

# **Twin Arginin Translokation in Mitochondrien höherer Pflanzen**

Dissertation der Fakultät Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
**Kerstin Alexandra Schäfer**  
aus München

Diese Dissertation zum Erwerb der „Doktorin der Naturwissenschaften“ (abgekürzt Dr. rer. nat.) wurde angefertigt unter der Leitung von Professor Dr. Jürgen Soll an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Erstgutachter: Professor Dr. Jürgen Soll

Zweitgutachter: PD Dr. Kai Hell

Tag der Abgabe: 28.04.2020

Tag der mündlichen Prüfung: 23.09.2020

## Zusammenfassung

Mitochondrien sind Organellen prokaryotischen Ursprungs, die sich aus einer primären Endosymbiose entwickelt haben und den Beginn eukaryotischen Lebens definieren. Sie führen wesentliche Stoffwechselprozesse durch, wie z.B. die oxidative Phosphorylierung und die Eisen-Schwefel-Cluster Biogenese. Während der primären Endosymbiose wurde der größte Teil des  $\alpha$ -proteobakteriellen Genoms durch einen horizontalen Gentransfer in das Genom des archaischen Wirts übertragen und resultierte in der ersten eukaryotischen Zelle und der Entstehung des Nukleus. Daher ist heute der größte Teil des mitochondrialen Proteoms unter nukleärer Kontrolle, muss im Cytosol translatiert und in das Organell reimportiert werden. Im Laufe der Evolution wurden die Mechanismen der Proteintranslokation und die Membraninsertion von Proteinen innerhalb der Mitochondrien teils neu erfunden oder vom prokaryotischen Vorfahren vererbt. Ein Beispiel für einen evolutionär divergierenden Translokationsmechanismus innerhalb der Mitochondrien ist die Reinsertion der Rieske 2Fe-2S Untereinheit in die innere Mitochondrienmembran von der Matrix und letztendlich in Komplex III der Atmungskette. Die Vorläuferform der Rieske 2Fe-2S Untereinheit wird im Cytosol translatiert, ungefaltet in die mitochondriale Matrix importiert, wo es durch die Aufnahme des Eisen-Schwefel-Clusters im C-Terminus teilweise gefaltet wird. Die Reinsertion der Rieske 2Fe-2S Untereinheit erfordert daher den C-Terminus in einem teilweise gefalteten Zustand, um in die innere Membran von der Matrixseite transloziert und assembliert zu werden.

In Mitochondrien von Säugetieren und Hefe wird dieser Prozess der Retranslokation durch das BCS1 Protein vermittelt. In pflanzlichen Mitochondrien muss dieser Prozess jedoch anders ablaufen, da BCS1 in der inneren Membran nicht zu finden ist. Es bestand lange die Theorie, dass in pflanzlichen Mitochondrien die Rieske 2Fe-2S-Translokation, ähnlich wie in Bakterien und Thylakoiden, durch einen Twin Arginin Translokationsmechanismus erfolgt. Die Twin Arginin Translokation ist ausschließlich für die Translokation gefalteter Proteine bekannt. In Mitochondrien frühentwickelter Spezies sind die Untereinheiten der Twin Arginin Translokation lückenhaft verteilt, sind aber bei den meisten höheren Pflanzenspezies konserviert, während sie in Mitochondrien von Spezies, die ein BCS1-Protein in der inneren Membran besitzen, meist fehlen.

In Arabidopsis wurden bisher nur zwei Untereinheiten – MTTATB und MTTATC – als exprimierte Proteine mit einer vorhergesagten, aber bisher nicht experimentell nachgewiesenen Funktion, beschrieben. In dieser Arbeit konnte durch mehrere Ansätze gezeigt werden, dass die partielle Komplementierung der embryoletalen MTTATB-Deletionsmutante zu einem Fehler der Komplex III Assemblierung führte, der auf eine ineffektive Translokation der Rieske 2Fe-2S Untereinheit zurückgeführt werden konnte. Dies war somit der erste Nachweis, dass pflanzliche Mitochondrien tatsächlich einen

funktionellen Twin Arginin Translokationsweg für die Translokation der Rieske 2Fe-2S Untereinheit in Komplex III besitzen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass dieser Prozess vom ursprünglichen Endosymbionten in Pflanzen beibehalten wurde, während er in nahezu allen opisthokonten Linien verloren ging und durch einen neu erfundenen Mechanismus, ausgeführt von BCS1, ersetzt wurde.

## Abstract

Mitochondria are prokaryotic derived organelles that evolved from a primary endosymbiosis, and define the origin of eukaryotic life. They perform essential metabolic processes, such as oxidative phosphorylation and iron sulfur cluster biogenesis. Due to their endosymbiotic origin, most of the  $\alpha$ -proteobacterial genome was transferred to the genome of the archaic related host, resulting in the formation of the nucleus of the first eukaryote. Hence, nowadays most of the mitochondrial proteome is under nuclear control, has to be translated in the cytosol and reimported into the organelle. During evolution, mechanisms of protein translocation and membrane insertion of proteins within mitochondria were either newly invented or inherited from the prokaryotic ancestor. One example of an evolutionary diverged translocation mechanism among mitochondria is the membrane insertion of the Rieske 2Fe-2S subunit from the matrix into complex III of the respiratory chain in the inner mitochondrial membrane. The precursor form of the Rieske 2Fe-2S subunit is translated in the cytosol, imported in an unfolded state into the mitochondrial matrix, and becomes partially folded by the insertion of the iron sulfur cluster into the C-terminus. The Rieske 2Fe-2S subunit in the inner membrane thus requires the C-terminus in a partially folded state, before being re-inserted into the inner membrane.

In mammalian and yeast mitochondria, re-translocation is mediated by the BCS1 protein. However, in plant mitochondria this process has to be performed differently, as BCS1 is not found in the inner membrane. It was hypothesized for a long time, that in plant mitochondria the Rieske 2Fe-2S translocation is performed similarly to bacteria and thylakoids by a twin arginine translocation pathway. Twin arginine translocation is uniquely known for folded protein translocation. In mitochondria, subunits of twin arginine translocation are patchily distributed among divergent species, but conserved among most higher plants, whilst mostly absent in the mitochondria, which contain a BCS1 protein in the inner mitochondrial membrane.

In Arabidopsis, so far only two subunits – MTTATB und MTTATC – have been described as expressed proteins with a predicted, but so far not experimentally proven function. In this work this was demonstrated by several approaches, including the partial complementation of the embryo lethal MTTATB deletion mutant, which led to a complex III assembly deficiency and was further traced back to an ineffective translocation of the Rieske 2Fe-2S subunit into complex III of the respiratory chain. Hence, this was the first evidence, that plant mitochondria indeed contain a functional twin arginine translocation pathway for the translocation of the Rieske 2Fe-2S subunit into complex III. It is most likely that this process was retained from the original endosymbiont in plants, while it was lost in most opisthokont lineages and replaced by a newly invented mechanism performed by the BCS1 protein.

## Abkürzungsverzeichnis

Δ	Deletionsmutante/Knock-out
AAA	AAA ATPase Domäne
ADP	Adenosindiphosphat
APH	Amphipatische Helix
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BN	Blue Native
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
°C	Grad Celsius
cDNA	Komplementäre (Copy-) DNA
c-myc	C-myc Anhang
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DSP	Dithiobis(succinimidylpropionat), Lomant's Reagenz
DTT	1,4-Dithiothreitol
Ec	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Fe	Eisen
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonacid

H <sub>2</sub> O	Wasser
IM	Innere Membran ( <i>inner membrane</i> )
IMS	Intermembranraum ( <i>inter membrane space</i> )
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
LMW	<i>Low molecular weight</i> Marker SDS-PAGE Größenstandard
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
Met	L-Methionin
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
MS	Murashige-Skoog Salz
MPP	Mitochondriale Prozessierungspeptidase
NAD(P)H	Nicotinamidadeninukleotid(-phosphat)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
OM	Äußere Membran ( <i>outer membrane</i> )
OXA	Oxidase Assemblierungsprotein
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglykol
PMF	Protonenmotorische Kraft
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
Retic	Reticulozytenlysatz
RISP	Rieske 2Fe-2S Untereinheit des Cytochrom bc <sub>1</sub> Komplexes
RNA	Ribonukleinsäure
RNasin	RNase Inhibitor
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
S	Schwefel
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
TAT	Twin Arginin Translokation
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TES	N-Tris-(hydroxymethyl)methyl-2-amino-ethansulfonsäure
TIM	Translokase der inneren Membran
TMH	Transmembranhelix
TNT	Transkription und Translation
TOM	Translokase der äußeren Membran
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
Tween	Polyethylenglykolsorbitanmonolaurat
UTR	Untranslatierter Bereich ( <i>untranslated region</i> )
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Ursprung und Funktionen von Mitochondrien</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Proteintranslokation und -sortierung in Mitochondrien</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3 Proteininsertion von der Matrixseite der IM</b> .....	<b>7</b>
1.3.1 Insertion ungefalteter Proteine durch OXA.....	8
1.3.2 Rieske Protein Insertion in Hefe und Säugermitchondrien durch BCS1 ..	9
1.3.3 Der Twin Arginin Translokationsweg (TAT).....	10
<b>1.4 Zielsetzung dieser Arbeit</b> .....	<b>15</b>
<b>2 Material</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1 Chemikalien</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2 Molekulargewicht- und Größenstandards</b> .....	<b>16</b>
<b>2.3 Enzyme und Kits</b> .....	<b>16</b>
<b>2.4 Oligonukleotide</b> .....	<b>16</b>
<b>2.5 Vektoren und Plasmide</b> .....	<b>16</b>
<b>2.6 Westernblotmembran</b> .....	<b>17</b>
<b>2.7 Antisera</b> .....	<b>17</b>
<b>2.8 Bakterienstämme</b> .....	<b>17</b>
<b>2.9 Genidentifikationsnummern und Pflanzenlinien</b> .....	<b>17</b>
<b>3 Methoden</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1 Pflanzenbiologische Methoden</b> .....	<b>18</b>
3.1.1 Wachstumsbedingungen.....	18
3.1.2 Stabile Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	18
3.1.3 Phänotypisierung .....	18
3.1.4 Pollenfärbung .....	19
3.1.5 Kallus Zellkultur.....	19
<b>3.2 Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>20</b>
3.2.1 Klonierungsstrategien .....	20

3.2.1.1 Gateway Klonierung .....	20
3.2.1.2 Golden Gate Klonierung.....	20
3.2.2 Sequenzierung .....	21
3.2.3 RNA Sequenzierung .....	21
3.2.4 Isolierung genomischer DNA aus <i>A. thaliana</i> und Genotypisierung .....	21
3.2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	22
3.2.6 RNA Isolierung aus <i>A. thaliana</i> und cDNA Synthese .....	22
3.2.7 Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	22
3.2.8 Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	23
<b>3.3 Biochemische Methoden .....</b>	<b>23</b>
3.3.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	23
3.3.2 TCA-Fällung mitochondrialer Proteine .....	23
3.3.3 Agarose Gelelektrophorese.....	23
3.3.4 SDS- Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	24
3.3.5 Blue Native (BN-) Polyacrylamid Gelelektrophorese (BN-PAGE) .....	24
3.3.6 Qualitative In-Gel Aktivitätsmessung von Komplexen der Atmungskette	25
3.3.7 Quantifizierung der absoluten Respiration der Elektronentransportkette	25
3.3.8 <i>In vitro</i> Transkription und Translation (TNT).....	26
3.3.9 Western Blot und Immunodetektion .....	26
3.3.10 Nachweis der Autoradiografie .....	27
3.3.11 Elektroelution isolierter Komplex III Dimere.....	27
3.3.12 Liquid chromatography-coupled tandem Massenspektrometrie (LC-MS/MS) .....	27
3.3.13 Co-Immunfällung und chemische Quervernetzung ( <i>Crosslinking</i> ) mitochondrialer Proteine .....	28
<b>3.4 Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>28</b>
3.4.1 Aufarbeitung von Mitochondrien aus <i>A. thaliana</i> .....	28
3.4.2 Aufbrechen der äußeren Membran von isolierten Mitochondrien .....	29
3.4.3 Proteinase K Verdau .....	29
3.4.4 Karbonatextraktion mitochondrialer Proteine .....	29
3.4.5 Membransolubilisierung .....	29
3.4.6 Pegylierung zugänglicher Cysteine von mitochondrialen Proteinen.....	30
3.4.7 <i>In vitro</i> Import von mitochondrialen Vorläuferproteinen.....	30

3.4.8 Assemblierung von <i>in vitro</i> importierten mitochondrialen Proteinen über die Zeit .....	30
<b>3.5 Computerbasierte Methoden.....</b>	<b>30</b>
3.5.1 Alignment von Pflanzen-spezifischen MTTATB ähnlichen Proteinen .....	30
3.5.2 Remodellierung von AtMTTATB.....	31
3.5.3 Evaluation der RNA Sequenzierungsdaten .....	31
3.5.4 Evaluation der Massenspektrometrie .....	31
3.5.5 Signifikanznachweis.....	32
<b>3.6 Mikroskopie .....</b>	<b>32</b>
3.6.1 Visualisierung der Antheren aus <i>A. thaliana</i> .....	32
3.6.2 Visualisierung von Mitochondrien aus <i>A. thaliana</i> durch Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .....	32
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1 Partielle Komplementierung durch den ABI3 Ansatz.....</b>	<b>34</b>
4.1.1 Prinzip der ABI3p-Komplementierung .....	34
4.1.2 Phänotypische Charakterisierung von partiell komplementierten Mutanten .....	34
4.1.3 Partiiell komplementierte Mutanten sind steril.....	36
<b>4.2 Alignment und Remodellierung von MTTATB .....</b>	<b>36</b>
<b>4.3 Funktionelle Komplementierung durch C-terminal verkürzte MTTATB Varianten.....</b>	<b>38</b>
4.3.1 Phänotypische Charakterisierung von Mutanten mit verkürzten MTTATB Protein Varianten .....	38
4.3.2 Sterilität der Antheren und verminderte Samenentwicklung der Mutanten .....	43
4.3.3 Ultrastruktur von Mitochondrien der MTTATB Linien im Vergleich zu <i>Col-0</i> .....	44
4.3.4 MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien prägen einen Komplex III assoziierten Phänotyp aus .....	46
4.3.5 MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien sind in der aeroben Atmung eingeschränkt	53
4.3.6 <i>In vitro</i> Import von Komplex III Untereinheiten in Mitochondrien aus MTTATB $\Delta$ 42 .....	55
4.3.7 Orientierung und Faltung von RISP in MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien.....	58
4.3.8 RISP kann mit MTTATB durch chemische Quervernetzung in Mitochondrien der Mutantenlinien verknüpft werden.....	65

<b>4.4 Funktionelle Komplementierung durch MTTATB-cmyc.....</b>	<b>66</b>
4.4.1 Phänotypische Charakterisierung von MTTATB-cmyc komplementierten Mutanten .....	66
4.4.2 Fertilität der Mutanten .....	67
4.4.3 Charakterisierung des molekularen Phänotyps der MTTATB-cmyc Mutanten .....	68
<b>4.5 Transkriptom Analyse von MTTATB<math>\Delta</math>42 und MTTATB-cmyc Mutanten im Vergleich zu <i>Col-0</i> .....</b>	<b>72</b>
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>74</b>
5.1 Pflanzenmitochondrien besitzen einen funktionsfähigen TAT Weg zur Insertion der RISP Untereinheit in Komplex III .....	74
5.2 Das MTTATBC System der Pflanzen – ein TAT System ohne TatA? .....	79
5.3 Evolutionärer Kontext.....	80
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>84</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>96</b>
<b>Curriculum Vitae.....</b>	
<b>Publikationen.....</b>	
<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	
<b>Versicherung der Co-Autoren.....</b>	
<b>Danksagung.....</b>	

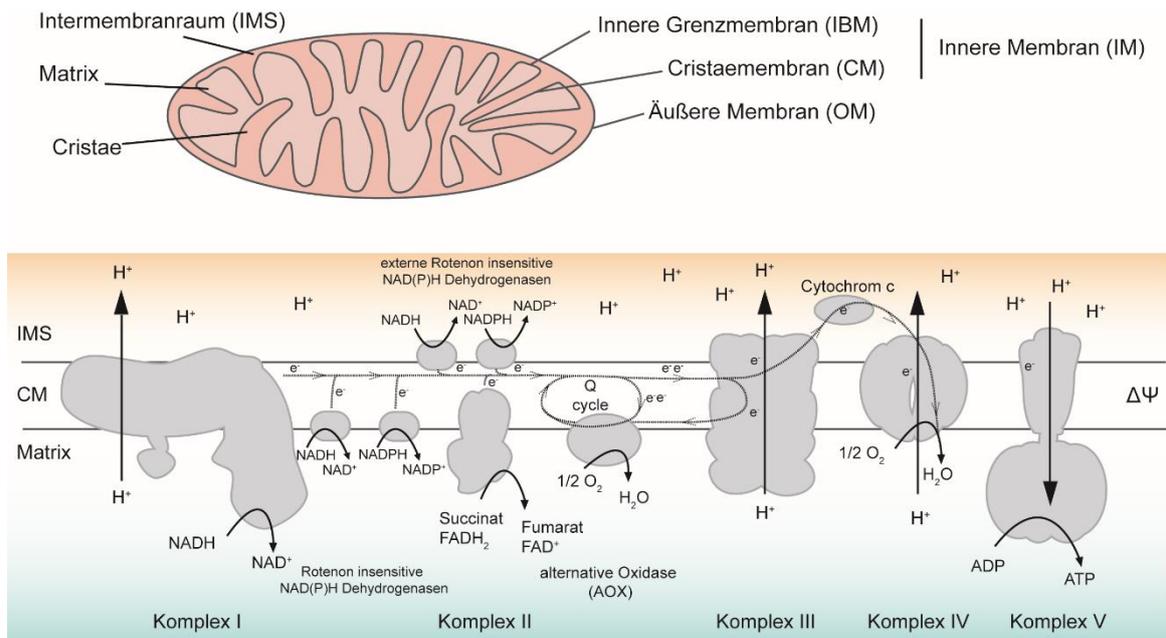
# 1 Einleitung

## 1.1 Ursprung und Funktionen von Mitochondrien

Die Entwicklung von Mitochondrien war die Voraussetzung zur Entstehung eukaryotischen Lebens. Mit größter Wahrscheinlichkeit gehen die Mitochondrien jeder Spezies auf einen gemeinsamen Vorfahren zurück, den *last eukaryotic common ancestor* (LECA), der durch primäre Endosymbiose entstanden ist (Martin et al. 2015; O'Malley et al. 2019). Die Endosymbiontentheorie erklärt den Ursprung der ersten Mitochondrien als ein einmaliges Ereignis, in dessen Verlauf ein  $\alpha$ -Proteobakterium in eine archaische Wirtszelle aufgenommen wurde (Martin et al. 2015). Die endosymbiotische Aufnahme eines  $\alpha$ -Proteobakteriums in ein Archaeum ermöglichte erstmalig eine bifunktionelle Energiegewinnung durch die Verwertung von Wasserstoff oder Sauerstoff (Martin et al. 2015). Diese Veränderung forcierte verschiedene Anpassungen, die zur Entstehung der ersten eukaryotischen Zelle und des ersten Mitochondriums führten. Unter anderem wurde ein Großteil des bakteriellen Genoms durch horizontalen Gentransfer in das Genom der Wirtszelle übermittelt (Martin et al. 2015). Dennoch verblieb ein kleiner Teil des endosymbiotischen Genoms und ist in den mitochondrialen Genomen von heute repräsentiert. Mitochondriale Genome variieren je nach Organismus zwischen drei (Plasmodium) und über 100 Genen (Andalucia), die für funktionsfähige Proteine kodieren (Burger et al. 2013; Gray et al. 1999).

Heutige Mitochondrien in eukaryotischen Zellen bestehen aus vier Kompartimenten: einer äußeren Membran (OM), dem Intermembranraum (IMS), einer inneren Membran (IM) und der mitochondrialen Matrix. Während die OM das Organell vom Cytosol abtrennt, formt die innere Membran ausgeprägte Ausstülpungen in die Matrix, die als Cristae bezeichnet werden. Durch das unterschiedliche, aber spezifische Auftreten bestimmter Proteinkomplexe in Arealen der IM nahe der OM beziehungsweise der Cristae lässt sich die innere Membran der Mitochondrien zudem in die innere Grenzmembran (IBM) und die Cristaemembran (CM) einteilen (Busch 2020; Palade 1953) (Abbildung 1).

Mitochondrien üben essentielle Funktionen der zellulären Homöostase aus. Sie sind vor allem für ihre Funktion im Rahmen des Tricarbonsäure-Zyklus und der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) in der aeroben Atmung bekannt, spielen aber auch fundamentale Rollen in zellulären Prozessen wie beispielsweise in der Biogenese organischer Verbindungen, der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese, der *reactive oxygen species* (ROS)-Produktion, sowie bei Stressresistenz, der zellulären Qualitätskontrolle und Autophagie (Colombatti et al. 2014; Demarquoy and Le Borgne 2015; Grancara et al. 2016; Janska and Kwasniak 2014; Lill and Freibert 2020).



**Abbildung 1. Aufbau der Mitochondrien und oxidative Phosphorylierung.** Die obere Darstellung zeigt die Kompartimente eines Mitochondriums. Das untere Schema stellt die oxidative Phosphorylierung mit den Komplexen der Atmungskette in der Cristaemembran dar.

Die Funktionen der Mitochondrien sind innerhalb der Stämme weitestgehend konserviert, dennoch gibt es diverse Unterschiede zwischen Mitochondrien autotropher Organismen wie Pflanzen im Vergleich zu Mitochondrien opisthokonter Organismen wie Säugern und Hefe. Im Allgemeinen besitzen Mitochondrien z.B. von Pflanzen ein weitaus größeres Genom (circa 40-50 kodierende Gene) als das Genom aus Hefe (8 kodierende Gene) oder das des Menschen (13 kodierende Gene) (Gray et al. 1999; Malina et al. 2018). Die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren wird in heterotrophen Organismen von Mitochondrien durchgeführt, während diese Funktion in autotrophen Organismen den Peroxisomen zugeordnet wird (Demarquoy and Le Borgne 2015). Außerdem sind Pflanzen wegen ihrer Sessilität anfälliger für umweltbedingten Stress, an dessen Regulation unter anderem Pflanzenmitochondrien beteiligt sind (Pu et al. 2015). Des Weiteren besitzen Pflanzenmitochondrien eine erhöhte Anzahl an Proteinimportkomponenten, an Enzymen der Elektronentransportkette und einen erhöhten RNA Metabolismus (Carrie et al. 2010b; Duncan et al. 2013; Hammani and Giege 2014; Mackenzie and McIntosh 1999; Schertl and Braun 2014).

In pflanzlichen Zellen befindet sich außerdem ein weiterer primärer Endosymbiont: der Plastid. Die Anwesenheit eines zweiten Organelltyps hat ein grundlegend anderes Redox- und Energieumfeld innerhalb der Zelle zur Folge und erfordert eine erhöhte Kommunikation der Organellen mit anderen Kompartimenten sowie dem Nukleus. Außerdem wird durch die Anwesenheit der Plastiden ein weiterer zellulärer Prozess ermöglicht, die Photorespiration

(Dellero et al. 2016; Hagemann and Bauwe 2016). Insgesamt umfasst jedes mitochondriale Proteom über 1000 Proteine, die für die Instandhaltung, Regulation und Kontrolle dieser Prozesse verantwortlich sind.

OXPPOS ist einer der wichtigsten Prozesse der Energiegewinnung der Zelle und ist in den Mitochondrien lokalisiert. Durch vier Multiproteinkomplexe wird ein Elektronentransfer von NADH und FADH<sub>2</sub> zu O<sub>2</sub> in einem mehrstufigen Transfer katalysiert, was die Bildung von H<sub>2</sub>O aus O<sub>2</sub> und einem Protonengradienten über die innere Membran zur Folge hat. Die Proteinkomplexe sind ausschließlich in der CM lokalisiert (Busch 2020). Die für den Elektronentransfer verantwortlichen Multiproteinkomplexe bestehen aus der NADH-Dehydrogenase (Komplex I), der Succinat-Dehydrogenase (Komplex II), der Ubiquinon-Cytochrom-bc1-Oxidoreduktase (Cytochrom bc1 Komplex oder Komplex III) und der Cytochrom c-Oxidase (Komplex IV) (Busch 2020).

Der Elektronentransfer wird durch die Oxidation der durch den TCA-Zyklus entstandenen Substrate NADH zu NAD<sup>+</sup> (Komplex I) oder Succinat zu Fumarat bzw. FADH<sub>2</sub> zu FAD<sup>+</sup> (Komplex II) initiiert. Die Elektronen werden auf den mobilen Elektronentransfer Co-Faktor Ubiquinon in der IM transferiert und auf Komplex III übertragen. Ein Elektron verfolgt einen zyklischen Elektronentransport über die Apocytochrom B (COB) Untereinheit von Komplex III zurück in den Ubiquinon Pool des Q-Zyklus (Hatefi 1985). Das andere Elektron wird über die an den Multiproteinkomplex gebundene Rieske 2Fe-2S und Cytochrom c1 Untereinheit an Cytochrom c weitergeleitet, einem kleinen mobilen und peripheren Membranprotein auf der IMS Seite der inneren Membran (Edwards et al. 1982). Über Cytochrom c wird ein Elektron zu Komplex IV weitergeleitet. Schließlich kann durch Komplex IV pro vier oxidierten Cytochrom c Moleküle ein O<sub>2</sub>-Molekül zu H<sub>2</sub>O reduziert werden (Hatefi 1985). Zudem verfügen die Komplexe I, III und IV über die Fähigkeit, Protonen von der Matrix in den IMS zu pumpen. Durch den entstehenden Protonengradienten wird, durch die ATP Synthase (Komplex V) in der Matrix, ATP generiert (Hatefi 1985) (Abbildung 1).

Neben der klassischen Elektronentransportkette verfügen die Mitochondrien der Pflanzen über ergänzende alternative Oxidasen in der IM. Hierbei handelt es sich um alternative Rotenon insensitive NAD(P)H-Dehydrogenasen und die alternative Oxidase (AOX), welche hauptsächlich während der zellulären Stressantwort aktiviert werden (Schertl and Braun 2014) (Abbildung 1).

All diese Multiproteinkomplexe besitzen eine individuelle Zusammensetzung und erfordern eine streng kontrollierte Assemblierung während der Biogenese der IM. Obwohl einige dieser Untereinheiten noch im mitochondrialen Genom kodiert sind und durch die mitochondriale Proteinbiosynthese translatiert werden, ist ein Großteil der Proteine infolge des horizontalen Gentransfers im Nukleus kodiert (Ott and Herrmann 2010). Ferner ist nahezu das komplette mitochondriale Proteom kernkodiert und muss außerhalb des

Organells im Cytosol translatiert und in die Mitochondrien importiert werden, um die Funktionalität des Organells zu garantieren (Gray et al. 1999; Martin et al. 2015; Murcha et al. 2014b). Daher entwickelten sich spezifische Signalpeptide und Multiproteinkomplexe, die ausschließlich für die Translokation der Proteine durch die Membranen zuständig sind.

## 1.2 Proteintranslokation und -sortierung in Mitochondrien

Die meisten mitochondrialen Proteine sind im Kern kodiert und werden an cytosolischen Ribosomen als Vorläuferproteine translatiert. Vorläuferproteine befinden sich nach der Proteinbiosynthese in einem ungefalteten Zustand und sind mit spezifischen Targetingsignalen versehen (Dudek et al. 2013). Um korrekt sortiert das finale Ziel zu erreichen, werden die ungefalteten Vorläuferproteine durch Chaperone zum Organell geleitet und verfolgen anschließend, je nach Targetingsignal, einen von vier verschiedenen Wegen, um die Membranen der Mitochondrien zu passieren (Dudek et al. 2013) (Abbildung 2).

Mit Ausnahme einiger Proteine, die direkt an der OM inseriert werden, durchqueren alle anderen Proteine die OM durch den Multiproteinkomplex der Translokase der äußeren Membran (TOM). In Pflanzenmitochondrien besteht der TOM Komplex aus den Untereinheiten TOM9, TOM20 und TOM40 (Duncan et al. 2013). Mit Hilfe des Rezeptorproteins TOM20 werden die Vorläuferproteine durch die Poren-formende Untereinheit TOM40 in den IMS geleitet (Ahting et al. 2005). Außerdem sind die peripheren Membranproteine und Assemblierungsfaktoren TOM5, TOM6 und TOM7 an der Regulation des Proteinkomplexes beteiligt (Duncan et al. 2013).

Nachdem die Vorläuferproteine den IMS erreicht haben, werden sie je nach Targetingsignal in die Kompartimente der Mitochondrien sortiert.

Der IMS beherbergt mehrere Proteine, die an den unterschiedlichen Importwegen beteiligt sind. Mitochondriale Intermembranraumproteine besitzen ein internes Cysteinangereichertes Signalpeptid, das die Zielproteine nach dem Passieren des TOM-Komplexes zum Disulfidbrücken-Redox-System MIA40/ERV1 leitet (Gabriel et al. 2007) (Abbildung 2, Weg 2). Die Disulfidbrückenbildung der Zielproteine wird durch MIA40/ERV1 katalysiert und resultiert in der Faltung der Substrate, um einen Rücktransport in das Cytosol zu verhindern (Deponte and Hell 2009; Mesecke et al. 2005). Die kleinen Untereinheiten der Translokase der inneren Membran (TIM) im IMS - TIM8, TIM9, TIM10 und TIM13 - fungieren als Chaperone zur zielgerichteten Weiterleitung von mitochondrialen Vorläuferproteinen (Carrie et al. 2010b; Chacinska et al. 2009).

Zum einen leiten die kleinen TIM-Proteine  $\beta$ -barrel Vorläuferproteine der OM zum *sorting und assembly complex of the outer membrane* (SAM) Komplex, der eine schrittweise

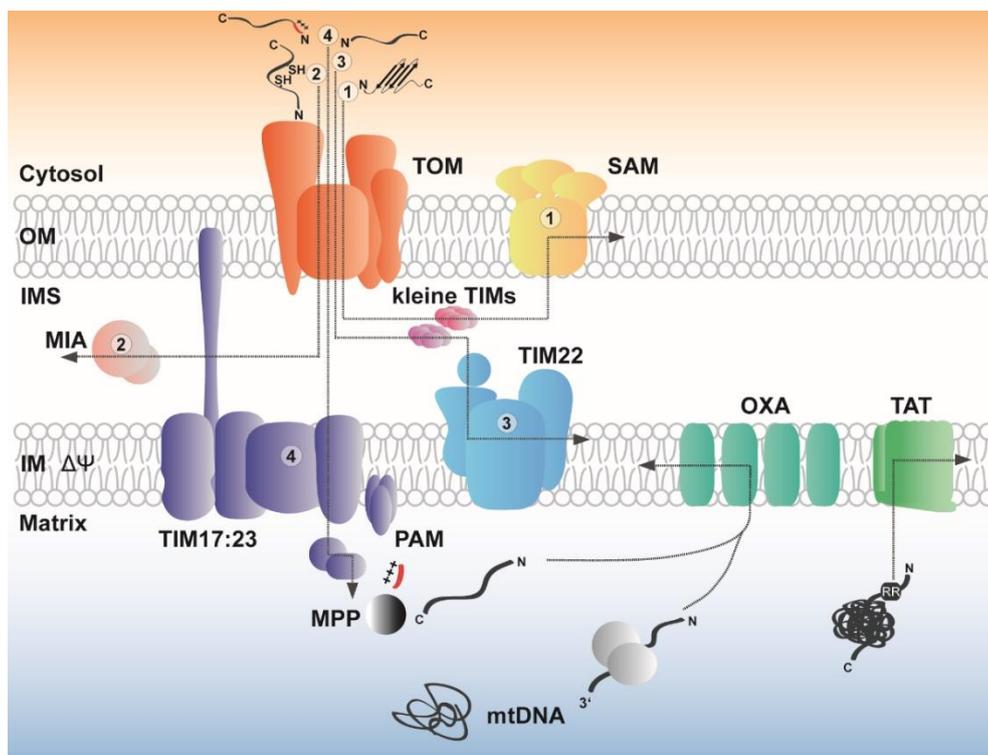
Translokation in die OM ermöglicht (Höhr et al. 2018; Wiedemann et al. 2003) (Abbildung 2, Weg 1).

Zum anderen leiten sie Vorläufer von hydrophoben Membranproteinen mit nicht-absplaltbaren und internen Signalpeptiden zum integralen Membranprotein TIM22 (Lister et al. 2002; Murcha et al. 2004) (Abbildung 2, Weg 3), das die Translokation in die IM von der IMS-Seite mit Hilfe des Membranpotentials der IM initiiert (Duncan et al. 2013; Kolli et al. 2018). Durch den TIM22 Komplex erfolgt die Translokation von polytopischen Membranproteinen. TIM22 ist auch als die *Carrier*-Translokase bekannt, da die meisten Substrate dieses Translokationswegs der *Carrier*-Protein-Familie zugeordnet werden (Sirrenberg et al. 1996). Der TIM22 Komplex in Hefe Mitochondrien wird zudem durch die Untereinheiten TIM54 und TIM18 unterstützt, die für den Translokationsprozess essentiell sind (Gebert et al. 2011; Kerscher et al. 1997; Sirrenberg et al. 1996; Sirrenberg et al. 1998). In Mitochondrien höherer Pflanzen konnten bislang keine Homologe dieser Untereinheiten identifiziert werden (Carrie et al. 2010b). Das Substrat arretiert durch das hydrophobe Signalpeptid im TIM22 Komplex und wird anschließend lateral in die IM entlassen. Interessanterweise besitzen einige Substrate des TIM22 Translokationsweges aus der *Carrier*-Protein-Familie absplaltbare N-terminale Sequenzen, die für die Insertion in die IM zwar nicht essentiell sind, aber vermutlich eine Rolle für die Effizienz des Imports spielen (Laloi 1999; Murcha et al. 2005b).

Positiv geladene, N-terminale und absplaltbare Signalpeptide leiten Vorläuferproteine direkt zum TIM23:17 Multiproteinkomplex (Moulin et al. 2019) (Abbildung 2, Weg 1). Der TIM23:17 Komplex bildet die Haupteintrittspforte für einen Großteil des mitochondrialen Proteoms in die Matrix (Bolender et al. 2008). Während TIM23 zusammen mit TIM17 die zentrale Translokationspore darstellt, kann die TIM17 Untereinheit auch eine Verbindung zur OM herstellen (Carrie et al. 2010b; Duncan et al. 2013; Murcha et al. 2005a). Zudem besteht der TIM-Komplex in Pflanzenmitochondrien neben TIM23 und TIM17 aus den Untereinheiten TIM50, TIM21, TIM44 und der Komplex I Untereinheit B14.7 (Murcha et al. 2014a). TIM23, TIM17 und TIM22 gehören zur *preprotein and amino acid transport* (PRAT) Familie und bilden durch ihre hydrophoben Transmembransegmente Poren-formende Strukturen aus (Murcha et al. 2007; Rassow et al. 1999). Zusammen mit TIM23:17 sind die Untereinheiten TIM50 und TIM21 zur lateralen Insertion von ungefalteten Vorläuferproteinen in Abhängigkeit vom Membranpotential verantwortlich (Chacinska et al. 2009; van der Laan et al. 2007). Vorläuferproteine, die durch TIM23:17 in die IM entlassen werden, bestehen meist aus nur einer membranspannenden Transmembrandomäne und werden wie bei der TIM22 Translokase durch ein Arretieren des positiv geladenen Signalpeptids im TIM23:17 Translokationskanal durch TIM23, TIM17 und TIM50 lateral in die Membran entlassen (Herrmann and Neupert 2003; van der Laan et al. 2007).

TIM50 fungiert als Regulator für den TIM23:17 Kanal und ist an den ersten Schritten der Übertragung des Vorläuferproteins von der Außen- zur Innenmembran beteiligt (Chacinska et al. 2009).

Zur vollständigen Translokation in die mitochondriale Matrix interagiert der TIM23:17 Komplex mit TIM50, TIM44, dem *presequence translocate-associated motor* (PAM), und dem mitochondrialen *heat shock protein 70* (MTHSP70) (Wagner et al. 2009). Die Translokation verläuft in Abhängigkeit von ATP und wird durch die Bindung des Substrats an MTHSP70 angetrieben (Chacinska et al. 2010). Die assoziierten Chaperone des PAM Motors – PAM16, PAM17 und PAM18 – binden an HSP70 und modulieren dessen Aktivität. Dadurch wird die Assoziation zum TIM17:23-Kanal unterstützt (Frazier et al. 2004; Truscott et al. 2003). Nachdem die Vorläuferproteine in die Matrix importiert wurden, wird durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase (MPP) das N-terminale Signalpeptid abgespalten (Murcha et al. 2004).



**Abbildung 2. Proteinimport und -exportwege in pflanzlichen Mitochondrien.** Alle Vorläuferproteine passieren die OM durch den TOM Komplex. Translokationsweg 1 deutet die Insertion von  $\beta$ -barrel Vorläuferproteinen in die OM durch den SAM-Komplex an. Translokationsweg 2 zeigt den MIA40/ERV1 (MIA) Weg zur Assemblierung und Faltung von Intermembranraumproteinen. Translokationsweg 3 steht für die laterale Insertion von hydrophoben Vorläuferproteinen ohne abspaltbares Signalpeptid in die IM durch den TIM22 Komplex. Translokationsweg 4 zeigt die Translokation von Vorläuferproteinen mit N-terminal abspaltbaren und positiv geladenen Signalpeptiden in die Matrix durch den TIM23:17 Komplex. Die Translokationswege OXA und TAT zeigen die Möglichkeiten zur Insertion von importierten bzw. in Mitochondrien synthetisierten Proteinen von der Matrixseite in die IM. OXA vermittelt die Translokation von ungefalteten, TAT die Insertion von gefalteten Proteinen.

Bemerkenswert ist, dass anstatt neuer Mechanismen und Wege für den mitochondrialen Proteinimport zu entwickeln, die mitochondriale Proteinmaschinerie unter anderem durch die Anpassung und Umrüstung bereits bestehender bakterieller Proteinexport- und Membran-Insertionswege entstand (Hewitt et al. 2011). Zum Beispiel haben die Komplexe SAM, TIM23 (und ihre Untereinheiten) jeweils klar identifizierte Homologe in Bakterien. Der mitochondriale SAM-Komplex ist ein Homolog zum bakteriellen BAM-Komplex, die beide für die Insertion von  $\beta$ -barrel Proteinen in die äußere Membran zuständig sind (Gentle et al. 2004; Paschen et al. 2003). Im Fall des TIM23-Komplexes scheint die Poren-bildende TIM23 Untereinheit zum Aminosäure-Transporter LivH verwandt zu sein (Rassow et al. 1999). Die Entwicklung der mitochondrialen Importmaschinerien aus den bakteriellen Vorfahren spielte also nicht nur eine Schlüsselrolle bei der Etablierung der Mitochondrien als Organell, sondern auch bei der Etablierung der ersten Eukaryoten.

### 1.3 Proteininsertion von der Matrixseite der IM

Die IM der Mitochondrien faltet sich durch Cristae zu einem Kompartiment mit enormer Oberfläche mit einem hohen Anteil an Proteinen. Im Vergleich zur OM ist das Protein-Lipidverhältnis der IM mit circa 75% Protein- zu 25 % Lipidanteil in etwa doppelt so hoch (Hallermayer and Neupert 1974). Die Proteine der IM sind größtenteils im Nukleus und in manchen Fällen im mitochondrialen Genom kodiert. Mitochondrien besitzen noch eine eigene Proteinbiosynthese, mit der sie mitochondrial-kodierte Gene translatieren können. Ein großer Teil des mitochondrialen Genoms kodiert für Untereinheiten der Komplexe der Atmungskette, die nach der Translation von der Matrix in die IM transloziert werden müssen (Gray et al. 1999; Unseld et al. 1997). Außerdem müssen manche, nukleär-kodierte Proteine zunächst in die Matrix importiert werden, um z.B. einen Co-Faktor zu erhalten und anschließend zurück in die IM transportiert zu werden (Abbildung 2, OXA und TAT). Die co- bzw. posttranslationale Translokation ungefalteter Proteine wird von *oxidase assembly* (OXA) Proteinen durchgeführt (Kolli et al. 2018; Wang and Dalbey 2011) (siehe nächstes Kapitel). Der einzige beschriebene Fall, der eine gefaltete Proteintranslokation benötigt, ist die Translokation der RISP Untereinheit in Komplex III, dessen Faltung durch den Einbau des 2Fe-2S Clusters in den C-Terminus vor der Translokation bedingt ist. In Mitochondrien opisthokonter Linien wird dieser Prozess durch die AAA-ATPase BCS1 durchgeführt (Wagener et al. 2011) (siehe Kapitel 1.3.2). In Pflanzenmitochondrien konnte für diesen Prozess bislang kein experimenteller Nachweis erbracht werden, jedoch wird vermutet, dass die Translokation von RISP durch Twin Arginin Translokation erfolgt (Carrie et al. 2016) (siehe Kapitel 1.3.3).

### 1.3.1 Insertion ungefalteter Proteine durch OXA

OXA Proteine gehören zur Oxa1 Superfamilie (ehemals YidC/Oxa1/Alb3 Familie) (Anghel et al. 2017), und kommen in Bakterien (YidC), Thylakoiden (Alb3) und Mitochondrien vor (Bonney et al. 1994; Kolli et al. 2019; Wang and Dalbey 2011). Neueste Studien identifizierten außerdem Homologe der OXA Proteine im eukaryotischen endoplasmatischen Retikulum (Anghel et al. 2017). Die Funktion der Proteine der Oxa1 Superfamilie ist die Insertion und Translokation von ungefalteten Proteinen in Membranen (Funes et al. 2004; Kolli et al. 2019; Urbischek et al. 2015).

Typischerweise sind sie durch fünf Transmembranhelix-Domänen charakterisiert und mit verschiedenen Interaktionsdomänen, im zum IMS orientierten N- und Matrix-orientierten carboxy(C)-Terminus, ausgestattet (Kolli et al. 2018). Im Allgemeinen besitzen Mitochondrien mindestens zwei Homologe, Oxa1 und Cox18 (Oxa2). Durch die C-terminale ribosomale Bindedomäne Domäne von Oxa1 können mitochondrial-kodierte Proteine co-translational in die IM transloziert werden (Hell et al. 2001). Dies passiert beispielsweise in ersten Schritten der Cox2-Assemblierung im Rahmen der Komplex IV Biogenese (Szyrach et al. 2003). Die positiv geladene coiled-coil Domäne von Oxa1 interagiert mit der negativ geladenen 21S rRNA der großen Untereinheit des Ribosoms in der Nähe des Polypeptid Ausgangstunnels (Gruschke et al. 2010; Ott and Herrmann 2010). Damit kann Oxa1 in einem äußerst frühen Stadium der Cytochrom c Oxidase-Biogenese mit der Untereinheit Cox2 interagieren und es direkt in die IM inserieren (Kolli et al. 2018). Oxa1 verfügt nicht nur über eine Translokationsfunktion, sondern kann darüber hinaus auch als Chaperon fungieren (Jia et al. 2007). Cox18 besitzt keine Ribosom-bindende coiled-coil-Domäne und übt eine Rolle in der post-translationalen Translokation der zweiten TMH von Cox2 in die IM aus (Saracco and Fox 2002).

In Mitochondrien höherer Pflanzen kommen aufgrund unabhängiger Genduplikationen vier OXA Proteine vor (Benz et al. 2013): OXA1a, OXA1b, OXA2a und OXA2b. OXA1a und OXA1b besitzen die typischen coiled-coil Domänen. Demgegenüber besitzen OXA2a und OXA2b Pflanzen-spezifische, C-terminale Tetratricopeptide repeat (TPR) Motive (Zhang et al. 2009). TPR-Domänen sind hauptsächlich für ihre Funktion bezüglich Protein-Protein-Interaktionen bekannt (Blatch and Lassle 1999). Vermutlich üben die TPR-Domänen der OXA2 Proteine eine Funktion in der Chaperoninteraktion aus, ermöglichen Proteintranslokation oder geben Hilfestellung während der Mutliproteinkomplex-Assemblierung (Kolli et al. 2018). Außer OXA1b sind alle OXA Proteine essentiell in *A. thaliana* (Benz et al. 2013) und vermutlich für die Assemblierung von kern- und mitochondrial kodierten Untereinheiten der Komplexe der Atmungskette verantwortlich sind (Hamel et al. 1997). OXA2b wurde außerdem als essentielle Komponente für die

Translokation der zweiten TMH und des C-Terminus von COX2 durch die Membran identifiziert (Kolli et al. 2019). Die explizite Funktion der anderen OXA Proteine ist bislang noch nicht beschrieben worden.

### 1.3.2 Rieske Protein Insertion in Hefe und Säugermitchondrien durch BCS1

In Mitochondrien opisthokonter Organismen wird die Rieske FeS (RISP) Untereinheit des bc1-Komplexes (oder Komplex III) durch das *ubiquinol-cytochrome c reductase (bc1) synthesis* (BCS1) Protein in Komplex III transloziert. RISP erhält nach dem Import durch TOM und TIM23:17 in seiner Form als Apoprotein seinen 2Fe-2S-Cluster in der Matrix und wird daher in einem partiell gefalteten Zustand in die Membran inseriert (Kispal et al. 1997; Kispal et al. 1999; Wagener et al. 2011). In seiner finalen Ausrichtung ist das Protein mit einer Transmembranhelix (TMH) in der IM verankert und besitzt eine kugelförmige Eisen-Schwefel-Cluster-Domäne im C-Terminus (2Fe-2S-Domäne), die in voll assembliertem Zustand zum IMS zeigt (Hunte et al. 2000).

BCS1 ist ein AAA-ATPase Protein in der IM mit einer AAA-Domäne ausgerichtet zur Matrix. Die kurze N-terminale Sequenz ist zum IMS orientiert. BCS1 besitzt außerdem eine Transmembrandomäne, die die IM durchspannt, und eine N-Linker Region (Folsch et al. 1996; Nobrega et al. 1992).

In Mitochondrien aus Hefe wurde gezeigt, dass in Abwesenheit von BCS1 die RISP Untereinheit nicht in den Cytochrom bc1 Komplex assemblieren kann und löslich in der Matrix akkumuliert (Wagener et al. 2011). Im Gegensatz dazu war RISP in Deletionsmutanten von Cytochrom c1, einer essentiellen Untereinheit von Komplex III, in seiner korrekten Topologie membranassoziiert, während die finale Assemblierung von Komplex III in beiden Verlustmutantenlinien ausblieb (Wagener et al. 2011). Ferner konnte dadurch bewiesen werden, dass BCS1 als Translokase der RISP Untereinheit fungiert, indem es RISP in die Membran inseriert und den C-Terminus von der Matrix auf die IMS Seite befördert (Wagener et al. 2011). Außerdem konnte damit ausgeschlossen werden, dass BCS1 eine mögliche Funktion als Chaperon während der Translokation von RISP in der Komplex III Biogenese übernimmt (Cruciat et al. 1999; Wagener et al. 2011).

