Analyse der Funktion von MORF-Proteinen im mitochondrialen RNA-Editing in Arabidopsis thaliana

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat. der Fakultät für Naturwissenschaften der Universität Ulm

vorgelegt von

Franziska Glass

aus Wernigerode

Ulm 2016

Amtierender Dekan der Fakultät für Naturwissenschaften:

Prof. Dr. Peter Dürre

Erstgutachter:

Prof. Dr. Axel Brennicke, Abteilung Molekulare Botanik, Universität Ulm

Zweitgutachter:

PD. Dr. habil. Mizuki Takenaka

Datum der Promotion:

25.04.2017

Inhaltsverzeichnis

A	obrevia	itur i	ınd Glossar	1
1	Einl	eitur	1g	4
	1.1	RNA	A-Editing	4
	1.2	PPR	-Proteine und die Erkennung des <i>cis</i> -Elementes von Editingstellen	7
	1.2.1	1	Die E-Domäne und ihr Rolle im Editing in Arabidopsis thaliana	9
	1.2.2	2	Die DYW-Domäne und ihre putative Funktion im Editosom	10
	1.3	MOI	RF-Proteine als wichtige Co-Faktoren des Editing in <i>A. thaliana</i>	11
	1.4	Ziel	setzung der Arbeit	12
2	Mat	erial	und Methode	13
	2.1	Mat	erial	13
	2.1.1	1	Pflanzenmaterial	13
	2.1.2	2	Bakterien- und Hefestämme	13
	2.1.3	3	Plasmide	13
	2.1.4	4	Enzyme	14
	2.1.	5	Oligonukleotide	15
	2.1.0	6	Chemikalien	15
	2.1.2	7	Kits	16
	2.1.8	8	Analyseprogramme	16
	2.2	Met	hode	16
	2.2.2	1	In-Fusion® HD Cloning	16
	2.2.2	2	Kultivierung, Transformation und Selektion von Saccharomyces cerevisiae	17
	2.2.3		Kultivierung, Transformation und Selektion von Arabidopsis thaliana	21
	2.2.4	4	Präparation von Ovularen für die Differenzialinterferenzkontrast (DIC)-	
	Mik	rosko _	opie	23
_	2.2.	5	Analyse des Editing-Phänotyps und statistische Auswertung	24
3	Erge	ebnis	Se	28
	3.1	MOI	RF-Dimere als Interaktionspartner spezifischer PPR-Proteine	28
	3.2	Ana	lyse der bindungsrelevanten Sequenzareale von MORF-Proteinen <i>in planta</i>	29
	3.2.1 Edit	1 ingst	Verifizierung der Komplementierbarkeit der in der Mutante <i>morf1-1</i> betroffene Follen	n 25
	3.2	gst 2	Eunktionalitätsanalvse der MORE1-MORE3-Chimären in der Mutante <i>morf1-1</i>	
3.2.2			Funktionalitätsanalyse der MORE3-MORE1-Chimären in der Mutante <i>morf1-1</i>	
4	Diel	, 1100i	on	
	4.1	Trin	nere aus MORF- und PPR-Proteinen als funktionelle Einheit im Editosom	
	4.2	Ana	lyse der bindungsrelevanten Sequenzareale von MORF-Proteinen	83

	4.2.1 funktior	Der MORF1-basierte N-Terminus der M1M3-Chimären ist an der Bildung eines nellen Editosoms beteiligt
	4.2.2 funktior	Der verlängerte C-Terminus des Proteins MORF1 ist nicht an der Bildung eines nellen Editosoms mit PPR –Proteinen der E-Subklasse beteiligt86
	4.2.3 beteilig	Motiv 1 ist an der Determinierung der Interaktionspartner von MORF-Proteinen
	4.2.4	Ausblick
5	Zusamm	1enfassung
6	Summar	ry
7	Abbildu	ngsverzeichnis
8	Tabeller	103 nverzeichnis
9	Literatu	rverzeichnis
10	Anhai	ng
11	Publil	kationsliste
1	1.1 Puł	likationen
1	1.2 Koi	ıgressvorträge
1	1.3 Pos	ter
12	Danks	sagung
13	Eides	stattliche Erklärung
14	Currio	culum vitae

