Shi X, Friso G, et al (2015) A zinc finger motif-containing protein is essential for chloroplast RNA editing. *PLOS Genet* 11:e1005028. doi: 10.1371/journal.pgen.1005028
- Takenaka M (2004) Complex *cis*-elements determine an RNA editing site in pea mitochondria. *Nucleic Acids Res* 32:4137–4144. doi: 10.1093/nar/gkh763
- Takenaka M, Jörg A, Burger M, Haag S (2019) RNA editing mutants as surrogates for mitochondrial SNP mutants. *Plant Physiol Biochem* 135:310–321. doi: 10.1016/j.plaphy.2018.12.014
- Takenaka M, Verbitskiy D, Zehrmann A, Brennicke A (2010) Reverse genetic screening identifies five E-class PPR proteins involved in RNA editing in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 285:27122–27129. doi: 10.1074/jbc.M110.128611
- Takenaka M, Zehrmann A, Brennicke A, Graichen K (2013a) Improved computational target site prediction for pentatricopeptide repeat RNA editing factors. *PLoS One* 8:e65343. doi: 10.1371/journal.pone.0065343
- Takenaka M, Zehrmann A, Verbitskiy D, et al (2013b) RNA editing in plants and its evolution. *Annu Rev Genet* 47:335–352. doi: 10.1146/annurev-genet-111212-133519
- Takenaka M, Zehrmann A, Verbitskiy D, et al (2012) Multiple organellar RNA editing factor (MORF) family proteins are required for RNA editing in mitochondria and plastids of plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:5104–5109. doi: 10.1073/pnas.1202452109
- Tanaka K, Suzukil T, Chiba and T The ligation systems for ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Mol Cells* 8:503–512
- Thomas SM, Lamb RA, Paterson RG (1988) Two mRNAs that differ by two nontemplated nucleotides encode the amino coterminal proteins P and V of the paramyxovirus SV5. *Cell* 54:891–902. doi: 10.1016/S0092-8674(88)91285-8
- Tillich M, Hardel SL, Kupsch C, et al (2009) Chloroplast ribonucleoprotein CP31A is required

- for editing and stability of specific chloroplast mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:6002–6007. doi: 10.1073/pnas.0808529106
- Tomal A, Kwasniak-Owczarek M, Janska H (2019) An update on mitochondrial ribosome biology: The plant mitoribosome in the spotlight. *Cells* 8:E1562. doi: 10.3390/cells8121562
- Tomoyasu T, Mogk A, Langen H, et al (2001) Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the *Escherichia coli* cytosol. *Mol Microbiol* 40:397–413. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02383.x
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350–4354. doi: 10.1002/bies.950190612
- Truscott KN, Brandner K, Pfanner N (2003) Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr. Biol.* 13:R326–R337
- Turmel M, Otis C, Lemieux C (2003) The mitochondrial genome of *Chara vulgaris*: Insights into the mitochondrial DNA architecture of the last common ancestor of green algae and land plants. *Plant Cell* 15:1888–1903. doi: 10.1105/tpc.013169
- Tyagi S, Pande V, Das A (2014) Whole mitochondrial genome sequence of an Indian *Plasmodium falciparum* field isolate. *Korean J Parasitol* 52:99–103. doi: 10.3347/kjp.2014.52.1.99
- Unsold M, Marienfeld JR, Brandt P, Brennicke A (1997) The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nat Genet* 15:57–61. doi: 10.1038/ng0197-57
- Uyttewaal M, Arnal N, Quadrado M, et al (2008a) Characterization of *Raphanus sativus* pentatricopeptide repeat proteins encoded by the fertility restorer locus for Ogura cytoplasmic male sterility. *Plant Cell* 20:3331–3345. doi: 10.1105/tpc.107.057208
- Uyttewaal M, Mireau H, Rurek M, et al (2008b) PPR336 is associated with polysomes in plant mitochondria. *J Mol Biol* 375:626–636. doi: 10.1016/j.jmb.2007.11.011
- Vandecasteele G, Szabadkai G, Rizzuto R (2001) Mitochondrial calcium homeostasis: mechanisms and molecules. *IUBMB Life* 52:213–219. doi: 10.1080/15216540152846028
- Vasina JA, Peterson MS, Baneyx F (1998) Scale-up and optimization of the low-temperature inducible cspA promoter system. *Biotechnol Prog* 14:714–721. doi: 10.1021/bp980061p
- Vempati UD, Han X, Moraes CT (2009) Lack of cytochrome c in mouse fibroblasts disrupts assembly/stability of respiratory complexes I and IV. *J Biol Chem* 284:4383–4391. doi: 10.1074/jbc.M805972200
- Vera A, González-Montalbán N, Arís A, Villaverde A (2007) The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. *Biotechnol Bioeng* 96:1101–1106. doi: 10.1002/bit.21218
- Verbitskiy D, Zehrmann A, Van Der Merwe JA, et al (2010) The PPR protein encoded by the *lovastatin insensitive 1* gene is involved in RNA editing at three sites in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 61:446–455. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.04076.x
- Wahleithner JA, Macfarlane JL, Wolstenholme DR (1990) A sequence encoding a maturase-related protein in a group II intron of a plant mitochondrial *nad1* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:548–552. doi: 10.1073/pnas.87.2.548
- Walkley CR, Li JB (2017) Rewriting the transcriptome: Adenosine-to-inosine RNA editing by ADARs. *Genome Biol.* 18:1–13
- Walter M, Piepenburg K, Schöttler MA, et al (2010) Knockout of the plastid RNase E leads to

