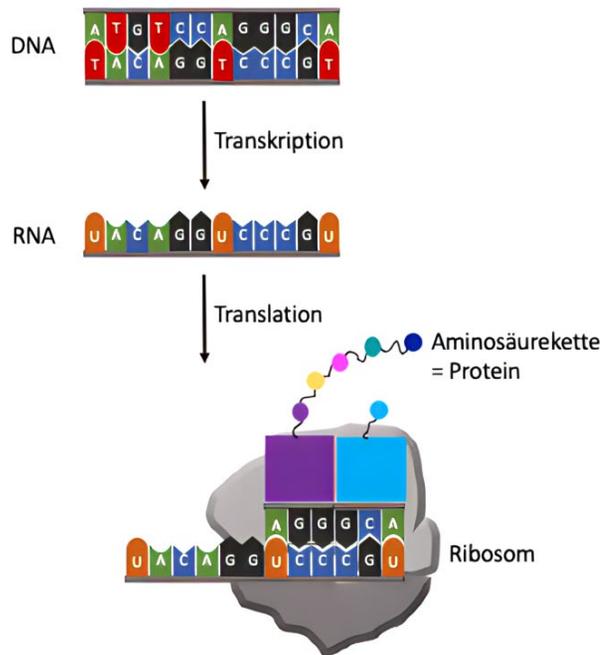


Untersuchung eines mitochondrialen Proteins führt zu neuen Erkenntnissen über die Proteinbiosynthese in pflanzlichen Mitochondrien

— *Arabidopsis thaliana* – die Acker-Schmalwand – wird in der Landwirtschaft lediglich als Unkraut wahrgenommen. In der Biologie stellt sie aber einen Modellorganismus dar, der vor allem in der Grundlagenforschung Anwendung findet. Die dort gewonnenen Erkenntnisse können dann auch auf Nutzpflanzen übertragen werden. Bereits seit den 1940er Jahren wird *Arabidopsis* als Modellorganismus verwendet und noch immer gibt es zahlreiche Prozesse auf zellulärer Ebene, die noch nicht entschlüsselt sind und weiterer Forschung bedürfen. Auch am Botanischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel erfreut sich *A. thaliana* großer Beliebtheit. In der Abteilung ›Botanische Genetik und Molekularbiologie‹ interessieren wir uns besonders für die Entschlüsselung molekularer Prozesse innerhalb der pflanzlichen Mitochondrien. Hierbei handelt es sich um ein zelluläres Organell, das verschiedene Funktionen hat, aber insbesondere der Bereitstellung von Energie dient. Daher spricht man umgangssprachlich auch oft von den Kraftwerken der Zelle. Die Mitochondrien sind im Rahmen eines endosymbiontischen Prozesses aus ursprünglich freilebenden alpha-Purpurbakterien entstanden.¹ Als Relikt davon besitzen Mitochondrien ein eigenes kleines Genom und eine eigene Maschinerie für die Genexpression. Dies schließt auch sogenannte Ribosomen ein, molekulare Maschinen, an denen die Proteinbiosynthese stattfindet. So kann ein kleiner Teil der mitochondrialen Proteine direkt in den Mitochondrien erzeugt werden.

Im Detail bedeutet dies, dass zunächst die Informationen, die in der DNA gespeichert sind, in RNA umgeschrieben werden. Diesen Prozess bezeichnet man als Transkription. Im Anschluss daran erfolgt die Synthese der Proteine, bei der die nun auf der Boten-RNA (mRNA) vorliegende Information in eine bestimmte Abfolge von Aminosäuren – den Bausteinen der

1 Vgl. Michael W. Gray: Mitochondrial Evolution, in: Science 283 (1999), S. 1476-1481.



↑ **Abb. 1.** Schematische Darstellung der Genexpression. Die DNA bildet das Ausgangsprodukt, die hier enthaltenen Informationen werden zunächst in RNA überschrieben (Transkription). Im Anschluss daran werden diese Informationen mit Hilfe der Ribosomen zu Proteinen übersetzt (Translation).

Proteine – übersetzt wird. Dieser Vorgang wird als Translation bezeichnet und von den sogenannten Ribosomen durchgeführt.

In pflanzlichen Mitochondrien findet man nur noch die Information für insgesamt 57 Gene, von denen 33 für Proteine kodieren. Im Laufe der mitochondrialen Evolution gingen die meisten der bakteriellen Vorläufer-Gene entweder verloren oder wurden in den Zellkern übertragen, wodurch kernkodierte Gene entstanden, deren Proteinprodukte für die mitochondrialen Funktionen wichtig wurden.² Um diese Proteine in die Mitochondrien zu transportieren, entwickelte sich im Laufe der Evolution eine Maschinerie für den Proteinimport. Darüber hinaus kommunizieren Mitochondrien und der Zellkern über retrograde Signale, also Signale von den Mitochondrien an den Zellkern, um die Expression kernkodierter mitochondrialer Gene in Abhängigkeit von der mitochondrialen Aktivität zu regulieren.