Abbreviatur und Glossar

А	Adenin
atp4	Transkript der ATP-Synthase, Untereinheit 4
atp9	Transkript der ATP-Synthase, Untereinheit 9
Bidest	zweifach destilliertes Wasser
BiFC	<i>Bimolecular Fluorescence Complementation</i> , Bimolekulare Fluoreszenz- komplementation
bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
С	Cytosin oder Cytidin
ccb203	Transkript des Cytochrom C – Biogenese-Gens ORF203
ccb206	Transkript des Cytochrom C -Biogenese-Gens ORF 206
ccb256	Transkript des Cytochrom C -Biogenese-Gens ORF 256
ccb452	Transkript des Cytochrom C -Biogenese-Gens ORF 452
cDNA	complementary Desoxyribonukleinsäure
<i>cis</i> -Element	RNA-Erkennungssequenz der PPR-Proteine 5´des zu editierenden C
CLB	RNA-Editingfaktor, PPR-Protein, Chloroplast Biogenesis
Col	Ökotyp Columbia, Arabidopsis thaliana
CRR	RNA-Editingfaktor, PPR-Protein, Chlororespiratory Reduction
cox2	Transkript der Cytochrom C-Oxydase, Untereinheit 2
cox3	Transkript der Cytochrom C-Oxydase, Untereinheit 3
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DYW1	RNA-Editingfaktor, PPR-Protein ohne detektierbare PLS-Motive
E	Extended
EMS	Ethylmethansulfonat
ε	Editingeffizienz

G	Guanin
ggf.	gegebenenfalls
in frame	das Leseraster des Triplett-Kodes bleibt erhalten
knock down	Pflanzenlinie, in der die Expression eines funktionalen Proteins beeinträchtigt, aber nicht vollkommen ausgeschaltet ist
matR	Transkript der Maturase MatR
MCS	Multiple Cloning Site
MEF	RNA-Editingfaktor, PPR-Protein , Mitochondrial RNA Editing Factor
MORF	RNA-Editingfaktor, Multiple Organellar RNA Editing Factor
MORF-Box	konservierter Bereich in MORF-Proteinen, ${\sim}100$ Aminosäuren
mRNA	messenger RNA
miRNA	micro RNA
nad1-7	Transkript NADH-Dehydrogenase, jeweils Untereinheit 1-7
ndhD-1	Transkript der NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase
ORF	Open Reading Frame, offenes Leseraster
orfX	Transkript für das hypothetische Homolog zum <i>MttB</i> -Gen (<i>Membrane Targeting and Translocation</i>) in <i>E.coli</i>
ORRM	RNA-Editingfaktor, Organelle RNA Recognition Motif
ОТР	RNA-Editingfaktor, PPR-Protein, Organelle Transcript Processing
0Z1	RNA-Editingfaktor, Organelle Zinc Finger Editing Factor 1
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PPR	Pentatricopeptide Repeat
PUF	Pumilio and FBF Homology
QED1	Quintuple Editing Factor 1
RIP	RNA-Editingfaktor, RNA Editing Factor Interacting, Synonym für MORF
RNA	Ribonukleinsäure
rpl5	Transkript für das ribosomale Protein L5
rps3	Transkript für das 30S ribosomale Protein S3

rps4	Transkript für das ribosomale Protein S4
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SNP	Single Nucleotide Polymorphism, Einzelnukleotid-Polymorphismus
Т	Thymin
TALE	Transcription Activator-Like Effektor
T-DNA	Transfer DNA, in ein Genom eingebautes DNA Stück aus dem Ti-Plasmid von <i>A. tumefaciens</i>
TPR	Tetratricopeptide Repeat
<i>trans</i> -Faktor	An der Editierung/Bildung des Editosoms beteiligte Proteine (Editing- faktoren)
U	Uracil oder Uridin
UAS	<i>upstream activating sequences,</i> Transkriptionsaktivierungssequenz 5' des Promotors
upstream	in 5'-Richtung lokalisierte Nukleotidsequenz
Xa	Auxotrophiemarker
Xr	Resistenz
<i>X</i> ε	Mittelwert der Editingeffizienzen