- defective RNA processing and chloroplast ribosome deficiency. *Plant J* 64:851–863. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04377.x
- Waltz F, Corre N, Hashem Y, Giegé P (2020a) Specificities of the plant mitochondrial translation apparatus. *Mitochondrion* 53:30–37. doi: 10.1016/j.mito.2020.04.008
- Waltz F, Giegé P (2020) Striking diversity of mitochondria-specific translation processes across eukaryotes. *Trends Biochem Sci* 45:149–162. doi: 10.1016/j.tibs.2019.10.004
- Waltz F, Nguyen T-T, Arrivé M, et al (2019) Small is big in *Arabidopsis* mitochondrial ribosome. *Nat plants* 5:106–117. doi: 10.1038/s41477-018-0339-y
- Waltz F, Soufari H, Bochler A, et al (2020b) Cryo-EM structure of the RNA-rich plant mitochondrial ribosome. *Nat plants* 6:377–383. doi: 10.1038/s41477-020-0631-5
- Wang X, Auwerx J (2017) Systems phytohormone responses to mitochondrial proteotoxic stress. *Mol Cell* 68:540-551.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2017.10.006
- Wank H, SanFilippo J, Singh RN, et al (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. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80371-8
- Watanabe N, Wachi S, Fujita T (2003) Identification and Characterization of BCL-3-binding Protein. *J Biol Chem* 278:26102–26110. doi: 10.1074/jbc.M303518200
- Weigel D, Glazebrook J (2002) *Arabidopsis: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Weijers D, Franke-van Dijk M, Vencken RJ, et al (2001) An *Arabidopsis* Minute-like phenotype caused by a semi-dominant mutation in a *RIBOSOMAL PROTEIN S5* gene. *Development* 128:4289–4299
- Williams-Carrier R, Kroeger T, Barkan A (2008) Sequence-specific binding of a chloroplast pentatricopeptide repeat protein to its native group II intron ligand. *RNA* 14:1930–1941. doi: 10.1261/rna.1077708
- Williams MA, Tallakson WA, Phreaner CG, Mulligan RM (1998) Editing and translation of ribosomal protein S13 transcripts: unedited translation products are not detectable in maize mitochondria. *Curr Genet* 34:221–226. doi: 10.1007/s002940050390
- Wolf J, Gerber AÂP, Keller W (2002) *tadA*, an essential tRNA-specific adenosine deaminase from *Escherichia coli*. *EMBO J* 21:3841–3851
- Woloszynska M, Kmiec B, Mackiewicz P, Janska H (2006) Copy number of bean mitochondrial genes estimated by real-time PCR does not correlate with the number of gene loci and transcript levels. *Plant Mol Biol* 61:1–12. doi: 10.1007/s11103-005-5773-3
- Woodson JD, Chory J (2008) Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nat Rev Genet* 9:383–395. doi: 10.1038/nrg2348
- Xie T, Chen D, Wu J, et al (2016) Growing Slowly 1 locus encodes a PLS-type PPR protein required for RNA editing and plant development in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 67:5687–5698. doi: 10.1093/jxb/erw331
- Yagi Y, Hayashi S, Kobayashi K, et al (2013) Elucidation of the RNA recognition code for pentatricopeptide repeat proteins involved in organelle RNA editing in plants. *PLoS One* 8:e57286. doi: 10.1371/journal.pone.0057286
- Yamazaki H, Tasaka M, 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. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02035.x
- Yan J, Yao Y, Hong S, et al (2019) Delineation of pentatricopeptide repeat codes for target RNA prediction. *Nucleic Acids Res* 47:3728–3738. doi: 10.1093/nar/gkz075

- Yan J, Zhang Q, Guan Z, et al (2017) MORF9 increases the RNA-binding activity of PLS-type pentatricopeptide repeat protein in plastid RNA editing. *Nat Plants* 3:1–8. doi: 10.1038/nplants.2017.37
- Yeh ETH, Gong L, Kamitani T (2000) Ubiquitin-like proteins: New wines in new bottles. *Gene* 248:1–14
- Yin P, Li Q, Yan C, et al (2013) Structural basis for the modular recognition of single-stranded RNA by PPR proteins. *Nature* 504:168–171. doi: 10.1038/nature12651
- Yuan H, Liu D (2012) Functional disruption of the pentatricopeptide protein SLG1 affects mitochondrial RNA editing, plant development, and responses to abiotic stresses in *Arabidopsis*. *Plant J* 70:432–444. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04883.x
- Yusupova G, Yusupov M (2017) Crystal structure of eukaryotic ribosome and its complexes with inhibitors. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 372:20160184. doi: 10.1098/rstb.2016.0184
- Yusupova G, Yusupov M (2014) High-resolution structure of the eukaryotic 80S ribosome. *Annu Rev Biochem* 83:467–486. doi: 10.1146/annurev-biochem-060713-035445
- Zaremba-Niedzwiedzka K, Caceres EF, Saw JH, et al (2017) Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature* 541:353–358. doi: 10.1038/nature21031
- Zauner S, Greilinger D, Laatsch T, et al (2004) Substitutional editing of transcripts from genes of cyanobacterial origin in the dinoflagellate *Ceratium horridum*. *FEBS Lett* 577:535–538. doi: 10.1016/j.febslet.2004.10.060
- Zehrmann A, Härtel B, Glass F, et al (2015) Selective homo- and heteromer interactions between the multiple organellar RNA editing factor (MORF) proteins in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 290:6445–6456. doi: 10.1074/jbc.M114.602086
- Zehrmann A, Verbitskiy D, Van Der Merwe JA, et al (2009) A DYW domain-containing pentatricopeptide repeat protein is required for RNA editing at multiple sites in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21:558–567. doi: 10.1105/tpc.108.064535
- Zeng R, Smith E, Barrientos A (2018) Yeast mitoribosome large subunit assembly proceeds by hierarchical incorporation of protein clusters and modules on the inner membrane. *Cell Metab* 27:645–656.e7. doi: 10.1016/j.cmet.2018.01.012
- Zhao X, Huang J, Chory J (2019) GUN1 interacts with MORF2 to regulate plastid RNA editing during retrograde signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:10162–10167. doi: 10.1073/pnas.1820426116
- Zhelyazkova P, Hammani K, Rojas M, et al (2012) Protein-mediated protection as the predominant mechanism for defining processed mRNA termini in land plant chloroplasts. *Nucleic Acids Res* 40:3092–3105. doi: 10.1093/nar/gkr1137
- Zhou W, Lu Q, Li Q, et al (2017) PPR-SMR protein SOT1 has RNA endonuclease activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E1554–E1563. doi: 10.1073/pnas.1612460114
- Zhu Q, Dugardeyn J, Zhang C, et al (2014) The *Arabidopsis thaliana* RNA editing factor SLO2, which affects the mitochondrial electron transport chain, participates in multiple stress and hormone responses. *Mol Plant* 7:290–310. doi: 10.1093/mp/sst102
- Zhu W, Miao Q, Sun D, et al (2012) The mitochondrial phosphate transporters modulate plant responses to salt stress via affecting ATP and gibberellin metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 7:e43530. doi: 10.1371/journal.pone.0043530
- Zmudjak M, Colas des Francs-Small C, Keren I, et al (2013) mCSF1, a nucleus-encoded CRM protein required for the processing of many mitochondrial introns, is involved in the biogenesis of respiratory complexes I and IV in *Arabidopsis*. *New Phytol* 199:379–394. doi: 10.1111/nph.12282

- Zsigmond L, Rigo G, Szarka A, et al (2008) Arabidopsis PPR40 connects abiotic stress responses to mitochondrial electron transport. *Plant Physiol* 146:1721–1737. doi: 10.1104/pp.107.111260
- Zuccotti P, Modelska A (2016) Studying the translome with polysome profiling. In: *Post-Transcriptional Gene Regulation, Methods in Molecular Biology*. pp 59–69
- Zuo X, Li S, Hall J, et al (2005) Enhanced expression and purification of membrane proteins by SUMO fusion in *Escherichia coli*. *J Struct Funct Genomics* 6:103–111. doi: 10.1007/s10969-005-2664-4

8 Anhang

8.1 Sequenzvergleiche der analysierten 5'-/3'-Enden

WT 5' UTR *cox2*

5' UTR -205/-151
Exon1

```

cox2 gene      53 aagaagaagaatccttacgccccaaattcccatctctttttcttggttgaccaaccggc
1             224 .....
cox2 gene     113 accagccatttcgctcttccttaattgggagagtcagaatcagtctctcttggttgggg
1             284 .....
cox2 gene     173 ggagcagaaaatgaaggaacctttgctttgaaatgattgttctaaaatggttattcctc
1             344 .....t.t
cox2 gene     233 acaatttctccttgatgcagcggaaacctggcaattaggatctcaagacgcagctaca
1             404 .....
cox2 gene     293 ccta
1             464 ....