Die mitochondriale Genexpression ist ein komplexer Mechanismus, der bisher nur unzureichend verstanden wird. Allerdings weiß man, dass die Regulierung der Genexpression in

2 Vgl. José M. Gualberto / Kathleen J. Newton: Plant mitochondrial genomes: Dynamics and mechanisms of mutation, in: Annual Review of Plant Biology 68 (2017), S. 225–252.



← **Abb. 2.** Wachstumsvergleich von Wildtyp (links) und Pflanzen mit defektem DWEORG1 (rechts) mit vier Wochen alten Pflanzen.

den Mitochondrien durch Modifikationen der mRNA kommt, die als RNA-Prozessierung bezeichnet werden. In Pflanzen werden diese Schritte vor allem durch Proteine aus einer riesigen Protein-Familie der sogenannten *pentatricopeptide-repeat* Proteine – oder kurz PPR-Proteine – durchgeführt, von denen es in Pflanzen viele hundert gibt. Charakteristisch sind Blöcke von 35 Aminosäuren, die wiederholt vorkommen.³ Die Familie der PPR-Proteine unterteilt sich in zwei Klassen: die P- und die PLS-Klasse. Diese unterscheiden sich sowohl im Aufbau als auch in ihren Aufgaben, die sie übernehmen können. Im Gegensatz zur P-Klasse weist die PLS-Klasse einen diverseren Aufbau auf und es befinden sich dort zusätzlich enzymatische Domänen, die der P-Klasse fehlen. Man findet diese Proteine, wenn auch in deutlich geringerer Anzahl, auch beim Menschen, wo sie ähnliche Funktionen aufweisen. Der charakteristische Aufbau der PPR-Proteine, mit sich wiederholenden Blöcken von 35 Aminosäuren, die die Bindung an RNA-Moleküle sicherstellen, erlaubt es ihnen, spezifisch an eine Ziel-RNA zu binden, wodurch weitere Proteine rekrutiert oder direkt Modifikationen an der RNA durchgeführt werden können. Fallen diese Schritte weg, kommt es zu einer fehlerhaften Proteinsynthese oder diese bleibt komplett aus.

*

In unserer Arbeitsgruppe wurden zwei verschiedene PPR-Proteine – das POCO1 und DWEORG1 Protein – pflanzlicher Mitochondrien näher untersucht und charakterisiert. Bei Pflanzen, die POCO1 nicht mehr bilden können, ist ein früherer Blühzeitpunkt im Vergleich

³ Vgl. Alice Barkan / Ian Small: Pentatricopeptide repeat proteins in plants, in: Annual Review of Plant Biology 65 (2014), S. 415-442.

zum Wildtyp zu beobachten.⁴ Im Rahmen der hier vorgestellten Forschungsarbeit wurden allerdings Pflanzen untersucht, die das Protein DWEORG1 nicht mehr bilden können (Knock-out Pflanzen). Der Wegfall dieses Proteins führt zu einem verringerten Wachstum der sonst gesunden Pflanzen.

Aufgrund dieses Erscheinungsbildes wurde auch der Name für das Protein gewählt; denn Dwoerg ist das altenglische Wort für Zwerg. Dieser Wachstumsdefekt ist auf eine gestörte Proteinbiosynthese der Mitochondrien zurückzuführen, die durch das Fehlen von DWEORG1 bedingt ist.

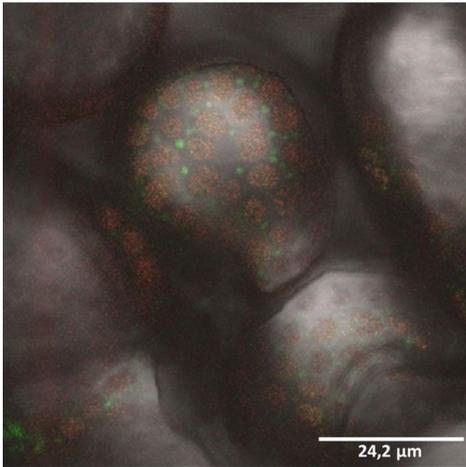
Bis vor einigen Jahren war man davon ausgegangen, dass PPR-Proteine ausschließlich an den RNA-Prozessierungsschritten beteiligt sind. 2019 wurde dann gezeigt, dass einige der P-Klasse Proteine als Bestandteil der mitochondrialen Ribosomen an der Regulierung der Genexpression in Mitochondrien beteiligt sind.⁵ Ribosomen bestehen stets aus zwei Untereinheiten: Einer großen und einer kleinen Untereinheit (LSU bzw. SSU). Beide stellen eine Kombination von bestimmten ribosomalen RNAs (rRNAs) und Proteinen dar, die man als Ribonukleoproteinkomplex bezeichnet.