1 Einleitung

Die hier vorgestellte Arbeit befasst sich mit dem Prozess des C-zu-U-Editing in mitochondrialen Transkripten der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*. Innerhalb der Transkripte werden definierte Cytidine zu Uridinen umgewandelt. Dies führt zu einer Veränderung der von der RNA kodierten Information und beeinflusst somit die Aminosäuresequenz des resultierenden Proteins.

Bei dieser Art des Editing wird das *cis*-Element, ein der Editingstelle vorgelagerter RNA-Abschnitt, spezifisch durch Vertreter der RNA-bindenden PPR-Proteine (PPR: *Pentatricopeptide Repeat*) erkannt. Diese Proteine beinhalten verschiedene C-terminale Extensionen. Sie werden als E- respektive DYW-Domänen bezeichnet (E: *Extended*, DYW: konserviertes Aminosäuretriplett der Domäne). Aufgrund einer innerhalb der DYW-Domäne konservierten Sequenz wird davon ausgegangen, dass sie an der Hydrolyse der Aminogruppe der Cytidine beteiligt ist. Die Rekrutierung des Editingenzyms bedarf weiterer *trans*-Faktoren, welche spezifisch mit den PPR-Proteinen interagieren. Die Gesamtheit dieses Proteinkomplexes wird als Editosom bezeichnet.

In den letzten Jahren wurden diverse Proteinfamilien identifiziert, die nicht zu den PPR-Proteinen gehören, aber einen ausgeprägten Effekt auf das C-zu-U–Editing in Pflanzen besitzen. Zu ihnen gehören MORF-Proteine, welche spezifisch mit PPR-Proteinen und weiteren *trans*-Faktoren interagieren. Die Funktionsweise der MORF-Proteine, sowie ihre Beteiligung an der Bildung des Editosoms, müssen noch weiter analysiert werden.

1.1 RNA-Editing

RNA-Editing beschreibt eine spezifische Veränderung der Nukleotidsequenz der RNA verglichen mit der für sie kodierenden DNA (Covello und Gray, 1993). Hierbei repräsentiert RNA-Editing, neben dem 5'-Capping, dem Splicing und der 3'-Adenylierung, einen der co- oder posttranskriptionellen Modifikationsprozesse der RNA (Gray, 2009; Cheng *et al.*, 2001). Grundsätzlich konnten verschiedene Formen dieses Prozesses in mRNA, tRNA, ribosomaler- oder viraler RNA beobachtet werden (Gray, 2003). An dieser Stelle soll jedoch ausschließlich näher auf die Modifikation von RNA in den Organellen von Eukaryoten eingegangen werden.

Die Veränderung der Nukleotidsequenz kann durch verschiedene Prozesse herbeigeführt werden. Bei dem sogenannten Insertions- bzw. Deletionsediting werden Nukleotide in die transkribierte Sequenz eingefügt oder aus ihr entfernt. Daraus resultiert eine Verschiebung des Translationsrasters. Dieser Prozess wurde erstmals in den Mitochondrien von Kinetoplasten beobachtet. Hierbei konnten gezielte Uridin-Insertionen in der mRNA von *Trypanosoma brucei* nachgewiesen werden (Benne *et al.*, 1986). Des Weiteren kann, durch die Substitution einzelner Basen, die Identität eines Nukleotides verändert werden. Findet diese Konversion an erster oder zweiter Position des Basentripletts statt, führt dies meist zur Veränderung der kodierten Aminosäure. Als Konsequenz daraus, stimmen die auf Basis der editierten RNA translatierten Proteine nicht mehr mit den ursprünglichen DNA-kodierte Informationen überein (Gray, 2009; Hiesel *et al.*, 1989). Ein Beispiel für diese Art des Editing stellt die Modifikation der mRNA-Sequenz, welche für das humane Apolipoprotein B kodiert, dar. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass es durch die Modifikation eines Cytidins zur Entstehung eines Stopp-Codon kommt (CAA zu UAA), der in der Synthese des verkürzten Proteins apoB48 resultiert (Powell *et al.*, 1987).