```

dweorg1 5' UTR *cox2*

5' UTR -205/-151
Exon1

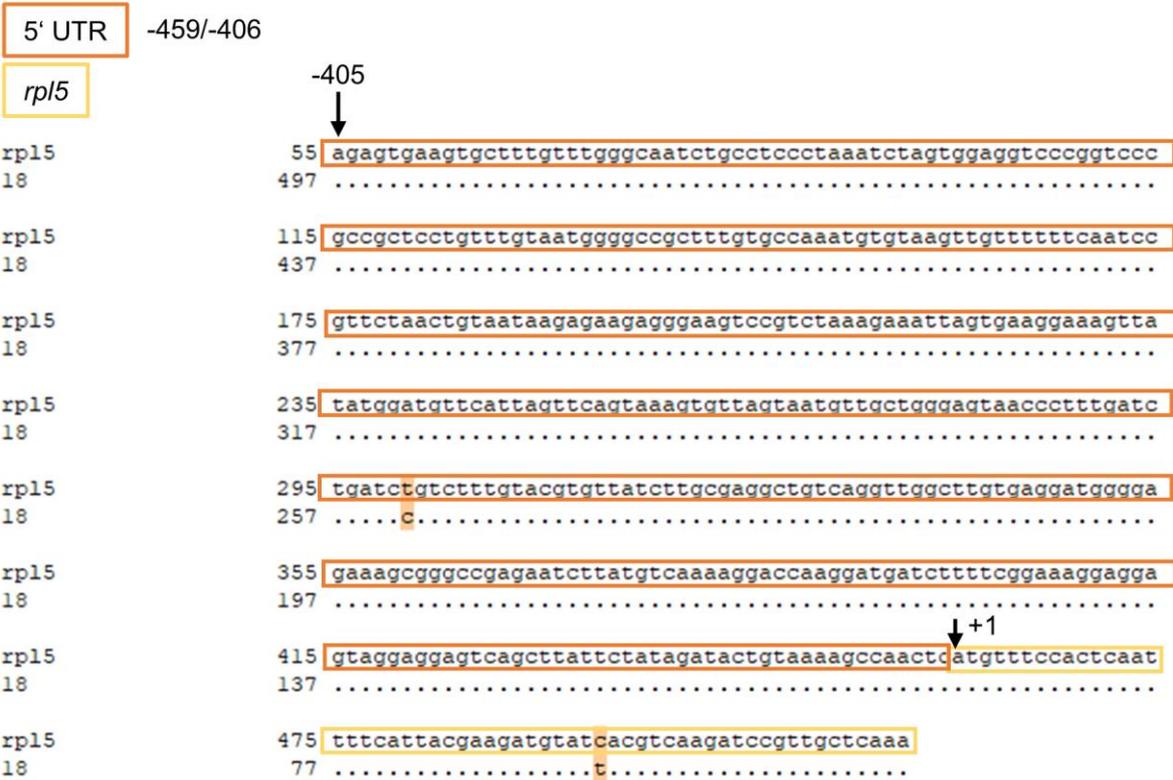
```

cox2 gene      53 aagaagaagaatccttacgccccaaattcccatctctttttcttggttgaccaaccggc
NoName        466 .....
cox2 gene     113 accagccatttcgctcttccttaattgggagagtcagaatcagtctctcttggttgggg
NoName        406 .....
cox2 gene     173 ggagcagaaaatgaaggaacctttgctttgaaatgattgttctaaaatggttattcctc
NoName        346 .....t.t
cox2 gene     233 acaatttctccttgatgcagcggaaacctggcaattaggatctcaagacgcagctaca
NoName        286 .....t.....
cox2 gene     293 cctataatgcaaggaataatagacttacatcacgatatctttttcttctcattctgatt
NoName        226 .....t.....
cox2 gene     353 ttggttttctgattatggatcttggttcgctttatggcatttccactataaaaaaaat
NoName        166 .....
cox2 gene     413 gcaatcccgcaaaggattgttcatggaactactatcgagattcttggaccatctttcct
NoName        106 .....t.....
cox2 gene     473 agtatcatctcgatgttcattgctataccatcattgctctcta
NoName         46 .....t.....a.....

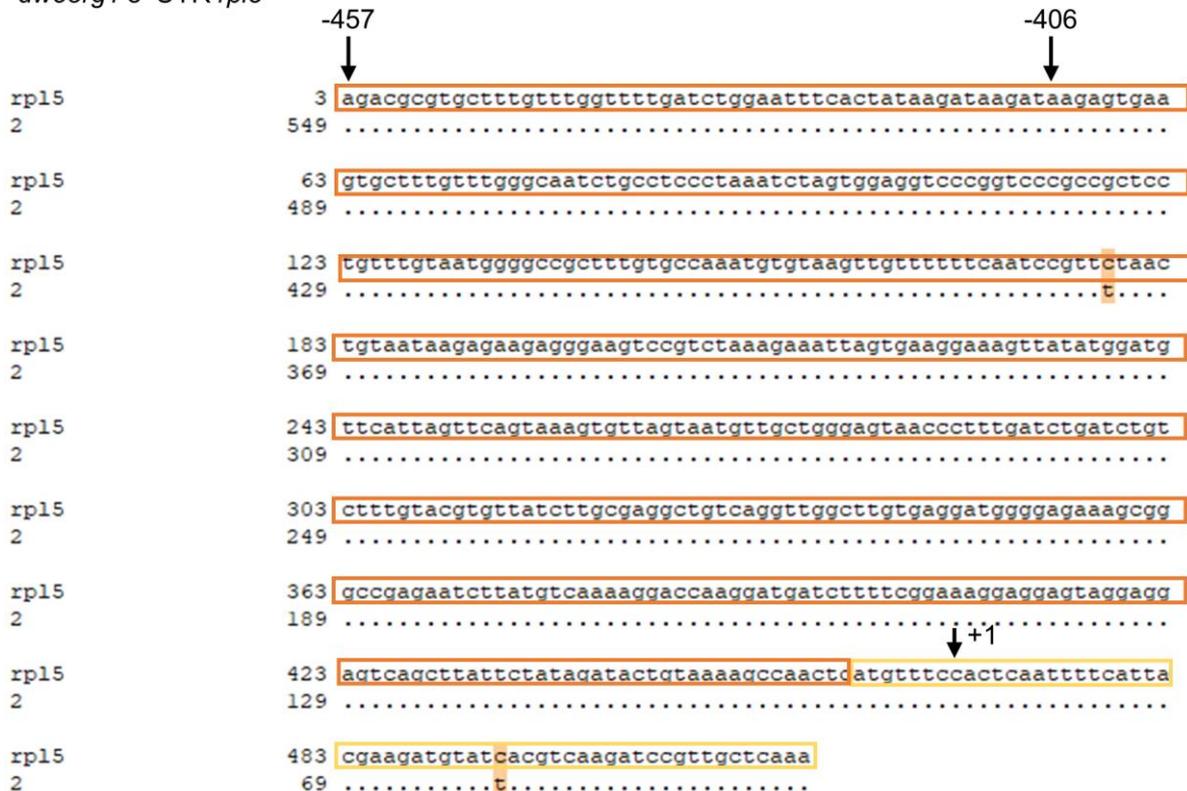
```