Der Mechanismus, wie BCS1 ein gefaltetes Protein durch die Membran schleust, war lange unklar. BCS1 ist dazu fähig, Oligomere einer Größe von ungefähr 500 kDa auszubilden, die groß genug sind, um den gefalteten RISP C-Terminus durch die IM zu befördern (Wagener and Neupert 2012). Neueste Studien haben gezeigt, dass die Oligomere von BCS1 aus Heptameren bestehen (Kater et al. 2020). Ferner wurde auf der Grundlage der analysierten Cryo-EM Struktur von BCS1 ein schleusenähnlicher Mechanismus für die Translokation von RISP in Komplex III vorgeschlagen (Kater et al. 2020). Dieser Mechanismus gliedert sich

laut Kater et al. (2020) in drei Teile. Der erste Schritt besteht aus der Assoziation von RISP mit dem in die Matrix ragenden Vestibül von BCS1. Als Zweites wird der Eingang von BCS1 versiegelt und RISP in die Pore befördert. In einem letzten Schritt wird der C-Terminus der RISP Untereinheit in den IMS entlassen, begleitet von einer lateralen Freisetzung der RISP TMH in die IM (Kater et al. 2020). Der BCS1 Mechanismus wird durch ATP-Hydrolyse angetrieben. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die ATP-Hydrolyse die Konformationsänderung der mittleren Domäne von BCS1 bewirkt, die zur Öffnung der Pore und Freisetzung der RISP Untereinheit in die Membran und Komplex III führt (Kater et al. 2020).

Die selektive Rücktranslokation der RISP-Untereinheit wird in Mitochondrien nicht uniform durchgeführt. In Pflanzenmitochondrien konnte bislang kein Homolog zu BCS1 identifiziert werden (Carrie et al. 2016). Ein BCS1-ähnliches Protein wurde unter dem Namen AtOM66 veröffentlicht und ist in der OM lokalisiert. Es besitzt keine spezifische BCS1-Domäne wie BCS1 von Säugern oder Hefe. Die Sequenzähnlichkeiten sind daher nur auf die AAA-ATPase-Domäne beschränkt (Zhang et al. 2014). Demnach ist AtOM66 auch nicht an der RISP Translokation von der Matrixseite in die IM involviert. Stattdessen besitzen Pflanzen mögliche Untereinheiten des Twin-Arginin-Translokationswegs, der in Bakterien und Thylakoiden die gefaltete Proteintranslokation, insbesondere von RISP Proteinen, ausübt (Carrie et al. 2016; Cline 2015; Petru et al. 2018; Richter et al. 2007).

### 1.3.3 Der Twin Arginin Translokationsweg (TAT)

Twin-Arginin-Translokation (TAT) wurde erstmals in Chloroplasten unter dem Namen  *$\Delta pH$  pathway* identifiziert (Mori and Cline 1998). TAT beteiligt sich durch Translokation gefalteter Proteine in Bakterien und Chloroplasten an verschiedenen biosynthetischen Zellprozessen, wie dem photosynthetischen und respiratorischen Energiestoffwechsel, der Zellteilung, der Stickstofffixierung und der Eisen- und Phosphatversorgung der Zelle (Berks 2015). Außerdem sind bestimmte Co-Faktoren mit dem TAT-Transport assoziiert, die sich grob in Metall-Schwefel Cluster und Co-Faktoren mit einer Nukleotid Einheit gruppieren lassen (Palmer and Berks 2012; Ranquet et al. 2007; Tottey et al. 2008). Das TAT-System kann eine Translokationspore mit einem Durchmesser von 20 Å bis 70 Å bereitstellen (Berks et al. 2000). Die Translokation erfolgt allein durch die protonenmotorische Kraft der Membran (PMF). Die PMF wird hierbei durch chemische Komponenten des Protonengradienten ( $\Delta pH$ ) der Membran erreicht (Braun et al. 2007).

Der Name Twin Arginin Translokation stammt von hochkonservierten Signalpeptiden, die ein Arg-Arg (RR, Twin Arginin) Motiv besitzen (Berks 1996; Stanley et al. 2000). Üblicherweise bestehen die TAT-Signalpeptide aus mindestens 30 Aminosäuren und

können in drei verschiedene Regionen unterteilt werden. Die N-terminale Region des Signalpeptids von bakteriellen Substraten ist polar und enthält das spezifische Ser-Arg-Arg-Xaa-Phe-Leu-Lys Targetingmotiv in dem Xaa durch eine variable polare Aminosäure oder Glycin ersetzt werden kann (Berks 1996; Stanley et al. 2000). In Signalpeptiden aus TAT-Substraten der Thylakoide sind die Positionen 5 und 6 der Sequenz durch eine hydrophobe Aminosäure und Leucin oder Methionin an sechster Stelle ausgetauscht (Peltier et al. 2000; Robinson and Bolhuis 2004). An die N-Region schließt eine hydrophobe (h)-Region und eine polare Konsens-(c)-Region an, die eine Peptidase-Erkennungsstelle zur Abspaltung des Signalpeptids nach erfolgreicher Translokation, besitzt (Berks 2015). Solch ein Signalpeptid ist ebenfalls in RISP aus *A. thaliana* vorhanden und stützt daher die Theorie, dass das Protein in einer TAT-abhängigen Translokation in die Membran inseriert wird (Carrie et al. 2016).

Im Allgemeinen stammen die TAT-Untereinheiten aus zwei verschiedenen Genfamilien (Berks 2015; Goosens et al. 2014). Die TatA Familie umfasst Gene, die für die Proteine TatA, TatB und TatE kodieren. TatE ist ein funktionelles Homolog zu TatA, wird aber in geringeren Mengen in entsprechenden Bakterien exprimiert (Eimer et al. 2015; Jack et al. 2001). In Chloroplasten entspricht TatA dem Protein Tha4 und TatB dem Protein Hcf106 (Sargent et al. 1998; Walker et al. 1999). Die Untereinheiten bestehen aus einer N-terminalen Transmembrandomäne, die durch fünf Aminosäuren und einem konservierten Glycin an eine amphipatische Helixdomäne (APH) gekoppelt ist. Die APH ist dem Cytoplasma der Bakterien oder dem Stroma der Chloroplasten zugewandt und im rechten Winkel, an der Membran anlehnend, zur TMH ausgerichtet (Rodriguez et al. 2013) (Abbildung 3A). Neben einem konservierten C-terminalen Phenylalanin Rest der APH besteht der C-Terminus aus stark geladenen Strukturen, die vermutlich die Transportaktivität von TatA fördern. Der N-Terminus von TatA Untereinheiten ist polar und spielt vermutlich eine entscheidende Rolle in der Protein-Protein-Interaktion (Dabney-Smith et al. 2003; Lee et al. 2002; Rodriguez et al. 2013).

TatB bildet zwei ergänzende  $\alpha$ -Helix Strukturen am C-terminalen Ende aus (Abbildung 3A). Trotz struktureller Ähnlichkeiten unterscheiden sich die Funktionen von TatA und TatE zu denen von TatB. TatA und TatE definieren sich durch die Fähigkeit der Oligomerisierung. Dem gegenüber bilden TatB Untereinheiten einen Präkomplex mit TatC Untereinheiten (Cline and Mori 2001). Der N-Terminus von TatB übernimmt eine wesentliche Rolle in der TatB-TatC Interaktion (Fincher et al. 2003) und der Rekrutierung des TatA Oligomers nach der Substratbindung (Berks 2015).

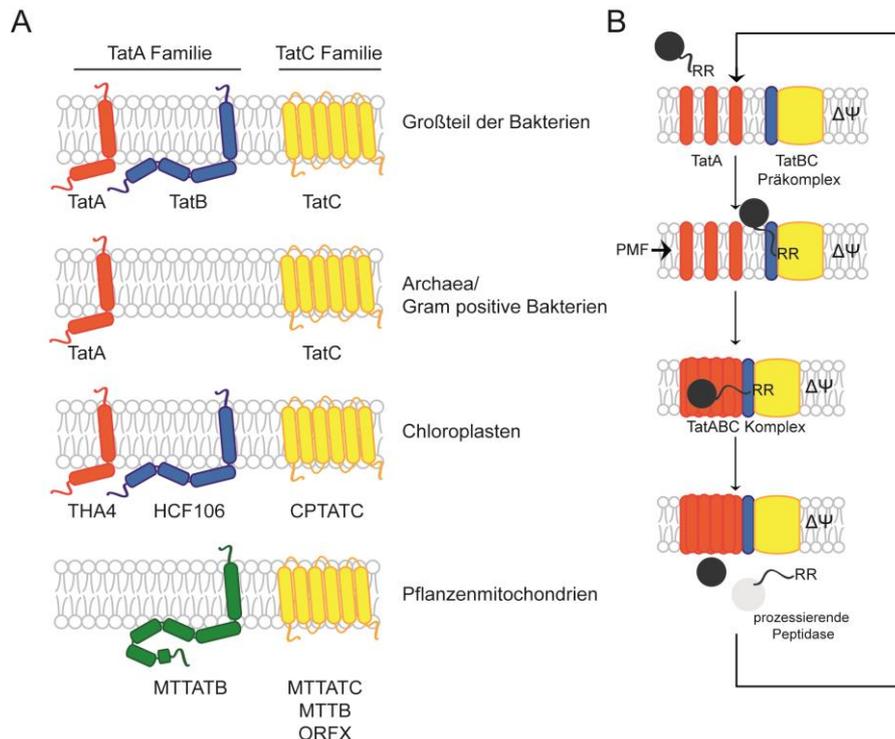
Die TatC Untereinheit gehört zur TatC Genfamilie. TatC ist ein sehr hydrophobes, integrales und polytopisches Transmembranprotein und spannt die Membran mit sechs  $\alpha$ -Helices (Abbildung 3A). TatC prägt vermutlich eine dem Cytoplasma zugewandte,

handschuhförmige Struktur aus, mit einem Glutamat- oder Glutaminrest nahe dem Zentrum (Rollauer et al. 2012).

Der TatBC-Komplex besteht aus einer äquimolaren Komposition beider Untereinheiten. Vier bis acht Moleküle jedes Proteins bilden einen Multiproteinkomplex mit einem ungefähren Molekulargewicht von 400 kDa in *E. coli* und 700 kDa in *Pisum sativum* (Martin et al. 2009; Oates et al. 2005). Die TatC Untereinheiten werden hierbei von TatB umschlossen und verkörpern den Bereich der Substraterkennung (Fröbel et al. 2012). Auch in den Mitochondrien aus *A. thaliana* konnten mögliche TAT Untereinheiten in einem stabilen Komplex mit einer Größe von 1500 kDa co-lokalisiert werden (Carrie et al. 2016).

Die klassische Anordnung einer TAT Translokase besteht aus den Untereinheiten TatA, TatB und TatC und kommt überwiegend in Chloroplasten und Proteobakterien vor (Abbildung 3A). Die TAT Substrat Translokation wird durch das Signalpeptid des Substratproteins initiiert, indem es vom TatBC-Präkomplex erkannt wird (Cline and Mori 2001; Gerard and Cline 2007; Mori and Cline 2002). Es wird vermutet, dass das N-terminale RR Motif des Substrats von zwei konservierten Glutaminsäureresten der TatC-Untereinheit zwischen den Transmembrandomänen TMH2 und TMH3 erkannt wird (Berks et al. 2014). Für Thylakoide gibt es zwei verschiedene Theorien der Substraterkennung. Zum einen könnte das Substrat durch eine schwache, elektrostatisch getriebene Wechselwirkung peripher im TatBC-Subkomplex gebunden werden und besitzt einen proteolytischen Zugang auf der stromalen Seite der Membran. Zum anderen könnte ein so genannter *deep insertion mode* zu einer starken Substrat-Präkomplex-Wechselwirkung führen. Somit wäre das Signalpeptid tief innerhalb des TatBC Präkomplexes eingebettet, wo es für eine proteolytische Spaltung unzugänglich wäre (Gerard and Cline 2007). Die N-Region des Substrats bindet hierbei zunächst im Zentrum der TatC-Untereinheit. Die C-Region orientiert sich anschließend zum Periplasma zwischen TMH5 und TMH6 (Berks et al. 2014).

Das Andocken des Signalpeptids löst eine durch die PMF angetriebene Oligomerisierung von bis zu 25 TatA-Untereinheiten zu einer ringförmigen Struktur aus, die zum TatBC Präkomplex rekrutiert wird und in der Ausbildung einer TatABC-Translokationspore resultiert (Celedon and Cline 2012; Gohlke et al. 2005). Zudem ist die Anzahl an oligomerisierenden TatA Molekülen abhängig von der Größe des gefalteten Substrats (Gerard and Cline 2007; Rose et al. 2013). Neben der Initiierung der Oligomerisierung der TatA Moleküle ist die PMF notwendig, um den Komplex in einem aktiven Zustand zu halten. Beim Eintreten einer begrenzten Bindungskapazität des TatBC-Subkomplexes können nicht assemblierte TatA-Oligomere auch Homotetramere ausbilden (Leake et al. 2008).



**Abbildung 3. Das Prinzip des Twin Arginin Translokationsweges. A)** Unterschiedliche Zusammensetzung funktionsfähiger (Bakterien und Chloroplasten) und putativer (Pflanzenmitochondrien) TAT Systeme. **B)** Funktionsweise eines klassischen TAT Weges bestehend aus den Untereinheiten TatA, TatB und TatC. RR = Signalpeptid eines TAT-Substrats. PMF = *proton motif force*, treibende Kraft der Translokation.

Das gefaltete Substrat wird entweder durch eine oligomere TatA-Translokationspore geschleust oder durch eine lokale Membranschwächung transloziert, die durch die Assemblierung des TatABC-Komplexes und die Protonenmotivkraft generiert wird (Berks 2015). Nach der vollständigen Translokation dissoziieren die TatA-Moleküle vom Translokationskomplex und das Signalpeptid wird durch eine Peptidase vom Substrat abgespalten (Luke et al. 2009; Mori and Cline 2002) (Abbildung 3B). Der zyklische Prozess der TAT-Translokation in Bakterien und Thylakoiden dauert zwischen ein und drei Minuten und kann nur ein Substrat auf einmal transportieren (Bageshwar and Musser 2007; Celedon and Cline 2012). Inwieweit die PMF für den Translokationsprozess notwendig erscheint, ist noch nicht eindeutig geklärt. Außerdem sind diverse Mechanismen zur Qualitätskontrolle unerlässlich und werden in Bakterien von entweder akzessorischen Chaperonen oder einem intrinsischen Korrekturmechanismus ausgeführt (Sargent 2007). Für Thylakoide konnte ein ähnlicher Qualitätskontrollmechanismus nicht charakterisiert werden (Schünemann 2007).

In grampositiven Bakterien und Archaeen wurde ebenfalls ein so genannter minimaler TAT-Signalweg entdeckt, der nur aus TatA- und TatC-Untereinheiten besteht. In dieser

Modifikation des TAT Systems scheint TatA sowohl die Rolle von TatA als auch von TatB zu übernehmen (Barnett et al. 2008) (Abbildung 3A).

In Mitochondrien konnte bislang keine Funktionsfähigkeit eines TAT-Signalweges bewiesen werden, obwohl einige Spezies, einschließlich einem Großteil höherer Pflanzen, mitochondrial kodierte TatC-Untereinheiten besitzen (Carrie et al. 2016; Petru et al. 2018; Pett and Lavrov 2013). Interessanterweise scheint die Existenz eines mitochondrial kodiertem TatC-Gens mit dem Auftauchen funktioneller BCS1-Proteine in opisthokonten Organismen negativ zu korrelieren (Carrie et al. 2016). Kürzlich wurde eine Studie veröffentlicht, die die Entwicklung und mögliche funktionelle Rollen der TAT-Signalwege in den Mitochondrien untersuchte. Petru et al. (2018) kartierten das Vorkommen von mitochondrialen TAT-Untereinheiten in Eukaryoten und fanden heraus, dass die putativen TAT-Maschinerien aus den Zusammensetzungen TatAC, TatBC oder nur TatC bestehen. Zudem war der TatAC-Signalweg aus dem Jakoboiden *Andalucia godoyi* dazu im Stande, eine TAT-Deletionsmutante aus *E. coli* partiell zu komplementieren. Daher konnte geschlussfolgert werden, dass auch mitochondriale TatAC-Signalwege funktionell sein können (Petru et al. 2018).

In Mitochondrien höherer Pflanzen konnte gezeigt werden, dass die Untereinheiten TatB (MTTATB) und TatC (MTTATC) existieren. MTTATB (Lokus AT5G43680) ist im Nukleus kodiert und übt eine essentielle Funktion aus, da die Deletion dieses Gens eine embryonische Letalität verursachte (Carrie et al. 2016). MTTATB wurde durch Strukturhomologie bei der Suche nach potentiellen Merkmalen eines TatB Proteins im *A. thaliana* Proteom identifiziert (Carrie et al. 2016). Durch die Produktion eines spezifischen Antiserums konnte die Proteinexpression bestätigt werden (Carrie et al. 2016). Außerdem konnte durch Sequenzvergleiche eine 14%ige Identität und 29%ige Ähnlichkeit des Lokus AT5G43680 zu EcTatB und eine 10%ige Identität beziehungsweise 19%ige Ähnlichkeit zu EcTatA festgestellt werden (Carrie et al. 2016). Phylogenetische Analysen mit der *maximum likelihood* Methode ergaben eine Gruppierung, in der putative MTTATB Proteine näher mit bakteriellen TatB als TatA Proteinen verwandt waren. Des Weiteren ist der C-Terminus von MTTATB im Vergleich zu EcTatB um 61 Aminosäuren verlängert (Carrie et al. 2016).

Der Lokus ATMG00570 kodiert für die im mitochondrialen Genom kodierte MTTATC Komponente. MTTATC aus *A. thaliana* ist auch bekannt als *mttB* (*membrane targeting and translocation B*) oder *orfX* (*open reading frame X*) (Giege and Brennicke 2001; Sunkel et al. 1994; Unseld et al. 1997). Dem Gen fehlt ein klassisches Startcodon und es wurde daher lange Zeit für ein Pseudogen gehalten. Die Erhaltung eines funktionellen Startcodons und eine umfangreiche RNA-Editierung des mtTatC-Transkripts deuteten jedoch darauf hin, dass das Gen für ein funktionelles Protein kodiert (Carrie et al. 2016). Außerdem konnte

durch die Entwicklung eines spezifischen Antikörpers die Expression bestätigt werden (Carrie et al. 2016). Aufgrund der Lokalisierung des Gens im mitochondrialen Genom gibt es keine Deletionsmutanten in *A. thaliana*, um die Funktion des Proteins zu charakterisieren. Allerdings wird MTTATC während der Proteinbiosynthese an 36 Positionen editiert, von denen zwei Positionen durch das Pentatricopeptide repeat (PPR) Protein SLOW GROWTH 2 (SLO2) verändert werden. Der Funktionsverlust in der Deletionsmutante von SLO2 führte demnach auch zu einem defekten Transkript von MTTATC. Außerdem resultiert der Verlust des Gens in Defiziten der Assemblierung der Atmungskettenkomplexe I, III und IV (Zhu et al. 2012a; Zhu et al. 2012b). Zwei weitere Stellen werden durch den PPR mitochondrial editing factor 31 (MEF31) editiert. An Position tatC-581 ändert die Editierung des Codons die Aminosäuresequenz von Prolin (CCA) zu Leucin (CUA). An Position tatC-586 beteiligt sich MEF31 indirekt an der Editierung, die vermutlich primär durch ein weiteres, bislang unbekanntes PPR Protein durchgeführt wird (Arenas et al. 2018).

Die Hypothese, dass TAT in Pflanzenmitochondrien die Translokation der gefalteten RISP Untereinheit in Komplex III durchführt, basiert hauptsächlich auf der Tatsache, dass in Chloroplasten und Bakterien homologe Rieske-FeS-Proteine durch die entsprechenden TAT Komplexe transloziert werden (Aldridge et al. 2008; De Buck et al. 2007; Molik et al. 2001). Außerdem ist das TAT Signalpeptid von RISP in Organismen die putative TAT Untereinheiten besitzen weitestgehend konserviert (Carrie et al. 2016; Hinsley et al. 2001; Pett and Lavrov 2013). In *A. thaliana* konnte ebenfalls demonstriert werden, dass das TAT Targeting Signal für die Assemblierung von RISP in Komplex III unverzichtbar ist (Carrie et al. 2016).

## 1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Bislang konnte der Twin Arginin Translokation in höheren Mitochondrien keine Funktion zugeordnet werden. Die Spekulationen über eine Funktion in der RISP Assemblierung in der Komplex III Biogenese werden bislang nicht experimentell unterstützt. Diese Arbeit demonstriert durch diverse Ansätze der funktionellen Komplementierung der embryoletalen *MTTATB/mttatb* Linie die Funktionalität des TAT Stoffwechselweges in Mitochondrien höherer Pflanzen. Es wird gezeigt, dass MTTATB für die Embryogenese essentiell ist. Zudem konnte durch Komplementierungsansätze mit verkürzten MTTATB Varianten und einer C-terminal verlängerten MTTATB Variante im Knockout-Hintergrund eine Assoziation zur Komplex III Biogenese in pflanzlichen Mitochondrien hergestellt werden, der ferner ein Defizit in der Assemblierung der RISP Untereinheit zu Grunde lag.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Falls nicht anders vermerkt, wurden die Chemikalien in höchster Qualität von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), New England BioLabs (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland), Thermo Fisher Scientific (Braunschweig, Deutschland) oder Serva (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

### 2.2 Molekulargewicht- und Größenstandards

Als Molekulargewichtsstandard für die Agarosegelelektrophorese wurde mit PstI behandelte  $\lambda$ -DNA (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) verwendet. Der peqGOLD protein marker I (VWR, Ismaning, Deutschland) diente als Größenstandard der SDS-PAGE.

### 2.3 Enzyme und Kits

Taq DNA Polymerase und Phusion DNA Polymerase wurden bei Bioron (Ludwigshafen, Deutschland) bzw. New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland) gekauft. Zur DNA Isolierung wurde das NucleoSpin PlasmidMini/Midi Kit verwendet. Zur DNA Aufreinigung von DNA Fragmenten wurde das Nucleospin Extract II Kit von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) eingesetzt. Restriktionsenzyme wurden entweder von Thermo Fisher Scientific oder New England BioLabs (Frankfurt am Main, Deutschland) erworben. Die T4 DNA Ligase wurde bei Thermo Fisher Scientific bestellt. Das RNeasy Plant Mini Kit 50 zur Isolierung von Pflanzen RNA stammte von Qiagen (Hilden, Deutschland), das Turbo DNA-free Kit von Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland) und das iScript™ cDNA Synthese Kit von Biorad (Feldkirchen, Deutschland).

### 2.4 Oligonukleotide

Eine Auflistung aller Oligonukleotide, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden, befindet sich in Tabelle 3 im Anhang. Alle Oligonukleotide wurden ausnahmslos bei Metabion (Martinsried, Deutschland) erworben.

### 2.5 Vektoren und Plasmide

Alle Plasmide wurden entweder durch Gateway (Karimi et al. 2002) oder Golden Gate Klonierung (Binder et al. 2014) erstellt. In Tabelle 4 im Anhang sind alle verwendeten Gateway-Konstrukte und Plasmide aufgelistet. Tabelle 5 im Anhang führt die verwendeten

Vektoren der Golden Gate Klonierung auf Level I (LI) und Level II (LII) Plasmide der Golden Gate Klonierung dieser Arbeit sind in Tabelle 6 und 7 aufgelistet.

## 2.6 Westernblotmembran

Die zum Proteintransfer eingesetzte PVDF Membran wurde bei Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) bestellt. Das Whatmann-Filterpapier wurde von Millipore (Deutschland) erworben.

## 2.7 Antisera

Die verwendeten primären Antikörper dieser Arbeit wurden in der jeweilig empfohlenen Verdünnung eingesetzt (1:200 bis 1:5000) und wurden teils erworben (Agrisera, Schweden oder PhytoAB, USA) oder bereits in angegebenen Studien veröffentlicht. Alle Antikörper und deren Herkunft sind in Tabelle 8 im Anhang vermerkt. Die sekundären Antikörper gegen Kaninchen und Huhn wurden bei Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) gekauft.

## 2.8 Bakterienstämme

Plasmide wurden mittels kompetenter *Escherichia coli* TOP10 (Genotype: *F- mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZ M15 lacX74 recA1 ara 139 (ara-leu)7697 galU galk rpsL (StrR) endA1 nupG*) Zellen transformiert. Die stabile Transformation in *A. thaliana* Pflanzen wurde durch die Transformation der Plasmide durch kompetente Zellen des *Agrobacterium tumefaciens* Stammes GV3101 (pMP90RK) erreicht.

## 2.9 Genidentifikationsnummern und Pflanzenlinien

In allen Ansätzen wurden Pflanzen der T-DNA Insertionslinie SALK\_003481 (*A. thaliana*) verwendet. Samen der Mutante wurden vom Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC) erworben. Die T-DNA Insertion der SALK\_003481 Linie befindet sich Exon 5 des Locus At5g43680 (*MTTATB*).

Mit folgenden Genidentifikationsnummern wurde außerdem in dieser Studie gearbeitet:  
*Arabidopsis thaliana*: ATMG00570 (*MTTATC*), AT4G32470 (*QCR7-1*), AT3G27240 (*CYC1-1*), AT5G13430 (*RISP*).

*Escherichia coli*: **NC\_000913.3** (*tatB* YP\_026270.1).

## 3 Methoden

### 3.1 Pflanzenbiologische Methoden

#### 3.1.1 Wachstumsbedingungen

Die Pflanzen wurden entweder auf Erde in Töpfen mit den Maßen 6,5 cm x 7,0 cm x 6,5 cm angezogen oder auf sterilen MS Platten ausgelegt (0,5 % (w/v) MES, 0,226 % (w/v) Murashige und Skoog (MS) Salzmischung einschließlich Vitamine, 4,52 g l<sup>-1</sup> Formel (Murashige and Skoog 1962), 1 % (w/v) Saccharose, pH 5,8 und 0,75 % (w/v) Agar-Agar). Die Sterilisierung der Samen erfolgte durch 70 % (v/v) Ethanol mit anschließender Behandlung mit 6 % (v/v) NaOCl und 0,05 % (v/v) Triton X-100.

Alle Samen wurden für 72 h im Dunkeln bei 4 °C stratifiziert und anschließend in Klimakammern mit 50 % relativer Luftfeuchtigkeit gebracht und unter Langtagbedingungen von 16 h Licht einer Stärke von 100 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> bei 22 °C und 8 h in Dunkelheit bei 18 °C aufgezogen. Pflanzen, die auf Erde angezogen wurden, wurden unmittelbar nach dem Öffnen der ersten Blüte in das Gewächshaus gebracht.

#### 3.1.2 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Heterozygote Pflanzen der Linie SALK\_003481 wurden durch die *floral dip* Methode transformiert (Clough and Bent 1998). Hierbei wurden die Blüten heterozygoter Elternpflanzen in 5 % (w/v) Saccharose mit 0,03 % (w/v) Silwet L-77 und den jeweilig Plasmid-tragenden Agrobakterien getaucht. Die nächste Generation wurde auf sterilen MS Platten durch Hygromycin oder Basta® Resistenz selektiert. Putative Transformanten wurden mittels PCR auf die ursprüngliche SALK T-DNA-Insertion geprüft und auf Zygote untersucht. Heterozygote Pflanzen mit dem richtigen Plasmid wurden der Selbstbefruchtung überlassen. Homozygote Pflanzen wurden durch Wiederholung der PCR und die Selektion auf MS Platten in der nächsten Generation identifiziert.

#### 3.1.3 Phänotypisierung

Die Phänotypisierung in der Wachstumsphase auf Platten- und Erdbodenbasis wurde wie folgend beschrieben durchgeführt (Boyes et al. 2001). 50 Einzelpflanzen wurden für plattenbasierte und 24 Einzelpflanzen für erdbodenbasierte Phänotypisierung untersucht. Die plattenbasierte Phänotypisierung beinhaltete die Erfassung der Wachstumsstadien der Samenkeimung (Stadium 0.1), Entstehung der Keimwurzel (Stadium 0.5), Entstehung von Hypokotyl und Kotyledonen (Stadium 0.7), der vollständigen Entfaltung beider Kotyledonen

(Stadium 1.0), der Länge von zwei Rosettenblättern > 1 mm (Stadium 1.02) und der Länge von vier Rosettenblättern > 1 mm (Stadium 1.04). Die Beobachtung der plattenbasierten Phänotypisierung wurde für mindestens 14 Tage durchgeführt. In der erdbodenbasierten Phänotypisierung wurden folgende Stadien aufgezeichnet: Länge von vier Rosettenblättern > 1 mm (Stadium 1.04), Länge von zehn Rosettenblättern > 1 mm (Stadium 1.10), Sichtbarkeit der ersten Blütenknospe (Stadium 5.10), Öffnen der ersten Blüte (Stadium 6.00) und das Stadium der vollständigen Blüte (Stadium 6.90). Die Wurzelwachstumsmessungen wurden aus 45 Replikaten berechnet, die auf vertikal platzierten MS-Platten (100 mm x 100 mm x 100 mm x 20 mm) angezogen wurden. Die Schotenlänge der jeweiligen Mutante wurde aus 75 Schoten nach Vollendung der Blüte bestimmt (Mutantenreplikate  $n > 3$ ).

### **3.1.4 Pollenfärbung**

Die Staubblätter ungeöffneter Blüten wurden von Petalen, Sepalen und Fruchtknoten getrennt. Antheren wurden mit der Alexander Färbelösung (9,6 % (v/v) EtOH, 0,1 mg ml<sup>-1</sup> Malachitgrün, 25 % (v/v) Glycerin, 5 % (w/v) Phenol, 5 % (w/v) Chloralhydrat, 0,5 mg ml<sup>-1</sup> Säurefuchsin, 0,05 mg ml<sup>-1</sup> Orange G und 4 % (v/v) Eisessig) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Lebensfähige Pollen färbten sich violett und nicht-lebensfähige Pollen grün (Alexander 1969).

### **3.1.5 Kallus Zellkultur**

Zur Ansetzung von Kallus Zellkulturen wurden 14 Tage alte Pflanzenblätter verwendet, die auf sterilen MS Platten angezogen wurden. Die Blätter wurden mechanisch verletzt und auf Platten mit B5 Medium (3,15 g l<sup>-1</sup> Gamborg's B5 basales Medium einschließlich Vitamine (Gamborg et al. 1968), 2 % (w/v) D-Glukose, 0,5 g l<sup>-1</sup> MES, pH 5,8 und 0,8 % (w/v) Agar-Agar) mit dem Zusatz von 0,5 mg l<sup>-1</sup> 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure und 0,05 mg l<sup>-1</sup> Kinetin ausgelegt, um die Kallusentwicklung zu initiieren. Die Anzucht flüssiger Kalluskulturen wurde in MS Medium mit 3 % (w/v) Saccharose, 0,5 mg l<sup>-1</sup> 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure, 0,05 mg l<sup>-1</sup> Kinetin und 100 mg l<sup>-1</sup> Ampicillin durchgeführt.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Klonierungsstrategien

#### 3.2.1.1 Gateway Klonierung

Das GATEWAY-Klonierungssystem (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland) wurde verwendet, um Gene von Interesse in binäre Pflanzentransformationsvektoren zu klonieren. Zunächst wurden die Genkonstrukte gemäß der Anweisung des Herstellers mit attB-Sites flankiert und per PCR amplifiziert. Das PCR Produkt wurde durch das Nucleospin® Gel and PCR Clean-up Kit von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) aufgereinigt und in den Eintrittsvektor pDONR207 (Entry clone, BP Reaktion) subkloniert, um anschließend durch die LR Reaktion in den Expressionsvektor pH2GW7 (Plant Systems Biology, Zwijnaarde, Belgien) übertragen zu werden (Karimi et al. 2002). Alle Plasmide der jeweiligen Schritte wurden durch das NucleoSpin® Plasmid EasyPure Kit (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland) aufgereinigt und zur Überprüfung sequenziert.

Zur Herstellung der Mutantenlinien für die Komplementierung der Deletionsmutante von MTTATB wurden die kodierenden Sequenzen von MTTATB in vollständiger Länge und drei verkürzten Varianten amplifiziert und kloniert. Den verkürzten Varianten von MTTATB fehlten 22, 42 oder 62 Aminosäuren des C-terminalen Endes der Sequenz. Im Anhang in Tabelle 4 sind alle in dieser Arbeit hergestellten Gateway Konstrukte dieser Arbeit aufgeführt.

#### 3.2.1.2 Golden Gate Klonierung

Das Golden Gate Klonierungssystem (Binder et al. 2014) wurde verwendet, um Zielgene in binäre Pflanzen- beziehungsweise Bakterientransformationsvektoren zu klonieren oder sie nach der Klonierung *in vitro* zu translatieren und in Organellen zu importieren. Die Zielgene wurden zunächst mittels spezifischen Oligonukleotiden mit BbsI und BsaI Schnittstellen und spezifischen 4 bp langen Überhängen flankiert und per PCR amplifiziert. Das PCR Produkt wurde durch das Nucleospin Gel and PCR Clean-up Kit von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) aufgereinigt und in den Level I (LI) pUC57 Vektor durch eine BbsI Cut-Ligation Reaktion kloniert. In der Level II Reaktion der Golden Gate Klonierung konnten Expressionsvektor, Promotor (A-B Fragment), N-terminaler *tag* (B-C Fragment), Zielgen (C-D Fragment), C-terminaler *tag* (D-E Fragment), Terminator (E-F Fragment) und Resistenz in Pflanzen (F-G Fragment) aus verschiedenen LI Plasmiden individuell zusammengestellt werden. Durch überlappende 4 bp Überhänge, mit denen die LI Konstrukte flankiert waren

(Binder et al. 2014), konnten alle Fragmente in einer BsaI Cut Ligation Reaktion zu einem Plasmid kloniert werden. Alle Eintritts- und Expressionsvektoren sind in Tabelle 5 des Anhangs aufgelistet. Tabelle 6 des Anhangs führt alle generierten LI Plasmide dieser Arbeit auf.

Zur ausschließlich embryonalen Expression von MTTATB wurde ein 3 kb Fragment aus dem Vektor pHABI3 (Dr. Christopher Carrie, AG Soll) in LI kloniert. Außerdem wurde der native Promotor von MTTATB kloniert (1500 bp CDS At5g43680 *upstream*). Alle erstellten LII Plasmide sind im Anhang in Tabelle 7 aufgelistet. Falls nicht anders vermerkt, wurden die Plasmidvorlagen aus Binder et al. (2014) verwendet.

Eine Cut-Ligation Reaktion gliederte sich in eine Inkubation bei 37°C für 5 min, gefolgt von einer Inkubation bei 16°C für 5 min. Dieser Zyklus wurde 30 Mal wiederholt. Abschließend wurde das Produkt für 10 min bei 37°C und 20 min bei 65°C inkubiert.

### 3.2.2 Sequenzierung

Die Sequenzierung der jeweiligen Plasmide wurde durch den Sequenzierungsservice der Genomics Service Uni (GSU, LMU München) ermöglicht. Pro Sequenzierung wurden 10 mM des jeweiligen Oligonukleotides und ungefähr 150 ng Plasmid verwendet.

### 3.2.3 RNA Sequenzierung

Die RNA Sequenzierung im 150 bp paired-end Modus und die Erstellung der RNA-Sequenzbibliotheken wurde von Novogene Biotech (Peking, China) unter Verwendung von Standard Illumina (San Diego, USA) Protokollen durchgeführt. Die RNAseq Rohdaten wurden bei der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information short read archive* (SRA) unter der Projektkennung [PRJNA596617](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA596617) hinterlegt.

### 3.2.4 Isolierung genomischer DNA aus *A. thaliana* und Genotypisierung

Zur Isolierung genomischer DNA aus *A. thaliana* wurde zunächst ein erbsengroßes Stück Blatt einer Pflanze in High Purity Extraction Puffer (0,1 M Tris, 0,5 M NaCl, 50 mM EDTA, 1 % (w/v) PVP-40, pH 7,5) durch Hochgeschwindigkeitsschütteln in einem Tissue Lyser (Qiagen, Hilden, Deutschland) homogenisiert. Nach der Zugabe von 40 mM SDS und 1,13 M Kaliumacetat wurde die Suspension für 15 min bei 16100 x g bei RT zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die genomische DNA wurde in 0,7 vol Isopropanol für 15 bis 40 min bei -20 °C gefällt und für 15 min bei 16100 x g bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % (v/v) EtOH durch Zentrifugation für 5 min bei 16100 x g bei RT gewaschen, anschließend getrocknet und in H<sub>2</sub>O<sub>MILLIQ</sub> resuspendiert. Zur

Genotypisierung wurde eine Polymerasekettenreaktion mit SALK-Linien spezifischen (Linker und rechter Primer; LP und RP) und einem T-DNA Insertions-spezifischen Primer (LB1.3) durchgeführt.

### 3.2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Als Vorlage für eine PCR dienten gDNA, cDNA oder Plasmid-DNA. Zur Amplifizierung von DNA Fragmenten wurde eine Phusion PCR durchgeführt. Für die Genotypisierung wurde DFS Taq Polymerase gewählt. Annealing-Temperatur und Elongationstemperatur wurden den Oligonukleotiden und der Konstruktlänge angepasst. Eine PCR gliederte sich in einen 5 min Denaturierungsschritt bei 98 °C, gefolgt von einem drei-Schritte Zyklus von einer Denaturierung für 30 s bei 98 °C, Primer-Annealing für 30 s bei 50 bis 60 °C und Elongation bei 72 °C für 1 – 2,5 min, der 35 mal wiederholt wurde. Abschließend wurden die Proben für 10 min bei 72 °C inkubiert.

PCR-Produkte für die Klonierung wurden durch EtBr visualisiert, aus 1 % Agarosegelen im TAE-Puffer (40 mM Tris, 2,5 mM EDTA, 0,11 % (v/v) Essigsäure) ausgeschnitten und mit dem NucleoSpin Gel und PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) aufgereinigt. Die DNA-Konzentrationen wurden mit einem P-class NanoPhotometer™ P300 (IMPLEN, München, Deutschland) gemessen.

### 3.2.6 RNA Isolierung aus *A. thaliana* und cDNA Synthese

Gesamt RNA wurde aus 100 mg Blattgewebe aus *A. thaliana* mit dem RNeasy Plant Mini Kit 50 (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers isoliert, gefolgt von einer zusätzlichen DNase Behandlung mit dem TURBO DNA-free Kit (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Braunschweig, Deutschland). Arabidopsis cDNA wurde aus isolierter Wildtyp RNA durch das iScript cDNA Synthese Kit (Biorad, Hercules, USA) nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Ermittlungen der RNA und cDNA Konzentrationen wurden mit einem P-class NanoPhotometer™ P300 (IMPLEN, München, Deutschland) durchgeführt.

### 3.2.7 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Die stabile Transformation der Plasmide in Arabidopsis Pflanzen wurde durch kompetente *A. tumefaciens* Zellen des Stammes GV3101 erreicht. Circa 500 ng des jeweiligen Plasmids wurden zunächst mit 100 µl kompetenter GV3101 Zellen 5 min auf Eis inkubiert, dann 5 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 500 µl LB Medium (1 % (w/v) Pepton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) NaCl) wurde die

Transformation 4 h bei 28 °C geschüttelt und auf LB Medium Platten (1 % (w/v) Pepton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) NaCl, 1,5 % (w/v) Agar-Agar) mit den Antibiotikaergänzungen 50 mg ml<sup>-1</sup> Rifampicin, 10 mg ml<sup>-1</sup> Gentamycin und 50 mg ml<sup>-1</sup> Spectinomycin ausplattiert. Die Platten wurden für zwei bis drei Nächte bei 28 °C inkubiert. Zur stabilen Transformation in *A. thaliana* wurde eine Kolonie für drei Tage in 500 ml LB<sub>RifGentSpec</sub> kultiviert.

### **3.2.8 Transformation von *Escherichia coli***

Kompetente *E. coli* Zellen des Stammes TOP10 wurden mit circa 100 ng des jeweiligen Plasmids für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 1 min einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt, 2 min auf Eis inkubiert und nach der Zugabe von 200 µl LB 1 h bei 37 °C geschüttelt und auf LB Medium Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

## **3.3 Biochemische Methoden**

### **3.3.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde nach Bradford ermittelt. 1 µl der jeweiligen Proteinlösung wurde zu einem 1:5 Verhältnis zwischen Bradford-Reagenz (Bio-Rad, Hercules, USA) und Wasser hinzugegeben und die Absorption wurde gegen 1 µl Puffer bei 595 nm gemessen. Übliche Proteinkonzentrationen einer Aufarbeitung von Mitochondrien lagen bei ungefähr 10 bis 15 mg ml<sup>-1</sup>.

### **3.3.2 TCA-Fällung mitochondrialer Proteine**

Gelöste Proteine wurden durch Zugaben von 0,1 vol 100 % (w/v) Trichloressigsäure (TCA) für 15 min auf Eis gefällt und anschließend bei 16100 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 80 % (w/v) eiskaltem Aceton für 5 min bei 16100 x g bei 4 °C gewaschen und anschließend in 2 X Laemmli-Puffer (126 mM Tris-HCl, pH 6,8, 20 % (v/v) Glycerin, 4 % (w/v) SDS und 0,02 % Bromphenolblau) resuspendiert.

### **3.3.3 Agarose Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung von DNA Proben wurden PCR Produkte und verdaute Plasmide durch 1 % (w/v) Agarose in TAE Puffer (40 mM Tris, 2,5 mM EDTA, 0,11 % (v/v) Essigsäure) für 25 -

40 min bei 100 V aufgetrennt und durch EtBr visualisiert. Die Größe der Fragmente wurde durch PstI verdaute  $\lambda$ -DNA verifiziert.

### 3.3.4 SDS- Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrem Molekulargewicht erfolgte durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Je nach Größe des Zielproteins wurden Gele mit Acrylamidkonzentrationen von 12,5 % oder 15 % (Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30 % (29:1) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 375 mM Tris-HCl pH 8,8) eingesetzt. Das Sammelgel setzte sich aus 4,8 % Acrylamid und 125 mM Tris-HCl pH 6,8 zusammen. Die SDS-PAGE wurde bei 28 mA per Gel für ca. zwei Stunden durchgeführt. Das Laufmittel enthielt 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1 % (w/v) SDS.

### 3.3.5 Blue Native (BN-) Polyacrylamid Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Mitochondriale Proteinkomplexe wurden durch eine Blue-Native (BN)-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde mit Hilfe eines Gradientenmischers aus einer leichten und einer schweren Acrylamid/Bisacrylamid-gellösung gegossen. Die leichte ~4 % Acrylamid/Bisacrylamidlösung enthielt 255 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 25 mM Bis-Tris, 4,4 % (v/v) Acrylamid und 0,14 % (v/v) Bisacrylamid, pH 7,0. Die schwere ~16 % Acrylamid/Bisacrylamidlösung enthielt 255 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 25 mM Bis-Tris, 15,8 % (v/v) Acrylamid, 0,5 % (v/v) Bisacrylamid und 19 % (v/v) Glyzerin, pH 7,0. Das Sammelgel setzte sich aus 255 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 25 mM Bis-Tris, 3,6 % (v/v) Acrylamid, 0,12 % (v/v) Bisacrylamid, pH 7,0 zusammen. Zunächst wurden die Proben in 5 % (w/v) Digitonin (Serva, Heidelberg, Deutschland) in Digitonin Extraktionspuffer (30 mM HEPES-KOH 7,4, 150 mM Kaliumacetat und 10 % (v/v) Glyzerin) für 20 min auf Eis solubilisiert und unlösliche Bestandteile 20 min bei 15000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Dem Überstand wurden pro 100  $\mu$ g Protein 1  $\mu$ l Serva Blue G (750 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure und 5 % (w/v) Coomassie G250) hinzugefügt und die Proben auf das BN-Gel geladen. Die Proben liefen zunächst 45 min bei 100 V und 8 mA per Gel ein und wurden danach bei 500 V und 15 mA per Gel für 5 Stunden aufgetrennt. Der Kathodenpuffer enthielt 50 mM Tricine, 15 mM Bis-Tris und 0,02 % (w/v) Coomassie G250, pH 7,0. Der Anodenpuffer enthielt 50 mM Bis-Tris, pH 7,0. Die Durchführung der BN-PAGE fand stets bei 4 °C statt. Die Fixierung der Proteinkomplexe nach der BN-PAGE erfolgte durch Entfärberlösung (40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure), falls die Proteinkomplexe nicht auf eine Membran transferiert werden sollten. Für den anschließenden Transfer der Proteinkomplexe auf eine PVDF Membran wurde der Kathodenpuffer nach der Hälfte der

Auftrennungszeit durch Kathodenpuffer ohne Coomassie G250 ausgetauscht (Eubel and Millar 2009).

### **3.3.6 Qualitative In-Gel Aktivitätsmessung von Komplexen der Atmungskette**

Qualitative In-Gel Aktivitätsmessungen wurden wie in (Whelan and Murcha 2015; Schertl and Braun 2015) und (Sabar et al. 2005) beschrieben durchgeführt. Bevor der Nachweis der jeweiligen Komplexaktivität durchgeführt wurde, wurden die BN-gel für 30 min in destilliertem Wasser inkubiert. Das BN-gel wurde für den Aktivitätsnachweis von Komplex I der Atmungskette für 10 bis 20 min in einer spezifischen Färbelösung (100 mM Tris-HCl, pH 7,4, 140 mM NADH und 0,1 % (w/v) Nitrotetrazoliumblau (NBT)) eingelegt. Durch die Oxidation von NADH durch die NADH-Dehydrogenaseaktivität von Komplex I der Atmungskette kann NBT zu Formazan reduziert werden, welches im BN Gel durch eine dunkelblaue Färbung sichtbar wurde. Die Aktivität von Komplex III wurde durch die Pierce-1-Step-TMB-Blotting Solution (Thermo Fisher) sichtbar gemacht. Die Lösung diente als Elektronendonator für Komplex III und die Aktivität wurde durch eine dunkelblaue Färbung erkennbar. Komplex IV Aktivität wurde durch die Zugabe von einer Färbelösung (10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4, 0,3 % (w/v) 3,3-Diaminobenzidin (DAB) und 0,1 % (w/v) Cytochrom c) durch ein dunkelbraunes Präzipitat erkennbar. Die Reduktion von Sauerstoff führt durch Komplex IV zu einer Oxidation von Cytochrom c, welches wiederum DAB oxidiert (dunkelbraune Färbung).

### **3.3.7 Quantifizierung der absoluten Respiration der Elektronentransportkette**

Die absolute elektronentransportketten-(ETC)-gebundene Atmung wurde mit einer Clark-Sauerstoffelektrode (Hansatech Instruments, Pentney, Vereinigtes Königreich) gemessen. Der Sauerstoffverbrauch wurde durch eine kontrollierte Überwachung der oxidativen Phosphorylierung von isolierten Kallus Mitochondrien dargestellt (Lyu et al. 2018). 100 µg Mitochondrien wurden in 950 µl luftgesättigtem Respirationsmedium (300 mM Saccharose, 10 mM NaCl, 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 % (w/v) BSA und 10 mM TES) aufgenommen und 0,05 mM ATP zugefügt. Zunächst wurde gemessen, bis sich ein stabiler Zustand eingestellt hatte. Anschließend wurden 0,1 mM NADH und 0,5 mM Bernsteinsäure hinzugefügt und beobachtete den Verbrauch der Substrate durch die Mitochondrien über Zeit. Durch die wiederholte Zugabe von 0,03 mM ADP konnte die aerobe Atmung durch die Elektronentransportkette ihr Maximum erreichen. Einen vollständigen Abbruch der Elektronentransportkette wurde durch die Zugabe von 0,1 mM Kaliumcyanid (KCN) erreicht.