Wie bereits eingangs erläutert, findet an den Ribosomen die Proteinbiosynthese und damit die sogenannte Translation statt, bei der mit Hilfe der transfer-RNAs (tRNAs), die Kodone der mRNA in eine korrespondierende Folge von Aminosäuren übersetzt werden. Spannend ist, dass es Hinweise gibt, dass die Ribosomen die Genexpression über den Prozess der Proteinbiosynthese regulieren können. Dies kann beispielsweise über die Ribosomendichte der mRNA (Translationseffizienz) geschehen. Bei der Proteinbiosynthese können sich mehrere Ribosomen gleichzeitig an verschiedenen Stellen einer mRNA befinden und parallel das gleiche Protein synthetisieren. Je mehr Ribosomen also an einer mRNA sitzen, desto höher ist deren Translationseffizienz, weil immer größere Proteinmengen gebildet werden. Die meisten Proteine, die vom pflanzlichen mitochondrialen Genom kodiert werden, üben Funktionen in der Atmungskette der Mitochondrien aus, die aus fünf großen Proteinkomplexen besteht, die letztlich für die Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) – dem Energielieferanten aller Zellen – verantwortlich sind. Die restlichen Proteine bilden Bestandteile der Ribosomen oder dienen anderen mitochondrialen Prozessen. In der Regel weisen die mRNAs der Atmungskettenproteine eine höhere Translationseffizienz auf, als alle anderen mRNAs.⁶

4 Vgl. Hossein Emami / Frank Kempken: PRECOCIOUS1 (POC01), a mitochondrial pentatricopeptide repeat protein affects flowering time in *Arabidopsis thaliana*, in: *The Plant Journal* 100 (2019), S. 265-278.

5 Vgl. Florent Waltz u.a.: Small is big in *Arabidopsis* mitochondrial ribosome, in: *Nature Plants* 5 (2019), S. 106-117.

6 Vgl. Hanna Janska / Malgorzata Kwasniak: Mitoribosomal regulation of OXPHOS biogenesis in plants, in: *Frontiers in Plant Science* 5 (2014), S. 1-6.



← **Abb. 3.** Bild von Pflanzenzellen aufgenommen mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop. In Rot sind die Chloroplasten durch ihre Autofluoreszenz zu erkennen, in Grün die Mitochondrien (aufgrund des an das grün fluoreszierende Protein (GFP) gekoppelte DWEORG1).

*

In unserer Forschungsarbeit *The Ptype pentatricopeptide repeat protein DWEORG1 is a nonpreviously reported rPPR protein of Arabidopsis mitochondria* (Das P-Klasse *pentatricopeptide-repeat* Protein DWEORG1 ist ein bisher nicht beschriebenes rPPR-Protein in Arabidopsis Mitochondrien) wurde das mitochondrial lokalisierte P-Klasse PPR-Protein DWEORG1 identifiziert und gezeigt, dass es mit mitochondrialen Ribosomen in *A. thaliana* assoziiert ist. Für die Untersuchungen wurden Pflanzen verwendet, die nicht mehr in der Lage sind, das DWEORG1 Protein (Knock-out Pflanzen) zu bilden, und zum Vergleich unveränderte Pflanzen – man spricht hier vom Wildtyp. Knockout-Pflanzen zeigen eine globale Abnahme der mitochondrialen Translationseffizienz und eine signifikante Verringerung der mitochondrialen rRNA-Stabilität, was auf eine Destabilisierung der mitochondrialen Ribosomen hindeutet.

Zunächst zeigten wir, dass das DWEORG1 Protein in den Mitochondrien lokalisiert ist. Hierfür verwendeten wir eine künstliche Fusion von DWEORG1 mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP). Dieses Protein stammt aus der Qualle *Aequorea victoria* und fluoresziert bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün. Mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops wurden grün leuchtende Mitochondrien nachgewiesen und damit der Aufenthaltsort von DWEORG1.