Fortsetzung nächste Seite

WT 5' UTR *rp15*



dweorg1 5' UTR *rp15*



Fortsetzung nächste Seite

WT 3' UTR *rpl5*

3' UTR +58
cob

```

rpl5      4041 ttctgggacgagttggaagaggaattcctaattcttacacggatgagactgatcacacct
18        616 .....a.....
          ↓ -1
rpl5      4101 gatcagtgaaaaattctgacaccaatcatttacatattacccaagaattgacaagcaga
18        556 .....c.....↑
                                     +58
    
```

dweorg1 3' UTR *rpl5*

```

rpl5      4040 attctgggacgagttggaagaggaattcctaattcttacacggatgagactgatcacacctgatcagtgga
2         669 .....t.....
          ↓ -1
rpl5      4110 aaaattctgacaccaatcatttacatattacccaagaattgacaagcaga
2         599 .....↑
                                     +58
    
```

WT 5' UTR *rps4*

5' UTR +2

```

          +2
          ↓
rps4      2 tgtggctgcttaaaaaactgattcaacgagatatagatttgccccattaagatttcaa
NoName    322 .....
          62 cttgtcgtctactttcaggaaatgttcggaacagaga
rps4      382 .....
NoName
    
```

dweorg1 5' UTR *rps4*

```

          +2
          ↓
rps4      1 atgtggctgcttaaaaaactgattcaacgagatatagatttgccccattaagatttcaa
NoName    132 .....
          61 acttgtcgtctactttcaggaaatgttcggaacagaga
rps4      72 .....
NoName
    
```

Fortsetzung nächste Seite

WT 3' UTR *rps4*



```

rps4      1007 taggtcatatccctcacgacataagattaaaagatccaaaccttctcttgggagcagaa
NoName    37  .....tt.....t.....t.....
rps4      1067 acggacgtggccaaaacatataagatcggcgtagtcactcatagggacatctctatccc
NoName    97  .....
rps4      1127 gatagaggatagctagatcgattcatagatggattttttcatctagataggtatcccgt
NoName   157  .....
rps4      1187 ggatagagagaaaagatagggatccatctagatcttgattcactatttccatttttttta
NoName   217  .....
rps4      1247 cttagtcttattaattgggtggggttcggggagcatgcccggcat
NoName   277  .....
    
```



dweorg1 3' UTR *rps4*

```

rps4      1007 taggtcatatccctcacgacataagattaaaagatccaaaccttctcttgggagcagaa
NoName   736  .....
rps4      1067 acggacgtggccaaaacatataagatcggcgtagtcactcatagggacatctctatccc
NoName   676  .....
rps4      1127 gatagaggatagctagatcgattcatagatggattttttcatctagataggtatcccgt
NoName   616  .....
rps4      1187 ggatagagagaaaagatagggatccatctagatcttgattcactatttccatttttttta
NoName   556  .....
rps4      1247 cttagtcttattaattgggtggggttcggggagcatgcccggcataatcaaggccgtcgc
NoName   496  .....
rps4      1307 cccttcttcgacggggatgggcgataaaattcgggttcctagtcgggtgggtgggtccag
NoName   436  .....
rps4      1367 ttgaagtcggaaaagtcgctagagaacaaaagatgtaatgaaaagataagcaatagaagt
NoName   376  .....
rps4      1427 gqccaggtcaccocgctagaaaaactcgcttagacaaaagactcaatcaatttttcggaaa
NoName   316  .....
rps4      1487 ggaggggtagtaggagtcaagatattgcgatataaatatataacgagagagagtctcttg
NoName   256  .....
rps4      1547 agcggccgagaatcttatgtcaaaaggaccaaggacgatct
NoName   196  .....
    
```



WT 3' UTR *ccmF_{N2}*

3' UTR +170

ccmF_{N2}

```

ccmFN2      533 ttttctaccagatgaagcagcagggcatcggtcctgtagaacgtataaaaaagagatggttg
6           23  ....--g..-.-t.....

ccmFN2      593 tggcgcgaagtactcttgtgcatctacgtcactcggctcgcgcgcaaccccgccccgtta
6           77  .....
                ↓-1

ccmFN2      653 tgttatggaagaattgaacttcttggctgggctggttattcagagccagcaattggctgdc
6           137 .....

ccmFN2      713 ggatttcgtcctgcaatgagggcagatcgcttcgggggggtcactgtggcgtggctgaatgt
6           197 .....

ccmFN2      773 agagcagtcocccctacagcgtttgatcagtagattatttagaacttcggaagatggtc
6           257 .....

ccmFN2      833 aaggtac
6           317 .....
                ↑
                +170
    
```

dweorg1 3' UTR *ccmF_{N2}*

3' UTR +170

ccmF_{N2}

```

ccmFN2      533 ttttctaccagatgaagcagcagggcatcggtcctgtagaacgtataaaaaagagatggttg
9           26  ....--g..-.-t.....

ccmFN2      593 tggcgcgaagtactcttgtgcatctacgtcactcggctcgcgcgcaaccccgccccgtta
9           80  .....
                ↓-1

ccmFN2      653 tgttatggaagaattgaacttcttggctgggctggttattcagagccagcaattggctgcc
9           140 .....

ccmFN2      713 ggatttcgtcctgcaatgagggcagatcgcttcgggggggtcactgtggcgtggctgaatgt
9           200 .....

ccmFN2      773 agagcagtcocccctacagcgtttgatcagtagattatttagaacttcggaagatggtc
9           260 .....

ccmFN2      833 aaggtac
9           320 .....
                ↑
                +170
    
```

Fortsetzung nächste Seite

WT 5' UTR *ccmF_{N2}**dweorg1* 5' UTR *ccmF_{N2}*

Abbildung A 1: Sequenzvergleiche zur Bestimmung der 5'-/3'-Enden der mitochondrialen Transkripte *cox2*, *rps4*, *rpl5* und *ccmF_{N2}*. Die obere Sequenz stellt jeweils die annotierte Vergleichssequenz dar. Die untere Sequenz ist das Produkt der Sequenzierung.