### 3.3.8 *In vitro* Transkription und Translation (TNT)

Für *in vitro* Import-Assays wurde die vollständige kodierende Sequenz von RISP (AT5G13430), CYC1 (AT3G27240) oder QCR7 (AT4G32470) durch Golden Gate Cloning in LI und anschließend in den LII pTNT-Vektor kloniert (Binder et al. 2014). RISP wurde zusätzlich mit verschiedenen C-terminalen Anhängen (6His-FLAG, c-myc, Grün fluoreszierendes Protein (GFP) und Hämagglutinin (HA)) in Level II kloniert (Vgl. Tabelle 7 im Anhang).

Durch den inserierten T7/SP6 Promotor und T7 Terminator der LII Konstrukte, konnten die Plasmide *in vitro* in Retikulozytenlysat, unter Zugabe von 20 Einheiten T7 RNA Polymerase (Promega), 40 Einheiten RNasIN, 20  $\mu\text{Ci}$   $^{35}\text{S}$ -Methionin und 1X TNT Puffer (50 mM Tris, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$  und 0,05 mM rNTPs) bei einem Endvolumen von 50  $\mu\text{l}$ , in Vorläuferproteine translatiert werden, indem zwei Stunden lang bei 30 °C inkubiert wurde. Das angewendete System wurde nach dem Protokoll des Flexi Kaninchen Retikulozytenlysat *in vitro* Transkriptions- und Translationssystems (TNT) (Promega, Madison, USA) durchgeführt.

### 3.3.9 Western Blot und Immunodetektion

Um Proteine durch Immunoblotdetektion zu visualisieren, wurden 50  $\mu\text{g}$  mitochondriale Proteine pro SDS-PAGE beziehungsweise 100  $\mu\text{g}$  mitochondriale Proteine pro BN-PAGE im entsprechenden Gel analysiert. Der Transfer von Proteinen aus BN-Gelen wurde durch einen Nassblot auf eine PVDF Membran erreicht, während Proteine nach der SDS-PAGE durch Semidry Western Blotting auf eine PVDF Membran transferiert wurden. Der Nassblot wurde mit einer Lage Whatmanpapier für 50 mA in Tris-Glycin Transferpuffer (40 mM Glycin, 50 mM Tris und 0,038 % (w/v) SDS) für 16 Stunden bei 4 °C durchgeführt. Der Semidry Western Blot wurde von drei Schichten mit Transferpuffer angefeuchteten Whatmanpapier umschlossen und bei 0,8 mA pro  $\text{cm}^2$  für eine Stunde bei RT durchgeführt. Transferierte Proteine wurden reversibel durch Ponceau S (3 % (w/v) Trichloressigsäure, 0,2 % (w/v) Ponceau S) Färbung visualisiert und 1 h in 3 % (w/v) fettarmen Milchpuffer in TBS-T (150 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,1 % (v/v) Tween-20) geblockt. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte bei 4 °C über Nacht auf einem Rolltaumler in 1 % (w/v) fettarmen Milchpulver in TBS-T und entsprechenden Verdünnungen des Antikörpers von 1:200 bis 1:5000. Die Membranen wurden drei Mal mit TBS-T 10 min bei RT gewaschen und im sekundären Antikörper (1:10000 Verdünnung) für 1 h inkubiert. Nach wiederholtem Waschen in TBS-T wurde die Membran durch Chemilumineszenz entwickelt. Die Chemilumineszenz des HRP-konjugierten sekundären Antikörpers wurde mit einer Mischung aus der Lösung ECL 1 (100 mM Tris, 1 % (w/v) Luminol, 0,44 % (w/v) p-

Cumarsäure, pH 8,5) und ECL 2 (100 mM Tris, 0,18 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH 8,5) nachgewiesen und mit einem Image QuantLAS4000 Image Visualizer (GE Healthcare, München, Deutschland) visualisiert. Die Bilder wurden mit ImageJ ausgewertet (Schneider et al. 2012). Die Quantifizierung von mit SDS-PAGE separierten mitochondrialen Proteinen wurde in ImageJ analysiert und mit drei biologischen Replikaten durchgeführt.

### **3.3.10 Nachweis der Autoradiografie**

Gele von *in vitro* Import Experimenten wurden getrocknet und Phosphorscreens für 1 bis 14 Tage ausgesetzt. Autoradiographische Bilder wurden durch einen Typhoon-Scanner (GE Healthcare, München, Deutschland) mit einer Auflösung von 100 microns aufgenommen und in ImageJ analysiert.

### **3.3.11 Elektroelution isolierter Komplex III Dimere**

Komplexe III Dimere von 500 µg Mitochondrien wurden aus einer BN-PAGE der ersten Dimension ausgeschnitten und in Elutionspuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris und 0,1 % (w/v) SDS) für 6 h bei Raumtemperatur durch einen Model 422 Elektroeluter (Biorad, Hercules USA) eluiert. Die Elutionen wurden mit Amicon® 3K Ultrazentrifugenröhrchen (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf ein Volumen von ~100 µl konzentriert und durch SDS-PAGE und anschließenden Western Blotting analysiert.

### **3.3.12 Liquid chromatography-coupled tandem Massenspektrometrie (LC-MS/MS)**

Massenspektrometrie von ausgeschnittenen BN-Gelbanden wurde, wie in (Rügen et al. 2019) beschrieben, durchgeführt. Banden von Komplex III Dimeren aus eindimensionaler BN-PAGE wurden ausgeschnitten, getrocknet und einem in-Gel Trypsin-Verdau unterzogen. Peptide wurden durch einen einstündigen Lauf in einem 5 % (v/v) bis 30,4 % (v/v) Acetonitril (ACN)-Gradienten mit einem UltiMate 3000 UHPLC (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland) aufgetrennt. Die Ergebnisse der eluierten Peptide wurden in einem Q-Exactive Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland) mit der Top 10 Methode analysiert.

Zur Identifizierung von MTTATB-Bindungspartnern durch Co-Immunfällung wurden Proteine, die nach der Co-Immunfällung mit gereinigten MTTATB-Antikörper oder seinem Präimmunserum eluiert wurden, nach Bradford quantifiziert. 50 µg Protein wurden in SDS-haltigem Puffer gelöst, auf einem SDS-Gel aufgereinigt und anschließend wie beschrieben

einem in-Gel Verdau unterzogen (Thal et al. 2018). LC-MS/MS wurde wie bereits beschrieben durchgeführt. Die Auswertung der Massenspektrometrie wurde mit Hilfe von Dr. Holger Eubel und Patrick Künzler (Leibniz-Universität Hannover, Deutschland) im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Die Daten der Massenspektrometrie wurden beim ProteomeXchange-Konsortium über das PRIDE-Partner-Repository mit der Datensatzkennung PXD017155 hinterlegt.

### **3.3.13 Co-Immundefällung und chemische Quervernetzung (*Crosslinking*) mitochondrialer Proteine**

Die Co-Immundefällung/-präzipitation (Co-IP) von MTTATB und RISP wurde mit 750 µg mitochondrialem Protein durchgeführt. Nachdem 750 µg mitochondriale Proteine für 15 min mit 0,5 mM DSP auf Eis chemisch quervernetzt wurden, wurde die Reaktion mit 50 mM Glycin für 15 min auf Eis abgestoppt (Trösch et al. 2015). Die Mitochondrien wurden pelletiert, in Waschpuffer (300 mM Saccharose, 10 mM TES, pH 7,5) resuspendiert und auf AminoLink plus Kopplungsbeads (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland) geladen, an die entweder 100 µl MTTATB-Antiserum (Carrie et al. 2016) oder Präimmuserum gebunden war. Die Co-Immundefällung wurde nach Anweisungen des Pierce Co-Immundefällungssets (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland) durchgeführt. Die Antikörper-gebundenen Beads wurden über Nacht bei 4 °C mit den mitochondrialen Proteinen inkubiert. Für darauffolgende Schritte wurden den Anweisungen des Herstellers Folge geleistet. Antikörper gebundene Proteine wurden bei niedrigem pH-Wert eluiert und per SDS-PAGE und Immunoblots analysiert.

## **3.4 Zellbiologische Methoden**

### **3.4.1 Aufarbeitung von Mitochondrien aus *A. thaliana***

Mitochondrien wurden aus Flüssigkulturen oder aus Zellkulturen isoliert. Das Pflanzenmaterial wurde in Aufschlusspuffer (300 mM Saccharose, 25 mM Tetranatriumpyrophosphat, 2 mM EDTA, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 % (w/v) PVP-40, 1 % (w/v) BSA, pH 7,5) gemörsert und 5 min bei 2500 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend für 20 min bei 17500 x g und 4 °C abzentrifugiert und das Pellet in Waschpuffer (300 mM Saccharose, 20 mM TES, 0,2 % (w/v) BSA, pH 7,5) mit Hilfe eines Pinsels resuspendiert. Nach einer Wiederholung der Zentrifugationsschritte wurde das mit Organellen angereicherte Pellet in einem kleinen Volumen Waschpuffer aufgenommen, auf

einen 0 - 4.4 % (w/v) PVP-40 Gradienten geladen und 40 min bei 40000 x g und 4 °C ohne Bremse aufgetrennt. Die Fraktion angereicherter Mitochondrien wurde durch eine gelbgräuliche Wolke nahe des Röhrchenbodens erkennbar und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Nach zweimaligem Waschen in Waschpuffer ohne BSA bei 31000 x g für 15 min mit mäßiger Bremse bei 4 °C wurde das Pellet angereicherter Mitochondrien in ein neues Gefäß überführt. Pro Aufarbeitung konnten ca. 3-5 mg Mitochondrien gewonnen werden (Murtha and Whelan 2015).

### **3.4.2 Aufbrechen der äußeren Membran von isolierten Mitochondrien**

Das Aufbrechen der äußeren mitochondrialen Membran wurde durch osmotische Anschwellung der inneren mitochondrialen Membran erreicht (Murtha et al. 2003). Die Mitochondrien wurden in 20 mM HEPES-KOH pH 7,4 resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 250 mM Saccharose und 15 mM KCl, wurden die Proben entweder unbehandelt oder nach einem Proteinase K Verdau durch Zentrifugation reisoliert.

### **3.4.3 Proteinase K Verdau**

100 µl Probe wurde für 20 – 30 min mit 8 µl 0,4 mg ml<sup>-1</sup> Proteinase K auf Eis inkubiert. Der proteolytische Vorgang wurde durch die Zugabe von 2 mM Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) gestoppt.

### **3.4.4 Karbonatextraktion mitochondrialer Proteine**

Die Integrität der mitochondrialen Membranproteine wurde durch Karbonat-Extraktion untersucht (Carrie et al. 2016). Mitochondrien wurden in 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 11,0) für 30 min auf Eis inkubiert. Unlösliche Proteine wurden anschließend für 30 min bei 16100 x g und 4 °C pelletiert. Der Überstand enthielt die löslichen Proteine, diese wurden durch TCA-Fällung gewonnen.

### **3.4.5 Membransolubilisierung**

Die Solubilisierung membrangebundener Proteine wurde durch die Zugabe von 5 % (w/v) Digitonin in Digitonin Extraktionspuffer (30 mM HEPES-KOH 7,4, 150 mM Kaliumacetat und 10 % (v/v) Glycerin) erzielt. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis wurden unlösliche Bestandteile der Proben durch Zentrifugation für 20 min bei 15000 x g und 4 °C pelletiert und der Überstand, der gelöste Membranproteine enthielt, zur Probenanalyse verwendet.

### 3.4.6 Pegylierung zugänglicher Cysteine von mitochondrialen Proteinen

Mitochondrien wurden mit der alkylierenden Verbindung Methyl-Polyethylenglykol 24- Maleimid (mm(PEG)<sub>24</sub>) zur Pegylierung unter verschiedenen Vorbehandlungen behandelt. Darunter unbehandelte Mitochondrien, Mitochondrien mit aufgebrochener Außenmembran, TCA-gefällte Mitochondrien und solubilisierte Mitochondrienmembranen. Die Pegylierung wurde für 1 h auf Eis durchgeführt und durch die Zugaben von 4 mM DTT gestoppt.

### 3.4.7 *In vitro* Import von mitochondrialen Vorläuferproteinen

*In vitro* Import von *in vitro* translatierten mitochondrialen Vorläuferproteinen in Mitochondrien wurde in Importpuffer (300 mM Saccharose, 50 mM KCl, 20 mM MOPS-KOH pH 7,4, 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 % (w/v) BSA) und in der Gegenwart von 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Methionin, 0,2 mM ADP, 0,75 mM ATP, 5 mM Bernsteinsäure, 5 mM DTT, 5 mM NADH und 1 mM GTP bei 26 °C und 350 rpm für verschiedene Zeitperioden (10, 20, 30, 60 und 120 min) durchgeführt. Pro 200 µl Reaktionsansatz wurden 10 µl radioaktiv markiertes Vorläuferprotein und 100 µg Mitochondrien verwendet.

### 3.4.8 Assemblierung von *in vitro* importierten mitochondrialen Proteinen über die Zeit

Um die Assemblierung verschiedener Komplex III Untereinheiten über die Zeit zu verfolgen, wurden die Vorläuferproteine zunächst für eine *pulse* Periode von 30 min in isolierte Mitochondrien importiert. Anschließend wurden die Organellen durch Zentrifugation reisoliert und in Importpuffer und -substraten ohne Vorläuferprotein resuspendiert. Durch die Entfernung der *in vitro* translatierten Vorläuferproteine konnten nur noch Proteine in Komplex III assembliert werden, die bereits in der *pulse* Periode in die mitochondriale Matrix importiert wurden. Die Assemblierung wurde zu den Zeitpunkten 30, 60 und 120 min überprüft.

## 3.5 Computerbasierte Methoden

### 3.5.1 Alignment von Pflanzen-spezifischen MTTATB ähnlichen Proteinen

Sequenzen von MTTATB-ähnlichen Proteinen wurden aus JGI Phytozom v12.1.5 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!search?show=BLAST>) durch BLASTen

gegen den Locus AT5G43680 (MTTATB) ermittelt. Das Alignment wurde in MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>, (Kuraku et al. 2013)) durchgeführt und die Sequenzähnlichkeiten mit der Multiple Align Show ([https://www.bioinformatics.org/sms/multi\\_align.html](https://www.bioinformatics.org/sms/multi_align.html), (Stothard 2000)) mit Standardeinstellungen demonstriert, wobei der Prozentsatz der Sequenzen, der für die Identität oder Ähnlichkeit übereinstimmen muss, auf 80 % gesetzt wurde.

### 3.5.2 Remodellierung von AtMTTATB

Die vermutliche Faltung der Sekundärstruktur von MTTATB (AT5G43680) wurde durch Remodellierung im Normal- und Intensivmodus durch den Onlineserver Phyre2 (Kelley et al. 2015) durchgeführt.

### 3.5.3 Evaluation der RNA Sequenzierungsdaten

Die Erstellung der RNA-seq-Bibliotheken und die Sequenzierung mit einem 150 bp Paired-end Modus wurde von Novogene Biotech (Peking, China) unter Verwendung von Standard Illumina (San Diego, USA) Protokollen durchgeführt. Drei biologische Replikate wurden zur RNA Analyse sequenziert. Ein biologisches Replikat bestand aus einer RNA-Präparation von drei reifen Rosettenblättern derselben Pflanze. Die Qualitätskontrolle der RNA Sequenzierungsdaten wurde mit der Software FastQC durchgeführt. Die Häufigkeit der Transkripte als Transkripte pro Million und geschätzte Zählungen wurden auf Genebene durch Pseudoaligning gegen einen k-mer-Index quantifiziert. Der k-mer-Index wurde aus den repräsentativen Transkriptmodellen der Araport11-Annotation unter Verwendung einer k-mer-Länge von 31 im kallisto-Programm mit 100 Bootstraps erstellt (Bray et al. 2016; Cheng et al. 2017). Unterschiedlich exprimierte Gene wurden mit Hilfe der 3D RNAseq-Pipeline berechnet und auf der Basis einer log<sub>2</sub>-fachen Änderung > 1 mit einem angepassten p-Wert von  $p < 0,01$  selektiert (Guo 2019). Die *gene ontology* (GO)-Term Anreicherungsanalyse wurde mit Thalmin (Krishnakumar et al. 2015) und der Holm-Bonferroni-Testkorrektur durchgeführt. Die RNA Sequenzierungsanalyse wurde mit Hilfe von Dr. Christopher Carrie (Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland) im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

### 3.5.4 Evaluation der Massenspektrometrie

Die Evaluation der Massenspektrometrie wurde im Rahmen dieser Arbeit von Dr. Holger Eubel und Patrick Künzler (Leibniz-Universität Hannover, Deutschland) durchgeführt. Eluierte Peptide wurden in einem Q-Exactive MS (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig,

Deutschland) mit einer Top-10-Methode ausgewertet. Die relative Verteilung jeder Untereinheit von Komplex III zum Komplex selbst wurde berechnet, indem die einzelnen Häufigkeiten auf der Basis der iBAQ-Werte (Schwanhauser et al. 2011) durch die kumulierten iBAQ-Werte aller Untereinheiten dividiert wurden. Diese Einzelbeiträge wurden dann zwischen Wildtyp und Mutantenlinien verglichen.

Die Analyse der Co-IP-Daten auf Basis der LFQ-Intensitäten wurde mit dem Softwarepaket Perseus (Tyanova et al. 2016) wie beschrieben in (Thal et al. 2018) ausgewertet.

### **3.5.5 Signifikanznachweis**

Die statistische Signifikanz wurde durch den Studenten *t*-Test (abhängig, zweiseitig) nachgewiesen und wurde mit *p*-Werten von  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) und  $p < 0,001$  (\*\*\*) angegeben. Die Stichprobengröße der Phänotypisierung wurde bereits unter Punkt 3.1.3 Phänotypisierung beschrieben. Die Auszählung sichtbarer Cristae-Strukturen von Mitochondrien aus TEM-Bildern wurde mit 25 einzelnen Mitochondrien aus drei verschiedenen Pflanzen durchgeführt. Alle Boxplots wurden mit BoxPlotR erstellt (Spitzer et al. 2014). Zur Quantifizierung von drei biologischen Replikaten der Immunoblotanalyse wurde Image J (Schneider et al. 2012) verwendet.

## **3.6 Mikroskopie**

### **3.6.1 Visualisierung der Antheren aus *A. thaliana***

Die Antheren wurden nach der Pollenfärbung mit Hilfe eines LEICA DM1000 Mikroskops (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) zur Analyse vergrößert und mit einer LEICA DFC7000 T Kamera (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) fotografiert. Die Aufnahmen wurden im entsprechenden Softwarepaket bearbeitet.

### **3.6.2 Visualisierung von Mitochondrien aus *A. thaliana* durch Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)**

Die Pflanzenblätter wurden mit 2,5 % Glutaraldehyd in einem 75 mM Cacodylat-Puffer fixiert. Die Nachfixierung wurde mit 1%igem wässrigem Osmiumtetroxid durchgeführt, gefolgt von einer In-Bloc-Färbung mit 1%igem Uranylacetat und einer Dehydratisierung. Die Proben wurden in Spurr's Harz eingebettet und anschließend ultradünn geschnitten. Die

Dünnschnitte wurden mit Bleicitrat nachgefärbt und mit einem Zeiss EM912 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) untersucht. Das Mikroskop war mit einem OMEAG-Filter in der Säule ausgestattet, wurde im *zero-loss* Modus betrieben und die Beschleunigungsspannung wurde auf 80 kV eingestellt. Für die Bildaufnahme wurde eine Tröndle 2k x 2k Slow-Scan CCD-Kamera mit dem entsprechenden Softwarepaket verwendet (Tröndle Restlichtverstärkersysteme, Moorenweis, Deutschland). Die Analyse der TEM wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe von Prof. Dr. Andreas Klingl und Dr. Katja Schneider (Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland) durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Partielle Komplementierung durch den ABI3 Ansatz

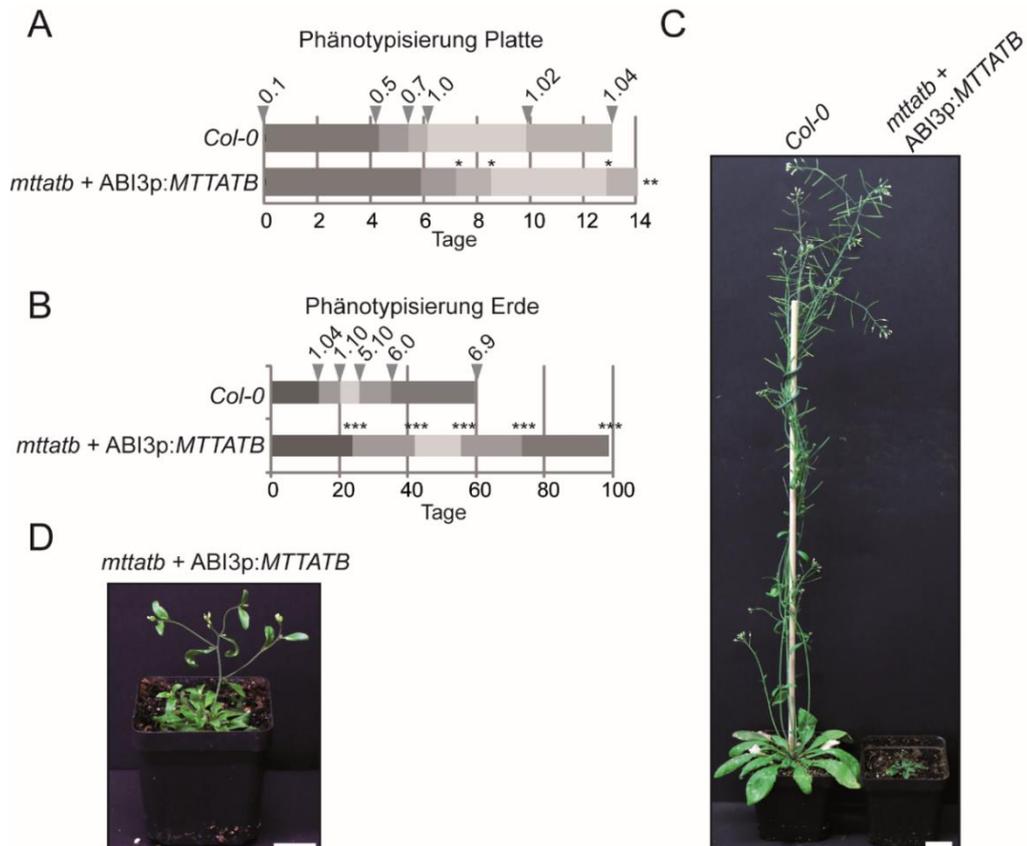
#### 4.1.1 Prinzip der ABI3p-Komplementierung

Da ein vollständiger Knock-out von *MTTATB* (*mttatb*) bei *A. thaliana* embryolethal war (Carrie et al. 2016), wurde zunächst eine partielle Komplementierung von MTTATB durch eine Genexpression ausschließlich während der Embryogenese angestrebt. Hierfür wurde der ABSCISIC ACID INSENSITIVE GEN 3 (ABI3) Promotor verwendet. ABI3 wird nur während der Embryogenese exprimiert und die Expression nach der Samenkeimung abgeschaltet, sodass die Genexpression nur in Samen und Pflanzenorganen embryonalen Ursprungs nachgewiesen werden kann (Parcy et al. 1994). Daher wurde der *Open Reading Frame* (ORF) von MTTATB unter die Kontrolle des ABI3-Promotors gebracht, um eine ausschließlich embryonale Genexpression zu gewährleisten (Despres et al. 2001). Das Konstrukt wurde in heterozygote Pflanzen der Linie SALK\_003481 (*mttatb*) eingeführt. *mttatb* trägt eine T-DNA-Insertion in Exon 5 von At5g43680 (Carrie et al. 2016). In der nächsten Generation der Mutantenlinie konnten homozygote Nachkommen per Genotypisierung identifiziert werden, die zur weiteren Analyse der Funktion von MTTATB verwendet werden konnten.

#### 4.1.2 Phänotypische Charakterisierung von partiell komplementierten Mutanten

Die durch den ABI3 Promotor partiell komplementierte *mttatb* Linie wurde durch quantitative Phänotypisierung charakterisiert (Boyes et al. 2001). Homozygote Mutanten wurden auf sterilen MS Platten oder Erde aufgezogen und mit den Wachstumsstadien von Wildtyp Pflanzen verglichen. Die Phänotypisierung von auf Platten wachsenden Pflanzen umfasste die Dokumentation der Wachstumsstadien der Samenkeimung (Stadium 0.1), Entstehung der Keimwurzel (Stadium 0.5), Entstehung von Hypokotyl und Kotyledonen (Stadium 0.7), der vollständigen Entfaltung beider Kotyledonen (Stadium 1.0), der Länge von zwei Rosettenblättern > 1 mm (Stadium 1.02) und der Länge von vier Rosettenblättern > 1 mm (Stadium 1.04) (Abbildung 4A). In diesem Versuchsansatz unterschieden sich Mutante und Wildtyp nur geringfügig. Die Wachstumsstadien der partiell komplementierten Mutante wurden vergleichsweise zum Wildtyp später erreicht und verzögerten sich zunehmend über die Zeit. Von auf Erde aufgezogenen Pflanzen wurden die Wachstumsstadien von der Länge von vier Rosettenblättern > 1 mm (Stadium 1.04), der Länge von zehn Rosettenblättern > 1 mm (Stadium 1.10), der Sichtbarkeit der ersten Blütenknospe (Stadium 5.10), dem Öffnen der ersten Blüte (Stadium 6.00) und das Stadium der

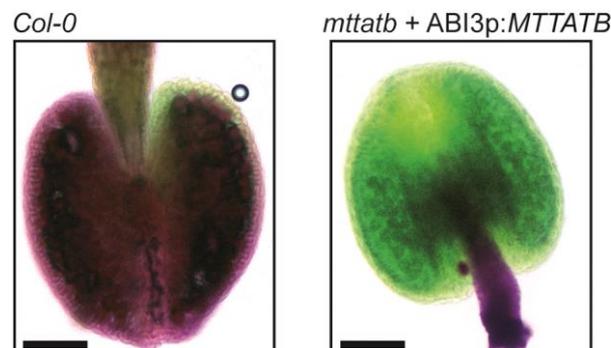
vollständigen Blüte (Stadium 6.90) dokumentiert (Abbildung 4B). Die ABI3-Mutante zeigte eine stark ausgeprägte und signifikante Wachstumsverzögerung in allen Entwicklungsstadien im Vergleich zum Wildtyp auf (Abbildung 4B). ABI3-komplementierte Pflanzen waren außerdem deutlich kleiner (Abbildung 4C, 4D) und prägten einen für mitochondriale Defekte charakteristischen Phänotyp von gewellten Blättern aus (Abbildung 4D).



**Abbildung 4. Phänotypisierung von partiell komplementierten ABI3p:MTTATB-Pflanzen. A)** Plattenbasierte Wachstumsphänotypisierung der angegebenen Linien bis zu einem Zeitpunkt von 14 Tagen. Das Erreichen des jeweiligen Stadiums wird durch Pfeile angezeigt und umfasste die Wachstumsstadien: Samenkeimung (0.1), Entstehung der Keimwurzel (0.5), Entstehung von Hypokotyl und Kotyledonen (0.7), der vollständigen Entfaltung beider Kotyledonen (1.0), der Länge von zwei Rosettenblättern > 1 mm (1.02) und der Länge von vier Rosettenblättern > 1 mm (1.04). Die Balken stellen die Dauer dar, die benötigt wurde, um das jeweilige Wachstumsstadium zu vollenden. **B)** Erdbodenbasierte Wachstumsphänotypisierung von der Samenkeimung bis zum Eintreten der Seneszenz. Pfeile geben den Zeitpunkt an, zu dem der Wildtyp das jeweilige Entwicklungsstadium erreicht hat: Länge von vier Rosettenblättern > 1 mm (1.04), der Länge von zehn Rosettenblättern > 1 mm (1.10), der Sichtbarkeit der ersten Blütenknospe (5.10), dem Öffnen der ersten Blüte (6.00) und das Stadium der vollständigen Blüte (6.90). **C)** Repräsentatives Bild von sieben Wochen alten Pflanzen aus der erdbodenbasierten Wachstumsphänotypisierung. Der Maßstab entspricht 2 cm. **D)** Repräsentatives Bild einer 10 Wochen alten Mutantepflanze. Der Maßstab entspricht 2 cm. Statistisch signifikante Wachstumsunterschiede im Vergleich zum Wildtyp innerhalb der gleichen Behandlung wurden nach dem Studenten t-Test berechnet und sind durch p-Werte von  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) oder  $p < 0,001$  (\*\*\*) angezeigt. Abbildung entnommen aus (Schäfer et al. 2020), modifiziert.

### 4.1.3 Partiiell komplementierte Mutanten sind steril

Neben der signifikanten Wachstumsverzögerung konnten zudem keine Samen von homozygoten ABI3-Mutanten gewonnen werden. Um die Beobachtung genauer zu untersuchen, wurden Antheren aus Knospen, die kurz vor der Blüte standen, durch eine spezifische Fertilitätsfärbung namens *Alexander staining* (Alexander 1969) gefärbt. Die Lösung färbte lebensfähige Pollen violett und nicht-lebensfähige Pollen grün. Es wurde ersichtlich, dass eine violette Pollenfärbung nur beim Wildtyp zu verzeichnen war, während sich die Pollen der ABI3-Linie ausschließlich grün färbten (Abbildung 5).



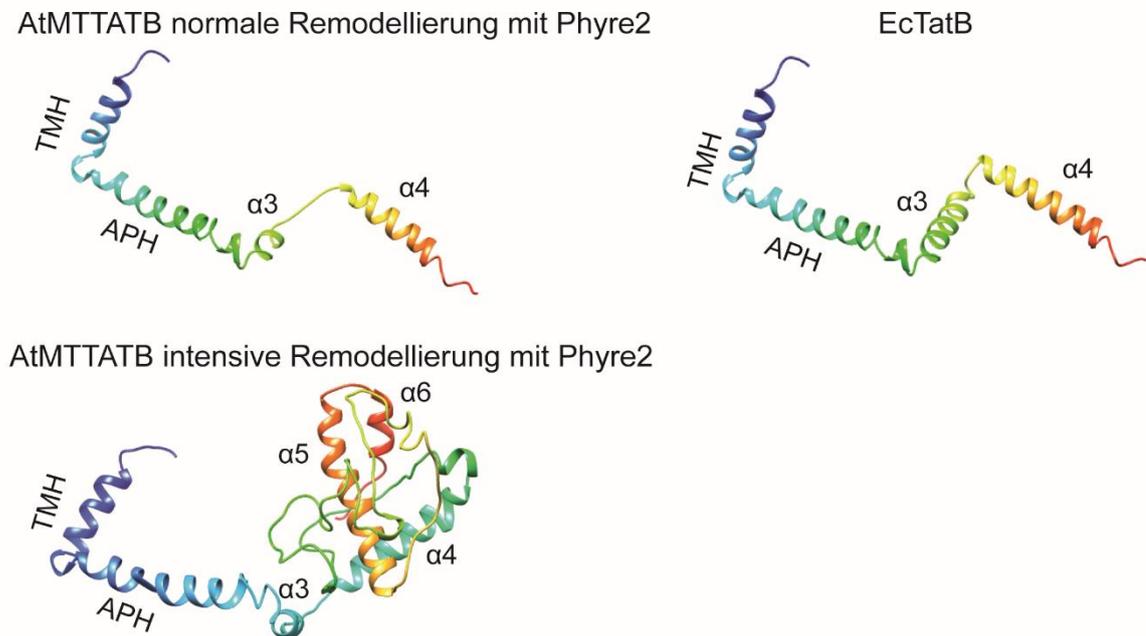
**Abbildung 5. Alexander-Pollen-Färbung von repräsentativen Staubbeutelchen aus den angegebenen Linien.** Lebensfähige Pollen färbten sich violett und nicht lebensfähige Pollen färbten sich grün. Der Maßstab entspricht 100  $\mu\text{m}$ . Abbildung entnommen aus (Schäfer et al. 2020), modifiziert.

Damit wurde eine absolute Sterilität der männlichen Geschlechtsorgane der Mutanten nachgewiesen, was die Verwendung der ABI3-komplementierten Pflanzen für weitere Versuchsansätze deutlich erschwerte. Experimente mit dieser Linie konnten daher nur durch die Verwendung heterozygoter Elternpflanzen durchgeführt werden. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass MTTATB nicht nur für die Embryonalentwicklung, sondern auch für das vegetative Wachstum und die Pollenbildung essentiell ist.

## 4.2 Alignment und Remodellierung von MTTATB

Die Entdeckung von MTTATB entstammte einer reversen Strukturanalyse durch den Webserver Phyre2 (Carrie et al. 2016). Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass die Proteinstruktur von MTTATB der Struktur von EcTatB voraussichtlich sehr ähnelt. Durch das Alignment von MTTATB an EcTatB wurde deutlich, dass MTTATB viele charakteristische Merkmale eines TatB Proteins besitzt (Carrie et al. 2016). Neben diesen für ein TatB Protein spezifischen Merkmalen besitzt MTTATB aus *A. thaliana* einen um 61 Aminosäure längeren

C-Terminus, der bei der Remodellierung bisher nicht berücksichtigt wurde (Carrie et al. 2016).



**Abbildung 6. Remodellierung von MTTATB aus *A. thaliana* (AtMTTATB) im normalen und intensiven Modus durch den Webserver Phyre2.** Strukturelle Ähnlichkeiten wurden bei der Remodellierung im Vergleich zur Struktur von EcTatB deutlich. Die intensive Remodellierung des Proteins ergab zwei weitere, putative  $\alpha$ -Helix Strukturen in der Verlängerung des C-Terminus von AtMTTATB im Vergleich zu bisher bekannten TatB Strukturen. TMH: Transmembranhelix, APH: amphipatische Helix,  $\alpha$ 3-6: alpha Helix Struktur 3-6.

Die Remodellierung der Sekundärstruktur von MTTATB wurde hier demzufolge in zwei verschiedenen Modi im Webserver Phyre2 ausgeführt, um zusätzlich die Strukturen des verlängerten C-Terminus einschätzen zu können (Kelley et al. 2015). Im Normalmodus werden nur die Teile des Proteins modelliert, die mit bekannten Strukturen übereinstimmen, während im Intensivmodus die nicht übereinstimmenden Proteinteile durch ein Vorhersageprogramm laufen, um die wahrscheinlichste Struktur zu ermitteln. Die Remodellierung im normalen Modus ergab eine ähnliche Struktur und eine nahezu identische Remodellierung wie für EcTatB (Abbildung 6 und vgl. Carrie et al. 2016). Bei der intensiven Remodellierung von MTTATB wurde die gleiche Struktur des N-terminalen Abschnitts ermittelt und zwei weitere alpha-Helix Formationen im Pflanzenmitochondrien-spezifischen C-terminalen Ende des Proteins festgestellt ( $\alpha$ 5 und  $\alpha$ 6 der intensiven Remodellierung von MTTATB in Abbildung 6), die in bakteriellen und plastidären TatB Proteinen nicht vorhanden sind.

Durch multiple Sequenzvergleiche putativer, MTTATB-ähnlicher Proteine in höheren Pflanzen konnte außerdem gezeigt werden, dass die Sequenzen innerhalb dieser Pflanzenmitochondrien-spezifischen Region hoch konserviert sind (Abbildung 7). Eine besonders hohe Konservierung von Sequenzabschnitten wurde hierbei in dem Bereich verzeichnet, der vermutlich die fünfte  $\alpha$ -Helix Struktur des Proteins bildet (Abbildung 7). Dieses Ergebnis demonstriert, dass pflanzliches MTTATB einen konservierten, längeren C-Terminus enthält und lässt darüber hinaus vermuten, dass dieser Anhang von funktioneller Bedeutung ist.

	pos.	α5																												pos.																							
<i>A. thaliana</i>	167 S P	V	L	P	V	S	A	E	M	A	K	L	L	P	Q	R	K	E	S	A	R	-	G	S	D	L	M	L	E	A	V	L	E	A	E	V	A	H	K	A	K	S	F	F	A	Q	A	E	K	E	T	217	
<i>B. rapa</i>	167 S P	V	L	P	V	S	A	E	M	A	K	L	L	P	H	R	K	E	S	A	K	-	G	S	D	L	M	L	E	A	V	L	E	A	E	V	A	H	K	A	K	H	F	F	A	Q	A	E	K	E	T	217	
<i>P. trichocarpa</i>	193 L N	V	L	P	V	S	A	E	S	T	G	L	L	P	N	R	Q	D	V	V	N	-	G	S	D	I	V	L	E	A	I	L	E	A	E	V	A	H	S	A	K	D	F	F	S	Q	P	T	N	Q	I	243	
<i>G. max</i>	174 L T	V	L	P	I	S	A	E	N	A	G	L	L	P	I	R	G	A	D	V	K	-	G	S	D	I	V	L	E	A	I	V	E	A	E	V	A	H	N	A	K	E	F	F	S	Q	P	Q	N	Q	I	224	
<i>V. vinifera</i>	172 L A	V	L	P	V	S	A	E	S	A	G	L	L	P	N	R	K	D	S	M	K	-	G	S	D	I	V	L	E	A	I	L	E	A	E	V	A	H	S	A	K	D	F	F	S	Q	P	Q	N	Q	I	222	
<i>S. tuberosum</i>	203 I V	V	L	P	V	S	A	E	S	A	G	L	L	P	K	R	K	A	G	A	K	-	G	S	D	I	I	L	E	A	I	L	E	A	D	V	A	K	N	A	K	E	F	L	T	A	T	K	P	I	K	253	
<i>Z. mays</i>	213 L T	V	L	P	I	S	A	E	S	A	G	L	L	P	S	R	P	D	K	P	T	-	G	S	D	L	V	L	E	A	V	L	E	A	E	V	A	E	N	A	K	L	F	V	S	Q	P	H	D	Q	L	263	
<i>O. sativa</i>	219 L N	I	L	P	I	S	A	E	S	A	G	L	L	P	S	R	S	D	K	P	Q	-	G	S	D	L	L	L	E	A	T	L	E	A	E	V	A	E	H	A	K	S	F	A	Q	Q	H	H	D	E	L	269	
<i>P. patens</i>	197 L V	V	L	P	I	S	A	V	E	A	G	L	L	P	S	K	Q	E	P	I	S	G	-	G	A	D	I	V	L	A	S	I	V	E	R	K	V	A	F	Q	S	K	S	F	L	E	H	G	E	I	-	246	
<i>M. polymorpha</i>	202 I I	V	L	P	I	S	A	L	S	A	G	L	L	P	S	R	T	D	H	V	R	G	-	G	S	D	V	V	F	E	A	I	V	E	R	R	V	A	F	D	T	L	E	F	F	K	Q	S	E	T	L	T	253

**Abbildung 7. Alignment des C-terminalen Endes von MTTATB-ähnlichen Proteinen repräsentativer Pflanzenspezies.** Schwarz hinterlegte Aminosäuren markieren identische und grau hinterlegte Aminosäuren ähnliche Aminosäuren.  $\alpha 5$  kennzeichnet den Bereich der putativen fünften  $\alpha$ -Helix von MTTATB. *Brassica rapa* – *B. rapa*, *Populus trichocarpa* – *P. trichocarpa*, *Glycine max* – *G. max*, *Vitis vinifera* – *V. vinifera*, *Solanum tuberosum* – *S. tuberosum*, *Zea mays* – *Z. mays*, *Oryza sativa* – *O. sativa*, *Physcomitrella patens* – *P. patens*, *Marchantia polymorpha* – *M. polymorpha*.

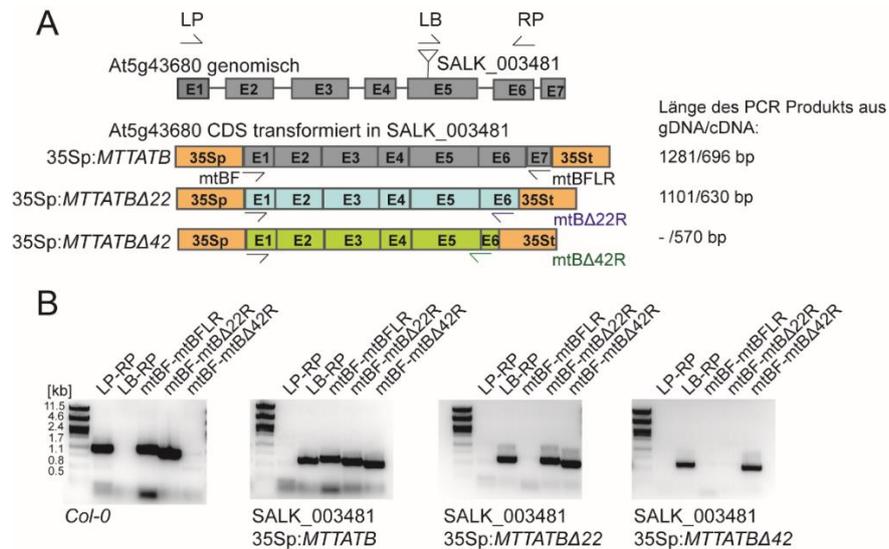
## 4.3 Funktionelle Komplementierung durch C-terminal verkürzte MTTATB Varianten

### 4.3.1 Phänotypische Charakterisierung von Mutanten mit verkürzten MTTATB Protein Varianten

In einem weiteren Komplementierungsansatz wurden C-terminal verkürzte Varianten von MTTATB unter der Kontrolle des 35S-Promotors in heterozygote Verlustmutanten *MTTATB/mttatb*-Pflanzen durch die *floral dip* Methode und durch Agrobakterien des Stammes GV3101 transformiert. Insgesamt wurden vier verschiedene Linien mit den folgenden Konstrukten hergestellt: MTTATB-Kodierungssequenz (CDS) der vollen Länge (35Sp:*MTTATB*), die für 232 Aminosäuren kodiert, und MTTATB mit entweder 22, 42 oder 62 Aminosäuren, die vom C-Terminus entfernt wurden (35Sp:*MTTATB* $\Delta$ 22, 35Sp:*MTTATB* $\Delta$ 42 und 35Sp:*MTTATB* $\Delta$ 62) (Abbildung 8A). Vereinfacht werden die Mutanten fortan als MTTATB, MTTATB $\Delta$ 22, MTTATB $\Delta$ 42 und MTTATB $\Delta$ 62 bezeichnet. MTTATB $\Delta$ 42 wies eine Deletion eines hochkonservierten Sequenzteils auf, der eine putative  $\alpha$ -Helix beinhalten soll ( $\alpha 5$  in Abbildung 6). Im Fall von MTTATB $\Delta$ 62 fehlte der gesamte Pflanzenmitochondrien-spezifische Sequenzteil (vgl. Abbildung 6 und 7).

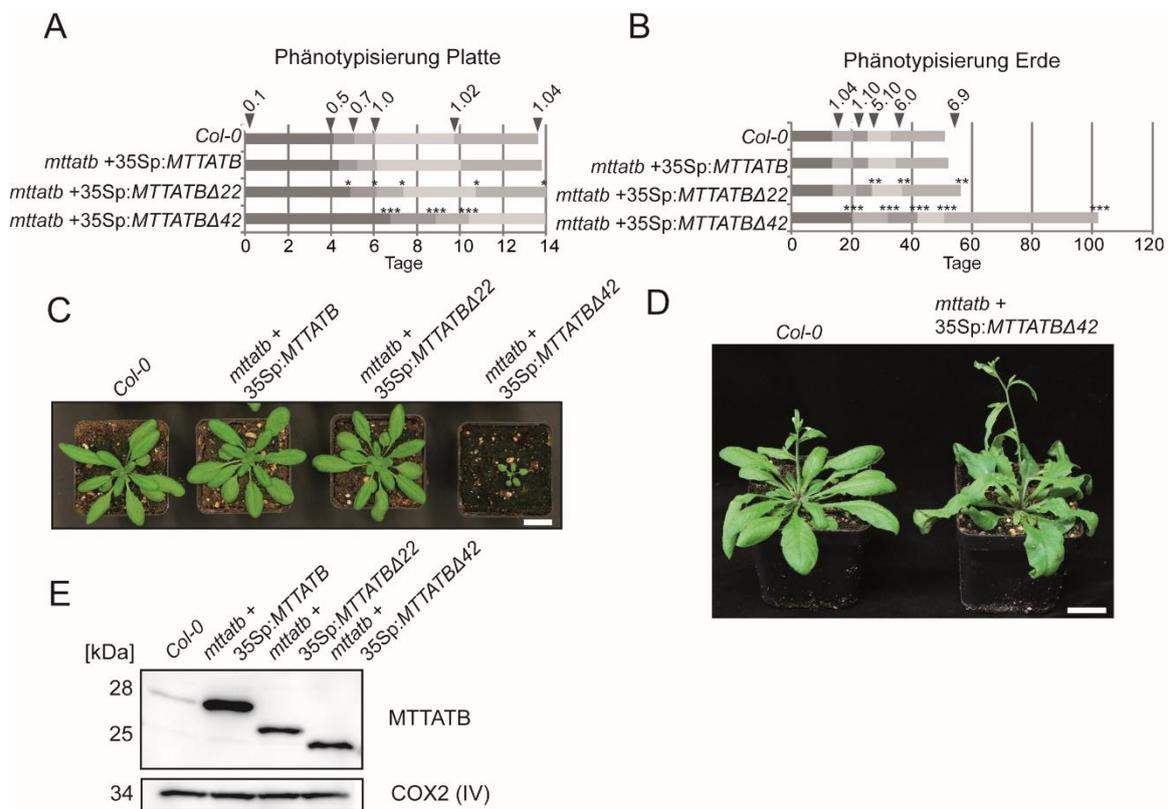
Um die erfolgreiche Transformation der T-DNA in homozygoten Pflanzen zu verifizieren, wurde genomische DNA (gDNA) der Mutanten und *Col-0* isoliert und mittels PCR mit Konstrukt-spezifischen Primern analysiert (Abbildung 8B). Erwartungsgemäß wurde ein PCR-Produkt mit der Kombination SALK\_003481 LP-RP mit einer Größe von 1175 bp in *Col-0* amplifiziert, nicht aber mit der T-DNA-Insertions-spezifischen Primerkombination der SALK-Linie (SALK LB1.3 - SALK\_003481 RP) (Abbildung 8B). Bei der Verwendung von *MTTATB* CDS-spezifischen Primern wurde die ORF des Gens in voller Länge amplifiziert (PCR-Produkt von 1281 bp), welche im Fall von genomischer Wildtyp DNA Genbereiche der Exons und Introns umfasste. Ein weiteres amplifiziertes PCR-Produkt wurde beobachtet, wenn die *MTTATB* CDS-spezifischen Primer für das verkürzte Konstrukt verwendet wurden, dem die letzten 22 Aminosäuren fehlten (1101 bp). Für *MTTATBΔ42* wurde kein Gen-spezifisches PCR-Produkt in gDNA von *Col-0* amplifiziert, da der reverse CDS-Primer von *MTTATBΔ42* in zwei verschiedenen Exons von *MTTATB* gebunden hätte und daher nicht in der Lage war, in genomischen *MTTATB* zu binden (Abbildung 8B). In keiner Mutante wurde ein PCR-Produkt durch die SALK\_003481 LP-RP-Kombination amplifiziert, aber PCR-Produkte mit einer korrekten Größe von etwa 500 bp festgestellt, wenn die T-DNA-Insertion-spezifische Primer-Kombination der SALK-Linie verwendet wurde (SALK LB1.3 - SALK\_003481 RP). Dies bestätigte die Lokalisierung der ursprünglichen T-DNA-Insertion und den Verlust des nativen Gens (Abbildung 8B).