Typisch für ribosomale PPR-Proteine ist eine hohe Kopiezahl in den Mitochondrien. Während reguläre PPR-Proteine 1–20x pro Mitochondrion vorkommen, sind ribosomale PPRs etwa 440–2200-fach vorhanden. DWEORG1 besitzt etwa 930 Kopien pro Mitochondrion.⁷ Basierend

7 Vgl. Philippe Fuchs u.a.: Single organelle function and organization as estimated from Arabidopsis mitochondrial proteomics, in: Plant Journal 101 (2020), S. 420–441.

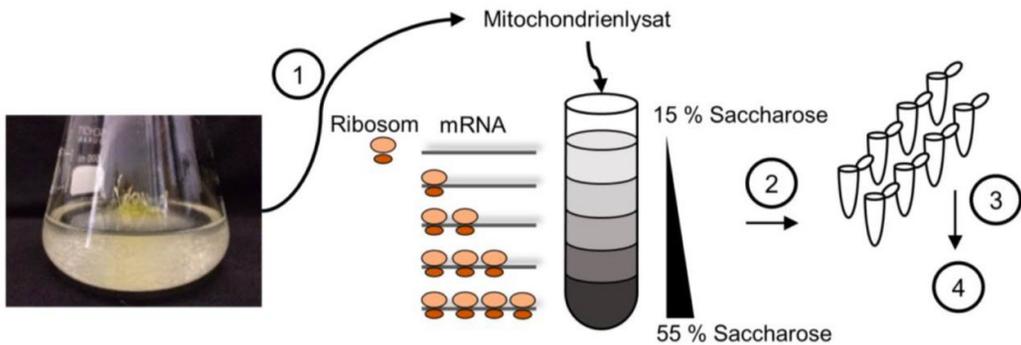
auf diesem Befund lag die Annahme nahe, dass auch DWEORG1 ein ribosomales PPR-Protein sein könnte. Daher haben wir eine Ribosomenprofilanalyse durchgeführt, bei der die Ribosomendichte der mRNAs der Knockout-Pflanzen sowie des Wildtyps bestimmt und in Relation zueinander gesetzt werden. Die Methode ist sehr kompliziert und wird nur von wenigen Spezialisten beherrscht, weshalb wir mit dem Labor von Dr. Hakim Mireau am INRA in Paris zusammengearbeitet haben. So waren wir in der Lage, die Translationseffizienz aller mitochondrialen mRNAs im Wildtyp und der Mutante miteinander zu vergleichen. Zusammenfassend stellten wir fest, dass für fast alle mitochondrial kodierten mRNAs in der Knockout-Pflanze eine Abnahme der Ribosomenbeladung der mRNAs vorliegt. Dabei fielen vier mRNAs besonders auf, deren translatierte Proteine Funktionen in der Atmungskette und den Ribosomen ausführen.



Ein direkter Nachweis der Bindung von DWEORG1 an die Ribosomen ist durch die schon Jahrzehnte alte Methode der Zucker-Dichtegradienten-Zentrifugation möglich. Hierfür schichtet man in einem Zentrifugenröhrchen unterschiedlich hoch konzentrierte Zuckerlösungen, die dadurch eine unterschiedliche Dichte aufweisen, vorsichtig aufeinander. Dann isoliert man die verschiedenen Zellbestandteile und gibt sie oben auf den Gradienten. Es folgt dann eine stundenlange Zentrifugation bei hoher Umdrehungszahl. Dabei wandern die Zellbestandteile im Gradienten an die Positionen, die ihrer eigenen Dichte entsprechen. Dies gilt auch für Ribosomen, die an eine mRNA gebunden sind. Bei mit den Ribosomen assoziierten Proteinen sollten diese in derselben Schicht wie die Ribosomen nachweisbar sein. Dieser Nachweis wurde für das DWEORG1 Protein erbracht, sodass wir von einer Assoziation mit den Ribosomen ausgehen. Zudem konnte mit dieser Methode bestätigt werden, dass eine geringere Translationseffizienz in den untersuchten Mitochondrien vorliegt. Die Dichte des mRNA-Ribosomen-Komplexes steigt mit der Anzahl der gebundenen Ribosomen an, sodass man diese dann in verschiedenen Schichten des Gradienten nachweisen kann.

Je höher die Dichte, desto weiter unten im Gradienten befinden sich RNA und daran gebundene Ribosomen. Bei einer hohen Translationseffizienz sollten sich demnach vor allem in den unteren Schichten Ribosomen nachweisen lassen, wohingegen bei einer geringeren Effizienz eine Verschiebung in die oberen Schichten erkennbar sein sollte. Letzteres zeigten wir für die Ribosomen in den Mitochondrien der Knock-out Pflanzen, wodurch die Ergebnisse der Ribosomenprofilanalyse noch einmal bestärkt wurden.