8.2 Der bisher bekannte PPR-Code

Tabelle A 1: Der PPR-Code und die dazugehörige Basenpräferenz. Die hier dargestellte Tabelle wurde (Yan et al. 2019) entnommen. Sie zeigt den bisher bekannten PPR-Code und die bevorzugt gebundenen Basen der jeweiligen Aminosäurekombinationen. Die unterstrichenen Basen wurden als nur schwache Bindungspartner des jeweiligen PPR-Codes identifiziert. (-) gibt an, dass keine Präferenz bestimmt werden konnte.

PPR-Code	RNA-Base	PPR-Code	RNA-Base	PPR-Code	RNA-Base
ND	U>C>G> <u>A</u>	ID	<u>G</u>	GG	A> <u>C</u> , <u>G</u>
NN	C>U> <u>G</u> > <u>A</u>	SE	G> <u>A</u>	LN	-
TD	G>A>U	NC	U>C> <u>A</u> , <u>G</u>	LS	-
SD	G>A>U> <u>C</u>	AS	<u>A</u>	VN	A> <u>G</u>
TN	A>G> <u>U</u> > <u>C</u>	RS	<u>C</u>	TE	G>A
SN	A>C> <u>G</u> > <u>U</u>	MD	-	SP	-
NS	C>U>A	NK	C>U>> <u>A</u> , <u>G</u>	KN	C>U>A> <u>G</u>
NT	C>U> <u>A</u> , <u>G</u>	NL	C>U> <u>A</u>	NR	-
GN	A> <u>C</u> > <u>G</u> > <u>U</u>	DT	C	DN	C>> <u>U</u>
TS	A>G> <u>C</u> > <u>U</u>	RN	<u>C</u> , <u>U</u>	CS	A> <u>G</u>
GD	G>> <u>U</u>	TG	A>G> <u>C</u> , <u>U</u>	QD	<u>G</u>
TT	A>G> <u>C</u> , <u>U</u>	AN	A>> <u>G</u> , <u>U</u>	NV	U>C> <u>G</u> , <u>A</u>
RD	-	GS	A>C> <u>G</u>	ED	-
SS	A>> <u>C</u> , <u>G</u> , <u>U</u>	ES	A, G	IN	-
AD	G>> <u>U</u>	LD	-	VS	-
KD	A, G	SG	A>> <u>G</u> , <u>C</u>	HN	<u>C</u> , <u>A</u> , <u>U</u>
ST	A	GT	C>A> <u>G</u> , <u>U</u>	AT	A
NE	U>C>> <u>A</u> , <u>G</u>	HD	<u>G</u>	NH	U>C>> <u>A</u> , <u>G</u>
DS	C	CN	A>> <u>G</u> , <u>U</u> , <u>C</u>	AG	<u>A</u> , <u>G</u>
CD	G>> <u>A</u> , <u>U</u>	VD	G>A	NI	U>C
DD	U> <u>C</u> , <u>G</u>	NG	C>U>A>> <u>G</u>		

8.3 Ergebnisse der LC-MS-Analyse

Tabelle A 2: Ergebnis der LC-MS-Analyse putativer DWEORG1 Interaktionspartner

GFP-Pflanzen, löslich, Experiment 1									
Accession	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pi
AT3G15590.1@	614,02	15,74	1	10	10	27	610	69,3	8,37

AT1G61600.1@	35,28	1,90	1	1	1	1	421	48,7	9,41
AT5G14040.1@ Symbols: PHT3;1	33,32	2,40	1	1	1	1	375	40,1	9,20
AT1G07660.1@	427,30	31,07	1	3	3	19	103	11,4	11,47
AT5G54640.1@ Symbols: HTA1, RAT5, ATHTA1	100,35	6,92	11	1	1	3	130	13,6	10,15
AT5G12010.1@	33,76	1,59	1	1	1	2	502	56,8	5,94
gi1346343@	55,95	1,40	1	1	1	2	644	66,0	8,12
GFP-Pflanzen, löslich, Experiment 2									
Accession	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
AT3G15590.1@	1345,59	26,89	1	20	20	45	610	69,3	8,37
AT5G14040.1@ Symbols: PHT3;1	76,26	4,53	1	2	2	3	375	40,1	9,20
AT1G61600.1@	51,18	1,90	1	1	1	2	421	48,7	9,41
AT5G62390.1@ Symbols: ATBAG7, BAG7	377,45	21,08	1	8	8	14	446	51,5	9,26
AT5G09590.1@ Symbols: MTHSC70-2, HSC70-5	334,91	10,56	1	6	7	10	682	72,9	5,78
AT4G37910.1@ Symbols: mtHsc70-1	102,26	4,40	1	2	3	3	682	73,0	5,62
AT3G23990.1@ Symbols: HSP60, HSP60- 3B	122,93	5,20	3	3	3	4	577	61,2	5,78
AT1G80270.1@ Symbols: PPR596	79,04	3,52	1	2	2	2	596	67,2	7,65
AT4G28390.1@ Symbols: AAC3, ATAAC3	80,72	4,22	3	2	2	3	379	40,7	9,77
gi1346343@	581,05	17,08	1	10	12	16	644	66,0	8,12
gi547749@	530,89	14,84	1	11	11	19	593	59,5	5,21
gi547754@	295,96	14,11	1	6	8	10	645	65,8	8,00
gi162648@	132,72	8,57	1	4	4	4	607	69,2	6,18
GFP-Pflanzen, unlöslich, Experiment 1									
Accession	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
AT3G62530.1@	48,47	5,43	1	1	1	1	221	24,5	6,57
ATMG00070.1@ cl: NAD9	32,01	5,26	2	1	1	1	190	22,7	8,00
AT3G13920.3@ Symbols:	112,67	3,48	7	1	1	3	402	45,7	6,28