Bei allen Mutanten wurden die transformierten *MTTATB* CDS-Konstrukte bei Verwendung entsprechender CDS-spezifischer Primer verifiziert (*MTTATB* CDS: 696 bp; *MTTATBΔ22* CDS: 630 bp; *MTTATBΔ42* CDS: 570 bp), während die PCR-Produkte einschließlich der Intron-Längen nicht amplifiziert werden konnten (Abbildung 8B). Homozygote Pflanzen konnten somit für alle Konstrukte mit Ausnahme von *MTTATBΔ62* identifiziert werden. Das Screening von über 200 Pflanzen selbstbefruchteter, heterozygoter *MTTATBΔ62*-komplementierter Pflanzen ergab ein Verhältnis von 2:1 (Heterozygote zu Wildtyp), was darauf hindeutete, dass das *MTTATBΔ62*-Konstrukt den embryoletalen *mttatb*-Phänotyp nicht komplementieren konnte. Demnach war *MTTATB* vollständig funktionsunfähig, wenn die Pflanzenmitochondrien-spezifischen letzten 61 Aminosäuren des C-Terminus fehlten.



**Abbildung 8. Verifizierung der T-DNA-Insertionen durch Isolierung genomischer DNA und genotypisierendes Screening.** **A)** Schematische Darstellung des Lokus At5g43680 mit Exons (E1 - E7) und Introns (Linien) und der Lage der T-DNA-Insertion von SALK\_003481. Modifizierte *MTTATB* CDS-Konstrukte, die in SALK\_003481 transformiert wurden, werden mit Exons (E) und 35S-Promotor (35Sp) und Terminator (35St) dargestellt. Die für die Genotypisierung verwendeten Primer-Bindungsstellen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Schwarz: *MTTATB* CDS-spezifische Primer (mtBFLF- mtBFLR); blau: *MTTATBΔ22* CDS-spezifische Primer (mtBΔ22F-mtBΔ22R); grün: *MTTATBΔ42* CDS-spezifische Primer (mtBΔ42F-mtBΔ42R). LP = Linker Primer von SALK\_003481; LB = LB3.1 *left border* Primer spezifisch für SALK T-DNA-Insertionen; RP = rechter Primer von SALK\_003481. **B)** PCR-Produkte aus isolierter gDNA mit den angegebenen Primerpaaren. Die ersten beiden Primerpaare testeten die korrekte T-DNA-Position von SALK\_003481 und die Homozygotie, gefolgt von drei Spuren, die das Vorhandensein von Vollängen- und abgeschnittenen Formen von *MTTATB* überprüften. Die Größen der PCR-Produkte wurden mit einem λ-Pst Marker bestätigt.

Die Phänotypisierung der homozygoten Mutanten wurde auf MS-Platten und Erde durchgeführt (Boyes et al. 2001). Wie in Abbildung 9 dargestellt, wurde eine vollständige Komplementierung durch 35Sp:MTTATB im Vergleich zu *Col-0* erreicht. Interessanterweise entwickelten nur die Komplementationsmutanten von *MTTATBΔ42* einen stark ausgeprägten Wachstumsphänotyp, der in *MTTATBΔ22* nicht nachgewiesen werden konnte. Die Analyse von den auf MS Platten gewachsenen Pflanzen ergab, dass die Wachstumsentwicklung bei Mutanten von *MTTATBΔ22* nur leicht beeinträchtigt, aber in der *MTTATBΔ42* Linie stark verzögert war. Nur 30 % der Samen von *MTTATBΔ42* Mutanten keimten, von denen einige nur ein Keimblatt entwickelten. Nach 14 Tagen konnten die vollständig komplementierten *MTTATB* Mutanten, *Col-0* und circa 40 % der Linie *MTTATBΔ22* das Wachstumsstadium 1.04 abschließen (4 Rosettenblätter > 1 mm Länge) (Abbildung 9A). Bei Pflanzen der Linie *MTTATBΔ42* waren alle Wachstumsstadien stark verzögert und konnten das Stadium 1.02 (2 Rosettenblätter > 2 mm Länge) nach 14 Tagen nicht vollständig abschließen (Abbildung 9A).

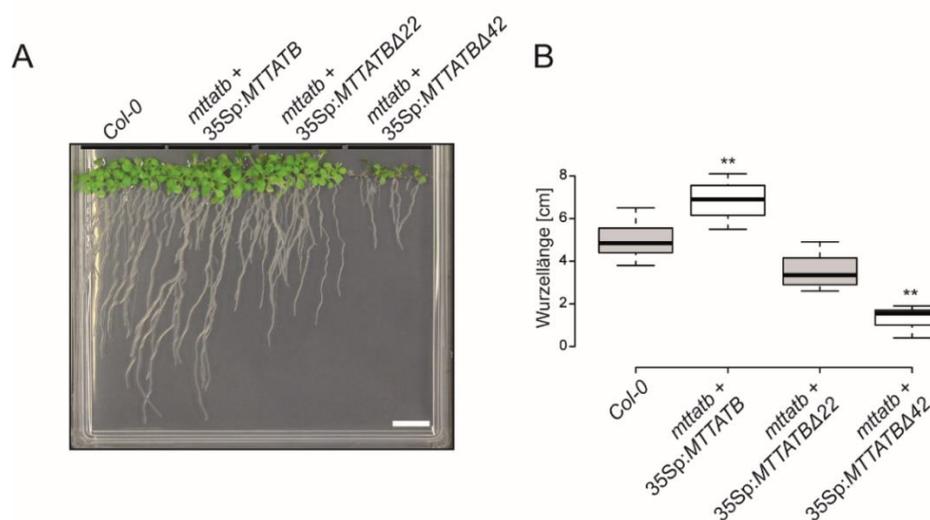


**Abbildung 9. Phänotypisierung der C-terminalen Deletionsmutanten von MTTATB.** **A)** Plattenbasierte Wachstumsphänotypisierung der angegebenen Linien bis zu einem Zeitpunkt von 14 Tagen. Das Erreichen des jeweiligen Stadiums wird durch Pfeile angezeigt und umfasste die Wachstumsstadien: Samenkeimung (0.1), Entstehung der Keimwurzel (0.5), Entstehung von Hypokotyl und Kotyledonen (0.7), der vollständigen Entfaltung beider Kotyledonen (1.0), der Länge von zwei Rosettenblättern > 1 mm (1.02) und der Länge von vier Rosettenblättern > 1 mm (1.04). Die Balken zeigen die Dauer an, die benötigt wurde, um das jeweilige Wachstumsstadium zu vollenden. **B)** Erdbodenbasierte Wachstumsphänotypisierung von der Samenkeimung bis zum Eintreten der Seneszenz. Pfeile geben den Zeitpunkt an, zu dem der Wildtyp das jeweilige Entwicklungsstadium erreicht hat: Länge von vier Rosettenblättern > 1 mm (1.04), der Länge von zehn Rosettenblättern > 1 mm (1.10), der Sichtbarkeit der ersten Blütenknospe (5.10), dem Öffnen der ersten Blüte (6.00) und das Stadium der vollständigen Blüte (6.90). **C)** Repräsentatives Bild von vier Wochen alten Pflanzen aus der erdbodenbasierten Wachstumsphänotypisierung. Der Maßstab entspricht 2 cm. **D)** Repräsentatives Bild des krasen Blattphänotyps von *mttatb* + 35Sp:*MTTATBΔ42* Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp. Bilder wurden während des Entwicklungsstadiums 6.0 (erste geöffnete Blüte) aufgenommen. Der Maßstab entspricht 2 cm. **E)** Bestätigung der MTTATB-Proteinexpression in den angegebenen Linien. Die COX2-Untereinheit von Komplex IV diente als Ladungskontrolle. 50 µg mitochondriales Protein der jeweiligen Linie wurden pro Spur geladen. Statistisch signifikante Wachstumsunterschiede im Vergleich zum Wildtyp innerhalb der gleichen Behandlung wurden nach dem Studententest berechnet und sind durch p-Werte von  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) oder  $p < 0,001$  (\*\*\*) angegeben. Abbildung entnommen aus (Schäfer et al. 2020), modifiziert.

Die *MTTATBΔ42* Linie zeigte bei auf Erdboden aufgezogenen Pflanzen ebenfalls eine starke und signifikante Wachstumsverzögerung im Vergleich zum Wildtyp. Im Gegensatz dazu war die *MTTATB*-Linie nahezu identisch und die *MTTATBΔ22* Linie zeigte nur geringe

Wachstumsdefekte im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 9B, 9C). Pflanzen, die das MTTATB $\Delta$ 42 Konstrukt enthielten, wuchsen nicht nur signifikant langsamer, sondern entwickelten auch einen krausen Blattphänotyp (Abbildung 9D).

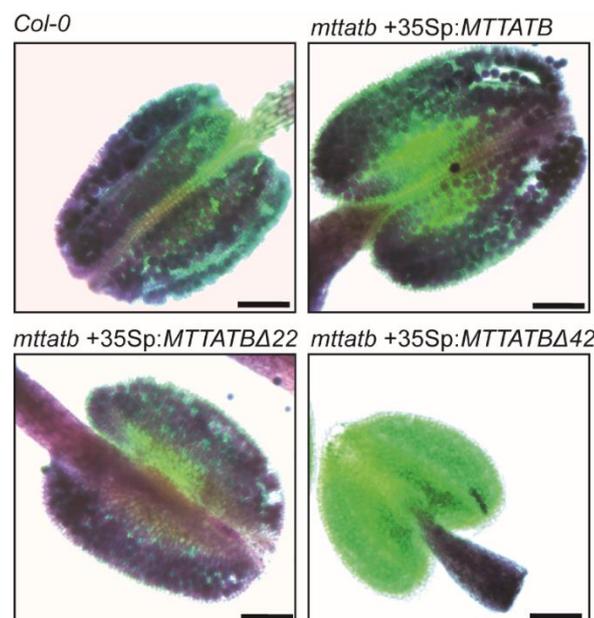
Durch einen spezifischen Antikörper konnte die Proteinexpression von MTTATB in voller Länge und verkürzten Varianten in der jeweiligen Pflanzenlinie (berechnetes Molekulargewicht MTTATB: 25 kDa, MTTATB $\Delta$ 22: 22,6 kDa, MTTATB $\Delta$ 42: 20 kDa) bestätigt werden (Abbildung 9E). Durch die Proteinüberexpression, erzeugt durch den 35S-Promotor, zeigten alle generierten Linien erwartungsgemäß höhere MTTATB-Mengen im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 9E). Da MTTATB in Mitochondrien lokalisiert ist, wurde auch der Effekt auf das primäre Wurzelwachstum untersucht. Ein verkürztes Wachstum der Primärwurzeln kann in der Regel auf einen mitochondrialen Defekt hinweisen. Die Auswertung von 45 Pflanzen jeder Linie ergab ein signifikant schnelleres Wurzelwachstum für die funktionelle Komplementierung durch MTTATB, ein leicht reduziertes Wurzelwachstum für die funktionelle Komplementierung durch MTTATB $\Delta$ 22 und ein stark reduziertes Wachstum der Primärwurzeln der funktionellen Komplementierung durch MTTATB $\Delta$ 42 (Abbildung 10A und B). Durch dieses Ergebnis wurde die Annahme, dass der stark ausgeprägte Phänotyp der MTTATB $\Delta$ 42 Linie mitochondrialen Ursprungs ist, unterstützt.



**Abbildung 10. Primärwurzelentwicklung der Mutantenlinien und Col-0. A)** Repräsentatives Bild der Primärwurzelentwicklung nach 14 Tagen. Der Maßstab entspricht 1 cm. **B)** Durchschnittliche Länge der Primärwurzeln der angegebenen Pflanzenlinien nach 14 Tagen, berechnet aus 45 Individuen und dargestellt durch Boxplots. Statistisch signifikante Wachstumsunterschiede im Vergleich zum Wildtyp innerhalb der gleichen Behandlung wurden nach dem Studententest berechnet und sind mit dem p-Wert  $p < 0,01$  (\*\*) angedeutet. Der Balken in der Box zeigt den jeweiligen Mittelwert an. Die Fehlerbalken außerhalb der Box geben die Standardabweichung an. Abbildung entnommen aus (Schäfer et al. 2020), modifiziert.

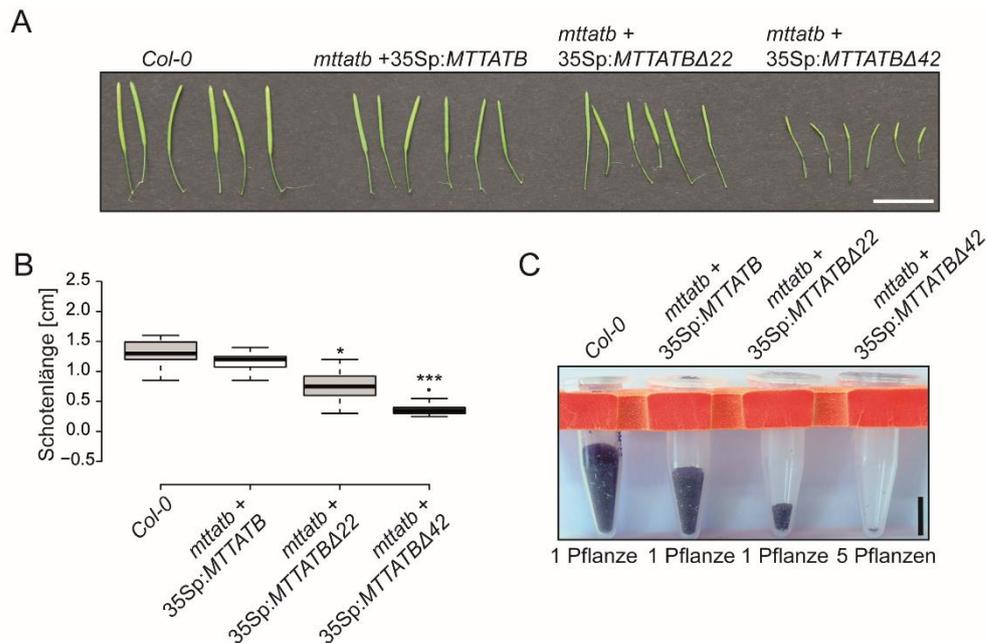
### 4.3.2 Sterilität der Antheren und verminderte Samenentwicklung der Mutanten

Auch in den Mutantenlinien MTTATB, MTTATB $\Delta$ 22 und MTTATB $\Delta$ 42 wurde die Lebensfähigkeit der Pollen durch die Alexander Färbelösung visualisiert. Für Wildtyp, MTTATB und MTTATB $\Delta$ 22 Antheren wurde die charakteristische, violette Färbung der Pollen beobachtet, die auf eine potentielle Lebensfähigkeit rückschließen ließ (Abbildung 11). Ähnlich wie bei der ABI3-komplementierten Linie wurde jedoch bei MTTATB $\Delta$ 42 fast keine violette Färbung der Pollen beobachtet und wies erneut auf eine Sterilität der männlichen Geschlechtsorgane hin (Abbildung 11).



**Abbildung 11. Die Fruchtbarkeit der verkürzten MTTATB-Pflanzen.** Alexander-Pollen-Färbung von repräsentativen Staubbeutel aus den angegebenen Linien. Lebensfähiger Pollen färbte sich violett und nicht lebensfähiger Pollen grün. Der Maßstab entspricht 100  $\mu$ m. Abbildung entnommen aus (Schäfer et al. 2020), modifiziert.

Die männliche Sterilität wurde durch eine Analyse der Schotenlängen bestätigt. Je 75 Schoten wurden von je drei Individuen pro Pflanzenlinie vermessen und auf ihre Länge hin überprüft. Schoten der Linie MTTATB $\Delta$ 42 entwickelten eine extreme Reduktion der Schotenlängen im Vergleich zum Wildtyp, von der die anderen beiden komplementierten Mutantenlinien nicht (MTTATB) oder nur mäßig (MTTATB $\Delta$ 22) betroffen waren (Abbildung 12A und B). Im Gegensatz zur vollständigen männlichen Sterilität der ABI3-komplementierten Linie hingegen, produzierte die MTTATB $\Delta$ 42 Linie noch einige Samen und konnte daher für molekularbiologische Charakterisierungsansätze verwendet werden (Abbildung 12C).



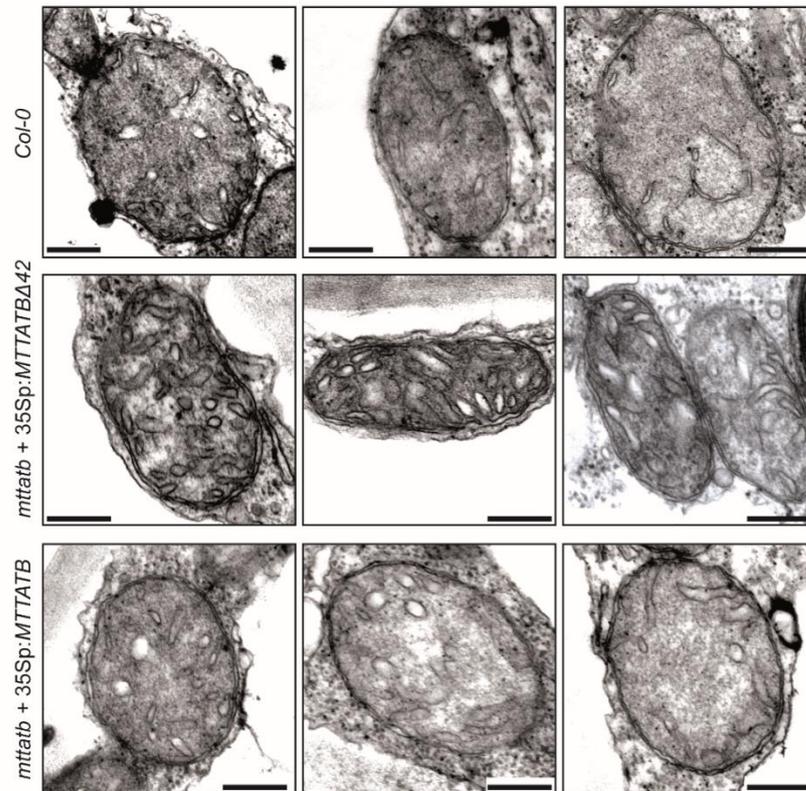
**Abbildung 12. Analyse der Schotenlänge und Samenproduktion der Mutantenlinien im Vergleich zum Wildtyp. A)** Unterschiede in der Entwicklung der Schotenlänge der angegebenen Linien im Vergleich zum Wildtyp (*Col-0*). Der Maßstabsbalken entspricht 1 cm. **B)** Statistische Auswertung der Schotenlängen von verkürzten MTTATB-Pflanzen im Vergleich zu *Col-0* und visualisiert durch eine Boxplot-Analyse. Statistisch signifikante Wachstumsunterschiede im Vergleich zum Wildtyp innerhalb der gleichen Behandlung wurden nach dem Studententest berechnet und sind durch p-Werte von  $p < 0,05$  (\*) oder  $p < 0,001$  (\*\*\*) angezeigt. Der Balken in der Box zeigt den jeweiligen Mittelwert an. Die Fehlerbalken außerhalb der Box geben die Standardabweichung an. **C)** Gesammelte Menge an Samen einer Pflanze von *Col-0*, *mttatb + 35Sp:MTTATB*, und *mttatb + 35Sp:MTTATBΔ22* und 5 Pflanzen von *mttatb + 35Sp:MTTATBΔ42*. Der Maßstab gibt 1 cm an. Abbildung entnommen aus (Schäfer et al. 2020), modifiziert.

#### 4.3.3 Ultrastruktur von Mitochondrien der MTTATB Linien im Vergleich zu *Col-0*

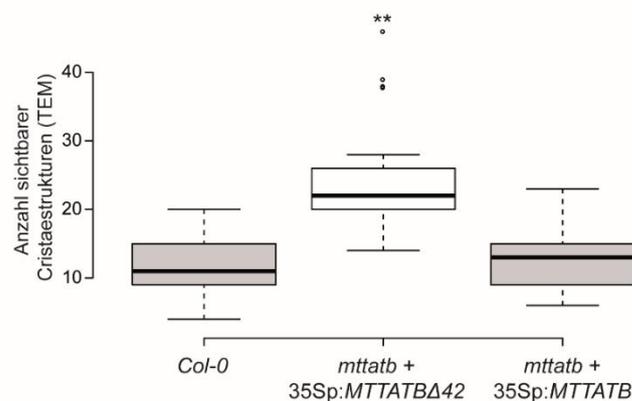
In vorangegangenen Studien wurde vermutet, dass ein Substrat des Pflanzenmitochondrialen TAT Weges die Rieske 2Fe-2S Untereinheit (RISP) von Komplex III der Atmungskette sei (Carrie et al. 2016). Damit könnte eine eingeschränkte Funktion von MTTATB zu einer Fehlassemblierung von Komplex III und dem daher resultierenden progressiven Phänotyp führen. Komplex III Dimere befinden sich hauptsächlich in der Cristae Membran der Mitochondrien (Gilkerson et al. 2003; Kühlbrandt 2015). Daher wurde die mitochondriale Ultrastruktur der MTTATBΔ42 Linie mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) an ausgewachsenen Blättern untersucht. Im Vergleich zum Wildtyp und MTTATB waren die Mitochondrien der MTTATBΔ42 Mutante an Cristae Strukturen angereichert (Abbildung 13A). Eine Zählung dieser gut erkennbaren Membranstrukturen ergab eine Anreicherung von doppelt so vielen Cristae-Strukturen

innerhalb der *MTTATBΔ42* Mitochondrien im Vergleich zu Wildtyp Mitochondrien und Mitochondrien der vollständigen Komplementierung durch *MTTATB* (Abbildung 13B).

A



B

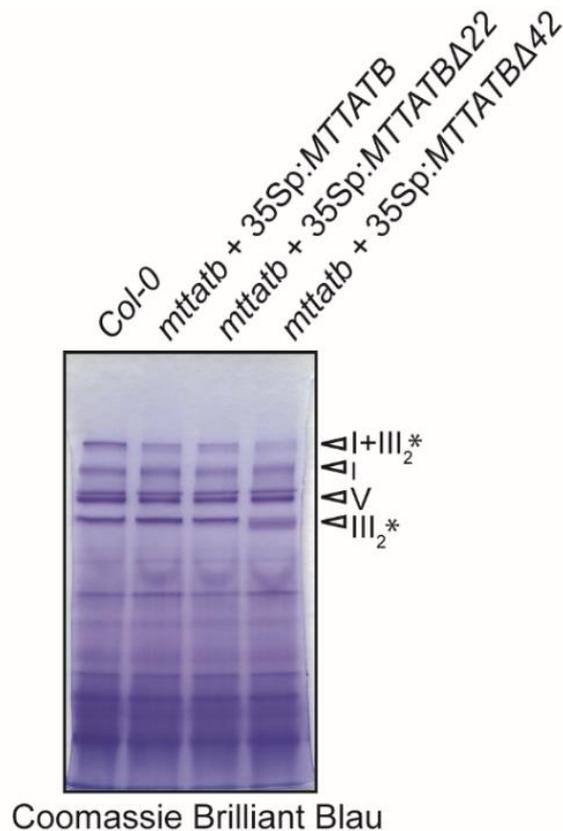


**Abbildung 13. Phänotyp der *MTTATBΔ42* Mitochondrien.** **A)** Repräsentative 2D-Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) von Mitochondrien aus ausgewachsenen Rosettenblättern der angegebenen Linien. Der Maßstab entspricht 250 nm. Die Bilder wurden im Rahmen dieser Arbeit von Prof. Dr. Andreas Klingl und Dr. Katja Schneider aufgenommen. **B)** Die durchschnittliche Anzahl der gezählten Cristae-Strukturen aus TEM-Bildern von 25 einzelnen Mitochondrien. Statistisch signifikante Unterschiede von Cristae-Strukturen der Mutantenlinien im Vergleich zum Wildtyp wurden gemäß dem Studententest berechnet und sind mit einem p-Wert von  $p < 0,01$  (\*\*) angegeben. Der Balken in der Box zeigt den jeweiligen Mittelwert an. Die Fehlerbalken außerhalb der Box geben die Standardabweichung an. Abbildung entnommen aus (Schäfer et al. 2020), modifiziert.

Obwohl diese Daten nur zweidimensionale Informationen über die mitochondriale Morphologie lieferten, stellten sie eine interessante Verbindung zwischen der Funktion von MTTATB in der putativen Assemblierung von RISP in Komplex III mit der Organisation und Formation der Cristae-Strukturen her. Darüber hinaus wurde bereits festgestellt, dass RISP mit Teilen des MICOS-Komplex (*mitochondrial contact site and cristae organizing system*) der pflanzlichen Mitochondrien, der verantwortlich für die Organisation der Cristaestrukturen ist, co-lokalisiert werden konnte (Li et al. 2019).

#### **4.3.4 MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien prägen einen Komplex III assoziierten Phänotyp aus**

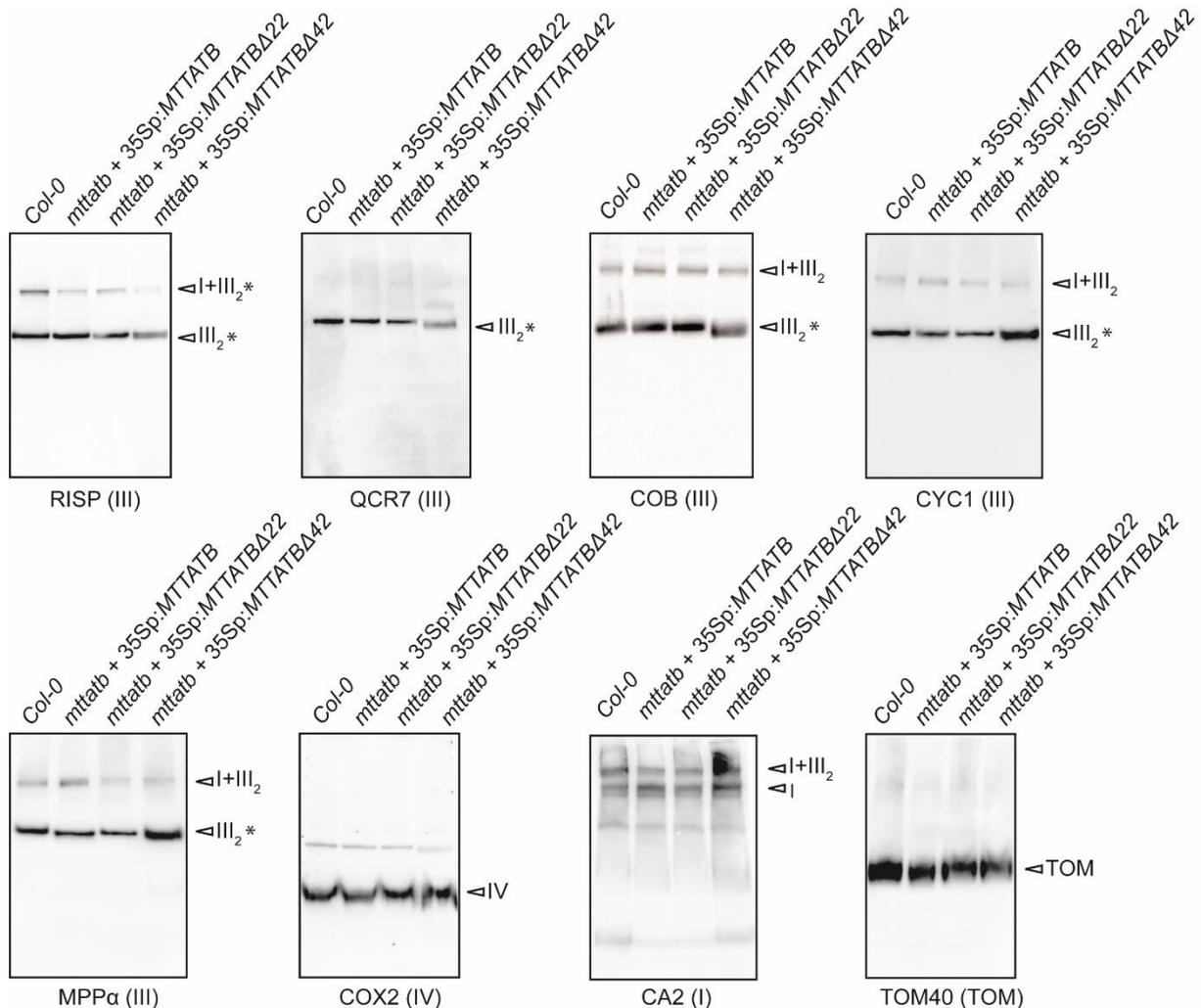
Um sich ein genaueres Bild des molekularbiologischen Phänotyps der partiell komplementierten Verlustmutante zu bilden, wurden zunächst Mitochondrien aus Kallus Zellkulturen isoliert. Die Zellkulturen wurden anstelle von Pflanzengewebe verwendet, da durch die nahezu vollständige Sterilität von MTTATB $\Delta$ 42 Mutante zu wenig pflanzliches Gewebe für eine Aufarbeitung von Mitochondrien zur Verfügung stand. Die aus Kalluskulturen isolierten Mitochondrien wurden durch BN-PAGE aufgetrennt, um die Komplexe der Atmungskette zu untersuchen. Es konnten Komplex I, Dimere von Komplex III (III<sub>2</sub>), Komplex V beziehungsweise die ATP-Synthase und die Superkomplexformation von Komplex I und dimerem Komplex III durch Coomassie Brilliant Blau Färbung visualisiert werden (Abbildung 14). Die Mutantenlinien MTTATB und MTTATB $\Delta$ 22 prägten nahezu denselben Phänotyp wie Wildtyp Mitochondrien aus, nur die Superkomplex Formation von Komplex I und III<sub>2</sub> schien gleichermaßen reduziert (Abbildung 14). MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien hingegen wiesen einen auffälligen Unterschied im Laufverhalten von Komplex III auf. Anstelle einer scharfen Bande verlief die Spur mehr in Form eines Ausstrichs von mehreren Banden, die demzufolge auch ein etwas geringeres Molekulargewicht besaßen (Abbildung 14). Zusätzlich war die Assemblierung der Superkomplexformation aus Komplex I und III<sub>2</sub> stärker reduziert als in den anderen beiden Mutantenlinien (Abbildung 14).



**Abbildung 14.** Analyse der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe der aus Kalluskulturen isolierten Mitochondrien. Die Mitochondrien der angezeigten Linien wurden durch BN-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. I - Komplex I, III<sub>2</sub> - Homodimer von Komplex III, V - ATP-Synthase oder Komplex V, I+III<sub>2</sub> - Superkomplex gebildet durch Komplex I und einen dimeren Komplex III. Abbildung entnommen aus (Schäfer et al. 2020), modifiziert.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde das Laufverhalten einzelner Komplex III Untereinheiten immunologisch untersucht. Hierbei sollte die Frage geklärt werden, ob eine fehlerhafte Assemblierung von einer oder sogar mehr Untereinheiten das Phänomen in der Komplex III Assemblierung von MTTATBΔ42 verursacht. Spezifisch getestet wurden die Untereinheiten Apocytochrom B (COB), die Untereinheit 7 der Ubichinol-Cytochrom c-Oxidoreduktase (QCR7), die Untereinheit alpha der mitochondriale Prozessierungs-Peptidase (MPPα), Cytochrom c1 (CYC1) und RISP (Abbildung 15). Die Untereinheiten COB und QCR7 wurden in Mitochondrien von MTTATBΔ42 im Vergleich zu den definierten Banden des Komplex III der anderen Pflanzenlinien bei einem geringeren Molekulargewicht erfasst. QCR7 war zusätzlich etwas weniger in Komplex III vorhanden. Die Untereinheiten MPPα und CYC1 verliefen in einer breiteren Bande als in den anderen Linien, waren aber in äquivalenten Proteinmengen in Komplex III vorhanden. Die RISP Untereinheit war im Gegensatz zu den anderen Untereinheiten in Mitochondrien aus MTTATBΔ42 ausschließlich in der höchsten Form von Komplex III zu erkennen und wurde mit einer

schwächeren Intensität verzeichnet, die auf eine reduzierte Assemblierung dieser Untereinheit schließen ließ. Als Kontrolle wurden die Untereinheit 2 der Carboanhydrase (CA2) aus Komplex I, die Untereinheit 2 der Cytochrom c Oxidase (COX2) aus Komplex IV und TOM40 des TOM-Komplexes visualisiert. Alle Kontrollproteine blieben in der jeweiligen Menge an assembliertem Protein im entsprechenden Komplex unverändert (Abbildung 15).

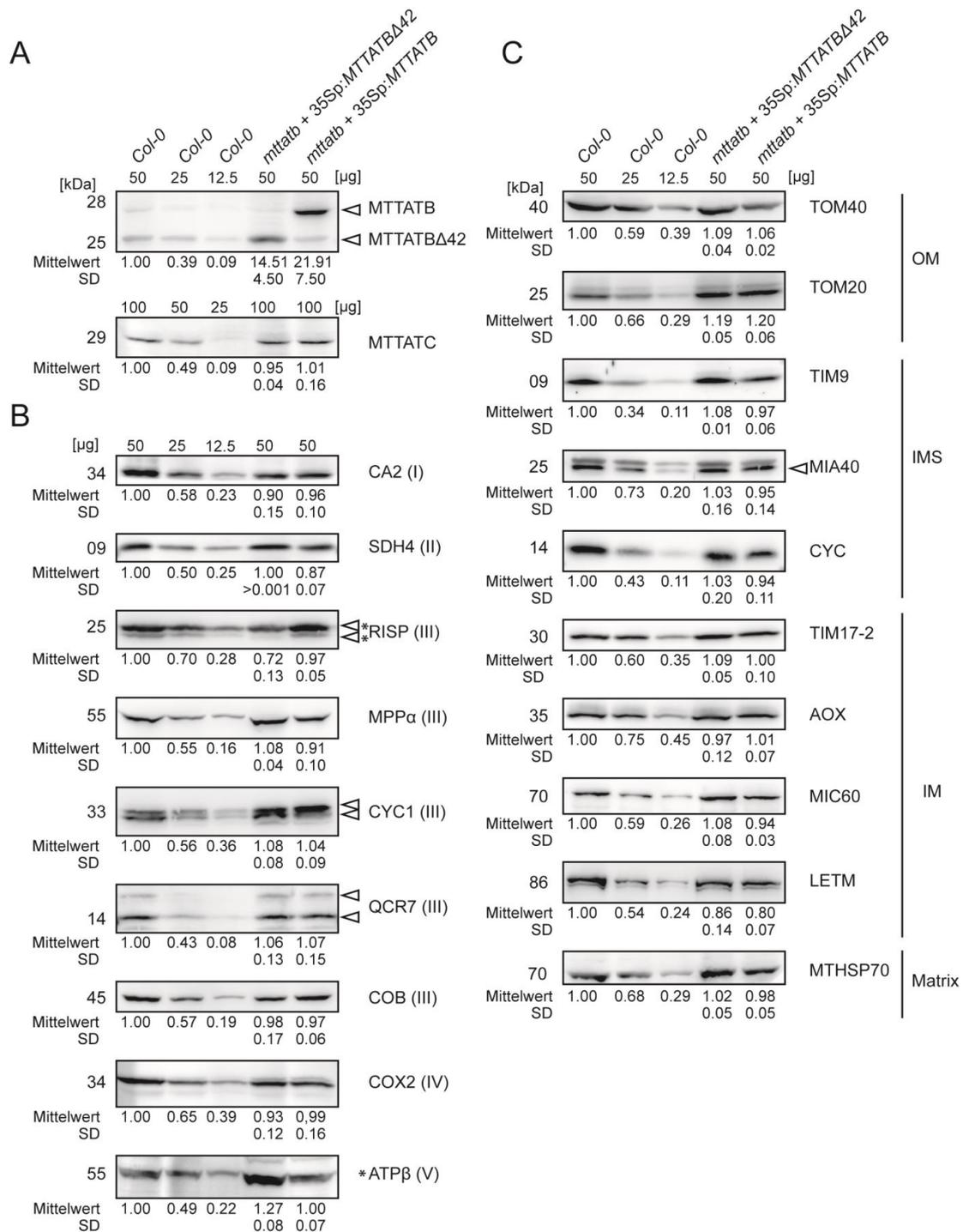


**Abbildung 15. Immunodetektion von Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe.**

Eindimensionale BN-PAGE wurde mit den folgenden Antikörpern analysiert: Apocytochrom B (COB, Komplex III); der Rieske-Eisen-Schwefel Untereinheit (RISP, Komplex III), Cytochrom c1 (CYC1, Komplex III), der Untereinheit alpha der mitochondrialen Prozessierungspeptidase (MPP $\alpha$ , Komplex III), der Untereinheit 7 des Cytochrom bc1 Komplexes (QCR7, Komplex III), der Untereinheit 2 der Carbonanhydrase (CA2, Komplex I), der Untereinheit 2 der Cytochrom c Oxidase (COX2, Komplex IV) und TOM40 (TOM-Komplex). I - Komplex I, III<sub>2</sub> - Homodimer von Komplex III, IV - Komplex IV, I+III<sub>2</sub> - Superkomplex gebildet durch Komplex I und einen dimeren Komplex III, TOM - TOM-Komplex. Das Sternchen markiert unregelmäßiges Laufverhalten und/oder eine reduzierte Proteindetektion in den MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien im Vergleich zum Wildtyp. Abbildung entnommen aus (Schäfer et al. 2020), modifiziert.

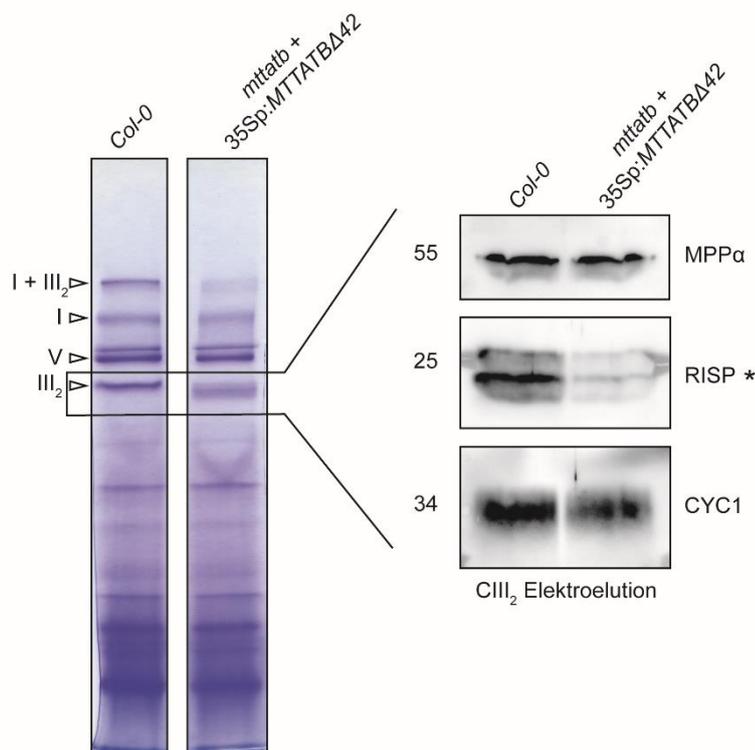
Des Weiteren wurden die Proteine der Mitochondrien aller Mutanten per SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend spezifisch mit Antikörpern nachgewiesen. Ziel dieses Ansatzes war die Ermittlung fehlexprimierter Gene, die als Ursache des Phänotyps von MTTATB $\Delta$ 42 in Frage kommen können. Nach der Quantifizierung der getesteten Proteine wurde deutlich, dass eine Veränderung der Abundanz von nur sehr wenigen Proteinen zu beobachten war (Abbildung 16). MTTATB war im Vergleich zum Wildtyp 10- bis 20-mal mehr in MTTATB $\Delta$ 42 und 15- bis 28-mal mehr in MTTATB Mitochondrien vorhanden (Abbildung 16A). Die Menge an mitochondrialem TatC (MTTATC) hingegen war in Mutanten-Mitochondrien nicht verändert (Abbildung 16A). Die einzigen beiden Proteine, die eine signifikante Veränderung in der Abundanz in MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien im Vergleich zur vollständigen Komplementationslinie und zum Wildtyp zeigten, waren RISP und die Untereinheit  $\beta$  der ATP-Synthase bzw. Komplex V (ATP $\beta$ ). ATP $\beta$  war um circa 20 % mehr vorhanden, während die Abundanz von RISP um 30 % reduziert war (Abbildung 16B). Außerdem war RISP im Vergleich zu Mitochondrien von MTTATB und *Col-0* die einzig reduzierte Untereinheit von Komplex III in Mitochondrien von MTTATB $\Delta$ 42.

Andere mitochondriale Proteine, die immunologisch visualisiert wurden, ließen keine veränderten Proteinmengen beobachten. Repräsentative Untereinheiten der Komplexe der Atmungskette waren hierfür CA2 aus Komplex I, die Untereinheit 4 der Succinatdehydrogenase aus Komplex II (SDH4), die Untereinheiten MPP $\alpha$ , CYC1, COB und QCR7 aus Komplex III und COX2 aus Komplex IV. TOM40 und TOM20 dienten als repräsentative Proteine der OM und waren in den Mutanten nicht verändert (Abbildung 16C). Die Proteinmengen vom *mitochondrial intermembrane space import and assembly protein 40* (MIA40), Cytochrom c (CYC) und TIM9 des IMS waren ebenfalls nicht beeinträchtigt (Abbildung 16C). Durch die Visualisierung von TIM17-2, der alternativen Oxidase (AOX), der MICOS Komplex Untereinheit von 60 kDa (MIC60) und des *leucine zipper-EF-hand-containing* Transmembranproteins (LETM) konnte gezeigt werden, dass sich auch die Proteinmengen der IM in den Mutanten nicht veränderten (Abbildung 16C). Auch das mitochondriale *heat shock protein* HSP70 der Matrix ließ keine veränderten Proteinmengen beobachten (Abbildung 16C).



**Abbildung 16. Quantifizierung der mitochondrialen Proteine. A)** Immunoblots von mitochondrialen TatB (MTTATB) und mitochondrialem TatC (MTTATC) in den angegebenen Linien. **B)** Immunoblot-Analyse der angegebenen Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe. I - Untereinheit von Komplex I. II - Untereinheit von Komplex II. III - Untereinheit des Komplexes III. IV - Untereinheit von Komplex IV. V - Untereinheit des Komplexes V. **C)** Immunoblot-Analyse von Proteinen, die an mitochondrialen Proteinimport und andere mitochondriale Funktionen gekoppelt sind. IM - inneres Membran Protein. IMS - Intermembranraum-Protein. OM - äußeres Membranprotein. Proteine mit signifikanten Veränderungen der Abundanz im Vergleich zum Wildtyp sind mit einem Sternchen markiert. Das Molekulargewicht des Proteins ist links in kDa angegeben. Der Mittelwert von drei Immunoblot-Quantifizierungen und entsprechende Standardabweichungen sind unter jedem Blot angegeben. Abbildung entnommen aus (Schäfer et al. 2020), modifiziert.

Um die Vermutung zu untersuchen, dass die ungewöhnliche Form der Komplex III Assemblierung in *MTTATBΔ42* auf RISP als Substrat des pflanzlichen mitochondrialen Tat Wegs zurückzuführen ist, wurden Komplex III Dimere aus einer eindimensionalen BN-PAGE ausgeschnitten und durch Elektroelution isoliert. Die Untereinheiten MPP $\alpha$ , CYC1 und RISP aus Komplex III wurden anschließend immunologisch nach SDS-PAGE visualisiert. Während MPP $\alpha$  und CYC1 in moderaten Mengen im Vergleich zu *Col-0* vorhanden waren, war die RISP Untereinheit in Komplex III von *MTTATBΔ42* Mitochondrien deutlich reduziert (Abbildung 17).



**Abbildung 17. Elektroelution von Komplex III aus *Col-0* und *mttatb* + *35Sp:MTTATBΔ42* Mitochondrien.** Die Dimere von Komplex III wurden aus eindimensionaler BN-PAGE ausgeschnitten und durch Elektroelution aufgereinigt. Die anschließende Visualisierung der Untereinheiten von Komplex III wurde durch SDS-PAGE und Immunoblotting erreicht. Jeder Blot zeigt das Äquivalent von 125  $\mu$ g mitochondrialem Protein. Immunologisch nachgewiesen wurden die Rieske-Eisen-Schwefel Untereinheit (RISP, Komplex III), Cytochrom c1 (CYC1, Komplex III) und die Untereinheit alpha der mitochondrialen Prozessierungspeptidase (MPP $\alpha$ , Komplex III). Abbildung entnommen aus (Schäfer et al. 2020), modifiziert.

Diese Beobachtung wurde durch Massenspektrometrie isolierter Komplex III Dimere gestärkt. Die Quantifizierung der Untereinheiten von Komplex III aus *Col-0* und *MTTATBΔ42* Mitochondrien ergab eine signifikante Reduktion von ausschließlich zwei Untereinheiten: der Untereinheit 10 der Ubiquinol-Cytochrom c Oxidoreduktase (QCR10) und RISP

(Tabelle 1). Andere Untereinheiten von Komplex III waren nicht signifikant reduziert. Im Detail handelte es sich hierbei um die Untereinheiten 6- 1 (QCR6-1), 7- 1 und 7- 2 (QCR7-1 und QCR7-2), 8 (QCR8) und 9 (QCR9) der Ubiquinol-Cytochrom *c* Oxidoreduktase, Cytochrom *c*1- 2 und Cytochrom *c*1- 2 (CYC1-1 und CYC1-2), COB und die Untereinheiten  $\alpha$ - 1,  $\alpha$ - 2 und  $\beta$  der mitochondrialen Peptidase (MPP $\alpha$ -1, MPP $\alpha$ -2 und MPP $\beta$ ).

Die Ursache der ungewöhnlichen Komplex III Assemblierung konnte damit auf eine ineffektive Assemblierung der Untereinheiten QCR10 und RISP eingegrenzt werden.

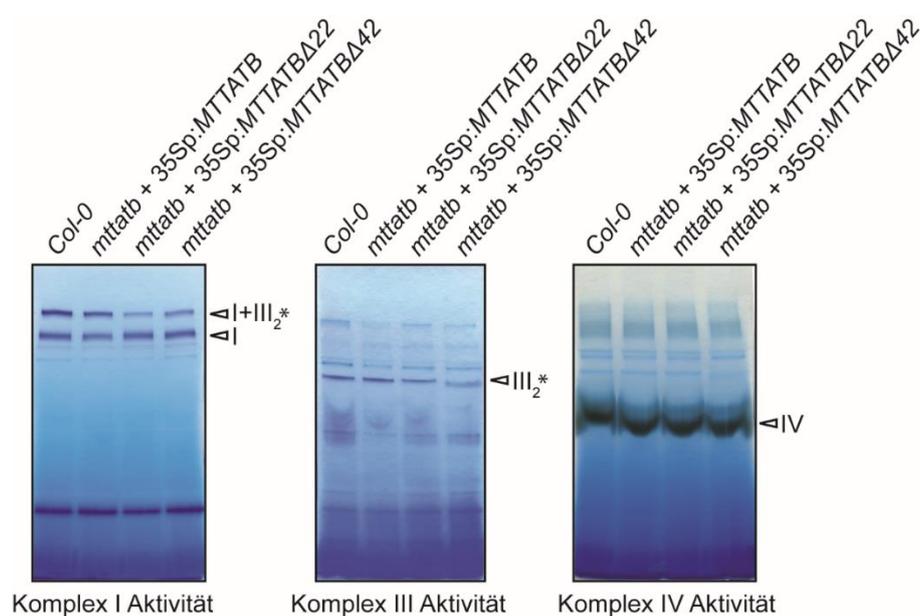
Da in der MTTATB $\Delta$ 42 Mutante der TAT Transport eingeschränkt ist, liegt es nahe, dass das Substrat einen gefalteten Zustand vor der Translokation einnehmen muss. Der C-Terminus von RISP ist dicht um einen 2Fe-2S Co-Faktor gepackt, der vor der Membraninsertion eingebaut wird und das Protein in einen teilweise gefalteten Zustand versetzt. Da QCR10 keinen Co-Faktor besitzt ist es unwahrscheinlich, dass eine Faltung der Untereinheit vor der Translokation in Komplex III stattfindet. Daher wurde geschlussfolgert, dass die fehlerhafte Assemblierung von RISP als Ursache des veränderten Komplex III Phänotyps in MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien gilt.