Diese ganz neue Erkenntnis zeigt, dass es sich bei dem Protein DWEORG1 um einen variablen Teil der Ribosomen handelt und untermauert die Hypothese der Heterogenität der mitochondrialen Ribosomen, die eine hochdynamische Zusammensetzung der mitochondrialen



↑ **Abb. 4.** Beispielhafte Darstellung (schematisch) der Auftrennung von mRNAs, die mit einer unterschiedlichen Anzahl von Ribosomen beladen sind. 1: Isolierung der Mitochondrien aus Pflanzenmaterial (sterile Wurzelkulturen); 2: Trennung der einzelnen RNA-Ribosomen-Komplexe über einen Zucker-Dichte-Gradienten; 3 und 4: Entnahme der einzelnen Fraktionen und Untersuchung dieser mit molekularbiologischen Methoden.

Translationsmaschinerie vorhersagt.⁸ Unterschiedlich zusammengesetzte Ribosomen ermöglichen eine Regulierung der Proteinbiosynthese unter verschiedenen Umweltbedingungen, während verschiedener Entwicklungsstadien oder in verschiedenen Geweben. Tatsächlich hat man in *A. thaliana* schon früher nachgewiesen, dass sich die Zusammensetzung der mitochondrialen Ribosomen in Fruchtblättern und Blättern unterscheidet.⁹

Eine weitere Hypothese – die sogenannte Ribosomen-Filterhypothese – besagt, dass Ribosomen nicht nur der passive Ort für die Translation sind, sondern diese und damit auch die Genexpression regulieren, indem sie als Reaktion auf verschiedene physiologische Bedingungen und verschiedene Entwicklungsstadien nur bestimmte mRNAs für die Translation auswählen.¹⁰ Die dynamische Zusammensetzung der Ribosomen macht im Hinblick auf diese Hypothese sehr viel Sinn, da unterschiedliche ribosomale Proteine unter verschiedenen Bedingungen wichtig für die Expression unterschiedlicher Gene sein können. Ein Prozess in pflanzlichen Mitochondrien, der bereits nachweislich über die Proteinsynthese reguliert wird, ist die Biogenese der Atmungsketten-Komplexe. Auch DWEORG1 scheint eine solche regulierende Rolle in den mitochondrialen Ribosomen zu spielen. Die Heterogenität der Ribosomen wäre eine gute Erklärung für die milden Auswirkungen des Fehlens von DWEORG1 in den Knock-

⁸ Vgl. Jos H.M. Schippers / Bernd Mueller-Roeber: Ribosomal composition and control of leaf development, in: Plant Science 179 (2010), S. 307–315.

⁹ Vgl. Debra J Skinner u.a.: The Arabidopsis HUELLENLOS gene, which is essential for normal ovule development, encodes a mitochondrial ribosomal protein, in: The Plant Cell 13 (2001), S. 2719–2730.

¹⁰ Vgl. Pedro Robles / Victor Quesada: Emerging roles of mitochondrial ribosomal proteins in plant development, in: International journal of molecular sciences 18 (2017), S. 1–12.

out-Pflanzen, denn eine variable Zusammensetzung der Ribosomen stellt deren Funktion auch dann noch sicher, wenn ein einzelnes ribosomales Protein fehlt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Erkenntnisse der hier vorgestellten Forschungsarbeit das Wissen um die Translation in pflanzlichen Mitochondrien erweitert haben und dass unsere Ergebnisse sowohl die Ribosomen-Filterhypothese als auch die Hypothese der Heterogenität stützen.

Autor*innen

Dr. Stefanie Grüttner ,

geboren 1987 in Hildesheim, Master of Science 2013, Studium der Biologie in Kiel, Promotion 2021 an der Universität Kiel. Seit 01/2022 wissenschaftliche Mitarbeiterin (Postdoktorandin) in Kiel.

E-Mail: sgruettner@bot.uni-kiel.de

Prof. Dr. Frank Kempken ,

geboren 1960 in Moers, 1985 Diplom an der Ruhr-Universität Bochum, 1988 Promotion, von 1989–1990 Post-Doc in Gainesville (USA), Habilitation 1996 an der Ruhr-Universität Bochum, Universitäts-Professor in Kiel seit Oktober 2001.

E-Mail: fkempken@bot.uni-kiel.de

 **Open Access** // Der Artikel ist unter der Creative-Commons-Lizenz Namensnennung 4.0 International veröffentlicht. Den Vertragstext finden Sie unter: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>. Bitte beachten Sie, dass einzelne, entsprechend gekennzeichnete Teile des Werks von der genannten Lizenz ausgenommen sein bzw. anderen urheberrechtlichen Bedingungen unterliegen können.