EIF4A1, RH4, TIF4A1										
AT1G66280.1@ Symbols: BGLU22	481,66	14,89	1	4	7	20	524	59,7	7,21	
AT1G66270.2@ Symbols: BGLU21	460,96	13,03	2	5	8	22	522	59,5	7,02	
AT3G09260.1@ Symbols: PYK10, PSR3.1, BGLU23, LEB	491,06	16,03	1	4	6	16	524	59,7	6,92	
AT3G16450.1@	257,56	15,33	1	3	3	5	300	32,0	5,22	
AT3G16460.1@	305,31	3,83	1	2	2	6	705	72,4	5,50	
AT3G14210.1@ Symbols: ESM1	154,18	2,55	1	1	1	5	392	44,0	7,72	
AT3G16420.1@ Symbols: PBP1, JAL30	767,28	26,17	1	7	7	26	298	32,1	5,77	
AT5G26260.1@	119,79	6,84	1	2	2	3	351	39,8	9,22	
AT5G26280.2@	142,17	4,59	2	1	1	2	327	36,9	8,18	
GFP-Pflanzen, unlöslich, Experiment 2										
Accession	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pi	
AT3G15590.1@	1494,98	34,92	1	23	23	52	610	69,3	8,37	
AT5G09590.1@ Symbols: MTHSC70-2, HSC70-5	285,51	17,60	1	9	11	12	682	72,9	5,78	
AT4G37910.1@ Symbols: mtHsc70-1	222,15	9,53	1	4	6	8	682	73,0	5,62	
AT5G62390.1@ Symbols: ATBAG7, BAG7	99,55	4,04	1	2	2	4	446	51,5	9,26	
AT5G14040.1@ Symbols: PHT3;1	65,43	6,93	1	3	3	3	375	40,1	9,20	
AT1G61600.1@	37,89	1,90	1	1	1	1	421	48,7	9,41	
AT3G08580.1@ Symbols: AAC1	378,93	21,52	2	8	8	14	381	41,4	9,83	
AT5G60390.2@	279,35	10,50	2	4	4	9	400	44,3	8,34	
AT5G08670.1@	143,86	4,32	3	2	2	3	556	59,6	6,57	
AT1G20620.2@ Symbols: CAT3, SEN2, ATCAT3	140,63	11,01	3	4	4	6	427	48,9	6,80	
AT3G61430.1@ Symbols: PIP1A, ATPIP1, PIP1, PIP1;1	116,44	10,49	1	3	3	3	286	30,7	9,01	
AT2G33040.1@ Symbols: ATP3	109,65	4,62	1	1	1	1	325	35,4	8,90	
AT3G20370.1@	100,62	7,65	1	2	2	2	379	43,4	6,58	
AT5G07440.3@ Symbols: GDH2	98,95	7,77	2	2	2	2	309	33,2	6,80	

AT1G54010.1@	97,30	5,70	2	1	2	4	386	43,1	8,07
AT3G16430.1@ Symbols: JAL31	92,56	5,74	2	2	2	3	296	32,2	6,29
AT4G02520.1@ Symbols: ATGSTF2, ATPM24.1, ATPM24, GST2, GSTF2	81,94	12,26	1	2	2	3	212	24,1	6,35
AT3G02090.1@ Symbols: MPPBETA	43,13	1,51	2	1	1	1	531	59,1	6,79
AT5G66760.1@ Symbols: SDH1- 1	39,83	1,58	1	1	1	1	634	69,6	6,29
AT1G07890.6@ Symbols: APX1, MEE6, CS1, ATAPX1, ATAPX01	36,24	4,42	2	1	1	1	249	27,5	6,29
AT5G14780.1@ Symbols: FDH	32,31	2,34	1	1	1	1	384	42,4	7,50
AT3G03600.1@ Symbols: RPS2	31,01	4,57	1	1	1	1	219	24,8	9,19
AT3G09260.1@ Symbols: PYK10, PSR3.1, BGLU23, LEB	1073,07	37,40	3	9	14	33	524	59,7	6,92
AT3G16460.1@	1028,03	20,71	1	11	11	21	705	72,4	5,50
AT1G66270.2@ Symbols: BGLU21	893,19	25,67	4	8	15	33	522	59,5	7,02
AT1G66280.1@ Symbols: BGLU22	849,71	25,00	3	6	13	30	524	59,7	7,21
AT3G14210.1@ Symbols: ESM1	647,09	17,86	1	5	6	16	392	44,0	7,72
AT5G26260.1@	321,37	13,11	1	3	4	7	351	39,8	9,22
AT3G13920.3@ Symbols: EIF4A1, RH4, TIF4A1	190,98	11,94	7	4	4	6	402	45,7	6,28
AT3G16450.1@	166,84	11,67	1	2	2	2	300	32,0	5,22
AT5G26280.2@	132,10	6,42	2	1	2	3	327	36,9	8,18
AT3G16470.3@ Symbols: JR1	39,44	3,37	2	1	1	1	297	32,1	5,44
gi13432173@	47,17	1,91	2	1	1	1	472	51,6	5,16
gi1346343@	76,13	3,73	1	2	2	2	644	66,0	8,12
Wildtyp löslich/unlöslich, Experiment 1 und 2									
Accession	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pi
AT3G16460.1@	1067,80	15,18	1	8	8	24	705	72,4	5,50
AT3G09260.1@ Symbols: PYK10,	677,42	17,75	1	7	7	19	524	59,7	6,92

PSR3.1, BGLU23, LEB										
AT5G12010.1@	32,90	1,59	1	1	1	1	502	56,8	5,94	
AT3G16420.1@ Symbols: PBP1, JAL30	529,77	25,17	1	5	5	18	298	32,1	5,77	
AT3G16450.1@	404,80	15,33	1	3	3	7	300	32,0	5,22	
AT3G14210.1@ Symbols: ESM1	304,50	13,01	1	4	4	11	392	44,0	7,72	
AT3G16460.1@	294,48	3,83	1	2	2	6	705	72,4	5,50	
AT1G66270.2@ Symbols: BGLU21	190,58	9,20	2	3	5	10	522	59,5	7,02	
AT3G13920.3@ Symbols: EIF4A1, RH4, TIF4A1	153,20	3,48	7	1	1	3	402	45,7	6,28	
AT1G66280.1@ Symbols: BGLU22	124,80	4,77	1	1	3	6	524	59,7	7,21	
AT5G26260.1@	55,66	2,56	1	1	1	2	351	39,8	9,22	
AT4G28390.1@ Symbols: AAC3, ATAAC3	52,73	2,90	3	1	1	1	379	40,7	9,77	
AT3G16470.1@ Symbols: JR1	41,23	6,21	2	1	1	1	451	48,5	5,26	
AT5G26280.1@	35,50	3,71	1	1	1	1	350	39,4	8,54	
gi1346343@	53,02	1,86	2	1	1	1	644	66,0	8,12	
gi1346343@	55,67	1,86	2	1	1	2	644	66,0	8,12	