**Tabelle 1. Massenspektrometrie von Komplex III aus MTTATB $\Delta$ 42.** Isolierte Komplex III Dimere wurden massenspektrometrisch im Rahmen dieser Arbeit von Dr. Holger Eubel und Patrick Künzler analysiert. Die relativen Häufigkeiten der einzelnen Komplex III Untereinheiten wurde aus den kumulierten iBAQ-Werten aller identifizierten Komplex III Untereinheiten berechnet. Die Ergebnisse wurden durch das Verhältnis von Protein zum Komplex in MTTATB $\Delta$ 42 geteilt durch *Col-0* berechnet. Grau schattierte Zellen zeigen einen p-Wert von  $\leq 0,05$  an. Hervorgehobene Zahlen geben ein Verhältnis von  $< 0,55$  an. Tabelle entnommen aus (Schäfer et al. 2020), modifiziert.

GEN	PROTEIN	MTTATB $\Delta$ 42 / <i>Col-0</i>	
		<i>T-Test</i>	<i>Verhältnis</i>
AT1G15120.1	QCR6-1	0,7376	0,86
AT1G51980.1	MPP alpha-1	0,5115	1,04
AT2G40765.1	QCR10	<b>0,0304</b>	<b>0,22</b>
AT3G02090.1	MPP beta	0,8935	0,98
AT3G10860.1	QCR8	0,0250	1,37
AT3G16480.1	MPP alpha-2	0,4952	1,06
AT3G27240.1	CYC1-2	0,2271	0,93
AT3G52730.1	QCR9	0,6944	0,94
AT4G32470.1	QCR7-1	0,0101	1,26
AT5G13430.1	RISP	<b>0,0008</b>	<b>0,51</b>
AT5G25450.1	QCR7-2	0,8171	1,14
AT5G40810.2	CYC1-1	0,3345	1,31
ATMG00220.E	COB	0,3111	0,77

#### 4.3.5 MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien sind in der aeroben Atmung eingeschränkt

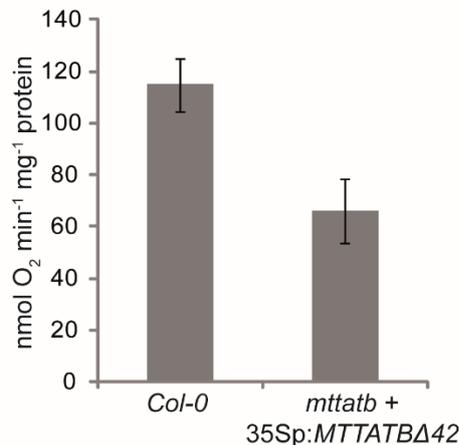
Nachdem gezeigt wurde, dass der Phänotyp der MTTATB $\Delta$ 42 Mutante auf eine ungewöhnliche Assemblierung von Komplex III zurückzuführen war, wurde im Folgenden die Aktivität der oxidativen Phosphorylierungs-(OXPHOS) Maschinerie auf zwei verschiedene Arten gemessen. Zum einen wurden die Aktivität der Komplexe der Atmungskette qualitativ in eindimensionalen BN-Gelen durch spezifische Aktivitätsfärbungen nachgewiesen (Abbildung 18). Die Aktivität von Komplex I wurde durch die NADH-Dehydrogenase-Aktivität visualisiert. Hierbei wurden die Substrate NADH und Nitrotetrazoliumblau (NBT) eingesetzt.



**Abbildung 18. Qualitative In-Gel-Aktivitätsfärbungen von Komplexen der Atmungskette.** Das linke Gel zeigt die NADH-Dehydrogenase-Aktivität (Komplex I Aktivität), das Gel in der Mitte die Cytochrom c Reduktase-Aktivität (Komplex III Aktivität) und das rechte Gel die Cytochrom c Oxidase-Aktivität (Komplex IV Aktivität). Das Sternchen markiert eine reduzierte Aktivität im Vergleich zum Wildtyp in der MTTATB $\Delta$ 42 Mutante. Abbildung entnommen aus (Schäfer et al. 2020), modifiziert.

Durch die Aktivität von Komplex I wurde NBT zu Formazan reduziert, was in einer Dunkelblaufärbung der Bande von Komplex I zu erkennen war. Komplex III wurde durch eine Elektronendonorlösung ebenfalls durch eine Dunkelblaufärbung der Bande sichtbar. Der Nachweis von Komplex IV erfolgte über eine Zugabe von Cytochrom c und 3,3-Diaminobenzidin, welches in oxidierte Form als dunkelbrauner Niederschlag auf Höhe der Bande der Cytochrom c Oxidase ausfiel. Die Ergebnisse dieses Versuchs ließen einen weniger aktiven Komplex III in MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien im Vergleich zu den anderen Pflanzenlinien beobachten, während die Aktivitäten von Komplex I und IV nicht beeinträchtigt waren (Abbildung 18).

Zum anderen wurde die mit der gesamten Elektronentransportkette (ETC) verknüpfte Atmung von *MTTATBΔ42* und Wildtyp Mitochondrien quantifiziert (Abbildung 19). Der Sauerstoffverbrauch der Mutantenmitochondrien war im Vergleich zum Wildtyp um 40% verringert, was darauf hindeutete, dass es trotz der deutlich reduzierten Komplex III Aktivität in der Mutante noch zu einer gewissen Restatmung kommen konnte.



**Abbildung 19.** Quantifizierung der mit der gesamten Elektronentransportkette (ETC) verknüpften Atmung von *mttatb* + 35Sp+*MTTATBΔ42* und Wildtyp Mitochondrien, angegeben in nmol O<sub>2</sub> pro min und mg Protein. Die Atmung wurde durch die Zugabe von NADH und Bernsteinsäure initiiert und die maximale Atmung durch die wiederholte Zugabe von ADP erreicht. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Abbildung entnommen aus (Schäfer et al. 2020), modifiziert.

Schlussfolgernd kann nach den Kapiteln 4.3.4 und 4.3.5 behauptet werden, dass höchst wahrscheinlich die Komplex III Assemblierung in *MTTATBΔ42* Mitochondrien in einem sehr späten Stadium verzögert oder sogar behindert ist. Da durch eine partielle Komplementierung der Verlustmutante durch *MTTATBΔ42* die Lebensfähigkeit der Linie wieder hergestellt werden konnte, ist anzunehmen, dass einige wenige vollständig assemblierte Komplex III Dimere vorhanden sein müssen, da sonst die Lebensfähigkeit nicht gewährleistet wäre. Eine Anreicherung von Assemblierungsintermediaten in einer späten Stufe der Komplex III Biogenese durch das Fehlen der RISP Untereinheit steht im Einklang mit der Theorie, dass RISP zum einen in einem der letzten Schritte in Komplex III assembliert wird (Meyer et al. 2019) und zum anderen das Substrat für den pflanzlichen mitochondrialen TAT-Weges ist. Da immer noch ca. 70 % des RISP Proteins in den Mitochondrien der *MTTATBΔ42* Mutante vorhanden ist, stellte sich die Frage, was damit passiert.

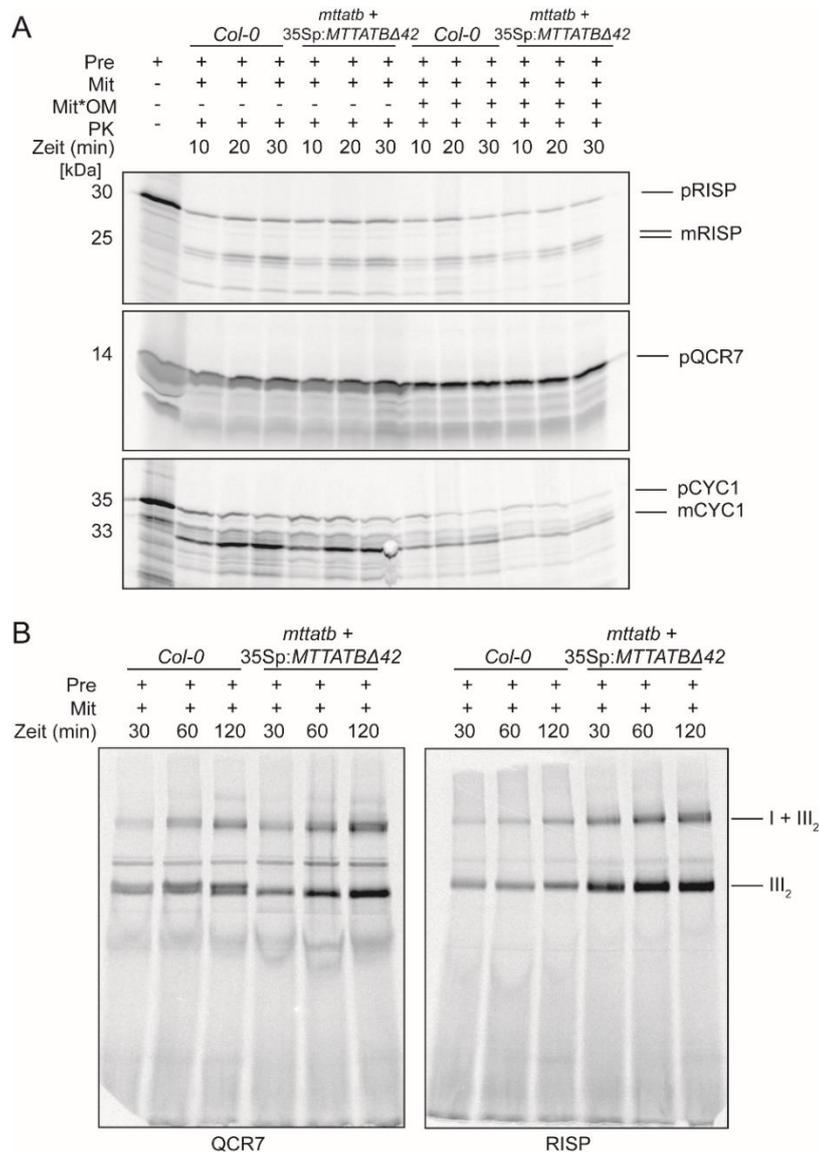
#### 4.3.6 *In vitro* Import von Komplex III Untereinheiten in Mitochondrien aus MTTATB $\Delta$ 42

Die RISP Untereinheit aus Komplex III ist im Nukleus kodiert und muss daher im Cytosol translatiert und in die mitochondriale Matrix importiert werden, bevor der 2Fe-2S Cluster in den C-Terminus eingebaut und sie in Komplex III assembliert werden kann. Ob dieser Vorgang in MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien noch korrekt verläuft, sollte in einem weiteren Versuchsansatz getestet werden. RISP wurde hierfür *in vitro* synthetisiert und radioaktiv markiert. Das markierte RISP wurde anschließend in isolierte Mitochondrien aus *A. thaliana* importiert. Als Kontrolle wurden zwei weitere Komplex III Untereinheiten in diese Studie miteinbezogen, nämlich CYC1 und QCR7. Die radioaktiv markierten Vorläufer wurden für definierte Zeitspannen (10, 20 und 30 min) sowohl mit Wildtyp als auch mit MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien unter Import begünstigenden Bedingungen inkubiert (Abbildung 20A).

Der erfolgreiche Import von Vorläuferproteinen wurde durch eine proteolytische Spaltung des Signalpeptids detektierbar, das im Falle von RISP und CYC1 zu einem niederen Molekulargewicht der ausgereiften Form des Proteins (mCYC1 und mRISP) führte. Nach einem erfolgreichen Import in die Mitochondrien wiesen die Proteine außerdem eine Resistenz gegenüber Proteinase K auf (Abbildung 20A). Im Gegensatz dazu enthält QCR7 ein internes, nicht abspaltbares Signalpeptid und ein erfolgreicher Import wurde somit nur durch den Schutz vor einem Proteinase K Verdau verzeichnet (Abbildung 20A). Alle Proteine wurden in die MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien genauso effizient importiert wie in den Wildtyp. Dies wurde durch den gleichen Anstieg der Intensität der importierten Banden über die Zeit nach autoradiografischer Detektion angezeigt (Abbildung 20A).

Um sicherzustellen, dass die Komplex III Untereinheiten vollständig durch beide Membranen importiert wurden, wurde in einem zweiten Importansatz die äußere Membran der Mitochondrien durch osmotische Schwellung nach der Import-Reaktion zum Platzen gebracht (Generation von Mitoplasten). Dies ermöglichte einen proteolytischen Verdau der zugänglichen und löslichen Proteine des Intermembranraums durch Proteinase K (Abbildung 20A, sechs rechte Spuren). Für QCR7 wurde keine Abschwächung der importierten Bande zwischen Wildtyp und MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien beobachtet, weder in intakten Mitochondrien noch in Mitoplasten, die mit PK behandelt wurden. Ein proteolytischer Verdau von löslichen Domänen von QCR7 wurde ebenfalls nicht erwartet, da für diese Untereinheit keine in den Intermembranraum ragenden Domänen beschrieben wurden. Im Gegensatz dazu besitzen sowohl CYC1 als auch RISP im Intermembranraum exponierte Domänen, nachdem sie ihre endgültige Topologie in der inneren Membran erreicht haben. CYC1 und RISP zeigen daher auch ähnliche Muster nach der PK Behandlung, die durch eine geringere Bandenintensität in Mitochondrien, die nach dem

Import zu Mitoplasten generiert und mit PK behandelt wurden, zu verzeichnen waren. Im Vergleich zum Import in intakte Mitochondrien konnte geschlossen werden, dass IMS exponierte Domänen für den Verdau teilweise zugänglich waren.



**Abbildung 20. *In vitro* Import von Komplex III Untereinheiten in Wildtyp und MTTATBΔ42 Mitochondrien. A)** Import der *in vitro* translatierten Komplex III Untereinheiten QCR7, RISP, und CYC1 ohne oder mit aufgebrochener Außenmembran, um importierte Proteine in Mitochondrien (Mit) bzw. Mitoplasten (Mit\*OM) zu visualisieren. Die Vorläufer (Pre) wurden vor dem Import mit [<sup>35</sup>S]-Methionin markiert. Der Import wurde für unterschiedliche Zeiträume von 10, 20 und 30 min durchgeführt und mit Proteinase K (PK) zur Entfernung von an Mitochondrien oder Mitoplasten gebundenen Restvorläufer behandelt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE getrennt und die Autoradiographie wurde mit einem Typhoon-Scanner (GE Healthcare) detektiert. p = Vorläuferform des Proteins. m = reife Form des Proteins. Das Molekulargewicht wird in kDa auf der linken Seite angegeben. **B)** Import der *in vitro* translatierten Komplex III Untereinheiten QCR7 und RISP in Mitochondrien (Mit) für Zeiträume von 30, 60 und 120 min. Die Analyse von der Assemblierung der Untereinheiten in Komplex III wurde durch eine Trennung der nativen Proteinkomplexen durch BN-PAGE ermöglicht. Radioaktiv markierte Proteine wurden wie oben beschrieben visualisiert. Abbildung entnommen aus (Schäfer et al. 2020), modifiziert.

Wurde jedoch Wildtyp mit MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien verglichen, so gab es keinen Unterschied. Die vor dem PK Verdau geschützten Proteine, die im Autoradiogramm zu erkennen waren, lassen sich dadurch erklären, dass sich ein Teil der importierten Proteine entweder noch auf der Matrixseite der Membran befand oder dass sowohl CYC1 als auch RISP durch den Einbau in Komplex III vor dem Verdau geschützt waren. Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass RISP normal in die MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien importiert werden kann.

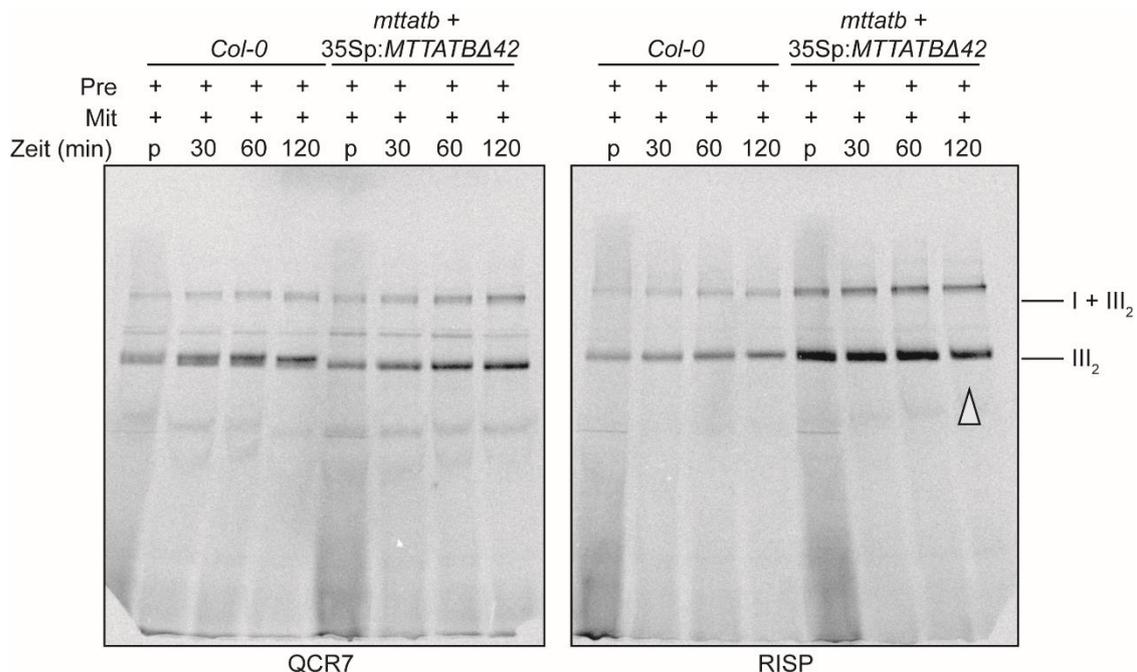
In einem weiteren Versuchsansatz wurde die korrekte Assemblierung von RISP in Komplex III untersucht. Nach dem *in vitro* Import wurden die Proteinkomplexe nativ durch BN-PAGE aufgetrennt und durch ihre radioaktive Markierung autoradiografisch veranschaulicht. Die Assemblierung von RISP und QCR7 konnte in beiden Pflanzenlinien verfolgt werden (Abbildung 20B). Der Einbau von QCR7 in Komplex III der Wildtyp Mitochondrien schien zunächst in einem Komplex, der etwas kleiner ist, zu akkumulieren, bevor die endgültige Größe erreicht werden konnte. Über die Zeit häufte sich QCR7 stärker im Gesamtkomplex III<sub>2</sub> an. Diese Beobachtung wurde auch für Superkomplexformation der Komplexe I und III gemacht (Abbildung 20B).

In den MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien hingegen scheint sich QCR7 nur in dem kleineren Subkomplex des Komplexes III wiederzufinden. Dasselbe wurde auch bei der Anhäufung von QCR7 in der Superkomplex Bande der Komplexe I und III beobachtet (Abbildung 20B). Dies unterstützte erneut die Hypothese, dass die Komplex III Biogenese in MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien nicht vollendet werden konnte und in einer Zwischenstufe stagnierte.

RISP reicherte sich lediglich in einer Form von Komplex III an, die vermutlich die des Gesamtkomplex III<sub>2</sub> repräsentierte. In den Mitochondrien des Wildtyps wurde RISP direkt in die finale Form des Komplex III assembliert und im Laufe der Zeit akkumuliert (Abbildung 20B). Interessanterweise wurde RISP in den MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien schneller als in Wildtyp Mitochondrien assembliert und Assemblierungsintermediate konnten weder in Wildtyp noch in MTTATB $\Delta$ 42 identifiziert werden. Dies zeigte, dass in den MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien der Import von RISP ähnlich dem Wildtyp, aber die Assoziation mit Komplex III schneller erfolgte.

Die Überakkumulation von *in vitro* importiertem RISP in Komplex III wurde weitergehend auf seine Stabilität innerhalb des Komplexes untersucht. Nach einer Importperiode von 30 min (*pulse*) wurden die Mitochondrien reisoliert und in Importpuffer ohne Vorläuferprotein resuspendiert. Die Reaktionen wurden dann 30, 60 und 120 min lang verfolgt (Abbildung 21). Ähnlich wie im ersten Experiment nahm die Menge an QCR7 mit der Zeit in vollständig assembliertem Komplex III<sub>2</sub> weiter zu (Abbildung 21, linke Seite). RISP zeigte jedoch zwei unterschiedliche Assemblierungsmuster zwischen Wildtyp- und MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien. Beim Wildtyp reicherte sich RISP, wie QCR7, während der

Verfolgungsperiode weiterhin in Komplex III an. In den MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien war jedoch keine Zunahme der RISP-Akkumulation im Komplex III zu erkennen, tatsächlich schien RISP zwischen 60 und 120 min teils degradiert worden zu sein (Abbildung 21, rechte Seite). Daher war das importierte RISP innerhalb von Komplex III nicht stabil, was entweder auf eine falsche Faltung oder eine falsche Endtopologie zurückzuführen war.



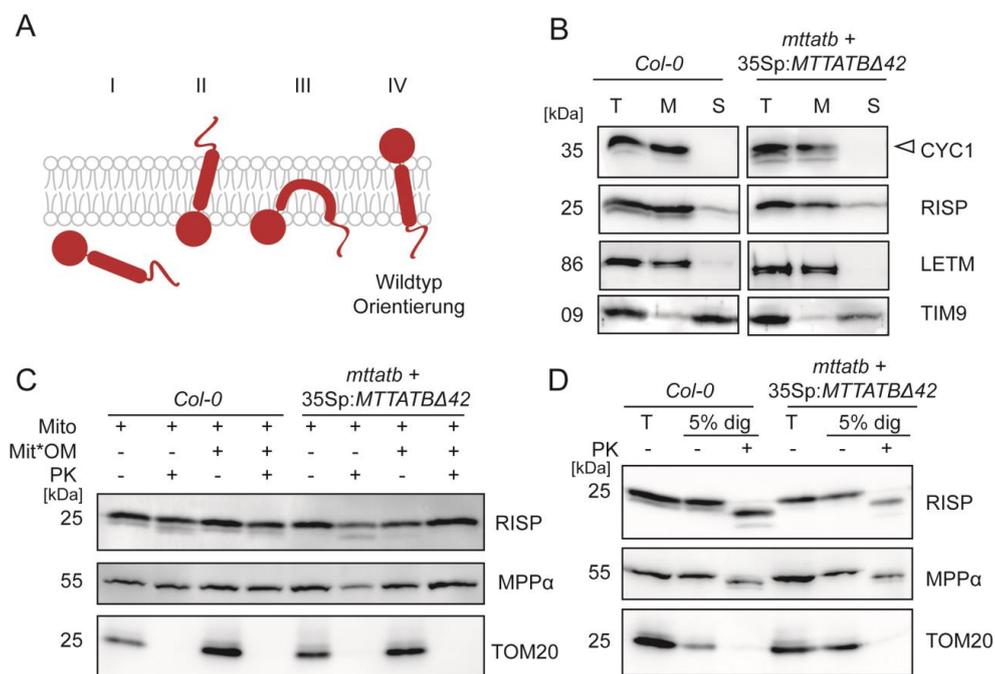
**Abbildung 21. Assemblierungsverfolgung der Untereinheiten QCR7 und RISP in Komplex III von Wildtyp und MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien.** *In vitro* translatiertes und radioaktiv markiertes QCR7 und RISP wurden mit isolierten Mitochondrien für eine *pulse* Periode (p) von 30 min inkubiert. Nach der *pulse* Periode wurden die Mitochondrien wieder isoliert, von nicht importiertem Protein freigeschrieben und in Importpuffer resuspendiert. Die Assemblierung von RISP und QCR7 wurde für die angegebenen Zeiträume verfolgt. Der Pfeil im Autoradiogramm von RISP weist auf die geringere Intensität von assembliertem RISP nach 120 min hin. III<sub>2</sub> - Homodimer des Komplexes III, I+III<sub>2</sub> - Superkomplex von Komplex I und Dimerkomplex III. Pre = Vorläuferprotein, Mit = Mitochondrien. Abbildung entnommen aus (Schäfer et al. 2020), modifiziert.

#### 4.3.7 Orientierung und Faltung von RISP in MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien

Nachdem festgestellt wurde, dass der Import von RISP in die Mitochondrien normal erfolgte, wurde als nächstes die Orientierung des Proteins in MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien untersucht. Die möglichen Orientierungen der RISP Untereinheit in Komplex III von MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien sind in Abbildung 22A schematisiert. Die RISP Untereinheit konnte entweder noch teilweise löslich in der mitochondrialen Matrix zurückbleiben (I), mit dem N-Terminus zum IMS und dem C-Terminus zur Matrix orientiert sein (II), mit beiden

Termini zur Matrix zeigend in der Membran vorliegen (III) oder in der korrekten Topologie wie im Wildtyp (IV) vorliegen (Abbildung 22A).

Durch die Verwendung einer Karbonat-Extraktion konnten lösliche von Membran-gebundenen mitochondrialen Proteinen unterschieden werden. Als Kontrolle wurden die membrangebundene Komplex III Untereinheit CYC1 und das IM Protein LETM, sowie das lösliche TIM9 des IMS verwendet. Wie erwartet wurden CYC1 und LETM in der Membranfraktion gefunden, während TIM9 in der löslichen Fraktion der Karbonatextraktion zu finden war. Sowohl im Wildtyp als auch in *MTTATBΔ42* war RISP hauptsächlich mit der Membranfraktion assoziiert (Abbildung 22B). Somit konnte die mögliche Orientierung (I) in *MTTATBΔ42* Mitochondrien ausgeschlossen werden.

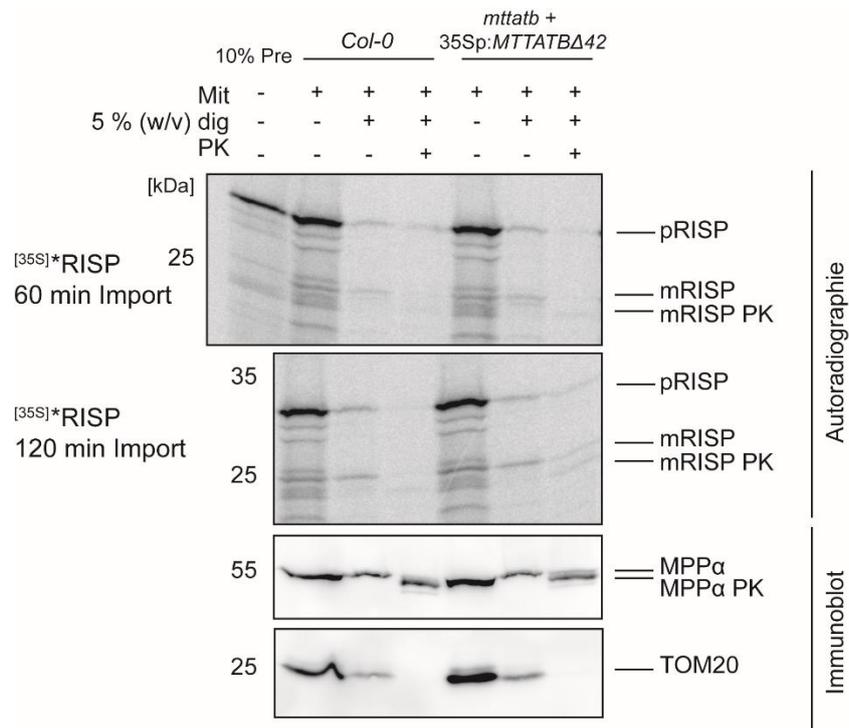


**Abbildung 22. Lokalisierung und Orientierung des Rieske-Eisen-Schwefel-Proteins in *MTTATBΔ42*** **A)** Schematische Darstellung der vier möglichen Ausrichtungen des RISP. I - RISP ist löslich und gefaltet in der Matrix. II - RISP befindet sich in der inneren Membran mit dem gefalteten C-Terminus zur Matrix und dem N-Terminus orientiert zur IMS-Seite. III - RISP ist in der inneren Membran mit den beiden N-Terminus und gefalteten C-Terminus zur Matrix orientiert. IV - die Wildtyp-Orientierung mit dem N-Terminus zur Matrix zeigend und dem gefalteten C-Terminus auf der IMS-Seite der inneren Membran. **B)** Wildtyp und *MTTATBΔ42* Mitochondrien nach Karbonat-Extraktion in 100 mM Natriumkarbonat pH 11,0. T = Absolute Menge von 50 µg Mitochondrien. M = Membranfraktion. S = lösliche Fraktion. CYC1 und LETM wurden als Membrankontrolle und TIM9 als Kontrolle der löslichen Fraktion verwendet. **C)** Wildtyp und *MTTATBΔ42* Mitochondrien (Mit) und Mitoplasten (Mit\*OM) wurden einem Proteinase K (PK) Verdau unterzogen. TOM20 und MPPα wurden als Kontrolle verwendet. **D)** Wildtyp und *MTTATBΔ42* Mitochondrien wurden in 5 % (w/v) Digitonin solubilisiert und einem Proteinase K (PK) Verdau unterzogen. TOM20 und MPPα wurden als Kontrollen verwendet. Abbildung entnommen aus (Schäfer et al. 2020), modifiziert.

Als nächstes wurden intakte Mitochondrien und Mitoplasten von Wildtyp und MTTATB $\Delta$ 42 mit Proteinase K behandelt. Zur Kontrolle wurden die Proteine TOM20 und MPP $\alpha$  visualisiert. TOM20 besitzt eine große cytosolische Domäne, die für den PK Verdau zugänglich ist. MPP $\alpha$  ist größtenteils von Komplex III vor einem proteolytischen Verdau geschützt, besitzt jedoch zugängliche Strukturen auf der Matrixseite der IM. RISP verhielt sich in Wildtyp Mitochondrien und Mitoplasten wie die Kontrolle MPP $\alpha$  und war vor einem proteolytischen Abbau geschützt, während die cytosolische Domäne von TOM20 degradiert wurde. Dasselbe konnte in MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien beobachtet werden, was wiederum bedeutete, dass in beiden Linien keine Domänen des RISP Proteins für Proteinase K zugänglich waren (Abbildung 22C).

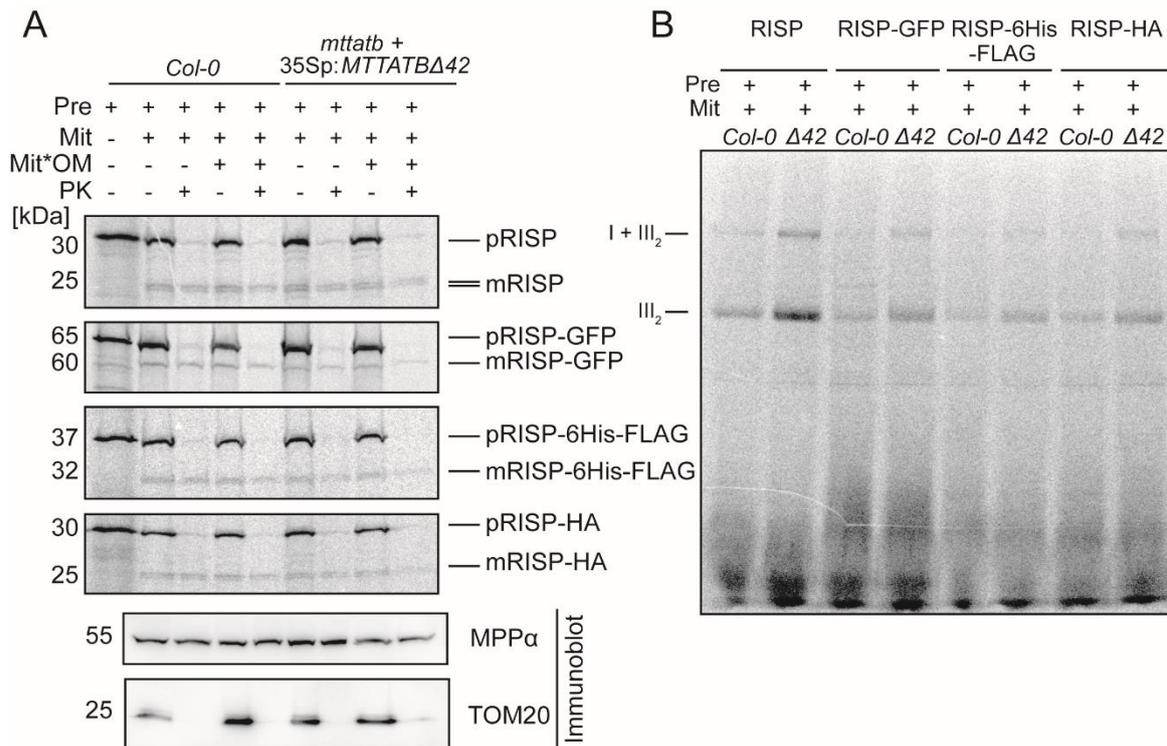
Um die Matrixseite der inneren Membran zu erreichen, wurden die Mitochondrien mit 5 % (w/v) Digitonin solubilisiert und anschließend einem Proteinase K Verdau unterzogen. Das Molekulargewicht von RISP wurde durch ca. 2 – 3 kDa verringert, aber erneut konnte kein Unterschied der Behandlung zwischen Wildtyp und MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien festgestellt werden (Abbildung 22D). Der molekulare Größenunterschied von RISP ist vermutlich auf eine proteolytische Abspaltung des N-Terminus zurückzuführen, der zur Matrix hin orientiert ist und nicht durch Komplex III geschützt wurde. Daher konnte die zweite Ausrichtungsmöglichkeit (II) ebenfalls vernachlässigt werden. Aus diesen Ergebnissen wurde ersichtlich, dass RISP in MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien membrangebunden war und der N-Terminus zur Matrix zeigte.

Nachdem die Orientierung von RISP immunologisch keine Unterschiede zum Wildtyp aufwies, wurde die Digitonin-Solubilisierung auch mit *in vitro* synthetisiertem und importiertem RISP durchgeführt. Die Solubilisierung mit anschließendem PK Verdau wurde nach 60 beziehungsweise 120 min Import durchgeführt. Als Kontrolle wurden nach der Behandlung der immunologische Nachweis von MPP $\alpha$  und TOM20 verwendet (Abbildung 23). Die importierte Form von RISP (mRISP) verhielt sich zur Behandlung in Wildtyp und MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien gleich (mRISP PK). Erneut konnte nur ein kleiner Teil des Proteins verdaut werden und ließ darauf schließen, dass es sich um den zur Matrixseite orientierten N-Terminus handelte. Demnach verhielt sich das *in vitro* synthetisierte RISP nach dem Import exakt wie das native RISP der Mitochondrien in der Immunoblotanalyse.



**Abbildung 23. Mitochondrien-Solubilisierung nach *in vitro* Import von RISP in Wildtyp und MTTATBΔ42.** Radioaktives RISP wurde 60 beziehungsweise 120 min in Mitochondrien von Wildtyp und MTTATBΔ42 importiert. Anschließend wurden die Mitochondrien in 5 % (w/v) Digitonin solubilisiert und der Proteinase K (PK) Verdauung ausgesetzt. TOM20 und MPPα wurden als Kontrollen verwendet. Pre = Vorläuferprotein, Mit = Mitochondrien p = Vorläuferform des Proteins. m = reife Form des Proteins dig = Digitonin.

Die Ausrichtung des C-Terminus hin zum IMS oder zur Matrix konnte aus bisherigen Versuchen nicht genau determiniert werden. Daher wurden *in vitro* Importanalysen von RISP mit C-terminalen Anhängen (*tags*) durchgeführt (Abbildung 24). Falls die Proteine vollständig transloziert und in Komplex III assembliert worden wären, wären die *tags* für einen Proteinase K Verdau im IMS nach der Generierung von Mitoplasten zugänglich. RISP Varianten wurden erfolgreich erstellt, *in vitro* translatiert und in intakte Mitochondrien importiert (Abbildung 24A). Jedoch waren alle importierten RISP Varianten gegen PK resistent. Da die C-terminal-verlängerten RISP-Proteine jedoch nicht korrekt in Komplex III assembliert wurden (Abbildung 24B), konnte dieser Ansatz keine genaue Schlussfolgerung über die Lokalisierung des C-Terminus getroffen werden. Die Verlängerung durch einen C-terminalen *tag* an RISP könnte den Einbau des 2Fe-2S-Clusters in den C-Terminus stören und dadurch die Faltung behindern. Folglich wäre dann auch die Translokation und Insertion in Komplex III nicht garantiert, da der TAT Translokationsweg eine gefaltete Konformation des Substrats für die Translokation voraussetzt. Ein ähnliches Phänomen wurde bereits zuvor in Hefe-Mitochondrien beobachtet (Cui et al. 2012).



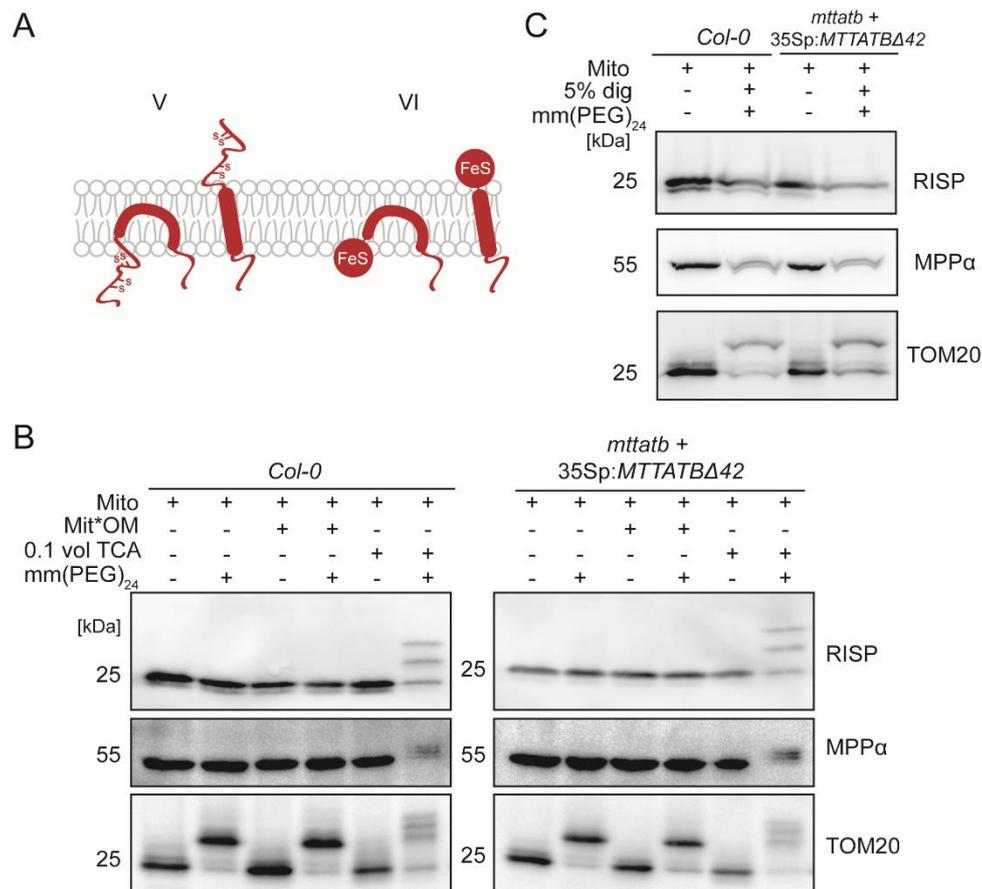
**Abbildung 24. *In vitro* Import und Assemblierung von RISP-Proteinen mit C-terminalen Anhängen in Wildtyp und MTTATBΔ42 Mitochondrien. A)** Import von *in vitro* translatierten RISP Varianten, die C-terminal mit GFP, 6His-FLAG und HA markiert wurden, ohne oder mit anschließender Rupturierung der äußeren Membran, um die importierten Proteine in Mitochondrien (Mit) bzw. Mitoplasten (Mit\*OM) sichtbar zu machen. Die Vorläufer (Pre) wurden vor dem Import mit [<sup>35</sup>S]-Methionin radioaktiv markiert. Der Import wurde für 30 min durchgeführt und mit Proteinase K (PK) behandelt, um nach dem Import die an Mitochondrien oder Mitoplasten angehefteten Vorläufer zu entfernen. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie mit einem Typhoon-Scanner (GE Healthcare) nachgewiesen. p = Vorläuferform des Proteins. m = reife Form des Proteins. Das Molekulargewicht ist auf der linken Seite in kDa angegeben. Zur Kontrolle der nachweislichen Rupturierung der äußeren Membran wurden Immunoblots mit MPPα und TOM20 verwendet. **B)** Import der *in vitro* translatierten RISP-Proteine in Mitochondrien (Mit) für 60 min. Die Verfolgung der einzelnen Komplex III Assemblierungen wurde durch die Trennung der nativen Proteinkomplexe mittels BN-PAGE erreicht. Radioaktiv markierte Proteine wurden wie bereits beschrieben visualisiert. Abbildung entnommen aus (Schäfer et al. 2020), modifiziert.

In einem weiteren Ansatz wurde schließlich die Faltung von RISP bzw. der damit verbundene Einbau des 2Fe-2S Clusters in den C-Terminus in MTTATBΔ42 Mitochondrien überprüft. Der C-Terminus könnte entweder in einem gefalteten (Abbildung 25A, Option V) oder ungefalteten Zustand (Abbildung 25A, Option VI) in den Mitochondrien von MTTATBΔ42 vorliegen. Um dies zu testen, wurde ein Versuchsansatz gewählt, in dem alle zugänglichen Thiolgruppen von Cysteinen markiert werden konnten, die weder eine Disulfidbindung ausbilden noch an einen Co-Faktor gebunden sind. Der C-Terminus von RISP enthält vier Cysteine, die entweder eine Disulfidbindung ausbilden (Cystein an Position 220 und 236) oder den Eisen-Schwefel-Cluster binden (Cystein an Position 215 und 234). Falls nun der C-Terminus von RISP in MTTATBΔ42 Mitochondrien gefaltet wäre,

könnte keines dieser Cysteine markiert werden. Zur Kontrolle wurden TOM20 und MPP $\alpha$  verwendet. TOM20 besitzt drei zugängliche Cysteine in der cytosolischen Domäne. MPP $\alpha$  besitzt ebenfalls drei Cysteine, die weder eine Disulfidbrücke, noch einen Co-Faktor binden und daher ebenfalls zugänglich für eine Markierung sind.

Die Mitochondrien wurden mit der alkylierenden Verbindung Methyl-Polyethylenglykol 24-Maleimid (mm(PEG)24) zur Pegylierung unter verschiedenen Bedingungen inkubiert. Die Markierung mit mm(PEG)24 erfolgt durch Alkylierung zugänglicher Cysteine und kann durch eine Größenzunahme von 2 kDa pro markiertem Cystein des Zielproteins immunologisch verifiziert werden (Backes et al. 2019). Die Pegylierung wurde zunächst mit Mitochondrien und Mitoplasten durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Cysteine des RISP C-Terminus von der IMS-Seite der Membran zugänglich waren, da mm(PEG)24 die innere Membran nicht durchqueren kann. Bei TOM20 konnte durch eine Markierung eine Zunahme des Molekulargewichts von circa 6 kDa beobachtet werden. Die Kontrolle MPP $\alpha$  wurde in diesem Versuch nicht markiert, da der zugängliche Teil des Proteins sich auf der Matrixseite der IM befindet und in Mitoplasten folglich nicht zugänglich ist. Weder in Wildtyp noch in MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien beziehungsweise Mitoplasten konnte eine Pegylierung von RISP unter den genannten Bedingungen beobachtet werden (Abbildung 25B). Nach einer TCA-Fällung von mitochondrialen Proteinen, die den Eisen-Schwefel-Cluster aus dem RISP C-Terminus entfernt, konnten die Cysteine allerdings pegyliert werden, was durch die Verschiebung des Molekulargewichts nach dem Immunoblotting demonstriert werden konnte (Abbildung 25B).

Des Weiteren wurden mitochondriale Membranen mit Digitonin solubilisiert und der Pegylierung unterzogen, um eine Markierung sowohl auf der IMS- als auch auf der Matrixseite der inneren Membran zu erreichen. Wie erwartet wurden beide Kontrollen TOM20 und MPP $\alpha$  markiert. Es schien im Fall von MPP $\alpha$  keine vollständige Pegylierung stattgefunden zu haben, da sich vermutlich ein großer Teil des Proteins in Komplex III befindet und daher in der IM vor der Markierung geschützt ist. RISP konnte auf keiner der beiden Seiten der inneren Membran pegyliert werden, da weder in Wildtyp- noch in MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien eine Verschiebung des Molekulargewichts beobachtet werden konnte (Abbildung 25C). Aus diesen Ergebnissen wurde ersichtlich, dass die Cysteine des RISP C-Terminus in den Mitochondrien von MTTATB $\Delta$ 42 nicht zugänglich waren und der C-Terminus entweder auf der IMS- oder der Matrixseite gefaltet sein musste.



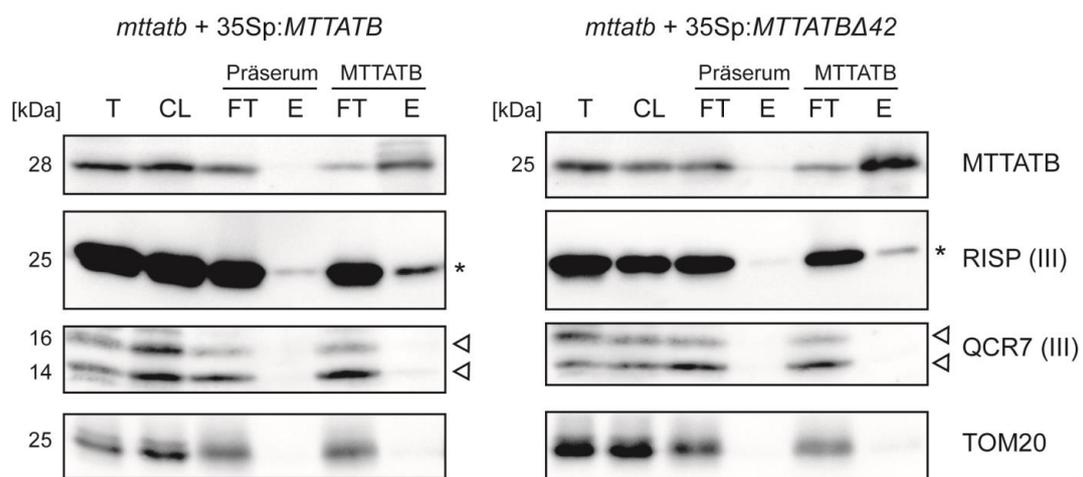
**Abbildung 25. Untersuchungen zur Faltung der RISP Untereinheit in Mitochondrien von Wildtyp und MTTATBΔ42. A)** Mögliche Topologien von RISP in MTTATBΔ42 Mitochondrien und Positionen der vier Cysteinreste im C-Terminus. V - der RISP C-Terminus ist ungefaltet. VI - der RISP-C-Terminus ist gefaltet und enthält den 2Fe-2S-Cluster (FeS), daher sind keine Cysteine zugänglich. **B)** Markierung von zugänglichen Cysteinen durch Pegylierung von intakten Mitochondrien (Mit), TCA-präzipitierten Mitochondrien und Mitoplasten (Mit\*OM) mit mm(PEG)<sub>24</sub>. Immunoblots von TOM20 und MPPα dienen als Kontrolle. **C)** Die Mitochondrien wurden zunächst in 5% (w/v) Digitonin gelöst und anschließend der Pegylierung durch mm(PEG)<sub>24</sub> ausgesetzt. Immunoblots von TOM20 und MPPα dienen als Kontrolle. Das Molekulargewicht wird in kDa auf der linken Seite des Blots angegeben. Abbildung entnommen aus (Schäfer et al. 2020), modifiziert.

RISP in MTTATBΔ42 Mitochondrien kann folglich entweder genau in der gleichen oder in einer ähnlichen Orientierung wie beim Wildtyp vorliegen. Da RISP aber nicht stabil in Komplex III ist, ist es unwahrscheinlich, dass es in Komplex III korrekt orientiert ist.

Wahrscheinlich befindet sich der Großteil von RISP in den MTTATBΔ42 Mitochondrien innerhalb der inneren Membran, wobei der C-Terminus, der den 2Fe-2S-Cluster enthält, der Matrix in einer sogenannten Haarnadelkonformation zugewandt ist. Vermutlich kommt die Assemblierung von RISP während der Biogenese von Komplex III aufgrund einer labilen Translokation, verursacht durch das verkürzte MTTATB des TAT Komplexes, zum Stillstand. Nichtsdestotrotz muss eine geringe Menge an RISP noch die richtige Topologie in Komplex III erreichen, da in der Mutante eine geringe Komplex III Aktivität zu beobachten war.

#### 4.3.8 RISP kann mit MTTATB durch chemische Quervernetzung in Mitochondrien der Mutantenlinien verknüpft werden

Um einen weiteren Hinweis zu erhalten, dass RISP ein Substrat für MTTATB ist, wurde eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt. Dies sollte untersuchen, ob MTTATB und RISP tatsächlich interagieren (Abbildung 26). Als Negativkontrolle wurde der Versuch mit Präimmunsersum durchgeführt. Co-Immunpräzipitationen wurden aufgrund der erhöhten Proteinexpression mit Mitochondrien der Linien MTTATB und MTTATB $\Delta$ 42 durchgeführt. Nach der Immunpräzipitation von MTTATB wurden die Elutionen auf die Interaktion von MTTATB mit RISP, QCR7 und TOM20 immunologisch getestet (Abbildung 26). Weder TOM20 noch QCR7 konnten nach Immunpräzipitation mit dem MTTATB Antikörper in Elutionen beider Linien nachgewiesen werden. Jedoch konnte eine geringe Menge RISP in den Elutionsfraktionen des MTTATB-Antikörpers nachgewiesen werden, die nicht in den Elutionen der Immunpräzipitation mit Präserum zu beobachten war (Abbildung 26).



**Abbildung 26.** Immunoblot-Analyse der Co-Immunpräzipitation von quervernetzten Mitochondrien aus MTTATB und MTTATB $\Delta$ 42 mit dem MTTATB-Antikörper (MTTATB) oder Präserum. Die Co-Elution wurde durch den immunologischen Nachweis von MTTATB, RISP, QCR7 und TOM20 analysiert. Die Co-Elution zusammen mit dem MTTATB Protein ist mit einem Sternchen auf der rechten Seite markiert. Bei allen Immunoblots ist auf der linken Seite das Molekulargewicht und auf der rechten Seite der verwendete Antikörper markiert. T= Gesamtmenge an Mitochondrien; CL = Mitochondrien nach dem Crosslinking; FL = Durchfluss (*flowthrough*); E = Elution. Abbildung entnommen aus (Schäfer et al. 2020), modifiziert.

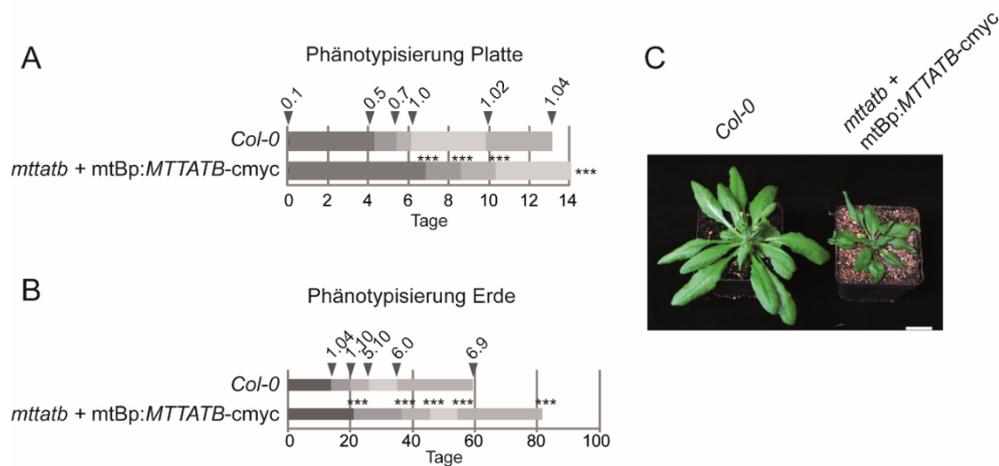
Ferner konnte MTTATB mit einem kleinen Pool des verfügbaren RISP innerhalb der Mitochondrien interagieren, der nicht mit Komplex III assoziiert wurde, da keine Interaktion mit QCR7 zu beobachten war (Abbildung 26). Die Wechselwirkung zwischen RISP und MTTATB wurde durch eine Verkürzung von MTTATB $\Delta$ 42 nicht beeinträchtigt, was darauf hindeutete, dass diese C-terminalen 42 Aminosäuren von MTTATB für die

Substratinteraktion vernachlässigbar sind und daher eher eine Rolle während des Translokationsprozesses spielen könnten. Des Weiteren wurde versucht weitere mögliche Bindungspartner von MTTATB zu identifizieren. Die Elutionsfraktionen wurden hierfür massenspektrometrisch untersucht. Abgesehen von MTTATB selbst wurden jedoch keine weiteren Proteine statistisch signifikant angereichert (siehe Tabelle 9 im Anhang).

## 4.4 Funktionelle Komplementierung durch MTTATB-cmyc

### 4.4.1 Phänotypische Charakterisierung von MTTATB-cmyc komplementierten Mutanten

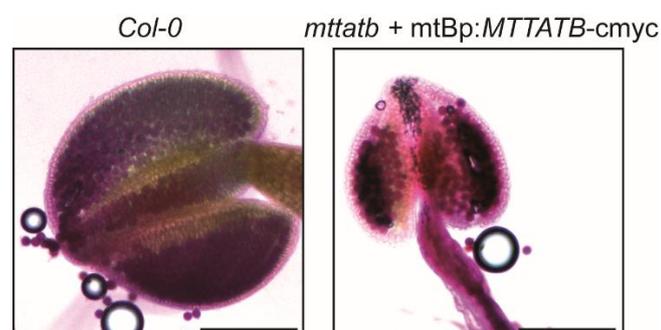
Zur Validierung der bisherigen Beobachtungen und Schlussfolgerungen wurde eine zweite Mutantenlinie charakterisiert. Die embryonale Verlustmutante *mttatb* wurde hierfür mit der vollen Länge der CDS von *MTTATB* unter der Kontrolle des nativen Promotors (1500 bp 3' UTR *upstream* der *MTTATB* CDS) und mit einem C-terminalen c-myc *tag* fusioniert, komplementiert. Die stabile Transformation durch *A. tumefaciens* GV3101 lieferte in der nächsten Generation homozygote Nachkommen, die einen ähnlichen Phänotyp zur bisher beschriebenen *MTTATB*Δ42 Linie ausprägte. Eine phänotypische Charakterisierung der *mttatb* + mtBp:*MTTATB-cmyc* (fortan *MTTATB-cmyc*) ergab eine jedoch nicht ganz so stark ausgeprägte Wachstumsverzögerung im Vergleich zur *MTTATB*Δ42 Linie, aber im Vergleich zum Wildtyp immer noch deutliche Unterschiede. Insbesondere in der platten- und erdbodenbasierten Phänotypisierung zeigte die C-terminal verlängerte Form des Proteins erneut einen negativen Effekt auf das vegetative Wachstum und eine Verzögerung des Erreichens der einzelnen Entwicklungsstadien (Abbildung 27A, 27B und 27C). Homozygote *MTTATB-cmyc* Pflanzen brauchten in etwa doppelt so lange, um das jeweilige Entwicklungsstadium 0.1 bis 1.04 auf Platten zu vollenden (Abbildung 27A). Homozygote Pflanzen, die auf Erde aufgezogen wurden, erreichten das jeweilige Entwicklungsstadium (Stadium 1.04 bis 6.9) im Vergleich zum Wildtyp mit einer Verzögerung von 5 – 22 Tagen (Abbildung 27B). Die Mutanten der Linie *MTTATB-cmyc* prägten außerdem einen leicht krausen Blattphänotyp aus (Abbildung 27C).



**Abbildung 27. Phänotypische Charakterisierung der MTTATB-cmyc Linie.** **A)** Plattenbasierte Wachstumsphänotypisierung der angegebenen Linien bis zu einem Zeitpunkt von 14 Tagen. Das Erreichen des jeweiligen Stadiums in Wildtyp Pflanzen wird durch Pfeile angezeigt und umfasste die Wachstumsstadien: Samenkeimung (0.1), Entstehung der Keimwurzel (0.5), Entstehung von Hypokotyl und Kotyledonen (0.7), der vollständigen Entfaltung beider Kotyledonen (1.0), der Länge von zwei Rosettenblättern > 1 mm (1.02) und der Länge von vier Rosettenblättern > 1 mm (1.04). Die Balken zeigen die Dauer an, die benötigt wurde, um das jeweilige Wachstumsstadium zu vollenden. **B)** Erdbodenbasierte Wachstumsphänotypisierung von der Samenkeimung bis zum Eintreten der Seneszenz. Pfeile geben den Zeitpunkt an, zu dem der Wildtyp das jeweilige Entwicklungsstadium erreicht hat: Länge von vier Rosettenblättern > 1 mm (1.04), der Länge von zehn Rosettenblättern > 1 mm (1.10), der Sichtbarkeit der ersten Blütenknospe (5.10), dem Öffnen der ersten Blüte (6.00) und das Stadium der vollständigen Blüte (6.90). **C)** Repräsentatives Bild von fünf Wochen alten Pflanzen aus der erdbodenbasierten Wachstumsphänotypisierung. Der Maßstab entspricht 2 cm. Abbildung entnommen aus (Schäfer et al. 2020), modifiziert.

#### 4.4.2 Fertilität der Mutanten

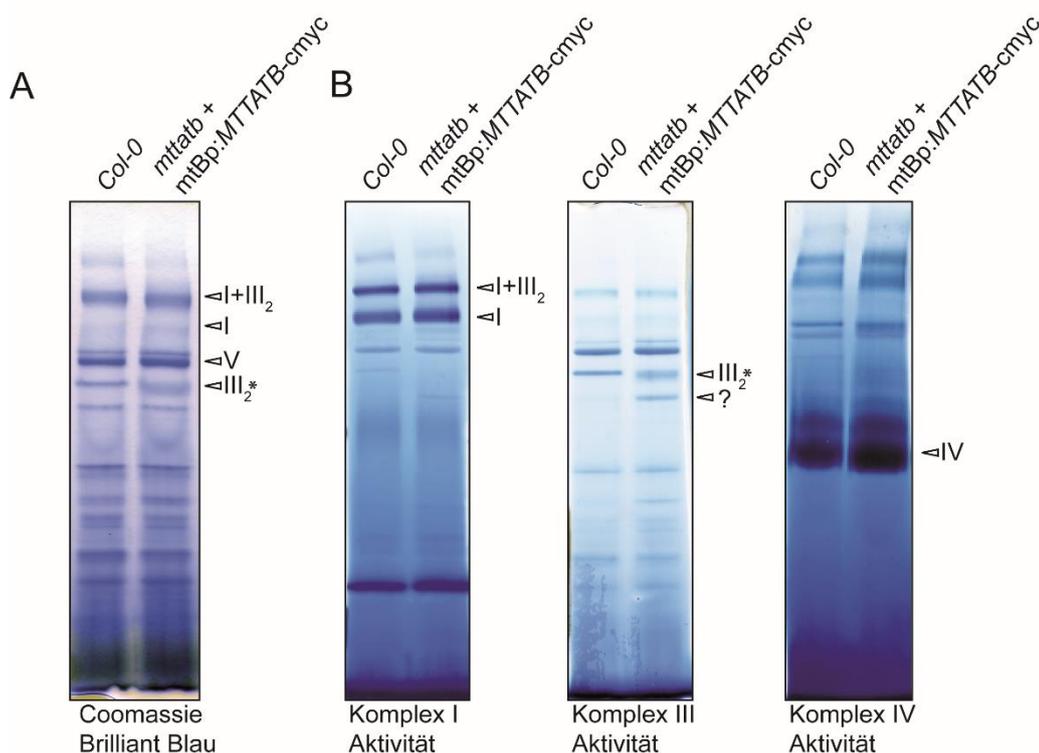
Die MTTATB-cmyc Linie zeigte nicht nur ein verbessertes Wachstum im Vergleich zur MTTATB $\Delta$ 42 Linie, sondern entwickelte auch Samen. Aufgrund dieser Beobachtung wurde die Linie auf die Fertilität der Pollen hin überprüft. Die Antheren dieser Linie waren im Vergleich zum Wildtyp deutlich kleiner. Pollen dieser Linie färbten sich durch die Alexander Färbelösung violett, was auf eine wiederhergestellte Fertilität hinwies (Abbildung 28).



**Abbildung 28. Entwicklung und Fruchtbarkeit von MTTATB-cmyc Pflanzen.** Alexander-Färbung von lebensfähigen Pollen. Lebensfähige Pollen färbten sich violett und nicht lebensfähige Pollen grün. Der Maßstab entspricht 100  $\mu$ m. Abbildung entnommen aus (Schäfer et al. 2020), modifiziert.

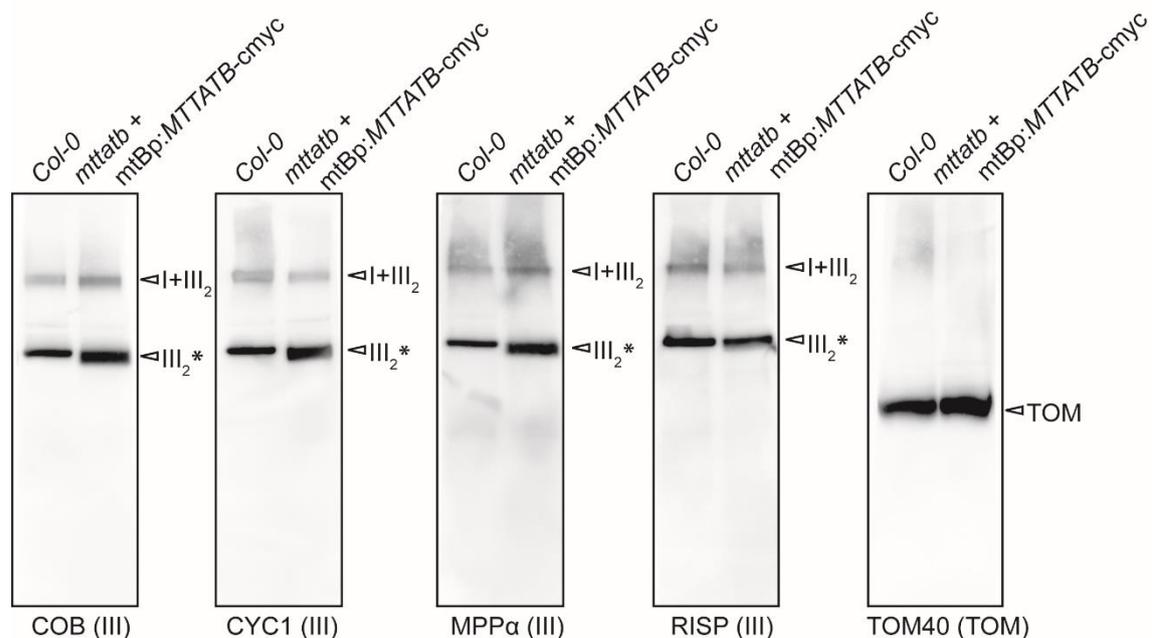
### 4.4.3 Charakterisierung des molekularen Phänotyps der MTTATB-cmyc Mutanten

Durch die Fertilität der MTTATB-cmyc Linie konnten Mitochondrien aus pflanzlichem Gewebe aufgearbeitet werden. Die Auftrennung der Mitochondrien durch BN-PAGE ergab einen äußerst ähnlichen molekularen Phänotyp im Vergleich zu MTTATB $\Delta$ 42. Die Coomassie-Färbung der BN-PAGE von Proteinkomplexen aus isolierten Mitochondrien zeigte ein sehr ähnliches Laufverhalten von Komplex III im Vergleich zu MTTATB $\Delta$ 42, während alle anderen Atmungskettenkomplexe nicht betroffen waren (Abbildung 29A). Dies wurde unter anderem durch die qualitativen Aktivitätsuntersuchungen von Komplex I, III und IV bestätigt, von denen Komplex III der einzige betroffene Komplex mit reduzierter Aktivität war, während die Aktivitäten von Komplex I und IV unverändert blieben (Abbildung 29B). Interessanterweise wurde eine weitere aktive Bande in der in-Gel Färbung der Komplex III Aktivität von MTTATB-cmyc beobachtet. Die Bande besaß ein etwas geringeres Molekulargewicht als Komplex III<sub>2</sub> und konnte in Wildtyp Mitochondrien nicht detektiert werden (Abbildung 29B).



**Abbildung 29. A)** Coomassie Brilliant Blau Färbung von Wildtyp und Mutanten Mitochondrien nach Auftrennung der Proteinkomplexe durch BN-PAGE. **B)** Qualitative In-Gel-Aktivitätsuntersuchungen für die NADH-Dehydrogenase Aktivität (Komplex I Aktivität), für die Cytochrom c Reduktase Aktivität (Aktivität des Komplexes III), und für die Cytochrom c Oxidase Aktivität (Aktivität des Komplexes IV). Abbildung entnommen aus (Schäfer et al. 2020), modifiziert.

Die immunologische Detektion einzelner Komplex III Untereinheiten nach der BN-PAGE ergaben erneut ein ungewöhnliches Laufverhalten von Komplex III. Auffallend war, dass der Großteil des RISP-Signals auf die Größe von vollständig assembliertem Komplex III beschränkt war, während die Untereinheiten COB, MPP $\alpha$  und CYC1 gleichmäßig in der verdickten Bande detektiert werden konnten (Abbildung 30). Als Ladekontrolle diente TOM40 aus dem TOM Komplex (Abbildung 30).



**Abbildung 30.** Westernblot-Analyse nach eindimensionaler BN-PAGE von Wildtyp und MTTATB-c-myc Mitochondrien mit den angegebenen Antikörpern. III<sub>2</sub> - Homodimer von Komplex III, I+III<sub>2</sub> - Superkomplex zusammengesetzt aus dimerem Komplex III und Komplex I, TOM = TOM-Komplex. Das Sternchen markiert unregelmäßiges Laufverhalten beziehungsweise veränderte Proteinhäufigkeit in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Abbildung entnommen aus (Schäfer et al. 2020), modifiziert.

Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurden dimere Komplex III Banden aus der eindimensionalen BN-PAGE ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Wie bereits in der MTTATB $\Delta$ 42 Linie zu beobachten war, zeigte kaum eine Untereinheit eine signifikante Reduktion im Vergleich zum Wildtyp auf. Statistisch signifikant reduziert waren nur die Komplex III Untereinheiten QCR10, COB und RISP. Die Abundanzen der Untereinheiten QCR6-1, QCR7-1 und QCR7-2, QCR8, QCR9, CYC1-1 und CYC1-2, MPP $\alpha$ -1 und MPP $\alpha$ -2, MPP $\beta$  und Cytochrom c (CYC-1) waren im Vergleich zum Wildtyp nicht signifikant verändert (Tabelle 2).

Nach einem Abgleich mit der massenspektrometrischen Analyse der MTTATB $\Delta$ 42 Linie wurde offensichtlich, dass QCR10 und RISP in Komplex III der MTTATB Mutanten nicht in voller Menge assembliert werden konnten.

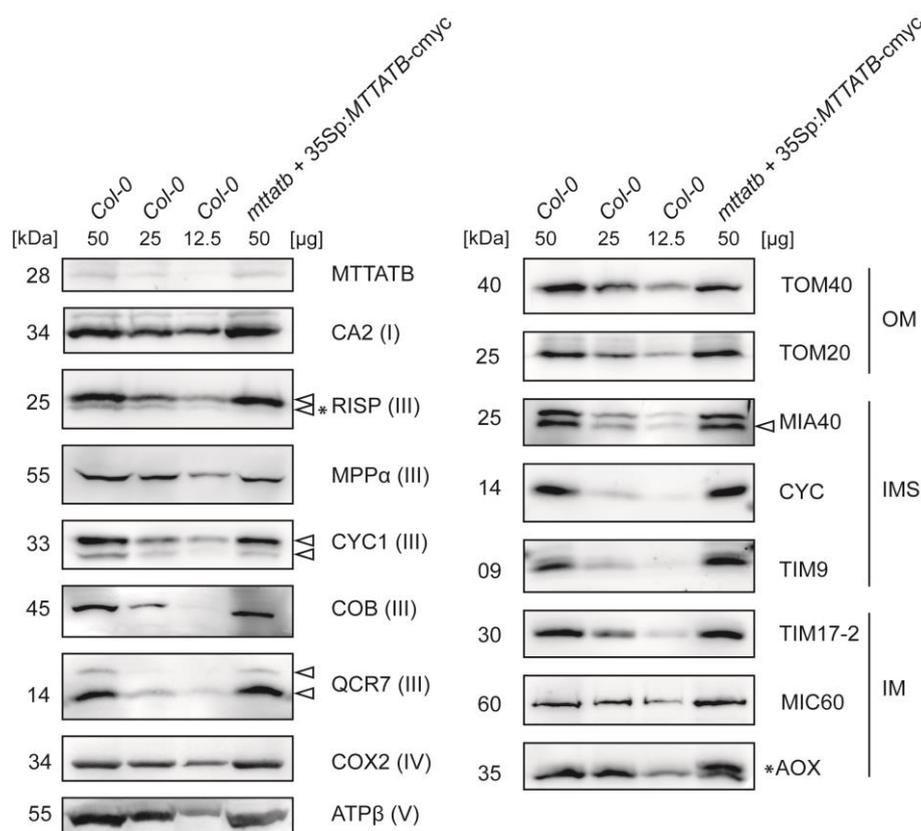
**Tabelle 2. Massenspektrometrie von Komplex III aus MTTATB-cmyc.** Isolierte Komplex III Dimere wurden massenspektrometrisch im Rahmen dieser Arbeit von Dr. Holger Eubel und Patrick Künzler analysiert. Die relativen Häufigkeiten der einzelnen Komplex III Untereinheiten wurde aus den kumulierten iBAQ-Werten aller identifizierten Komplex III Untereinheiten berechnet. Die Ergebnisse wurden durch das Verhältnis von Protein zum Komplex in MTTATB-cmyc geteilt durch *Col-0* berechnet. Grau schattierte Zellen zeigen einen p-Wert von  $\leq 0,05$  an. Hervorgehobene Zahlen geben ein Verhältnis von  $< 0,66$  an. Tabelle entnommen aus (Schäfer et al. 2020), modifiziert.

GEN	PROTEIN	MTTATB-cmyc/ <i>Col-0</i>	
		<i>T-Test</i>	<i>Verhältnis</i>
AT1G15120.1	QCR6-1	0,6734	0,77
AT1G22840.1	CYTC-1	0,3895	1,69
AT1G51980.1	MPP alpha-1	0,8612	1,01
AT2G40765.1	QCR10	<b>0,0257</b>	<b>0,42</b>
AT3G02090.1	MPP beta	0,5498	1,04
AT3G10860.1	QCR8	0,1495	1,31
AT3G16480.1	MPP alpha-2	0,7954	1,11
AT3G27240.1	CYC1-2	0,2879	1,06
AT3G52730.1	QCR9	0,7775	1,07
AT4G32470.1	QCR7-1	0,0686	1,13
AT5G13430.1	RISP	<b>0,0328</b>	<b>0,61</b>
AT5G25450.1	QCR7-2	0,5218	0,72
AT5G40810.2	CYC1-1	0,8735	0,95
ATMG00220.E	COB	<b>0,0010</b>	<b>0,65</b>

Die mitochondrialen Proteine wurden außerdem per SDS-PAGE aufgetrennt und immunologisch visualisiert. MTTATB wurde im Vergleich zum Wildtyp in der MTTATB-cmyc Mutante in äquivalenten Mengen detektiert, was auf die Funktionalität des nativen Promotors schließen lässt. Um einen Überblick über veränderte Proteinabundanz in den Mitochondrien dieser Mutante zu gewinnen, wurden die Untereinheiten CA2 (Komplex I), MPP $\alpha$  (Komplex III), CYC1 (Komplex III), RISP (Komplex III), COB (Komplex III), QCR7 (Komplex III), COX2 (Komplex IV) und ATP $\beta$  (ATP Synthase) immunologisch visualisiert (Abbildung 31). Außerdem wurden die Proteinmengen der OM Proteine TOM20 und TOM40, der IMS Proteine MIA40, CYC und TIM9 sowie die IM Proteine TIM17-2, MIC60 und AOX überprüft (Abbildung 31).

Die Westernblot-Analyse ergab, dass nur die Abundanz von RISP reduziert war und die untere Bande fast vollständig fehlte. Des Weiteren wurde eine leicht erhöhte Abundanz von AOX in der MTTATB-cmyc Linie festgestellt (Abbildung 31). Alle anderen Proteinmengen waren wie in MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien nicht signifikant verändert (Abbildung 31).

Zusammenfassend ließ sich zum einen schlussfolgern, dass die Komplex III Biogenese in späten Stadium in den Mitochondrien beider Linien arretierte und zum anderen, dass der ausschlaggebende Grund dafür die verzögerte Assemblierung der RISP Untereinheit war. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen in jedem Fall eine Assoziation von RISP mit Komplex III in beiden Mutanten, aber eine verringerte Aktivität des Komplex III Dimers. Daher wird vermutet, dass in den partiell komplementierten Mutanten eine funktionelle Störung besteht, die mit der Assemblierung der RISP Untereinheit in Komplex III zusammenhängt. Ferner ist es wahrscheinlich, dass die Translokation des gefalteten C-Terminus von RISP nicht vollständig durch Veränderungen im MTTATB Protein durchgeführt werden kann, was zum Auftreten der progressiven Phänotypen der MTTATB $\Delta$ 42 und MTTATB-cmyc Mutanten führte.



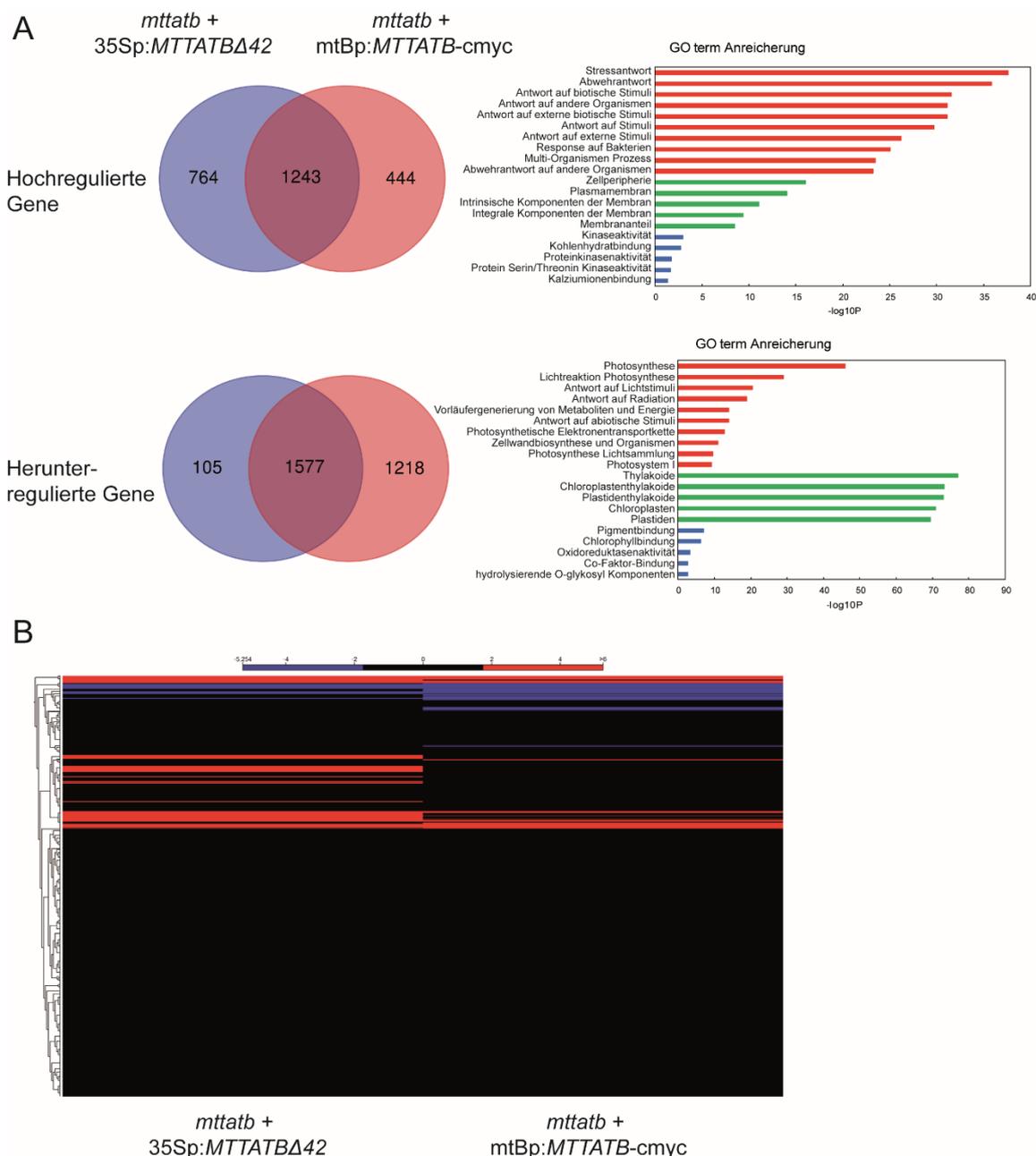
**Abbildung 31.** Repräsentative Immunoblotanalyse von Proteinen des Komplexes I, III, IV, und V, äußerer Membran-, IMS- und innerer Membranproteine. 50  $\mu$ g wurden in jeder Spur geladen. Das Molekulargewicht wird in kDa auf der linken Seite des Immunoblots angegeben. Das Sternchen auf der rechten Seite kennzeichnet im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Proteinmenge. Abbildung entnommen aus (Schäfer et al. 2020), modifiziert.

## 4.5 Transkriptom Analyse von MTTATB $\Delta$ 42 und MTTATB-cmyc Mutanten im Vergleich zu *Col-0*

Die quantitative Phänotypisierung der MTTATB $\Delta$ 42 und MTTATB-cmyc Mutanten zeigte, dass beide Linien aufgrund einer Verzögerung in der Komplex III Biogenese viel langsamer wuchsen als der Wildtyp. Um ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden molekularen Veränderungen sowohl in der MTTATB $\Delta$ 42 als auch der MTTATB-cmyc Mutantenlinie zu erhalten, wurden die Transkriptome sowohl der Mutantenlinien, als auch die der Wildtyp-Pflanzen mittels RNA-Sequenzierung (RNA-seq) analysiert (Abbildung 32). Unter Verwendung eines Ausschnitts der log<sub>2</sub>-fachen Veränderung > 1 mit einem angepassten p-Wert von  $\leq 0,05$  im Vergleich zum Wildtyp, enthielten die MTTATB $\Delta$ 42 Pflanzen 4042 differentiell exprimierte Gene (DEGS) und die MTTATB-cmyc-Pflanzen 4482 DEGS. Der Vergleich dieser beiden Linien zeigte, dass beide mutierten Linien die gleichen 1243 Gene hochregulierten und die gleichen 1577 Gene herunterregulierten (Abbildung 32A). Des Weiteren wurde eine *gene ontology* (GO)-Term-Anreicherungsanalyse an den überlappenden DEGS beider Linien durchgeführt, um herauszufinden, in welche Stoffwechselforgänge und regulatorische Prozesse diese Gene involviert waren. Die hochregulierten Gene sind hauptsächlich in stress-reaktiven Gengruppierungen angereichert. Die auffallendsten GO-Term Anreicherungen waren in der Reaktion auf Stress, in der Abwehrreaktion und in der Stressantwort auf andere Organismen (Abbildung 32A). Die herunterregulierten Gene waren in beiden Linien hauptsächlich in photosynthetischen Vorgängen gruppiert (Abbildung 32A).

Interessanterweise wurde weder in den hoch- noch in den herunterregulierten Transkripten eine Anreicherung an Genen, die für mitochondriale Proteine kodieren, beobachtet. Daher wurden circa 1000 bekannte Gene, die für mitochondriale Proteine kodieren, aus (Chrobok et al. 2016) entnommen, hierarchisch geclustert und die Hoch- (rot) beziehungsweise Herunterregulation (blau) der Genexpression als Heatmap veranschaulicht (Abbildung 32B). Die überwiegende Mehrheit der Gene der beiden Mutantenlinien, die für mitochondriale Proteine kodieren, zeigten keine signifikant abweichende Expression (schwarz) gegenüber dem Wildtyp. Die geringe Anzahl hochregulierter Gene repräsentierte hauptsächlich bekannte mitochondriale Gene, die in die Stressantwort involviert sind, einschließlich der alternativen Oxidase (AOX) und der alternativen NAD(P)H-Dehydrogenase B2 (NDB2). Die geringe Anzahl an herunterregulierten Genen kodieren Proteine, die an der Photorespiration beteiligt sind und höchstwahrscheinlich in Zusammenhang mit der Herunterregulierung photosynthetischer Prozesse stehen. Ferner war die Genexpression des Chloroplasten- beziehungsweise Photosynthese-Transkriptoms stärker betroffen als das Transkriptom der Mitochondrien. Schlussendlich konnte keine signifikante Veränderung

von RISP in den Mutantenlinien beobachtet werden. Auch die Identifizierung weiterer TAT Substrate blieb durch die geringe und selten signifikante Veränderung des mitochondrialen Transkriptoms aus.



**Abbildung 32. Transkriptomvergleich zwischen Wildtyp-, MTTATB-cmyc- und MTTATBΔ42 Pflanzen.** Angefertigt im Rahmen dieser Arbeit mit der Hilfe von Dr. Christopher Carrie. **A)** Venn-Diagramme von signifikant unterschiedlich exprimierten Genen in MTTATB-cmyc und MTTATBΔ42 Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp. GO-Term Anreicherung der differentiell exprimierten Gene, die in beiden Mutantenlinien beeinträchtigt sind. Die Top 10 der GO-Term Analyse von biologischen Prozessen sind in rot dargestellt. Die Top 5 der GO-Term Analyse von zellulären Kompartimenten sind in grün dargestellt. Die Top 5 der GO-Term Analyse im Rahmen der molekularen Funktionen sind in blau dargestellt. **B)** Heatmap nach hierarchischer Clustering von Genen, die für mitochondriale Proteine kodieren, in MTTATB-cmyc und MTTATBΔ42 Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp. Schwarz = nicht signifikant unterschiedlich, Blau = signifikant herunterreguliert. Rot = signifikant hochreguliert.

## 5 Diskussion

### 5.1 Pflanzenmitochondrien besitzen einen funktionsfähigen TAT Weg zur Insertion der RISP Untereinheit in Komplex III

Die mitochondriale TAT Translokation für die Assemblierung der RISP Untereinheit in Komplex III der Pflanzenmitochondrien konnte bislang nicht experimentell nachgewiesen werden und bestand nur als Theorie (Hinsley et al. 2001; Pett and Lavrov 2013).

Durch diverse Ansätze der funktionellen Komplementierung der *mttatb* Linie wurden in dieser Arbeit durch eine Veränderung bzw. Deletion von Teilen des MTTATB C-Terminus drastische Wachstumsverzögerungen verursacht, die mit einer stagnierten Komplex III Biogenese assoziiert waren. Durch die Kombination aus immunologischen Verfahren und Massenspektrometrie konnte gezeigt werden, dass der Phänotyp höchstwahrscheinlich auf eine ineffiziente Translokation von RISP, insbesondere des gefalteten C-Terminus der RISP Untereinheit von der Matrix- zur IMS-Seite der Membran, zurückzuführen war. Ferner wurde durch die Analyse der Topologie der RISP Untereinheit in Mitochondrien von MTTATB $\Delta$ 42 die Theorie aufgestellt, dass die Assemblierung in einem der letzten Schritte der Komplex III Biogenese stattfindet und die Translokation des gefalteten C-Terminus durch die Membran größtenteils stagnierte. Demnach würde der C-Terminus von RISP zu großen Teilen nicht vollständig durch die Membran transloziert werden und innerhalb der Membran feststecken, was zu einem zwar assemblierten Komplex III Dimer, aber zu einer eingeschränkten Funktion bis hin zum Funktionsverlust führen kann.

Der Ablauf der Komplex III Biogenese wurde in Mitochondrien aus Hefe und Mensch ausführlich untersucht (Ndi et al. 2018). In Pflanzenmitochondrien gibt es bislang keine Studien zum Ablauf der Komplex III Assemblierung, jedoch wird angenommen, dass die Schritte weitestgehend konserviert sind (Meyer et al. 2019). Komplex III besteht aus 10 Untereinheiten, von denen drei Untereinheiten Co-Faktoren besitzen, die essentiell für den Elektronentransfer während der OXPHOS sind, darunter zwei Cytochrome (Cytochrom c1 und Cytochrom b) und ein Rieske-2Fe-2S-Protein (Meyer et al. 2019; Ndi et al. 2018).

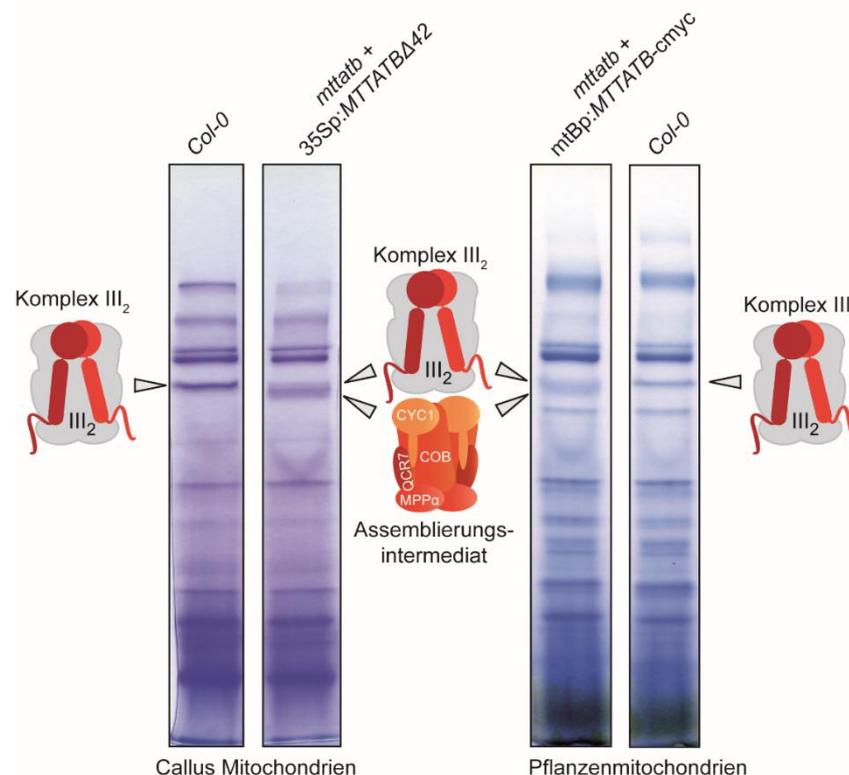
Die Reihenfolge, in der die zehn einzelnen Untereinheiten zu Komplex III assembliert werden, läuft vermutlich in Hefe, Säugern und Pflanzen gleich ab. Zunächst wird in der Komplex III Biogenese die mitochondrial-kodierte Untereinheit Cytochrom b (COB) co-translational in die Membran inseriert. Unmittelbar nach der Translation binden die Assemblierungsfaktoren Cbp3 und Cbp6 (*Cytochrom B mRNA Processing 3 und 6*) an COB und bilden das erste Assemblierungsintermediat in der IM (Gruschke et al. 2011). Als nächstes wird Häm b in die bL-Stelle in COB aufgenommen, was die Rekrutierung von Cbp4 (*Cytochrom B mRNA Processing 4*) auslöst. Cbp4 dient der Stabilisierung des Häms und bildet mit COB, Cbp3 und Cbp6 das Intermediat I (Hildenbeutel et al. 2014).

Anschließend wird das zweite Häm b in die bH-Stelle von COB eingefügt. Cbp3 und Cbp6 werden freigesetzt und QCR7 und QCR8 rekrutiert (Hildenbeutel et al. 2014). Es entsteht das Intermediat II (Meyer et al. 2019). Nach der Freisetzung von Cbp4 werden in einer derzeit undefinierten Reihenfolge die Untereinheiten Qcr6, Cytochrom c1, Core 1 und Core 2 assembliert (Gruschke et al. 2011). In dieser Phase der Komplex III Biogenese dimerisiert der Komplex und resultiert in der Formation des Intermediats III (Zara et al. 2009). Die Assemblierung von Cytochrom c1 (Cytc1) erfolgt über den Cytochrom *c maturation pathway* (ccm) von der IMS Seite. Homolog zu Core 1 und Core 2 in Hefe und Säugern besitzen Pflanzenmitochondrien die Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungspeptidase MPP $\alpha$  und MPP $\beta$ . Demnach führen die Untereinheiten der MPP in Pflanzenmitochondrien nicht nur die Prozessierung abspaltbarer Signalpeptide in der Matrix durch, sondern beteiligen sich auch als Untereinheiten von Komplex III der Atmungskette. In den letzten Schritten der Assemblierung werden die Untereinheiten QCR9, QCR10 und RISP in den Komplex integriert. Die RISP-Untereinheit wird in Säugern und Hefe durch BCS1 transloziert, um das mature Komplex Dimer zu bilden (Wagener et al. 2011). Über den genauen Ablauf der Assemblierung der Untereinheiten QCR10 und RISP wird jedoch noch diskutiert (Conte et al. 2015; Meyer et al. 2019; Ndi et al. 2018).

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit wurde dargelegt, dass in Pflanzenmitochondrien die Dimerisierung von Komplex III während seiner Biogenese, wie in Hefe und Säugern, vor der Assemblierung der Untereinheiten RISP und QCR10 stattfindet (Abbildung 17, Tabelle 1 und 2). Somit konnte auch erklärt werden, dass in beiden Mutantenlinien in der BN-PAGE Analyse neben vollständig assemblierten Komplex III Dimeren auch dimerisierte Assemblierungsintermediate mit einem geringeren Molekulargewicht zu beobachten waren (Abbildung 33). Im Vergleich zur Komplex III Biogenese von Säugern und Hefe wäre dies analog zum Intermediat III (Ndi et al. 2018). Solche Intermediate konnten ebenfalls in Hefe durch die Deletion von entweder BCS1 oder RISP verzeichnet werden (Zara et al. 2009). Ähnlich wie auch in Hefe Mitochondrien konnte hier gezeigt werden, dass die Untereinheit QCR10 höchstwahrscheinlich entweder gleichzeitig mit RISP oder unmittelbar nach der RISP-Assemblierung stattfindet (Zara et al. 2009).

Die schwache Interaktion zwischen RISP und überexprimiertem MTTATB bzw. MTTATB $\Delta$ 42 war ein zusätzlicher Hinweis darauf, dass RISP tatsächlich das Substrat des TAT Wegs in Pflanzenmitochondrien ist. Diese Hypothese wird zudem dadurch unterstützt, dass die Mutation des TAT Targetingsignals von RISP aus *A. thaliana* dazu führte, dass die Untereinheit zwar in die mitochondriale Matrix importiert wurde, jedoch nicht in Komplex III assembliert werden konnte (Carrie et al. 2016). Damit ähnelt der Mechanismus der Assemblierung der RISP Untereinheit von Komplex III durch TAT in Pflanzenmitochondrien

mehr der chloroplastidären oder prokaryotischen Translokation von Rieske-Eisen-Schwefel-Proteinen durch TAT statt dem analogen Translokationsprozess durch BCS1 in Mitochondrien von Hefe und Säugern.



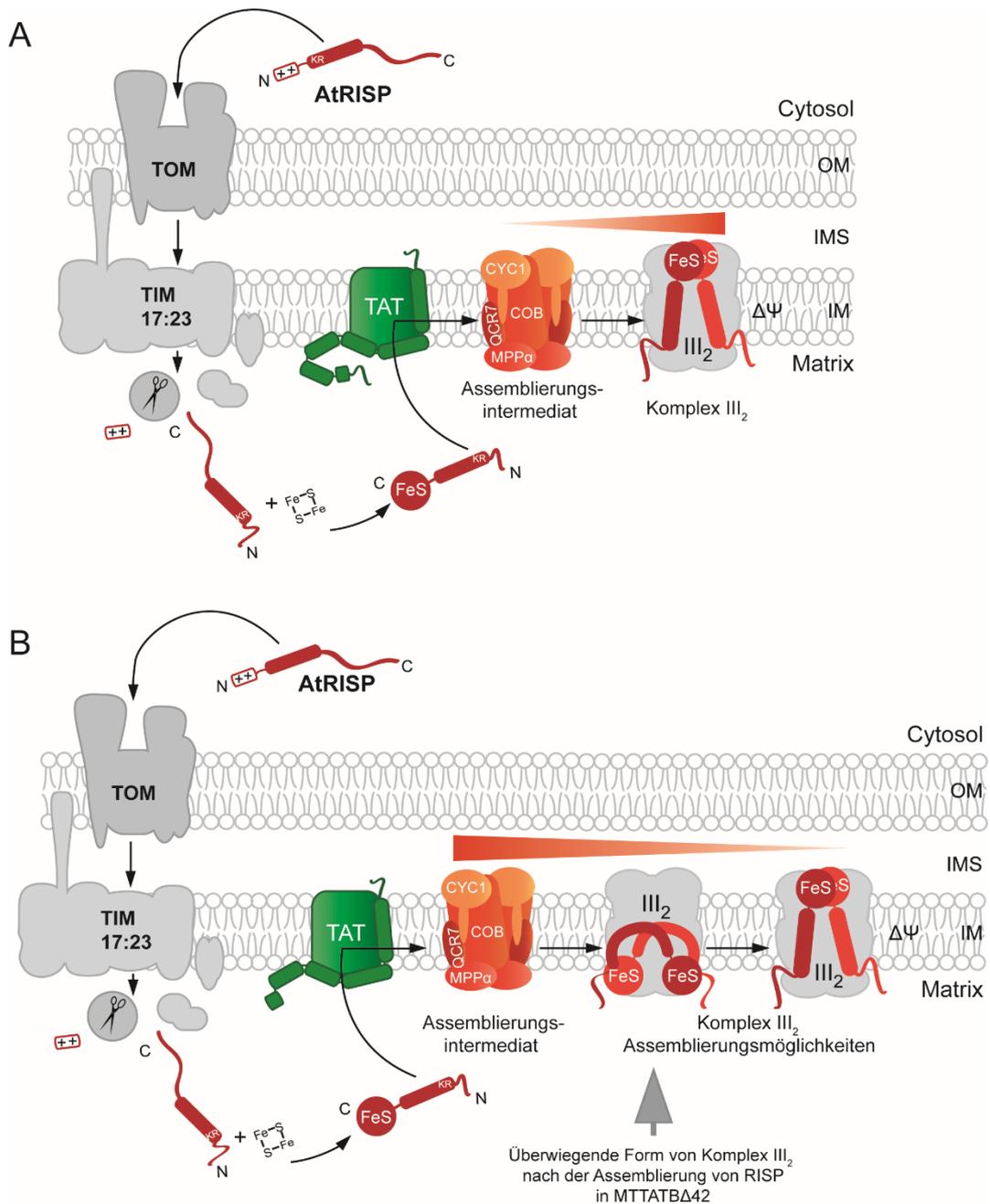
**Abbildung 33. Indikation der visualisierten Komplex III Dimere aus der BN-PAGE von MTTATB $\Delta$ 42 und MTTATB-cmyc Mitochondrien im Vergleich zum Wildtyp.** Während in Wildtyp nur voll-assemblierte Komplex III Dimere zu verzeichnen waren, konnten in beiden Mutantenlinien die vollständige Assemblierung und zusätzlich noch Assemblierungsintermediate nach der Dimerisierung festgestellt werden. In den Mutanten wurde die RISP Untereinheit nicht vollständig assembliert, während alle Schritte vor der RISP-Assemblierung noch stattfinden konnten.