8.4 Plasmidkarten



Fortsetzung nächste Seite

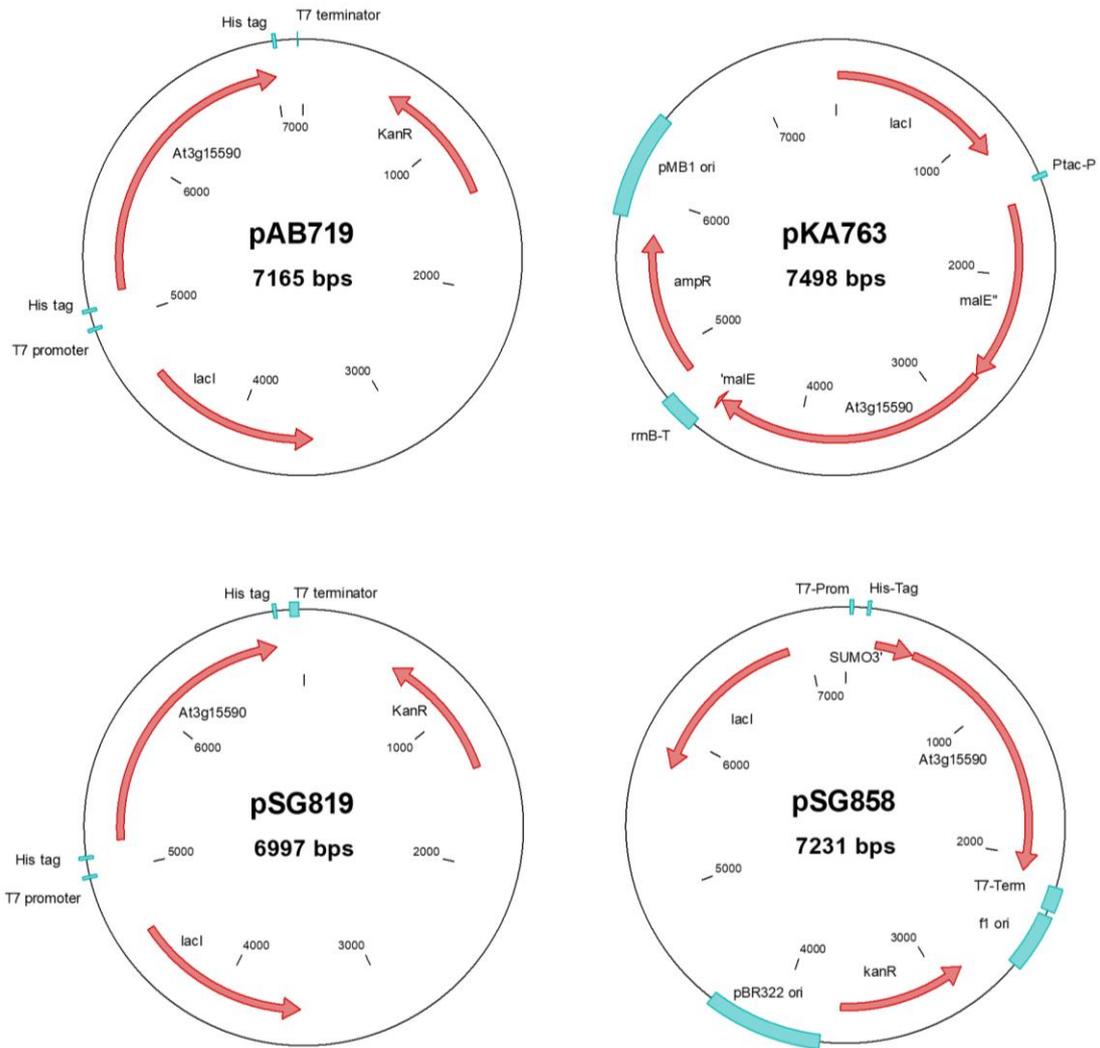


Abbildung A 2: Plasmidkarten der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

8.5 Verwendete Oligonukleotide

Tabelle A 3: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Description	Sequence (5'/3')	Purpose
AB1088	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	LB of T-DNA, screening of GK-188B06
AB1333	ACACATTGTCTGCCTTCATCC	<i>DWEORG1</i> wild type gene, upstream of T-DNA insertion, screening of GK-188B06
AB1334	GCAGTTTGAGTTCACAGAGGC	<i>DWEORG1</i> wild type gene, downstream of T-DNA insertion, screening of GK-188B06
AB1453	GATAACGTGAAGGCTAAGATCC	<i>UBQ11</i> , qRT-PCR, forward
AB1454	GGAGGACCAAGTGAAGAGTAGA	<i>UBQ11</i> , qRT-PCR, revers
AB2112	GGACATCAATGGTATCGGAC	<i>COX2</i> , qRT-PCR, forward
AB2113	GAGTTTTGGCTGGTACAACC	<i>COX2</i> , qRT-PCR, revers
RS3133	TACCGAGGCTCCTCTTAACC	<i>ACT2</i> , qRT-PCR, forward
RS3134	AGCTTGGATGGCGACATACA	<i>ACT2</i> , qRT-PCR, revers
SG3176	ATACCATTGATGTCCAATAGC	cDNA synthesis for cRT analysis
SG3177	AATGGCTGGATCTACTACTACCTCGTCCATTG	cRT analysis, 5'/3' <i>COX2</i> , oligo1
SG3178	AATTAATCCCCCAAACCGGGGAAG	cRT analysis, 5'/3' <i>COX2</i> , oligo2
SG3233	TGGGGGATTAATTGATTGGA	qRT-PCR, <i>COX2</i> spliced with SG3234; <i>COX2</i> unspliced with SG3235
SG3234	TGATGCTGTACCTGGTCGTT	qRT-PCR, <i>COX2</i> spliced with SG3233
SG3235	AGCAGTACGAGCTGAAAGGC	qRT-PCR, <i>COX2</i> unspliced with SG3233
SG3236	GGCTATAAGTAGGCCGTTTG	<i>COX2</i> 3' end, qRT-PCR, oligo1
SG3237	CCTCGTCTTGCTTGCTTCTG	<i>COX2</i> 3' end, qRT-PCR, oligo2
SG3238	CTGCTGCTTTTAGGAGAGTG	<i>COX2</i> 5' end, qRT-PCR, oligo1
SG3239	CCCCAAACAAAGAGAGACTG	<i>COX2</i> 5' end, qRT-PCR, oligo2
SG3250	TCAGCATGCCGCGGTGAATATG	18S rRNA mitochondria, qRT-PCR, oligo1
SG3251	TGCTTCGGGCGAAACCAATTCC	18S rRNA mitochondria, qRT-PCR, oligo2
SG3252	TGCGAGGTGGGTAGTTTATC	26S rRNA mitochondria, qRT-PCR, oligo1
SG3253	GGCAGGCTTATACCATTACG	26S rRNA mitochondria, qRT-PCR, oligo2
SG3254	GCTGAAACTTAAAGGAATTGACG	18S rRNA cytosol, qRT-PCR, oligo1
SG3255	CAGTCTGTCAATCCTTACTATG	18S rRNA cytosol, qRT-PCR, oligo2
SG3256	CTGTCTACTATCCAGCGAAAC	25S rRNA cytosol, qRT-PCR, oligo1
SG3257	CCTACACCTCTCAAGTCATTTT	25S rRNA cytosol, qRT-PCR, oligo2
SG3258	CTATAACGGTCCTAAGGTAGCG	23S rRNA chloroplast, qRT-PCR, oligo1
SG3259	CTATTTACCGAGCCTCTCTC	23S rRNA chloroplast, qRT-PCR, oligo2
SG3260	GCGTAGAGATCGGAAAGAAC	16S rRNA chloroplast, qRT-PCR, oligo1
SG3261	GGGTATCTAATCCCATTTCG	16S rRNA chloroplast, qRT-PCR, oligo2

9 Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen

Grüttner S, Hopf C, Kumar A, Kempken F (2013) Deletions in *cox2* mRNA result in loss of splicing and RNA editing and gain of novel RNA editing sites. PLoS ONE, PLoS One 8:e82067. doi: 10.1371/journal.pone.0082067