Durch die Ergebnisse der Analyse der Orientierung und Topologie von RISP in MTTATB $\Delta$ 42 Mitochondrien konnte zum einen gezeigt werden, dass der C-Terminus in der Mutante den FeS Cluster enthält und gefaltet ist. Zum anderen wurde gezeigt, dass eine korrekte Faltung zur effektiven Translokation notwendig ist (Abbildung 24 und 25). Auch in Hefe Mitochondrien benötigt die Translokation der RISP Untereinheit einen partiell gefalteten C-Terminus für die Assemblierung (Wagener et al. 2011). Des Weiteren wird aufgrund einer auf immunologischer Ebene nicht unterscheidbaren Topologie der RISP Untereinheit in Wildtyp und Mutante angenommen, dass RISP in die Membran inseriert und mit dem dimeren Komplex III Intermediat assoziiert ist, aber der gepackte C-Terminus zu großen Teilen nicht vollständig durch die IM transloziert werden kann (Abbildung 34). RISP steckt daher wahrscheinlich zu großen Teilen in einer Haarnadelformation im letzten Intermediat von Komplex III fest (Abbildung 34B). Das Assemblierungsintermediat kommt dadurch zu Stande, dass durch die Veränderung des MTTATB C-Terminus eine labile TAT Translokation

verursacht wurde. Während der N-Terminus von RISP noch normal in die Membran inseriert werden kann, ist die Translokation des gefalteten C-Terminus nicht vollständig bzw. zu großen Teilen nicht mehr möglich. Die Vermutung liegt nahe, dass die Translokationspore der TAT-Maschinerie durch die Veränderung im MTTATB C-Terminus einen kritischen Durchmesser besitzt, der die Translokation des RISP C-Terminus von der Matrix durch die IM auf die IMS-Seite nur bedingt zulässt. Dies hat wiederum zur Folge, dass RISP zwar in die Membran inseriert wird, aber nach der Assemblierung zu großen Teilen in einer nicht funktionsfähigen Orientierung im Komplex III-Dimer besteht. Dennoch ist die Translokation von RISP nicht vollständig stagniert und Komplex III kann in geringen Mengen vollständig und funktionsfähig assembliert werden (Abbildung 34B). Diese Art von Haarnadelkonformation konnte bereits in Bakterien während der Translokation von TAT-Substraten nachgewiesen werden (Hamsanathan et al. 2017).

MTTATB enthält einen um circa 60 AA längeren, pflanzen-spezifischen C-Terminus, der für die Funktion des Proteins essentiell ist. Diese Sequenz ist in MTTATB-ähnlichen Proteinen von höheren Pflanzen hoch konserviert und umfasst laut Vorhersageprogramm zwei weitere  $\alpha$ -Helices (Abbildung 6 und 7). Durch das Fehlen der letzten 42 Aminosäuren in MTTATB $\Delta$ 42 besaßen die Mutanten noch eine gewisse Funktionalität, durch die die RISP-Untereinheit noch gebunden werden konnte. Daher ist es unwahrscheinlich, dass der pflanzen-spezifische C-Terminus für die Substratbindung zuständig ist, sondern eher eine Rolle während der Translokation spielt. Damit unterscheidet sich MTTATB maßgeblich von EcTatB, da die letzten 70 Aminosäuren vom C-Terminus für dessen Funktionalität verzichtbar sind (Lee et al. 2002).

Eine außergewöhnliche Beobachtung war die Anreicherung an Cristae-Strukturen in MTTATB $\Delta$ 42-Mitochondrien. Bisher wurde in Mutantenlinien, die in der OXPHOS beeinträchtigt waren, eine Abnahme der Cristae-Strukturen durch TEM beobachtet (Cohen et al. 2014; Keren et al. 2012; Rigas et al. 2009; Zmudjak et al. 2013). Hauptsächlich handelte es sich aber hierbei um Mutanten von Komplex I und nicht Komplex III. Die Zunahme der Cristae-Strukturen in den Mutanten obliegt daher nicht unbedingt der defekten Aktivität der Atmungskette, sondern könnte auch durch die Fehltranslokation von RISP verursacht werden. Diese Theorie wird durch eine Assoziation von RISP mit einem als mitochondrialer Transmembran-Lipoproteinkomplex (MTL) bezeichnetem Multiproteinkomplex unterstützt, der in pflanzlichen Mitochondrien identifiziert werden konnte (Michaud et al. 2016).



**Abbildung 34. Modell des RISP Imports und dessen Insertion in die IM in Wildtyp und MTTATBΔ42 Mitochondrien. A)** Situation im Wildtyp. RISP ist im Zellkern kodiert, wird im Cytosol synthetisiert und post-translational durch OM und IM der Mitochondrien importiert. Nach Erreichen der Matrix wird der 2Fe-2S-Cluster (FeS) in den C-Terminus eingefügt. Die TMH von RISP wird dann in die IM freigesetzt und der gefaltete C-Terminus durch die Membran durch TAT zur IMS-Seite zurücktransportiert. **B)** In den MTTATBΔ42 Mitochondrien wird RISP gefaltet und in die IM eingefügt. Die Mehrheit der RISP Untereinheit weist jedoch eine Orientierung von N- und C-Terminus gegenüber der Matrix auf, was zu einer reduzierten Menge und Aktivität von vollständig assemblierten Komplex III und zur Anhäufung des letzten Assemblierungsintermediates führt. Die Dreiecke über den Möglichkeiten der Assemblierung von Komplex III deuten das ungefähre Verhältnis der Komplex III Intermediate und voll assemblierten Komplex III an, die in Wildtyp (A) bzw. MTTATBΔ42 Mitochondrien (B) vorhanden sind. Abbildung entnommen aus (Schäfer et al. 2020), modifiziert.

Dieser Komplex besteht aus mehreren Proteinen, darunter Untereinheiten aus dem TOM Komplex und AtMIC60, einer Untereinheit des MICOS Komplexes (Michaud et al. 2016). Der MICOS Komplex ist zur Formation und Organisation der Cristae notwendig (Harner et al. 2016). Die Proteinexpression von AtMIC60 war aber in Mitochondrien aus MTTATB $\Delta$ 42 nicht verändert (MIC60, Abbildung 16C). RISP könnte daher ein Bestandteil beider Komplexe – Komplex III und MTL Komplex – sein und vermag durch das Verhältnis der Assoziation des Proteins mit den Komplexen den Lipidtransfer in der Cristae-Biogenese zu stimulieren. Durch die Fehlassemblierung von RISP in Komplex III der Mutante könnte ein größerer Teil durch einen bislang unbekanntem Mechanismus mit MIC60 assoziieren und den Lipidtransfer sowie die Cristae-Formation der IM beeinflussen. Falls dies der Fall ist, würde RISP eine weitaus größere Rolle in der Biogenese der IM in Pflanzenmitochondrien spielen.

## 5.2 Das MTTATBC System der Pflanzen – ein TAT System ohne TatA?

Durch die ungewöhnliche Zusammensetzung der Komponenten des pflanzlichen TAT Systems ist es unklar, wie es konkret funktioniert. Normalerweise besteht ein TAT System aus TatA, TatB und TatC. Während TatB und TatC einen Präkomplex ausbilden, besitzt TatA die Fähigkeit zu oligomerisieren. Neben dem klassischen TAT Weg wurde zudem ein minimaler TAT Weg aus nur den Untereinheiten TatA und TatC beschrieben, in dem TatA die Rolle von TatA und TatB übernehmen kann (Barnett et al. 2008). Ob auch eine Anordnung von nur TatB und TatC tatsächlich funktional sein kann, war bisher fragwürdig, da sich TatB und TatA zwar strukturell ähnlich sind, aber unterschiedliche Funktionen im Translokationsprozess übernehmen wenn alle drei Untereinheiten von TAT gegeben sind (Petru et al. 2018).

Weder im nukleären noch im mitochondrialen Genom konnte bisher eine mögliche TatA Untereinheit identifiziert werden (Carrie et al. 2016). Die TatA Untereinheit aus Chloroplasten wird auch nicht dual in Chloroplasten und Mitochondrien importiert (Carrie et al. 2016). Es kann trotzdem nicht eindeutig ausgeschlossen werden, dass ein mitochondriales TatA dennoch existiert.

MTTATB aus *A. thaliana* ist, sowohl unter Verwendung der Phylogenetik als auch der Strukturmodellierung, eindeutig enger mit TatB-Proteinen als mit TatA-Proteinen verwandt. Dennoch könnte MTTATB ein stark divergentes TatA-ähnliches Protein sein. Dies wäre auch eine Erklärung für die kritische Rolle des Pflanzen-spezifischen C-Terminus von MTTATB. Der Pflanzen-spezifische C-Terminus könnte überdies die Notwendigkeit eines

unabhängigen TatA-Proteins ersetzen. Die Deletion des gesamten C-Terminus führt zu einem nicht funktionsfähigen Protein, was im Gegensatz zu dem steht, was über andere TatB Proteine aus Bakterien und Chloroplasten bekannt ist, da der C-Terminus für deren Funktion entbehrlich ist (Lee et al. 2002). Eine ähnlich lange TatB Sequenz (198 AA Länge) wurde zudem kürzlich im nukleären Genom des Jakobiden *Andalucia godoyi* identifiziert (Gray et al. 2020).

Da das verkürzte MTTATB $\Delta$ 42 Protein mit RISP interagieren kann, ist es wahrscheinlich, dass der konservierte C-Terminus an der Translokation beteiligt ist. Die zwei zusätzlichen, putativen  $\alpha$ -Helices könnten in der Lage sein zu oligomerisieren und eine kanalähnliche Struktur für die Translokation bereitzustellen. Es liegt daher sehr nahe, dass das mitochondriale TAT System nur aus den zwei Komponenten TatB und TatC besteht und damit eine neue Modifikation der Twin Arginin Translokation darstellt.

### 5.3 Evolutionärer Kontext

Alle Mitochondrien stammen durch ein endosymbiotisches Ereignis von einem gemeinsamen  $\alpha$ -proteobakteriellen Vorfahren ab (Gray et al. 1999). Während der Transformation des Endosymbionten in ein Organell wurde ein Großteil der Gene in das Genom des Wirts übertragen. Mit einer handvoll Ausnahmen sind die Proteine der Mitochondrien demnach im Nukleus kodiert, müssen im Cytosol translatiert und in das Organell reimportiert werden (Alcock et al. 2010). Manche Proteintranslokationskomplexe für den Proteinimport und -export konnten vom ursprünglichen bakteriellen Endosymbionten nahezu übernommen werden, dennoch entwickelten Mitochondrien in einigen Fällen auch neue Translokationsmechanismen (Dolezal et al. 2006).

In heutigen Mitochondrien sind die meisten Translokationswege konserviert. Dennoch gibt es feine Unterschiede in der Zusammensetzung der Multiproteinkomplexe und dem Ablauf der einzelnen Mechanismen.

Ein repräsentatives Beispiel ist das lückenhafte Auftreten von unterschiedlichen Komponenten des TAT Systems im Laufe der Evolution.

Untereinheiten des TAT Wegs sind auf den mitochondrialen Genomen von Jakobiden bis hin zu Pflanzen kodiert, kommen aber in Mitochondrien der meisten opisthokonten Organismen nicht vor, mit Ausnahme von *Monosiga brevicollis* (einem Choanoflagellaten) und in homoscleromorphen Schwämmen (Oscarellidae) (Burger et al. 2003; Burger et al. 2013; Carrie et al. 2016; Wang and Lavrov 2007). Die breite evolutionäre Verteilung der TAT Untereinheiten deutet auf eine funktionelle Relevanz hin, die für eine bestimmte Aufgabe erhalten wurde, aber in manchen Organismen durch andere Prozesse ersetzt wird.

Die mitochondrialen TAT Systeme können in drei unterschiedlichen Kombinationen auftreten: TatAC, TatBC und nur TatC (Petru et al. 2018). Die Funktionsfähigkeit der TAT Systeme in Mitochondrien der Eukaryoten wird kontrovers diskutiert, da z.B. TatC alleine keine Translokation durchführen könnte. Petru et al. (2018) kamen in ihrer jüngsten Arbeit zu dem Schluss, dass die Funktion des gefalteten Proteintransports durch TAT in Bakterien und Chloroplasten möglicherweise nicht die Funktion von mitochondrialen TAT in derzeitigen Mitochondrien widerspiegelt (Petru et al. 2018). Im Jakobiden *A. godoyi* wurde außerdem beobachtet, dass dessen Kombination aus den mitochondrial kodierten Untereinheiten TatA und TatC das TAT System von *E. coli* partiell komplementieren konnte. Damit war gezeigt, dass der minimale TAT Weg in Mitochondrien dennoch funktionell sein könnte (Petru et al. 2018). Neueste Studien identifizierten in *A. godoyi* außerdem die nukleär-kodierte Untereinheit TatB, die in Petru et al. (2018) noch nicht berücksichtigt werden konnte. Hierdurch wurden zum ersten Mal alle drei TAT Untereinheiten in einer jakobiden Spezies detektiert. Darüber hinaus wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Twin Arginin Translokationsweg im Eukaryoten Andalusia höchstwahrscheinlich funktionell ist (Gray et al. 2020).

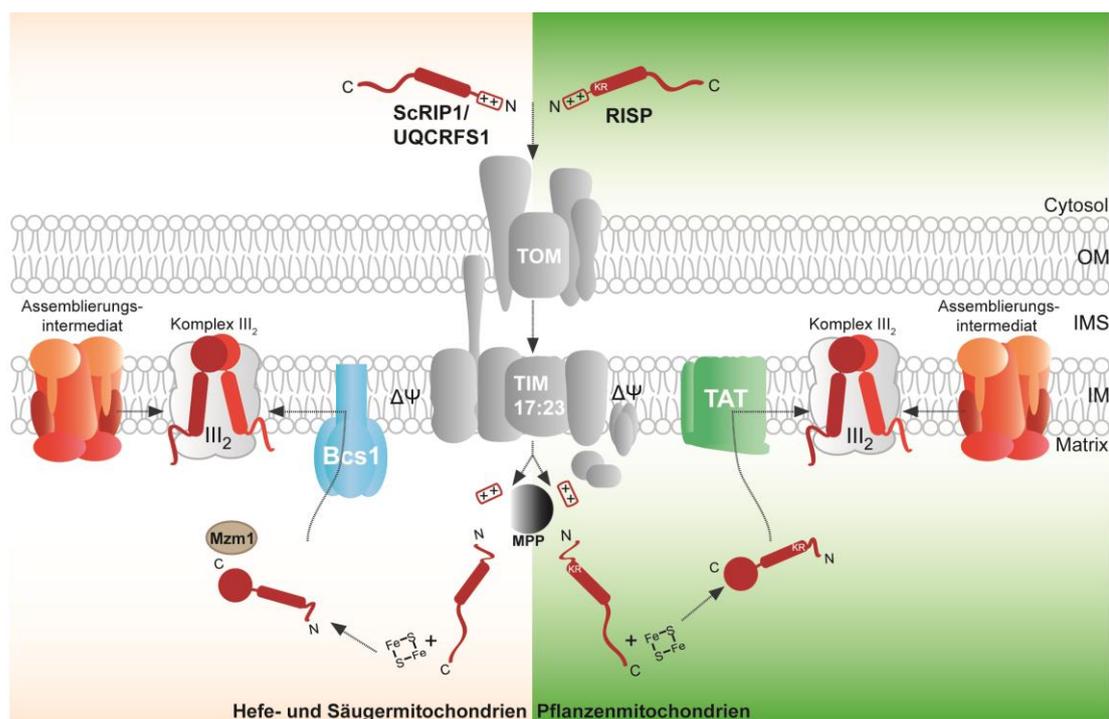
In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der mitochondriale TAT Weg von *A. thaliana* in die Translokation der gefalteten RISP Untereinheit von Komplex III involviert ist. Damit wird die Hypothese von Petru et al. (2018) widerlegt, da die Translokation von gefalteten Rieske Proteinen in Bakterien und Plastiden exklusiv von TAT übernommen wird (De Buck et al. 2007; Hopkins et al. 2014; Molik et al. 2001).

Eine genauere Untersuchung der Komplex III Biogenese in Mitochondrien deutete ferner darauf hin, dass in Pflanzen der Ablauf der Assemblierung ähnlicher zu Bakterien als zu Mitochondrien aus Hefe und Säugern zu sein scheint. Die Mitochondrien der Pflanzen behelfen sich mit Assemblierungsfaktoren, die vermutlich von einem prokaryotischen Vorfahren vererbt wurden. Dies umfasst das TAT System zur RISP Translokation und die Typ I Sekretion der Ausreifung von Cytochrom c1 (Meyer et al. 2019). In Mitochondrien von Hefe und Säugern sind die analogen Prozesse die RISP Assemblierung durch die AAA-ATPase BCS1 und das Häm-Lyase Sekretionssystem Typ III zur Ausreifung der Cyt c1 Untereinheit in Komplex III (Meyer et al. 2019; Wagener et al. 2011). Dennoch scheint die Reihenfolge der Zusammensetzung der Untereinheiten in Pflanzen, Hefe und Säugern identisch zu sein (Meyer et al. 2019; diese Arbeit). Die pflanzlichen Mitochondrien befinden sich dadurch evolutionär gesehen in einer interessanten Position, da sie bakterielle Assemblierungsfaktoren nutzen, um die eukaryotischen Untereinheiten von Komplex III zusammenzusetzen.

Überdies ist auch der Ablauf der Assemblierung von Untereinheiten in Komplex I von Pflanzen zu der Assemblierung in Bakterien ähnlicher, als zur Assemblierung von Komplex I

in Mitochondrien aus Hefe und Säugetieren (Giege et al. 2008; Ligas et al. 2019). Das Disulfidbrücken-Redox-System MIA40/ERV1 für die oxidative Faltung von IMS Proteinen scheint in Pflanzen ebenfalls eine ältere Form zu sein als die, die bei Säugetier- und Hefe Mitochondrien vorliegt (Carrie et al. 2010a; Carrie and Soll 2017). Dies deutet darauf hin, dass die Evolution der pflanzlichen Mitochondrien in gewissen Punkten anders verlief und dass die Mitochondrien höherer Pflanzen in bestimmten Aspekten den bakteriellen Vorfahren ähnlicher sind.

Dass RISP das Substrat für den mitochondrialen TAT-Signalweg in höheren Pflanzen ist, deutet auf eine interessante Wende des Assemblierungsprozesses in der Evolution der Mitochondrien hin. Der mitochondriale TAT-Signalweg ging schätzungsweise im Laufe der Evolution der Eukaryoten 21 Mal verloren und wurde entweder durch den BCS1-Signalweg oder durch einen anderen unbekanntem Mechanismus ersetzt (Petru et al. 2018) (Abbildung 35). *Chlamydomonas reinhardtii* scheint wiederum weder einen BCS1 noch einen mitochondrialen TAT-Translokationsweg zu besitzen. Demnach wird bislang vermutet, dass das chlorplastidäre TAT System durch *dual-targeting* auch in Mitochondrien vorhanden ist und dort die gefaltete Proteintranslokation übernehmen kann (Carrie et al. 2016).



**Abbildung 35. Modell des RISP Imports und dessen Translokation in Hefe-/Säugetiermitochondrien im Vergleich zu Pflanzenmitochondrien.** In Pflanzen, Hefe und Säugetieren wird RISP im Zellkern kodiert, im Cytosol synthetisiert und post-translational in die Mitochondrien importiert. Nach dem Erreichen der Matrix und der Einbringung des 2Fe-2S-Clusters in den C-Terminus unterscheiden sich die Wege. In Hefe- und Säugetiermitochondrien wird RISP wieder in die innere Membran eingefügt und der gefaltete C-Terminus durch das Protein BCS1 durch die Membran zurück in den IMS transloziert. In Pflanzen erfolgt der Translokationsschritt über den mitochondrialen TAT-Signalweg, der höchstwahrscheinlich vom bakteriellen Vorfahren vererbt wurde. Abbildung entnommen aus (Schäfer et al. 2020), modifiziert.

Nichtsdestotrotz sind die Untereinheiten des mitochondrialen TAT Wegs in Pflanzen nicht dazu im Stande, das *E. coli* oder das chloroplastidäre TAT System funktionell zu komplementieren. Eine Komplementierung von BCS1 Knock-out Mutanten in Hefe verlief erfolglos, da MTTATC äußerst hydrophob ist, im mitochondrialen Genom kodiert ist und außerdem die mRNA vor der Translation an 36 Stellen editiert wird.

Aufgrund der gezeigten Existenz der Funktionalität von TAT in Mitochondrien aus *A. thaliana* kann ferner behauptet werden, dass Organismen die neben Pflanzen mitochondriale TAT-Transportwege-Untereinheiten enthalten, diese auch zumindest für die RISP Translokation beibehielten. Schlussfolgernd könnte dies außerdem darauf hindeuten, dass der ursprüngliche bakterielle Vorfahre der Mitochondrien ein TAT System zur Translokation von RISP benutzte.

Warum also den TAT Weg durch Mechanismen wie die BCS1-vermittelte Translokation ersetzen?

Eine mögliche Theorie ist die universelle Kodierung der Translokationsmaschinerie im Nukleus. Eine Veränderung von TAT zu BCS1 könnte eine unkompliziertere Kontrolle durch die Koordination von nur einem anstatt mehrerer Proteine für die RISP Translokation ermöglichen. Außerdem ist BCS1, wie MTTATB, im Nukleus kodiert, während MTTATC unter Kontrolle der mitochondrialen Genexpression liegt. Der Grund, warum MTTATC wahrscheinlich noch im mitochondrialen Genom kodiert ist, ist die hohe Hydrophobizität, die es dem Protein nahezu unmöglich macht durch die mitochondrialen Membranen reimportiert zu werden (Petru et al. 2018). Im Gegensatz dazu haben die meisten Chloroplasten einen kernkodierten TAT-Signalweg, der alle drei Untereinheiten – TatA, TatB und TatC – umfasst. (Mori et al. 2001). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Hydrophobizität nicht der einzige Zwang einer Organellen- und nukleären Genexpressionskontrolle sein muss. Ein Vergleich zwischen Mitochondrien und Chloroplasten gestaltet sich jedoch schwierig. Trotz ihres ähnlichen endosymbiotischen Ursprungs, konnte durch neueste Studien gezeigt werden, dass die Organellen möglicherweise nicht denselben Grundbedingungen hinsichtlich des Proteinimports unterliegen, da die Translokasen des äußeren und inneren Envelopes der Chloroplasten (TOC/TIC Komplex) im Gegensatz zum TOM und TIM Komplex auch dazu im Stande sind gefaltete Proteine zu transportieren (Ganesan and Theg 2019).

Eine andere Theorie kann eine Anzahl an nicht identifizierter Substrate für das TAT Translokationssystem der Pflanzen sein. Nachdem neben dem Komplex III Phänotyp in Mutanten in dieser Arbeit keine weiteren einschlägigen Defizite in den Pflanzen beobachtet wurden, ist es jedoch naheliegend, dass RISP das einzige Substrat von TAT in Pflanzenmitochondrien ist. Dies wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass RISP auch in Rickettsien das einzige Substrat des TAT Systems ist (Gillespie et al. 2015).

## 6 Literaturverzeichnis

- Ahting U, Waizenegger T, Neupert W, Rapaport D (2005) Signal-anchored proteins follow a unique insertion pathway into the outer membrane of mitochondria. *J Biol Chem* 280 (1):48-53. doi:10.1074/jbc.M410905200
- Alcock F, Clements A, Webb C, Lithgow T (2010) Evolution. Tinkering inside the organelle. *Science* 327 (5966):649-650. doi:10.1126/science.1182129
- Aldridge C, Spence E, Kirkilionis MA, Frigerio L, Robinson C (2008) Tat-dependent targeting of Rieske iron-sulphur proteins to both the plasma and thylakoid membranes in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Mol Microbiol* 70 (1):140-150. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06401.x
- Alexander MP (1969) Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technol* 44 (3):117-122. doi:10.3109/10520296909063335
- Anghel SA, McGilvray PT, Hegde RS, Keenan RJ (2017) Identification of Oxa1 Homologs Operating in the Eukaryotic Endoplasmic Reticulum. *Cell Rep* 21 (13):3708-3716. doi:10.1016/j.celrep.2017.12.006
- Arenas MA, Gonzalez-Duran E, Gomez I, Burger M, Brennicke A, Takenaka M, Jordana X (2018) The Pentatricopeptide Repeat Protein MEF31 is Required for Editing at Site 581 of the Mitochondrial *tatC* Transcript and Indirectly Influences Editing at Site 586 of the Same Transcript. *Plant Cell Physiol* 59 (2):355-365. doi:10.1093/pcp/pcx190
- Backes S, Garg SG, Becker L, Peleh V, Glockshuber R, Gould SB, Herrmann JM (2019) Development of the Mitochondrial Intermembrane Space Disulfide Relay Represents a Critical Step in Eukaryotic Evolution. *Mol Biol Evol* 36 (4):742-756. doi:10.1093/molbev/msz011
- Bageshwar UK, Musser SM (2007) Two electrical potential-dependent steps are required for transport by the *Escherichia coli* Tat machinery. *J Cell Biol* 179 (1):87-99. doi:10.1083/jcb.200702082
- Barnett JP, Eijlander RT, Kuipers OP, Robinson C (2008) A minimal Tat system from a gram-positive organism: a bifunctional TatA subunit participates in discrete TatAC and TatA complexes. *J Biol Chem* 283 (5):2534-2542. doi:10.1074/jbc.M708134200
- Benz M, Soll J, Ankele E (2013) *Arabidopsis thaliana* Oxa proteins locate to mitochondria and fulfill essential roles during embryo development. *Planta* 237 (2):573-588. doi:10.1007/s00425-012-1793-9
- Berks BC (1996) A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol Microbiol* 22 (3):393-404. doi:10.1046/j.1365-2958.1996.00114.x
- Berks BC (2015) The twin-arginine protein translocation pathway. *Annu Rev Biochem* 84:843-864. doi:10.1146/annurev-biochem-060614-034251
- Berks BC, Lea SM, Stansfeld PJ (2014) Structural biology of Tat protein transport. *Curr Opin Struct Biol* 27:32-37. doi:10.1016/j.sbi.2014.03.003
- Berks BC, Sargent F, Palmer T (2000) The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol* 35 (2):260-274. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01719.x
- Binder A, Lambert J, Morbitzer R, Popp C, Ott T, Lahaye T, Parniske M (2014) A modular plasmid assembly kit for multigene expression, gene silencing and silencing rescue in plants. *PLoS One* 9 (2):e88218. doi:10.1371/journal.pone.0088218
- Blatch GL, Lassel M (1999) The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* 21 (11):932-939. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199911)21:11<932::AID-BIES5>3.0.CO;2-N
- Bolender N, Sickmann A, Wagner R, Meisinger C, Pfanner N (2008) Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Rep* 9 (1):42-49. doi:10.1038/sj.embor.7401126
- Bonnefoy N, Chalvet F, Hamel P, Slonimski PP, Dujardin G (1994) OXA1, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene whose sequence is conserved from

- prokaryotes to eukaryotes controls cytochrome oxidase biogenesis. *J Mol Biol* 239 (2):201-212. doi:10.1006/jmbi.1994.1363
- Boyce DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Gorlach J (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* 13 (7):1499-1510. doi:10.1105/tpc.010011
- Braun NA, Davis AW, Theg SM (2007) The chloroplast Tat pathway utilizes the transmembrane electric potential as an energy source. *Biophys J* 93 (6):1993-1998. doi:10.1529/biophysj.106.098731
- Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L (2016) Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol* 34 (5):525-527. doi:10.1038/nbt.3519
- Burger G, Forget L, Zhu Y, Gray MW, Lang BF (2003) Unique mitochondrial genome architecture in unicellular relatives of animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (3):892-897. doi:10.1073/pnas.0336115100
- Burger G, Gray MW, Forget L, Lang BF (2013) Strikingly bacteria-like and gene-rich mitochondrial genomes throughout jakobid protists. *Genome Biol Evol* 5 (2):418-438. doi:10.1093/gbe/evt008
- Busch KB (2020) Inner mitochondrial membrane compartmentalization: Dynamics across scales. *Int J Biochem Cell Biol* 120:105694. doi:10.1016/j.biocel.2020.105694
- Carrie C, Giraud E, Duncan O, Xu L, Wang Y, Huang S, Clifton R, Murcha M, Filipovska A, Rackham O, Vrielink A, Whelan J (2010a) Conserved and novel functions for Arabidopsis thaliana MIA40 in assembly of proteins in mitochondria and peroxisomes. *J Biol Chem* 285 (46):36138-36148. doi:10.1074/jbc.M110.121202
- Carrie C, Murcha MW, Whelan J (2010b) An in silico analysis of the mitochondrial protein import apparatus of plants. *BMC Plant Biol* 10:249. doi:10.1186/1471-2229-10-249
- Carrie C, Soll J (2017) To Mia or not to Mia: stepwise evolution of the mitochondrial intermembrane space disulfide relay. *BMC Biol* 15 (1):119. doi:10.1186/s12915-017-0468-1
- Carrie C, Weissenberger S, Soll J (2016) Plant mitochondria contain the protein translocase subunits TatB and TatC. *J Cell Sci* 129 (20):3935-3947. doi:10.1242/jcs.190975
- Celedon JM, Cline K (2012) Stoichiometry for binding and transport by the twin arginine translocation system. *J Cell Biol* 197 (4):523-534. doi:10.1083/jcb.201201096
- Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N (2009) Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138 (4):628-644. doi:10.1016/j.cell.2009.08.005
- Chacinska A, van der Laan M, Mehnert CS, Guiard B, Mick DU, Hutu DP, Truscott KN, Wiedemann N, Meisinger C, Pfanner N, Rehling P (2010) Distinct forms of mitochondrial TOM-TIM supercomplexes define signal-dependent states of preprotein sorting. *Mol Cell Biol* 30 (1):307-318. doi:10.1128/MCB.00749-09
- Cheng CY, Krishnakumar V, Chan AP, Thibaud-Nissen F, Schobel S, Town CD (2017) Araport11: a complete reannotation of the Arabidopsis thaliana reference genome. *Plant J* 89 (4):789-804. doi:10.1111/tbj.13415
- Chrobok D, Law SR, Brouwer B, Linden P, Ziolkowska A, Liebsch D, Narsai R, Szal B, Moritz T, Rouhier N, Whelan J, Gardestrom P, Keech O (2016) Dissecting the Metabolic Role of Mitochondria during Developmental Leaf Senescence. *Plant Physiol* 172 (4):2132-2153. doi:10.1104/pp.16.01463
- Cline K (2015) Mechanistic Aspects of Folded Protein Transport by the Twin Arginine Translocase (Tat). *J Biol Chem* 290 (27):16530-16538. doi:10.1074/jbc.R114.626820
- Cline K, Mori H (2001) Thylakoid DeltapH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *J Cell Biol* 154 (4):719-729. doi:10.1083/jcb.200105149

- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16 (6):735-743. doi:10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x
- Cohen S, Zmudjak M, Colas des Francs-Small C, Malik S, Shaya F, Keren I, Belausov E, Many Y, Brown GG, Small I, Ostersetzer-Biran O (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 (2):253-268. doi:10.1111/tpj.12466
- Colombatti F, Gonzalez DH, Welchen E (2014) Plant mitochondria under pathogen attack: a sigh of relief or a last breath? *Mitochondrion* 19 Pt B:238-244. doi:10.1016/j.mito.2014.03.006
- Conte A, Papa B, Ferramosca A, Zara V (2015) The dimerization of the yeast cytochrome bc1 complex is an early event and is independent of Rip1. *Biochim Biophys Acta* 1853 (5):987-995. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.02.006
- Cruciat CM, Hell K, Folsch H, Neupert W, Stuart RA (1999) Bcs1p, an AAA-family member, is a chaperone for the assembly of the cytochrome bc(1) complex. *EMBO J* 18 (19):5226-5233. doi:10.1093/emboj/18.19.5226
- Cui TZ, Smith PM, Fox JL, Khalimonchuk O, Winge DR (2012) Late-stage maturation of the Rieske Fe/S protein: Mzm1 stabilizes Rip1 but does not facilitate its translocation by the AAA ATPase Bcs1. *Mol Cell Biol* 32 (21):4400-4409. doi:10.1128/MCB.00441-12
- Dabney-Smith C, Mori H, Cline K (2003) Requirement of a Tha4-conserved transmembrane glutamate in thylakoid Tat translocase assembly revealed by biochemical complementation. *J Biol Chem* 278 (44):43027-43033. doi:10.1074/jbc.M307923200
- De Buck E, Vranckx L, Meyen E, Maes L, Vandersmissen L, Anne J, Lammertyn E (2007) The twin-arginine translocation pathway is necessary for correct membrane insertion of the Rieske Fe/S protein in *Legionella pneumophila*. *FEBS Lett* 581 (2):259-264. doi:10.1016/j.febslet.2006.12.022
- Dellero Y, Jossier M, Schmitz J, Maurino VG, Hodges M (2016) Photorespiratory glycolate-glyoxylate metabolism. *J Exp Bot* 67 (10):3041-3052. doi:10.1093/jxb/erw090
- Demarquoy J, Le Borgne F (2015) Crosstalk between mitochondria and peroxisomes. *World J Biol Chem* 6 (4):301-309. doi:10.4331/wjbc.v6.i4.301
- Deponte M, Hell K (2009) Disulphide bond formation in the intermembrane space of mitochondria. *J Biochem* 146 (5):599-608. doi:10.1093/jb/mvp133
- Despres B, Delseny M, Devic M (2001) Partial complementation of embryo defective mutations: a general strategy to elucidate gene function. *Plant J* 27 (2):149-159. doi:10.1046/j.1365-313x.2001.01078.x
- Dolezal P, Likic V, Tachezy J, Lithgow T (2006) Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science* 313 (5785):314-318. doi:10.1126/science.1127895
- Dudek J, Rehling P, van der Laan M (2013) Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks. *Biochim Biophys Acta* 1833 (2):274-285. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.05.028
- Duncan O, Murcha MW, Whelan J (2013) Unique components of the plant mitochondrial protein import apparatus. *Biochim Biophys Acta* 1833 (2):304-313. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.02.015
- Edwards CA, Bowyer JR, Trumpower BL (1982) Function of the iron-sulfur protein of the cytochrome b-c1 segment in electron transfer reactions of the mitochondrial respiratory chain. *J Biol Chem* 257 (7):3705-3713
- Eimer E, Frobel J, Blummel AS, Muller M (2015) TatE as a Regular Constituent of Bacterial Twin-arginine Protein Translocases. *J Biol Chem* 290 (49):29281-29289. doi:10.1074/jbc.M115.696005

- Eubel H, Millar AH (2009) Systematic monitoring of protein complex composition and abundance by blue-native PAGE. *Cold Spring Harb Protoc* 2009 (5):pdb prot5221. doi:10.1101/pdb.prot5221
- Fincher V, Dabney-Smith C, Cline K (2003) Functional assembly of thylakoid delta-pH-dependent/Tat protein transport pathway components in vitro. *Eur J Biochem* 270 (24):4930-4941. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03894.x
- Folsch H, Guiard B, Neupert W, Stuart RA (1996) Internal targeting signal of the BCS1 protein: a novel mechanism of import into mitochondria. *EMBO J* 15 (3):479-487
- Frazier AE, Dudek J, Guiard B, Voos W, Li Y, Lind M, Meisinger C, Geissler A, Sickmann A, Meyer HE, Bilanchone V, Cumsky MG, Truscott KN, Pfanner N, Rehling P (2004) Pam16 has an essential role in the mitochondrial protein import motor. *Nat Struct Mol Biol* 11 (3):226-233. doi:10.1038/nsmb735
- Fröbel J, Rose P, Lausberg F, Blummel AS, Freudl R, Müller M (2012) Transmembrane insertion of twin-arginine signal peptides is driven by TatC and regulated by TatB. *Nat Commun* 3:1311. doi:10.1038/ncomms2308
- Funes S, Nargang FE, Neupert W, Herrmann JM (2004) The Oxa2 protein of *Neurospora crassa* plays a critical role in the biogenesis of cytochrome oxidase and defines a ubiquitous subbranch of the Oxa1/YidC/Alb3 protein family. *Mol Biol Cell* 15 (4):1853-1861. doi:10.1091/mbc.e03-11-0789
- Gabriel K, Milenkovic D, Chacinska A, Müller J, Guiard B, Pfanner N, Meisinger C (2007) Novel mitochondrial intermembrane space proteins as substrates of the MIA import pathway. *J Mol Biol* 365 (3):612-620. doi:10.1016/j.jmb.2006.10.038
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50 (1):151-158
- Ganesan I, Theg SM (2019) Structural considerations of folded protein import through the chloroplast TOC/TIC translocons. *FEBS Lett* 593 (6):565-572. doi:10.1002/1873-3468.13342
- Gebert N, Gebert M, Oeljeklaus S, von der Malsburg K, Stroud DA, Kulawiak B, Wirth C, Zahedi RP, Dolezal P, Wiese S, Simon O, Schulze-Specking A, Truscott KN, Sickmann A, Rehling P, Guiard B, Hunte C, Warscheid B, van der Laan M, Pfanner N, Wiedemann N (2011) Dual function of Sdh3 in the respiratory chain and TIM22 protein translocase of the mitochondrial inner membrane. *Mol Cell* 44 (5):811-818. doi:10.1016/j.molcel.2011.09.025
- Gentile I, Gabriel K, Beech P, Waller R, Lithgow T (2004) The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria. *J Cell Biol* 164 (1):19-24. doi:10.1083/jcb.200310092
- Gerard F, Cline K (2007) The thylakoid proton gradient promotes an advanced stage of signal peptide binding deep within the Tat pathway receptor complex. *J Biol Chem* 282 (8):5263-5272. doi:10.1074/jbc.M610337200
- Giege P, Brennicke A (2001) From gene to protein in higher plant mitochondria. *C R Acad Sci III* 324 (3):209-217. doi:10.1016/s0764-4469(00)01293-2
- Giege P, Grienemberger JM, Bonnard G (2008) Cytochrome c biogenesis in mitochondria. *Mitochondrion* 8 (1):61-73. doi:10.1016/j.mito.2007.10.001
- Gilkerson RW, Selker JM, Capaldi RA (2003) The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* 546 (2-3):355-358. doi:10.1016/s0014-5793(03)00633-1
- Gillespie JJ, Kaur SJ, Rahman MS, Rennoll-Bankert K, Sears KT, Beier-Sexton M, Azad AF (2015) Secretome of obligate intracellular *Rickettsia*. *FEMS Microbiol Rev* 39 (1):47-80. doi:10.1111/1574-6976.12084
- Gohlke U, Pullan L, McDevitt CA, Porcelli I, de Leeuw E, Palmer T, Saibil HR, Berks BC (2005) The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (30):10482-10486. doi:10.1073/pnas.0503558102

- Goosens VJ, Monteferrante CG, van Dijl JM (2014) The Tat system of Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1843 (8):1698-1706. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.10.008
- Grancara S, Ohkubo S, Artico M, Ciccariello M, Manente S, Bragadin M, Toninello A, Agostinelli E (2016) Milestones and recent discoveries on cell death mediated by mitochondria and their interactions with biologically active amines. *Amino Acids* 48 (10):2313-2326. doi:10.1007/s00726-016-2323-z
- Gray MW, Burger G, Derelle R, Klimes V, Leger MM, Sarrasin M, Vlcek C, Roger AJ, Elias M, Lang BF (2020) The draft nuclear genome sequence and predicted mitochondrial proteome of *Andalucia godoyi*, a protist with the most gene-rich and bacteria-like mitochondrial genome. *BMC Biol* 18 (1):22. doi:10.1186/s12915-020-0741-6
- Gray MW, Burger G, Lang BF (1999) Mitochondrial evolution. *Science* 283 (5407):1476-1481. doi:10.1126/science.283.5407.1476
- Gruschke S, Grone K, Heublein M, Holz S, Israel L, Imhof A, Herrmann JM, Ott M (2010) Proteins at the polypeptide tunnel exit of the yeast mitochondrial ribosome. *J Biol Chem* 285 (25):19022-19028. doi:10.1074/jbc.M110.113837
- Gruschke S, Kehrein K, Rompler K, Grone K, Israel L, Imhof A, Herrmann JM, Ott M (2011) Cbp3-Cbp6 interacts with the yeast mitochondrial ribosomal tunnel exit and promotes cytochrome b synthesis and assembly. *J Cell Biol* 193 (6):1101-1114. doi:10.1083/jcb.201103132
- Guo WT, N.; Stephen, G.; Milne, I.; Calixto, C.; Waugh, R.; Brown, C.J. W. S.; Zhang, R. (2019) 3D RNA-seq - a powerful and flexible tool for rapid and accurate differential expression and alternative splicing analysis of RNA-seq data for biologists. bioRxiv:656686
- Hagemann M, Bauwe H (2016) Photorespiration and the potential to improve photosynthesis. *Curr Opin Chem Biol* 35:109-116. doi:10.1016/j.cbpa.2016.09.014
- Hallermayer G, Neupert W (1974) Lipid composition of mitochondrial outer and inner membranes of *Neurospora crassa*. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 355 (3):279-288. doi:10.1515/bchm2.1974.355.1.279
- Hamel P, Sakamoto W, Wintz H, Dujardin G (1997) Functional complementation of an *oxa1*- yeast mutation identifies an *Arabidopsis thaliana* cDNA involved in the assembly of respiratory complexes. *Plant J* 12 (6):1319-1327. doi:10.1046/j.1365-313x.1997.12061319.x
- Hammani K, Giege P (2014) RNA metabolism in plant mitochondria. *Trends Plant Sci* 19 (6):380-389. doi:10.1016/j.tplants.2013.12.008
- Hamsanathan S, Anthonymuthu TS, Bageshwar UK, Musser SM (2017) A Hinged Signal Peptide Hairpin Enables Tat-Dependent Protein Translocation. *Biophys J* 113 (12):2650-2668. doi:10.1016/j.bpj.2017.09.036
- Harner ME, Unger AK, Geerts WJ, Mari M, Izawa T, Stenger M, Geimer S, Reggiori F, Westermann B, Neupert W (2016) An evidence based hypothesis on the existence of two pathways of mitochondrial crista formation. *Elife* 5. doi:10.7554/eLife.18853
- 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
- Hell K, Neupert W, Stuart RA (2001) *Oxa1p* acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *EMBO J* 20 (6):1281-1288. doi:10.1093/emboj/20.6.1281
- Herrmann JM, Neupert W (2003) Protein insertion into the inner membrane of mitochondria. *IUBMB Life* 55 (4-5):219-225. doi:10.1080/1521654031000123349
- Hewitt V, Alcock F, Lithgow T (2011) Minor modifications and major adaptations: the evolution of molecular machines driving mitochondrial protein import. *Biochim Biophys Acta* 1808 (3):947-954. doi:10.1016/j.bbamem.2010.07.019

- Hildenbeutel M, Hegg EL, Stephan K, Gruschke S, Meunier B, Ott M (2014) Assembly factors monitor sequential hemylation of cytochrome b to regulate mitochondrial translation. *J Cell Biol* 205 (4):511-524. doi:10.1083/jcb.201401009
- Hinsley AP, Stanley NR, Palmer T, Berks BC (2001) A naturally occurring bacterial Tat signal peptide lacking one of the 'invariant' arginine residues of the consensus targeting motif. *FEBS Lett* 497 (1):45-49. doi:10.1016/s0014-5793(01)02428-0
- Höhr AIC, Lindau C, Wirth C, Qiu J, Stroud DA, Kutik S, Guiard B, Hunte C, Becker T, Pfanner N, Wiedemann N (2018) Membrane protein insertion through a mitochondrial beta-barrel gate. *Science* 359 (6373). doi:10.1126/science.aah6834
- Hopkins A, Buchanan G, Palmer T (2014) Role of the twin arginine protein transport pathway in the assembly of the *Streptomyces coelicolor* cytochrome bc1 complex. *J Bacteriol* 196 (1):50-59. doi:10.1128/JB.00776-13
- Hunte C, Koepke J, Lange C, Rossmann T, Michel H (2000) Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc<sub>1</sub> complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure* 8 (6):669-684. doi:10.1016/s0969-2126(00)00152-0
- Jack RL, Sargent F, Berks BC, Sawers G, Palmer T (2001) Constitutive expression of *Escherichia coli* tat genes indicates an important role for the twin-arginine translocase during aerobic and anaerobic growth. *J Bacteriol* 183 (5):1801-1804. doi:10.1128/JB.183.5.1801-1804.2001
- Janska H, Kwasniak M (2014) Mitoribosomal regulation of OXPHOS biogenesis in plants. *Front Plant Sci* 5:79. doi:10.3389/fpls.2014.00079
- Jia L, Dienhart MK, Stuart RA (2007) Oxa1 directly interacts with Atp9 and mediates its assembly into the mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATP synthase complex. *Mol Biol Cell* 18 (5):1897-1908. doi:10.1091/mbc.e06-10-0925
- Karimi M, Inze D, Depicker A (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7 (5):193-195. doi:10.1016/s1360-1385(02)02251-3
- Kater L, Wagener N, Berninghausen O, Becker T, Neupert W, Beckmann R (2020) Structure of the Bcs1 AAA-ATPase suggests an airlock-like translocation mechanism for folded proteins. *Nat Struct Mol Biol* 27 (2):142-149. doi:10.1038/s41594-019-0364-1
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 10 (6):845-858. doi:10.1038/nprot.2015.053
- Keren I, Tal L, des Francs-Small CC, Araujo WL, Shevtsov S, Shaya F, Fernie AR, Small I, Ostersetzter-Biran O (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 (3):413-426. doi:10.1111/j.1365-3113X.2012.04998.x
- Kerscher O, Holder J, Srinivasan M, Leung RS, Jensen RE (1997) The Tim54p-Tim22p complex mediates insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol* 139 (7):1663-1675. doi:10.1083/jcb.139.7.1663
- Kispal G, Csere P, Guiard B, Lill R (1997) The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis. *FEBS Lett* 418 (3):346-350. doi:10.1016/s0014-5793(97)01414-2
- Kispal G, Csere P, Prohl C, Lill R (1999) The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J* 18 (14):3981-3989. doi:10.1093/emboj/18.14.3981
- Kolli R, Soll J, Carrie C (2018) Plant Mitochondrial Inner Membrane Protein Insertion. *Int J Mol Sci* 19 (2). doi:10.3390/ijms19020641
- Kolli R, Soll J, Carrie C (2019) OXA2b is Crucial for Proper Membrane Insertion of COX2 during Biogenesis of Complex IV in Plant Mitochondria. *Plant Physiol* 179 (2):601-615. doi:10.1104/pp.18.01286
- Krishnakumar V, Hanlon MR, Contrino S, Ferlanti ES, Karamycheva S, Kim M, Rosen BD, Cheng CY, Moreira W, Mock SA, Stubbs J, Sullivan JM, Krampis K, Miller JR,

- Micklem G, Vaughn M, Town CD (2015) Araport: the Arabidopsis information portal. *Nucleic Acids Res* 43 (Database issue):D1003-1009. doi:10.1093/nar/gku1200
- Kühlbrandt W (2015) Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol* 13:89. doi:10.1186/s12915-015-0201-x
- Kuraku S, Zmasek CM, Nishimura O, Katoh K (2013) aLeaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity. *Nucleic Acids Res* 41 (Web Server issue):W22-28. doi:10.1093/nar/gkt389
- Laloi M (1999) Plant mitochondrial carriers: an overview. *Cell Mol Life Sci* 56 (11-12):918-944. doi:10.1007/s000180050484
- Leake MC, Greene NP, Godun RM, Granjon T, Buchanan G, Chen S, Berry RM, Palmer T, Berks BC (2008) Variable stoichiometry of the TatA component of the twin-arginine protein transport system observed by in vivo single-molecule imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (40):15376-15381. doi:10.1073/pnas.0806338105
- Lee PA, Buchanan G, Stanley NR, Berks BC, Palmer T (2002) Truncation analysis of TatA and TatB defines the minimal functional units required for protein translocation. *J Bacteriol* 184 (21):5871-5879. doi:10.1128/jb.184.21.5871-5879.2002
- Li L, Lavell A, Meng X, Berkowitz O, Selinski J, van de Meene A, Carrie C, Benning C, Whelan J, De Clercq I, Wang Y (2019) Arabidopsis DGD1 SUPPRESSOR1 Is a Subunit of the Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System and Affects Mitochondrial Biogenesis. *Plant Cell* 31 (8):1856-1878. doi:10.1105/tpc.18.00885
- Ligas J, Pineau E, Bock R, Huynen MA, Meyer EH (2019) The assembly pathway of complex I in Arabidopsis thaliana. *Plant J* 97 (3):447-459. doi:10.1111/tpj.14133
- Lill R, Freibert SA (2020) Mechanisms of Mitochondrial Iron-Sulfur Protein Biogenesis. *Annu Rev Biochem*. doi:10.1146/annurev-biochem-013118-111540
- Lister R, Carrie C, Duncan O, Ho LH, Howell KA, Murcha MW, Whelan J (2007) Functional definition of outer membrane proteins involved in preprotein import into mitochondria. *Plant Cell* 19 (11):3739-3759. doi:10.1105/tpc.107.050534
- Lister R, Mowday B, Whelan J, Millar AH (2002) Zinc-dependent intermembrane space proteins stimulate import of carrier proteins into plant mitochondria. *Plant J* 30 (5):555-566. doi:10.1046/j.1365-313x.2002.01316.x
- Luke I, Handford JI, Palmer T, Sargent F (2009) Proteolytic processing of Escherichia coli twin-arginine signal peptides by LepB. *Arch Microbiol* 191 (12):919-925. doi:10.1007/s00203-009-0516-5
- Lyu W, Selinski J, Li L, Day DA, Murcha MW, Whelan J, Wang Y (2018) Isolation and Respiratory Measurements of Mitochondria from Arabidopsis thaliana. *J Vis Exp* (131). doi:10.3791/56627
- Mackenzie S, McIntosh L (1999) Higher plant mitochondria. *Plant Cell* 11 (4):571-586. doi:10.1105/tpc.11.4.571
- Malina C, Larsson C, Nielsen J (2018) Yeast mitochondria: an overview of mitochondrial biology and the potential of mitochondrial systems biology. *FEMS Yeast Res* 18 (5). doi:10.1093/femsyr/foy040
- Martin JR, Harwood JH, McCaffery M, Fernandez DE, Cline K (2009) Localization and integration of thylakoid protein translocase subunit cpTatC. *Plant J* 58 (5):831-842. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03816.x
- Martin WF, Garg S, Zimorski V (2015) Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370 (1678):20140330. doi:10.1098/rstb.2014.0330
- Mesecke N, Terziyska N, Kozany C, Baumann F, Neupert W, Hell K, Herrmann JM (2005) A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell* 121 (7):1059-1069. doi:10.1016/j.cell.2005.04.011
- Meyer EH, Lehmann C, Boivin S, Brings L, De Cauwer I, Bock R, Kuhn K, Touzet P (2018) CMS-G from Beta vulgaris ssp. maritima is maintained in natural

- populations despite containing an atypical cytochrome c oxidase. *Biochem J* 475 (4):759-773. doi:10.1042/BCJ20170655
- Meyer EH, Welchen E, Carrie C (2019) Assembly of the Complexes of the Oxidative Phosphorylation System in Land Plant Mitochondria. *Annu Rev Plant Biol* 70:23-50. doi:10.1146/annurev-arplant-050718-100412
- Michaud M, Gros V, Tardif M, Brugiére S, Ferro M, Prinz WA, Toulmay A, Mathur J, Wozny M, Falconet D, Marechal E, Block MA, Jouhet J (2016) AtMic60 Is Involved in Plant Mitochondria Lipid Trafficking and Is Part of a Large Complex. *Curr Biol* 26 (5):627-639. doi:10.1016/j.cub.2016.01.011
- Molik S, Karnauchoy I, Weidlich C, Herrmann RG, Klosgen RB (2001) The Rieske Fe/S protein of the cytochrome b6/f complex in chloroplasts: missing link in the evolution of protein transport pathways in chloroplasts? *J Biol Chem* 276 (46):42761-42766. doi:10.1074/jbc.M106690200
- Mori H, Cline K (1998) A signal peptide that directs non-Sec transport in bacteria also directs efficient and exclusive transport on the thylakoid Delta pH pathway. *J Biol Chem* 273 (19):11405-11408. doi:10.1074/jbc.273.19.11405
- Mori H, Cline K (2002) A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid [Delta]pH/Tat translocase. *J Cell Biol* 157 (2):205-210. doi:10.1083/jcb.200202048
- Mori H, Summer EJ, Cline K (2001) Chloroplast TatC plays a direct role in thylakoid (Delta)pH-dependent protein transport. *FEBS Lett* 501 (1):65-68. doi:10.1016/s0014-5793(01)02626-6
- Moulin C, Caumont-Sarcos A, Ieva R (2019) Mitochondrial presequence import: Multiple regulatory knobs fine-tune mitochondrial biogenesis and homeostasis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1866 (5):930-944. doi:10.1016/j.bbamcr.2019.02.012
- Murashige T, Skoog F (1962) Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* 15 (3):Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Murcha MW, Elhafez D, Lister R, Tonti-Filippini J, Baumgartner M, Philippar K, Carrie C, Mokranjac D, Soll J, Whelan J (2007) Characterization of the preprotein and amino acid transporter gene family in Arabidopsis. *Plant Physiol* 143 (1):199-212. doi:10.1104/pp.106.090688
- Murcha MW, Elhafez D, Millar AH, Whelan J (2004) The N-terminal extension of plant mitochondrial carrier proteins is removed by two-step processing: the first cleavage is by the mitochondrial processing peptidase. *J Mol Biol* 344 (2):443-454. doi:10.1016/j.jmb.2004.09.045
- Murcha MW, Elhafez D, Millar AH, Whelan J (2005a) The C-terminal region of TIM17 links the outer and inner mitochondrial membranes in Arabidopsis and is essential for protein import. *J Biol Chem* 280 (16):16476-16483. doi:10.1074/jbc.M413299200
- Murcha MW, Kmiec B, Kubiszewski-Jakubiak S, Teixeira PF, Glaser E, Whelan J (2014a) Protein import into plant mitochondria: signals, machinery, processing, and regulation. *J Exp Bot* 65 (22):6301-6335. doi:10.1093/jxb/eru399
- Murcha MW, Lister R, Ho AY, Whelan J (2003) Identification, expression, and import of components 17 and 23 of the inner mitochondrial membrane translocase from Arabidopsis. *Plant Physiol* 131 (4):1737-1747. doi:10.1104/pp.102.016808
- Murcha MW, Millar AH, Whelan J (2005b) The N-terminal cleavable extension of plant carrier proteins is responsible for efficient insertion into the inner mitochondrial membrane. *J Mol Biol* 351 (1):16-25. doi:10.1016/j.jmb.2005.06.004
- Murcha MW, Wang Y, Narsai R, Whelan J (2014b) The plant mitochondrial protein import apparatus - the differences make it interesting. *Biochim Biophys Acta* 1840 (4):1233-1245. doi:10.1016/j.bbagen.2013.09.026
- Murcha MW, Whelan J (2015) Isolation of Intact Mitochondria from the Model Plant Species Arabidopsis thaliana and Oryza sativa. *Methods Mol Biol* 1305:1-12. doi:10.1007/978-1-4939-2639-8\_1

- Ndi M, Marin-Buera L, Salvatori R, Singh AP, Ott M (2018) Biogenesis of the bc1 Complex of the Mitochondrial Respiratory Chain. *J Mol Biol* 430 (21):3892-3905. doi:10.1016/j.jmb.2018.04.036
- Nobrega FG, Nobrega MP, Tzagoloff A (1992) BCS1, a novel gene required for the expression of functional Rieske iron-sulfur protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 11 (11):3821-3829
- O'Malley MA, Leger MM, Wideman JG, Ruiz-Trillo I (2019) Concepts of the last eukaryotic common ancestor. *Nat Ecol Evol* 3 (3):338-344. doi:10.1038/s41559-019-0796-3
- Oates J, Barrett CM, Barnett JP, Byrne KG, Bolhuis A, Robinson C (2005) The *Escherichia coli* twin-arginine translocation apparatus incorporates a distinct form of TatABC complex, spectrum of modular TatA complexes and minor TatAB complex. *J Mol Biol* 346 (1):295-305. doi:10.1016/j.jmb.2004.11.047
- Ott M, Herrmann JM (2010) Co-translational membrane insertion of mitochondrially encoded proteins. *Biochim Biophys Acta* 1803 (6):767-775. doi:10.1016/j.bbamcr.2009.11.010
- Palade GE (1953) An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem* 1 (4):188-211. doi:10.1177/1.4.188
- Palmer T, Berks BC (2012) The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nat Rev Microbiol* 10 (7):483-496. doi:10.1038/nrmicro2814
- Parcy F, Valon C, Raynal M, Gaubier-Comella P, Delseny M, Giraudat J (1994) Regulation of gene expression programs during *Arabidopsis* seed development: roles of the ABI3 locus and of endogenous abscisic acid. *Plant Cell* 6 (11):1567-1582. doi:10.1105/tpc.6.11.1567
- Paschen SA, Waizenegger T, Stan T, Preuss M, Cyrklaff M, Hell K, Rapaport D, Neupert W (2003) Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature* 426 (6968):862-866. doi:10.1038/nature02208
- Peltier JB, Friso G, Kalume DE, Roepstorff P, Nilsson F, Adamska I, van Wijk KJ (2000) Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of lumenal and peripheral thylakoid proteins. *Plant Cell* 12 (3):319-341. doi:10.1105/tpc.12.3.319
- Perales M, Parisi G, Fornasari MS, Colaneri A, Villarreal F, Gonzalez-Schain N, Echave J, Gomez-Casati D, Braun HP, Araya A, Zabaleta E (2004) Gamma carbonic anhydrase like complex interact with plant mitochondrial complex I. *Plant Mol Biol* 56 (6):947-957. doi:10.1007/s11103-004-6324-z
- Petru M, Wideman J, Moore K, Alcock F, Palmer T, Dolezal P (2018) Evolution of mitochondrial TAT translocases illustrates the loss of bacterial protein transport machines in mitochondria. *BMC Biol* 16 (1):141. doi:10.1186/s12915-018-0607-3
- Pett W, Lavrov DV (2013) The twin-arginine subunit C in *Oscarella*: origin, evolution, and potential functional significance. *Integr Comp Biol* 53 (3):495-502. doi:10.1093/icb/ict079
- Pu X, Lv X, Tan T, Fu F, Qin G, Lin H (2015) Roles of mitochondrial energy dissipation systems in plant development and acclimation to stress. *Ann Bot* 116 (4):583-600. doi:10.1093/aob/mcv063
- Ranquet C, Ollagnier-de-Choudens S, Loiseau L, Barras F, Fontecave M (2007) Cobalt stress in *Escherichia coli*. The effect on the iron-sulfur proteins. *J Biol Chem* 282 (42):30442-30451. doi:10.1074/jbc.M702519200
- Rassow J, Dekker PJ, van Wilpe S, Meijer M, Soll J (1999) The preprotein translocase of the mitochondrial inner membrane: function and evolution. *J Mol Biol* 286 (1):105-120. doi:10.1006/jmbi.1998.2455
- Richter S, Lindenstrauss U, Lucke C, Bayliss R, Bruser T (2007) Functional Tat transport of unstructured, small, hydrophilic proteins. *J Biol Chem* 282 (46):33257-33264. doi:10.1074/jbc.M703303200
- Rigas S, Daras G, Laxa M, Marathias N, Fasseas C, Sweetlove LJ, Hatzopoulos P (2009) Role of Lon1 protease in post-germinative growth and maintenance of

- mitochondrial function in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 181 (3):588-600. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02701.x
- Robinson C, Bolhuis A (2004) Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 1694 (1-3):135-147. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.03.010
- Rodriguez F, Rouse SL, Tait CE, Harmer J, De Riso A, Timmel CR, Sansom MS, Berks BC, Schnell JR (2013) Structural model for the protein-translocating element of the twin-arginine transport system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (12):E1092-1101. doi:10.1073/pnas.1219486110
- Rollauer SE, Tarry MJ, Graham JE, Jaaskelainen M, Jager F, Johnson S, Krehenbrink M, Liu SM, Lukey MJ, Marcoux J, McDowell MA, Rodriguez F, Roversi P, Stansfeld PJ, Robinson CV, Sansom MS, Palmer T, Högbohm M, Berks BC, Lea SM (2012) Structure of the TatC core of the twin-arginine protein transport system. *Nature* 492 (7428):210-214. doi:10.1038/nature11683
- Rose P, Frobel J, Graumann PL, Müller M (2013) Substrate-dependent assembly of the Tat translocase as observed in live *Escherichia coli* cells. *PLoS One* 8 (8):e69488. doi:10.1371/journal.pone.0069488
- Rügen N, Straube H, Franken LE, Braun HP, Eubel H (2019) Complexome Profiling Reveals Association of PPR Proteins with Ribosomes in the Mitochondria of Plants. *Mol Cell Proteomics* 18 (7):1345-1362. doi:10.1074/mcp.RA119.001396
- 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 (5):893-901. doi:10.1111/j.1365-3113X.2005.02577.x
- Saracco SA, Fox TD (2002) Cox18p is required for export of the mitochondrially encoded *Saccharomyces cerevisiae* Cox2p C-tail and interacts with Pnt1p and Mss2p in the inner membrane. *Mol Biol Cell* 13 (4):1122-1131. doi:10.1091/mbc.01-12-0580
- Sargent F (2007) The twin-arginine transport system: moving folded proteins across membranes. *Biochem Soc Trans* 35 (Pt 5):835-847. doi:10.1042/BST0350835
- Sargent F, Bogsch EG, Stanley NR, Wexler M, Robinson C, Berks BC, Palmer T (1998) Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *EMBO J* 17 (13):3640-3650. doi:10.1093/emboj/17.13.3640
- Schäfer K, Künzler P, Klingl A, Eubel H, Carrie C (2020) The Plant Mitochondrial TAT Pathway Is Essential for Complex III Biogenesis. *Curr Biol* 30 (5):840-853 e845. doi:10.1016/j.cub.2020.01.001
- Schertl P, Braun HP (2014) Respiratory electron transfer pathways in plant mitochondria. *Front Plant Sci* 5:163. doi:10.3389/fpls.2014.00163
- Schertl P, Braun HP (2015) Activity measurements of mitochondrial enzymes in native gels. *Methods Mol Biol* 1305:131-138. doi:10.1007/978-1-4939-2639-8\_9
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9 (7):671-675. doi:10.1038/nmeth.2089
- Schünemann D (2007) Mechanisms of protein import into thylakoids of chloroplasts. *Biol Chem* 388 (9):907-915. doi:10.1515/BC.2007.111
- Schwanhauser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M (2011) Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473 (7347):337-342. doi:10.1038/nature10098
- Sirrenberg C, Bauer MF, Guiard B, Neupert W, Brunner M (1996) Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature* 384 (6609):582-585. doi:10.1038/384582a0
- Sirrenberg C, Endres M, Folsch H, Stuart RA, Neupert W, Brunner M (1998) Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. *Nature* 391 (6670):912-915. doi:10.1038/36136
- Spitzer M, Wildenhain J, Rappsilber J, Tyers M (2014) BoxPlotR: a web tool for generation of box plots. *Nat Methods* 11 (2):121-122. doi:10.1038/nmeth.2811

- Stanley NR, Palmer T, Berks BC (2000) The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 275 (16):11591-11596. doi:10.1074/jbc.275.16.11591
- Stothard P (2000) The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* 28 (6):1102, 1104. doi:10.2144/00286ir01
- Sunkel S, Brennicke A, Knoop V (1994) RNA editing of a conserved reading frame in plant mitochondria increases its similarity to two overlapping reading frames in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 242 (1):65-72. doi:10.1007/bf00277349
- Szyrach G, Ott M, Bonnefoy N, Neupert W, Herrmann JM (2003) Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *EMBO J* 22 (24):6448-6457. doi:10.1093/emboj/cdg623
- Thal B, Braun HP, Eubel H (2018) Proteomic analysis dissects the impact of nodulation and biological nitrogen fixation on *Vicia faba* root nodule physiology. *Plant Mol Biol* 97 (3):233-251. doi:10.1007/s11103-018-0736-7
- Totley S, Waldron KJ, Firbank SJ, Reale B, Bessant C, Sato K, Cheek TR, Gray J, Banfield MJ, Dennison C, Robinson NJ (2008) Protein-folding location can regulate manganese-binding versus copper- or zinc-binding. *Nature* 455 (7216):1138-1142. doi:10.1038/nature07340
- Trösch R, Mühlhaus T, Schroda M, Willmund F (2015) ATP-dependent molecular chaperones in plastids--More complex than expected. *Biochim Biophys Acta* 1847 (9):872-888. doi:10.1016/j.bbabi.2015.01.002
- Truscott KN, Voos W, Frazier AE, Lind M, Li Y, Geissler A, Dudek J, Muller H, Sickmann A, Meyer HE, Meisinger C, Guiard B, Rehling P, Pfanner N (2003) A J-protein is an essential subunit of the presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria. *J Cell Biol* 163 (4):707-713. doi:10.1083/jcb.200308004
- Tyanova S, Temu T, Cox J (2016) The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat Protoc* 11 (12):2301-2319. doi:10.1038/nprot.2016.136
- Unseld M, Marienfeld JR, Brandt P, Brennicke A (1997) The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nat Genet* 15 (1):57-61. doi:10.1038/ng0197-57
- Urbischek M, Nick von Braun S, Brylok T, Gugel IL, Richter A, Koskela M, Grimm B, Mulo P, Bolter B, Soll J, Ankele E, Schwenkert S (2015) The extreme Albino3 (Alb3) C terminus is required for Alb3 stability and function in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 242 (3):733-746. doi:10.1007/s00425-015-2352-y
- van der Laan M, Meinecke M, Dudek J, Hutu DP, Lind M, Perschil I, Guiard B, Wagner R, Pfanner N, Rehling P (2007) Motor-free mitochondrial presequence translocase drives membrane integration of preproteins. *Nat Cell Biol* 9 (10):1152-1159. doi:10.1038/ncb1635
- Wagener N, Ackermann M, Funes S, Neupert W (2011) A pathway of protein translocation in mitochondria mediated by the AAA-ATPase Bcs1. *Mol Cell* 44 (2):191-202. doi:10.1016/j.molcel.2011.07.036
- Wagener N, Neupert W (2012) Bcs1, a AAA protein of the mitochondria with a role in the biogenesis of the respiratory chain. *J Struct Biol* 179 (2):121-125. doi:10.1016/j.jsb.2012.04.019
- Wagner K, Mick DU, Rehling P (2009) Protein transport machineries for precursor translocation across the inner mitochondrial membrane. *Biochim Biophys Acta* 1793 (1):52-59. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.05.026
- Walker MB, Roy LM, Coleman E, Voelker R, Barkan A (1999) The maize *tha4* gene functions in sec-independent protein transport in chloroplasts and is related to *hcf106*, *tatA*, and *tatB*. *J Cell Biol* 147 (2):267-276. doi:10.1083/jcb.147.2.267
- Wang P, Dalbey RE (2011) Inserting membrane proteins: the YidC/Oxa1/Alb3 machinery in bacteria, mitochondria, and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 1808 (3):866-875. doi:10.1016/j.bbamem.2010.08.014

- Wang X, Lavrov DV (2007) Mitochondrial genome of the homoscleromorph *Oscarella carmela* (Porifera, Demospongiae) reveals unexpected complexity in the common ancestor of sponges and other animals. *Mol Biol Evol* 24 (2):363-373. doi:10.1093/molbev/msl167
- Whelan J, Murcha MW (2015) Plant mitochondria : methods and protocols. *Methods in molecular biology*,, vol 1305. Humana Press, New York
- Wiedemann N, Kozjak V, Chacinska A, Schonfisch B, Rospert S, Ryan MT, Pfanner N, Meisinger C (2003) Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature* 424 (6948):565-571. doi:10.1038/nature01753
- Zara V, Conte L, Trumpower BL (2009) Evidence that the assembly of the yeast cytochrome bc1 complex involves the formation of a large core structure in the inner mitochondrial membrane. *FEBS J* 276 (7):1900-1914. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.06916.x
- Zhang B, Carrie C, Ivanova A, Narsai R, Murcha MW, Duncan O, Wang Y, Law SR, Albrecht V, Pogson B, Giraud E, Van Aken O, Whelan J (2012) LETM proteins play a role in the accumulation of mitochondrially encoded proteins in *Arabidopsis thaliana* and AtLETM2 displays parent of origin effects. *J Biol Chem* 287 (50):41757-41773. doi:10.1074/jbc.M112.383836
- Zhang B, Van Aken O, Thatcher L, De Clercq I, Duncan O, Law SR, Murcha MW, van der Merwe M, Seifi HS, Carrie C, Cazzonelli C, Radomiljac J, Hofte M, Singh KB, Van Breusegem F, Whelan J (2014) The mitochondrial outer membrane AAA ATPase AtOM66 affects cell death and pathogen resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 80 (4):709-727. doi:10.1111/tpj.12665
- Zhang YJ, Tian HF, Wen JF (2009) The evolution of YidC/Oxa/Alb3 family in the three domains of life: a phylogenomic analysis. *BMC Evol Biol* 9:137. doi:10.1186/1471-2148-9-137
- Zhu Q, Dugardeyn J, Zhang C, Takenaka M, Kuhn K, Craddock C, Smalle J, Karampelias M, Denecke J, Peters J, Gerats T, Brennicke A, Eastmond P, Meyer EH, Van Der Straeten D (2012a) SLO2, a mitochondrial pentatricopeptide repeat protein affecting several RNA editing sites, is required for energy metabolism. *Plant J* 71 (5):836-849. doi:10.1111/j.1365-313X.2012.05036.x
- Zhu Q, Meyer EH, Van Der Straeten D (2012b) Functional analysis of SLO2 provides new insight into the role of plant PPR proteins. *Plant Signal Behav* 7 (10):1209-1211. doi:10.4161/psb.21430
- Zmudjak M, Colas des Francs-Small C, Keren I, Shaya F, Belausov E, Small I, Ostersetzer-Biran O (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 (2):379-394. doi:10.1111/nph.12282

## Anhang

Tabelle 3. Liste aller Oligonukleotide dieser Arbeit

Name	Primer Sequenz 5' 3'	Verwendung
MTTATB F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCG AAGGAGATAGAACCATGCTTGGGCTTTCTTAC	Gateway Klonierung, stabile Transformation in <i>A. thaliana</i>
MTTATB R Full	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTC CACCTCCGGATCAATTTTCTCCTTTCCTGTC	Gateway Klonierung, stabile Transformation in <i>A. thaliana</i>
MTTATB R -22	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTC CACCTCCGGATCAGAAAAAGCTTTTTCGCCTT	Gateway Klonierung, stabile Transformation in <i>A. thaliana</i>
MTTATB R -42	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTC CACCTCCGGATCAAGATCCTCTTGCCTCTC	Gateway Klonierung, stabile Transformation in <i>A. thaliana</i>
MTTATB R -62	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTC CACCTCCGGATCAAAGAACAGGTGAATCACT	Gateway Klonierung, stabile Transformation in <i>A. thaliana</i>
MTTATB C-D F	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGCTTG GGCTTTCTTACGGTG	Golden Gate Klonierung, stabile Transformation in <i>A. thaliana</i>
MTTATB C-D R	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTATTTTCTC CTTTCCTGTCCAC	Golden Gate Klonierung, stabile Transformation in <i>A. thaliana</i>
ABI3 pro A-C F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCAGCGGT AAATAGGCTGAAAACCATAAATTATTTG	Golden Gate Klonierung, Promotor
ABI3 pro A-C R1	TAGAAGACAAgtgCGACCAAGCGGTGG TTCTT	Golden Gate Klonierung, Promotor
ABI3 pro A-C F2	TAGAAGACAAGCACCCTCAAATTCGAAC	Golden Gate Klonierung, Promotor
ABI3 pro A-C R2	TAGAAGACAAagaCGACAAAAAGCAAAC GTTTAAATTT	Golden Gate Klonierung, Promotor
ABI3 pro A-C F3	TAGAAGACAAGTCTTTGAAAATCAAA TGCTG	Golden Gate Klonierung, Promotor
ABI3 pro A-C R3	TAGAAGACAAaagCAGACTCTCTCTTT CTTTCA	Golden Gate Klonierung, Promotor
ABI3 pro A-C F4	TAGAAGACAAGCTTGTGGAGTAAACCC	Golden Gate Klonierung, Promotor
ABI3 pro A-C R4	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCAGGTGCC CGTTGAAGTGGAATGAAACAATA	Golden Gate Klonierung, Promotor
MTTATB pro A-B F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCAGCGGGG AGTCTGTCCATGAGAAGT	Golden Gate Klonierung, Promotor
MTTATB pro A-B R1	TAGAAGACAAtttATCTTCAATACAATAT AAAAACCAAAA	Golden Gate Klonierung, Promotor
MTTATB pro A-B F2	TAGAAGACAATAAAGAAGGTGAAAAG GACTC	Golden Gate Klonierung, Promotor
MTTATB pro A-B R2	TAGAAGACAAatgATCTCATCAATTTTCAT AAATTAATAATTAT	Golden Gate Klonierung, Promotor
MTTATB pro A-B F3	TAGAAGACAATCATATATTTATATAGAA TTTTTTTTAAAAAATACT	Golden Gate Klonierung, Promotor
MTTATB pro A-B R3	TAGAAGACAAgggCAGACGAAAGATCTT TTTGATTA	Golden Gate Klonierung, Promotor
MTTATB pro A-B F4	TAGAAGACAAGCCCTGAGACGGCGAGA CAAACACGAAA	Golden Gate Klonierung, Promotor
MTTATB pro A-B R4	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCAGGTGTGCTTCG TTCACCGGCGTTCTATCGTCGGTTTCGTGTTT GTCTCGCCG	Golden Gate Klonierung, Promotor

SALK_003481 LP	AAAGCTTTACCAGCTCCGATC	Genotypisierung
SALK_003481 RP	TGAAAACTTCCCTGCAACAC	Genotypisierung
SALK Lb1.3	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC	Genotypisierung
MTTATB Fwd	atgcttgggcttcttaccggtg	Genotypisierung
MTTATB full Rev	attttctccttctgctgactg	Genotypisierung
MTTATB -22 Rev	gaaaaagcttttcgccttgtg	Genotypisierung
MTTATB -42 Rev	agatcctctgctactctttg	Genotypisierung
AtRISP C-D F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGCTGC GTGTAGCAGGGAG	<i>In vitro</i> Import
AtRISP C-D R1	TAGAAGACAAGatAAAGACGGGCTTTCCACGC	<i>In vitro</i> Import
AtRISP C-D F2	TAGAAGACAATATCAGGCGAAGAACAGAAG	<i>In vitro</i> Import
AtRISP C-D R2	TAGAAGACAACgaATCTTCTTGTGGGTCCCTC	<i>In vitro</i> Import
AtRISP C-D F3	TAGAAGACAATTCGGTTAGGGTCAAGAAT	<i>In vitro</i> Import
AtRISP C-D R4	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTACCGATG AGTAACTTATTCTCTTC	<i>In vitro</i> Import
AtQCR7 C-D F	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCCatggcgtcgctt ctgaaagc	<i>In vitro</i> Import
AtQCR7 C-D R	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTgggagtgtgc gctggtatag	<i>In vitro</i> Import
AtCYC1-1 C-D F	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCCatggttgagg aggagtta	<i>In vitro</i> Import
AtCYC1-1 C-D R	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTgtaaccacgt caagaacca	<i>In vitro</i> Import

**Tabelle 4.** Liste aller Gateway Plasmide dieser Arbeit

Vektor	Verwendung	Quelle
pDONR207	Entry clone, Backbone	(Karimi et al. 2002)
pH2GW7	Expression clone <i>A. thaliana</i> , Backbone	(Karimi et al. 2002)
pB7FWG2	Expression clone <i>A. thaliana</i> , Backbone	(Karimi et al. 2002)
MTTATB pDONR207	Entry clone	diese Arbeit
MTTATB $\Delta$ 22 pDONR207	Entry clone	diese Arbeit
MTTATB $\Delta$ 42 pDONR207	Entry clone	diese Arbeit
MTTATB $\Delta$ 62 pDONR207	Entry clone	diese Arbeit
MTTATB pH2GW7	Expression clone, stable transformation in <i>A. thaliana</i>	diese Arbeit
MTTATB $\Delta$ 22 pH2GW7	Expression clone, stable transformation in <i>A. thaliana</i>	diese Arbeit
MTTATB $\Delta$ 42 pH2GW7	Expression clone, stable transformation in <i>A. thaliana</i>	diese Arbeit
MTTATB $\Delta$ 62 pH2GW7	Expression clone, stable transformation in <i>A. thaliana</i>	diese Arbeit

**Tabelle 5.** Liste aller Golden Gate Vektoren dieser Arbeit

<b>Vektor</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Resistenz</b>	<b>Quelle</b>
LI+Bpi, pUC57	Level I Golden Gate	Gentamycin	(Binder et al. 2014)
LIIβ F 1-2, Xpre2-S (pCAMBIA)	Level II Golden gate/ Stabile Transformation <i>A. thaliana</i>	Spectomycin	(Binder et al. 2014)
LIIc F 1-2, pAMP (Genart®)	Level II Golden Gate/ <i>E. coli</i> Komplementierung	Ampicillin	(Binder et al. 2014)
LIIc F 2-3, pAMP (Genart®)	Level II Golden Gate/ <i>E. coli</i> Komplementierung, Backbone	Ampicillin	(Binder et al. 2014)
LIIc F 4-5, pAMP (Genart®)	Level II Golden Gate/ <i>E. coli</i> Komplementierung, Backbone	Ampicillin	(Binder et al. 2014)
LIIc pTNT	Level II Golden Gate/ <i>In vitro</i> Transkription und Translation	Ampicillin	AG Soll/ Dr. Christopher Carrie

**Tabelle 6.** Liste aller Golden Gate LI Plasmide dieser Arbeit

<b>Vektor</b>	<b>Insert</b>	<b>Quelle</b>
LI Bpil BB03 PUC57	EcTatpro A-B	diese Arbeit
LI Bpil BB03 PUC57	ABI3 A-C	diese Arbeit
LI Bpil BB03 PUC57	mBpro A-B	diese Arbeit
LI Bpil BB03 PUC57	35Sp A-B	(Binder et al. 2014)
LI Bpil BB03 PUC57	SP6/T7pro A-B	AG Soll/ Dr. Christopher Carrie
LI Bpil BB03 PUC57	LI dy B-C	(Binder et al. 2014)
LI Bpil BB03 PUC57	mtTatB C-D	diese Arbeit
LI Bpil BB03 PUC57	AtQCR7 C-D	diese Arbeit
LI Bpil BB03 PUC57	AtRISP C-D	diese Arbeit
LI Bpil BB03 PUC57	AtCYC1 C-D	diese Arbeit
LI Bpil BB03 PUC57	LI dy D-E	(Binder et al. 2014)
LI Bpil BB03 PUC57	c-myc D-E	(Binder et al. 2014)
LI Bpil BB03 PUC57	GFP D-E	(Binder et al. 2014)
LI Bpil BB03 PUC57	6His-FLAG D-E	(Binder et al. 2014)
LI Bpil BB03 PUC57	HA D-E	(Binder et al. 2014)
LI Bpil BB03 PUC57	T7 term G-E	(Binder et al. 2014)
LI Bpil BB03 PUC57	Nos term G-E	(Binder et al. 2014)
LI Bpil BB03 PUC57	35S term G-E	(Binder et al. 2014)
LI Bpil BB03 PUC57	BASTA F-G	(Binder et al. 2014)
LI Bpil BB03 PUC57	LI dy F-G	(Binder et al. 2014)

**Tabelle 7.** Liste aller Golden Gate LII Plasmide dieser Arbeit

Vektor	A-B	B-C	C-D	D-E	E-F	F-G	Quelle
LIIb F 1-2 Xpre2-S (pCAMBIA)	ABI3 A-C	-	MTTATB	LI dy	Nos term	BASTA	diese Arbeit
LIIb F 1-2 Xpre2-S (pCAMBIA)	mBpro	LI dy	MTTATB	c-myc	Nos term	BASTA	diese Arbeit
pTNT	SP6/T7pro	5' beta	AtQCR7	LI dy	T7 term	LI dy	diese Arbeit
pTNT	SP6/T7pro	5' beta	AtRISP	LI dy	T7 term	LI dy	diese Arbeit
pTNT	SP6/T7pro	5' beta	AtCYC1	LI dy	T7 term	LI dy	diese Arbeit
pTNT	SP6/T7pro	5' beta	AtRISP	GFP	T7 term	LI dy	diese Arbeit
pTNT	SP6/T7pro	5' beta	AtRISP	c-myc	T7 term	LI dy	diese Arbeit
pTNT	SP6/T7pro	5' beta	AtRISP	6His-FLAG	T7 term	LI dy	diese Arbeit
pTNT	SP6/T7pro	5' beta	AtRISP	HA	T7 term	LI dy	diese Arbeit

**Tabelle 8.** Liste der verwendeten Antisera

Antiserum	Protein	Organismus	Quelle
anti-ATP $\beta$	beta subunit of the mitochondrial ATP synthase	<i>A. thaliana</i>	Agrisera -AS05085
anti-AOX	mitochondrial alternative oxidase 1/2	<i>A. thaliana</i>	Agrisera -AS04054
anti-CA2	Carbonic anhydrase 2 subunit of complex I	<i>A. thaliana</i>	(Perales et al. 2004)
anti-COB	Cytchrome b subunit of the cytochrome bc1 oxidoreductase (complex III)	<i>A. thaliana</i>	(Meyer et al. 2018)
anti-COX2	COX2 subunit of the cytochrome oxidase (complex IV)	<i>A. thaliana</i>	Agrisera -AS04053A
anti-CYC	Cytochrome c	<i>A. thaliana</i>	Agrisera -AS08343A
anti-CYC1	Cytochrome c1 (complex III)	<i>A. thaliana</i>	PhytoAB - PHY0566S
anti-HSP70	Mitochondrial heat shock protein 70 kDa	<i>A. thaliana</i>	Agrisera -AS08347
anti-LETM	Leucine zipper-EF-hand-containing transmembrane protein	<i>A. thaliana</i>	(Zhang et al. 2012)
anti-MIA40	Mitochondrial intermembrane space import and assembly protein 40	<i>A. thaliana</i>	(Carrie et al. 2010a)
anti-MIC60	Subunit of the MICOS complex 60 kDa	<i>A. thaliana</i>	(Michaud et al. 2016)
anti-MPP $\alpha$	Mitochondrial processing peptidase subunit alpha (complex III)	<i>A. thaliana</i>	PhytoAB - PHY0573S

anti-MTTATB	Mitochondrial TATB	<i>A. thaliana</i>	(Carrie et al. 2016)
anti-MTTATC	Mitochondrial TATC	<i>A. thaliana</i>	(Carrie et al. 2016)
anti-QCR7	Cytochrome bc1 complex subunit 7	<i>A. thaliana</i>	Prof. Dr. James Whelan
anti-RISP	Rieske 2Fe-2S subunit of the cytochrome bc1 reductase (complex III)	<i>A. thaliana</i>	(Carrie et al. 2010b)
anti-SDH4	Succinate dehydrogenase membrane anchor subunit 4 (complex II)	<i>A. thaliana</i>	PhytoAB - PHY0562S
anti-TIM17-2	Subunit of the translocase of the inner mitochondrial membrane, 17kDa	<i>A. thaliana</i>	(Murcha et al. 2005a)
anti-TIM9	Subunit of the translocase of the inner mitochondrial membrane, 9 kDa	<i>A. thaliana</i>	(Murcha et al. 2005a)
anti-TOM20-2	Subunit of the translocase of the outer mitochondrial membrane, 20kDa	<i>A. thaliana</i>	(Lister et al. 2007)
anti-TOM40	Subunit of the translocase of the outer mitochondrial membrane, 40kDa	<i>A. thaliana</i>	(Carrie et al. 2010b)

**Tabelle 9.** Liste aller signifikant unterschiedlichen Häufigkeiten von Proteinen in massenspektrometrisch untersuchten Elutionen von MTTATB im Verhältnis zum Präserum.

Anreicherungsfaktor in MTTATB	T-Test	Gen ID /Protein	Beschreibung
60,54	0,000007	AT5G43680.2	MTTATB
2,55	0,000213	AT4G37910.1	Mitochondrial heat shock protein 70-1 (mtHsc70-1)
2,49	0,023824	AT1G54220.2	Dihydrolipoamide acetyltransferase (PDCE2-3)
2,07	0,015211	AT2G28000.1	Chaperonin 60 alpha 1 (CPN60A1)
1,90	0,017914	AT1G03090.2	3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase complex subunit (MCCA)
1,77	0,028654	AT3G07770.1	Heat shock protein 89.1 (HSP89.1)
1,55	0,000173	AT3G13860.1	Heat shock protein 60-3A (HSP60-3A)
1,42	0,006709	AT1G03860.3	Prohibitin 2 (PHB2)
1,40	0,046604	AT1G11860.3	Glycine decarboxylase T-protein (GDC-T)
1,39	0,002034	AT3G23990.1	Chaperonin HSP60-3B (HSP60-3B)
1,33	0,001692	AT2G33210.2	Heat shock protein 60-2 (HSP60-2)
0,81	0,047166	AT1G47420.1	Succinate dehydrogenase subunit (SDH5)
0,80	0,047724	AT4G01100.1	Adenine nucleotide transporter 1 (ADNT1)
0,80	0,035919	AT5G46800.1	A bout de souffle (BOU)
0,80	0,047622	AT5G55610.1	Isopentenyl-diphosphate delta-isomerase
0,77	0,003594	AT1G55160.2	WAS/WASL-interacting family
0,75	0,046795	AT3G27240.1	Ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase subunit (cyt c1-2)
0,73	0,035106	AT4G12340.1	Copper ion binding
0,72	0,043469	AT3G20000.1	Translocase of the outer mitochondrial membrane 40 (TOM40-1)
0,70	0,008695	AT3G20390.1	Reactive intermediate deaminase A (RIDA)
0,70	0,002404	AT5G63400.1	Adenylate kinase (ADK1)

0,70	0,045194	AT4G19880.1	Glutathione S-transferase family protein
0,68	0,038195	AT5G15910.1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
0,66	0,003780	AT5G09810.1	Actin 7 (ACT7)
0,65	0,025945	AT5G40810.2	Ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase subunit (cyt c1-1)
0,65	0,004305	AT4G22310.1	Uncharacterised protein family (UPF0041)
0,63	0,011799	AT3G15090.1	GroES-like zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein
0,63	0,019812	AT3G54110.1	Plant uncoupling mitochondrial protein 1 (PUMP1)
0,62	0,026163	AT2G40765.1	Ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase subunit (QCR10)
0,61	0,005286	AT4G11010.1	nucleoside diphosphate kinase 3 (NDPK3)
0,60	0,023018	AT1G51650.1	ATP synthase subunit (ATP epsilon)
0,59	0,015164	AT3G01280.1	Voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1)
0,56	0,000170	AT4G20760.1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
0,53	0,027787	AT3G10370.1	FAD glycerol-3-phosphate dehydrogenase (SDP6)
0,52	0,007165	AT5G57490.1	Voltage-dependent anion channel 4 (VDAC4)
0,52	0,000013	AT5G15090.2	Voltage-dependent anion channel 3 (VDAC3)
0,51	0,000919	AT5G50370.1	Adenylate kinase family protein
0,49	0,001284	AT5G67500.1	Voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2)
0,38	0,015325	AT4G16155.1	Dihydrolipoyl dehydrogenase (LPD2)

# Curriculum Vitae

## Persönliche Daten:

Nachname: **Schäfer**  
Vornamen: **Kerstin Alexandra**  
Geburtstag: 22.08.1990  
Geburtsort: München, Deutschland  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

## Ausbildung:

seit 02/2017 **Doktorandin der Naturwissenschaften** (Dr. rer. nat.), Promotion  
Life Science  
im Rahmen des Programms der LSM Graduate School  
Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland  
PhD thesis: Twin Arginin Translokation in Mitochondrien höherer  
Pflanzen

10/2014 - 12/2016 **Master of Science in Biology**  
Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland  
Masterarbeit: Characterization of plant mitochondrial inner  
membrane translocase pathway components

10/2010 - 07/2013 **Bachelor of Science in Biologie**  
Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland  
Bachelorarbeit: Studien zur Lokalisierung von Transportproteinen  
in *Pisum sativum*.

09/2000 - 06/2009 **allgemeine Hochschulreife (Abitur)**  
Louise-Schroeder-Gymnasium, München, Deutschland

## Poster Präsentationen:

04/2019 International Conference of Plant Mitochondrial Biology (ICPMB  
2019), Ein Gedi, Israel  
Auszeichnung: 1. Platz „Best Poster Presentation“  
Schäfer, K., Klingl., A., Soll, J. and Carrie, C.  
„The plant mitochondrial TAT pathway is essential for complex III  
biogenesis“

04/2018 Mitochondrial Biology Symposium, Kyoto, Japan  
Schäfer, K., Klingl., A., Soll, J., and Carrie, C.  
„The plant mitochondrial TAT pathway is essential for complex III  
biogenesis“

04/2018 International Young Mito Conference, Kyoto, Japan  
Schäfer, K., Klingl., A., Soll, J., and Carrie, C.  
„The plant mitochondrial TAT pathway is essential for complex III  
biogenesis“

09/2017 ISE-G Meeting, Konstanz, Deutschland  
Schäfer, K., Soll, J. and Carrie, C.  
„Twin Arginine Translocation in plant mitochondria“

## Publikationen

Diese Arbeit wurde größtenteils veröffentlicht in:

**Schäfer K.**, Künzler, P., Schneider, K., Klingl, A., Eubel, H., Carrie, C.

The Plant Mitochondrial TAT Pathway Is Essential for Complex III Biogenesis, Current Biology (2020), <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.01.001>

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt wurde.

München, den 28.04.2020

---

Kerstin Schäfer

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich zuvor nicht versucht habe, anderweitig eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen. Die vorliegende Dissertation wurde keiner weiteren Prüfungskommission weder in Teilen noch als Ganzes vorgelegt.

München, den 28.04.2020

---

Kerstin Schäfer

## **Versicherung der Co-Autoren**

Hiermit wird im Namen aller Co-Autoren versichert, dass sämtliche Passagen dieser Arbeit, die wörtlich oder nahezu wörtlich aus der unten aufgeführten Veröffentlichung entnommen wurden, vom Autor dieser Dissertation selbst stammen.

München, den 28.04.2020

---

Dr. Christopher Carrie

**Schäfer K.**, Künzler, P., Schneider, K., Klingl, A., Eubel, H., Carrie, C.

The Plant Mitochondrial TAT Pathway Is Essential for Complex III Biogenesis, *Current Biology* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.01.001>

Das Copyright des Verlags wird dadurch gewahrt, dass es sich in der vorliegenden Dissertation um eine akademische, nicht-kommerzielle Veröffentlichung handelt und die entsprechenden Originalartikel ordnungsgemäß zitiert werden.

## **Danksagung**

Zuletzt möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in den letzten Jahren unterstützt haben, um diese Arbeit zu ermöglichen.

Als erstes danke ich Professor Dr. Jürgen Soll für die Bereitstellung meines Laborplatzes, zur praktischen Umsetzung meiner Theorien und sein stets offenes Ohr für jede Angelegenheit.

Als nächstes möchte ich mich vor allem bei Chris bedanken, der mich mit seiner ausgezeichneten wissenschaftlichen Expertise zuerst durch meine Masterarbeit und letztendlich durch die Zeit der Promotion geleitet hat, um dieses Projekt zu verwirklichen.

Außerdem danke ich Dr. Holger Eubel und Patrick Künzler für die Durchführung und Evaluation des Massenspektrometrie und Prof. Dr. Andreas Klingl und Dr. Katja Schneider für die tollen Aufnahmen der Ultrastruktur meiner Mitochondrien.

Vielen Dank auch nochmal an die Mitglieder meines TAC Komitees – Prof. Dr. Jürgen Soll, Prof. Dr. Andreas Klingl, Dr. Chris Carrie und PD Dr. Kai Hell – und die weiteren Prüfer meiner Arbeit und Disputation. Ebenfalls danke ich PD Dr. Bettina Bölter für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ein besonders großer Dank geht an meine Kolleginnen Annabel, Carina und Petra für Lichtblicke in dunklen Momenten, tolle Unterhaltungen über Gott und die Welt und einen Grund jeden Tag ins Labor zu kommen. Ebenfalls danke ich allen anderen Mädels, die das Ende der Ära AG Soll gestalteten – Renuka, Mel M, Mel B, Tamy, Sebnem – und auch allen Gruppenleitern und ehemaligen Kollegen, die mich in den letzten Jahren durch die Promotion begleitet haben.

Wie Albert Einstein schon sagte, „Es gibt viele Wege zum Glück – Einer davon ist aufhören zu jammern“.

Außerdem möchte ich mich bei allen Familienangehörigen, Freunden und Frau Müller bedanken, die mich stetig unterstützt und mir beigestanden haben.

Ein besonders großes DANKE geht hierbei an meine Eltern, meinen Bruder und meine engsten Freunde Resi, Vroni, Debby, Claudi und Kathi.

Ohne euch wäre nichts möglich gewesen und dafür werde ich immer dankbar sein.