Vorveröffentlichung:

Grüttner S, Nguyen T, Bruhs A, Mireau H, Kempken F (2021) The P-type pentatricopeptide repeat protein DWEORG1 is a non-previously reported subunit of the *Arabidopsis* mitoribosome

Vorträge

Stefanie Grüttner (2020), The PPR protein DWEORG1 as part of the mitoribosome in *Arabidopsis thaliana*, WebCaM (monatliche webinar-Serie zu Chloroplasten und Mitochondrien), **online**

Stefanie Grüttner (2018), The PPR protein DWEORG1 is involved in the mitochondrial translation of *cox2* transcripts in *A. thaliana*, XIX. Jahrestagung der Deutschen Sektion der Internationalen Gesellschaft für Endocytobiologie, **Bremerhaven**

Stefanie Grüttner (2015), The PPR protein DWEORG1 is involved in *cox2* translation, Jahrestagung der Gesellschaft für Genetik, **Kiel**

Poster

Stefanie Grüttner, Frank Kempken (2017), In *Arabidopsis thaliana* mitochondria, the PPR protein DWEORG1 mediates the *cox2* translation, Botanikertagung, **Kiel**

Stefanie Grüttner, Anika Bruhs, Frank Kempken (2016), The PPR protein DWEORG1 affects the *cox2* expression in *Arabidopsis thaliana* mitochondria, Mitochondria & Chloroplasts, Gordon Research Conference 2016, **West Dover, Vermont, USA**

Stefanie Grüttner, Anika Bruhs, Frank Kempken (2016), The *cox2* expression in *Arabidopsis thaliana* is affected by the PPR protein DWEORG1, 29. Tagung „Molekularbiologie der Pflanzen“, **Dabringhausen**

Stefanie Grüttner, Anika Bruhs, Frank Kempken (2015), *Arabidopsis thaliana dweorg1* plants show an altered expression pattern of COX2 and AOX, 28. Tagung „Molekularbiologie der Pflanzen“, **Dabringhausen**

10 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Frank Kempken, danken. Ich bedanke mich für die Möglichkeit mein Promotionsvorhaben in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können, die interessante Themenstellung und seine Unterstützung. Des Weiteren bedanke ich mich dafür, dass er Vertrauen in meine Arbeit hatte und mir stets die Möglichkeit gegeben hat, eigene Ideen umzusetzen. Bedanken möchte ich mich außerdem dafür, dass er mir die Teilnahme an zahlreichen nationalen und internationalen Kongressen ermöglicht hat.

Mein Dank gilt allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung „Botanische Genetik und Molekularbiologie“. Vor allem Hanna Schmidt, für die warme Aufnahme in der Arbeitsgruppe, die Begleitung meiner ersten Schritte im Labor und für äußerst unterhaltsame Kaffeepausen. Weiterhin gilt mein besonderer Dank Krisztina Kollath-Leiß für die konstruktiven fachlichen Diskussionen, ihre unendliche Unterstützung in fachlichen sowie außer-fachlichen Bereichen. Danke, dass du immer für mich da warst! Bei Hossein Emami bedanke ich mich für eine schöne Zeit als Labor-Mitbewohner, die Unterstützung beim „Blumen“ gießen und die schönen gemeinsamen Tagungsbesuche. Ich bedanke mich auch bei Linda Paun, Anika Bruhs und Kathi Knittler, die auch nach Verlassen der Arbeitsgruppe noch ein offenes Ohr für den Laboralltag und seine frustrierenden Seiten hatten. Zu guter Letzt bedanke ich mich bei Pradeep Phule, Puspendu Sardar, Abishek Kumar, Annika Regulin, Elkbir Hilal und Qin Yang für immer wieder lustige Zeiten im Labor.

Ich bedanke mich bei allen Abteilungen des Botanischen Instituts, besonders bei Prof. Dr. Wolfgang Bilger für seine Unterstützung bei der Verwendung der Clark-Elektrode, Susanne Braun für ihren fachlichen Rat in Bezug auf Western Blots. Außerdem danke ich dem Geschäftszimmer, Lidia Sobecki, Petra Kohrt und besonders Conny Herzog-Truxa für die geduldige Beantwortung aller verwaltungstechnischen Fragen und viele schöne Gespräche.

Bei Dr. Hakim Mireau und Dr. Tan-Trung Nguyen bedanke ich mich für die sehr wertvolle Kollaboration. Zudem bedanke ich mich bei Prof. Hans Peter Braun und Dr. Holger Eubel (Hannover) für die Durchführung der LC-MS Analyse.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Lieben! Meiner Familie, die mich immer in allem unterstützt was ich tue. Meinen Freunden, die mich immer wieder aufheitern, besonders Andreas fürs Korrekturlesen, Lars für die Unterstützung bei Formatierungsproblemen sowie Karo und Kristina für Sekt- und Kochabende, die einen all den Frust vergessen lassen. Ohne euer aller Unterstützung wäre diese Arbeit nie zustande gekommen.

11 Eigenanteil an den Experimenten

Mit Ausnahme der folgenden Experimente wurden alle in dieser Arbeit beschriebenen Experimente, sofern nicht anders vermerkt, eigenständig durchgeführt:

Ribosome footprint Analyse:

- Probennahme, Isolierung der Polysomen, Aufreinigung der *footprints* und Erstellung der Sequenzier *libraries* wurden durch Stefanie Grüttner durchgeführt
- Aufarbeitung der Rohdaten erfolgte durch Tan-Trung Nguyen (Institut Jean-Pierre Bourgin INRA, AgroParisTech, CNRS, Université Paris-Saclay, Versailles, Frankreich)

Analyse der mitochondrialen Proteinmenge:

- Probennahme, Isolierung der Proteine, Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran und alle Schritte für die RPS4 Detektion wurden durch Stefanie Grüttner durchgeführt
- Antikörperdetektion der anderen Proteine erfolgte durch Tan-Trung Nguyen (Institut Jean-Pierre Bourgin INRA, AgroParisTech, CNRS, Université Paris-Saclay, Versailles, Frankreich)

Northern Blot:

- Nachweis der 26S rRNA erfolgte durch Tan-Trung Nguyen (Institut Jean-Pierre Bourgin INRA, AgroParisTech, CNRS, Université Paris-Saclay, Versailles, Frankreich)

12 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Abhandlung nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer. Diese wurde nur mit den angegebenen Hilfsmitteln verfasst. Die Arbeit wurde bis jetzt weder ganz noch teilweise an anderen Stellen im Rahmen eines Prüfungsverfahrens an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel oder an einer anderen Hochschule vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe. Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden. Zudem erkläre ich, dass mir kein akademischer Grad entzogen wurde.

Der Zulassung von Zuhörern/Zuhörerinnen bei der mündlichen Prüfung wird nicht widersprochen.

Kiel, den _____

Stefanie Grüttner