RNA-Editing ermöglicht die Entstehung unterschiedlicher Proteine auf der Basis eines Gens. Durch die Veränderung der Aminosäuresequenz, das Einfügen von Start- oder Stopp-Codon oder die Korrektur von Leserasterverschiebungen trägt RNA-Editing zur Reifung korrekt translatierbarer Transkripte bei. Dementsprechend hat es Einfluss auf die Synthese funktionsfähiger Proteine. Durch die Editierung der mRNA entstehen meist Proteine, deren Aminosäuresequenz eine gesteigerte Homologie zu vergleichbaren Proteinen anderer Organismen aufweist (Gualberto *et al.*, 1989; Gray, 2003; Takenaka *et al.*, 2013b).

In den Transkripten von Pflanzen kommt es ausschließlich zur Konversion von Pyrimidinbasen (Covello und Gray, 1993; Hoch *et al.*, 1991; Gray, 2003). Bei der Umwandlung von Cytidin zu Uridin wird die Aminogruppe, an Position 4 des Pyrimidinrings, durch eine Carbonylgruppe ausgetauscht. Dieser Prozess wird dementsprechend als C-zu-U-Editing bezeichnet. Demgegenüber wird, bei der umgekehrten Reaktion des U-zu-C-Editing, die Ketongruppe an besagter Position durch einen Aminosubstituenten ersetzt.

Wahrscheinlich sind beide Arten des Editing nach der Abspaltung der Landpflanzen von ihrer phylogenetischen Schwestergruppe, den Charophyceae (Grünalgen), entstanden (Covello und Gray, 1993). Editing konnte in allen Abteilungen der Pflanze nachgewiesen werden. Dies schließt Moose (Bryophyta, Hepatophyta, Anthocerophyta), Farne (*Lycopodiophyta*, *Pteridophyta*) und Samenpflanzen (Gymnospermen, Angiospermen) ein. Die Ausnahme bilden in diesem Fall einige Vertreter der Marchantiales. In dieser Ordnung scheint die Fähigkeit zur Editierung organellarer Transkripte sekundär verloren gegangen zu sein (Malek et al., 1996; Rüdinger et al., 2008; Gray, 2003). C-zu-U-Editing finden hauptsächlich in den Organellen von höheren Pflanzen statt. In mitochondrialen mRNAs werden zwischen 400-600 Cytidine zu Uridinen umgewandelt. Trotz der größeren Zahl der kodierten Gene werden in Transkripten des Plastidengenoms lediglich 30-40 Cytidine editiert (Giegé und Brennicke, 1999; Gray, 2003; Okuda et al., 2008; Bentolila et al., 2013). Der umgekehrte Prozess des U-zu-C-Editing wurde bislang nicht bzw. sehr selten in organellaren Transkripten von Blütenpflanzen, Lebermoosen und Moosen nachgewiesen. Es kommt häufiger in niederen Tracheophyten wie Anthocerophyta, Lycopodiophyta und Pteridophyta vor (Schuster et al., 1990; Gualberto et al., 1990; Steinhauser et al., 1999; Wolf et al., 2004; Grewe et al., 2009).

Beide Arten des Editing konnten in mitochondrialen- und plastidären Transkripte von Pflanzen beobachtet werden. Betroffen sind hauptsächlich mRNA- und tRNA-Moleküle. Dabei findet Editing in proteinkodierenden Regionen, Introns und 5'- respektive 3'untranslatierten Sequenzen statt (Covello und Gray, 1990; Binder *et al.*, 1994; Börner *et* *al.*, 1995; Gray, 2003) Ribosomale RNA wird partiell aber sehr selten editiert (Schuster et al., 1991). Es gibt keine Hinweise darauf, dass weitere cytoplasmatische RNAs von dieser Art der Nukleotidmodifikation betroffen werden (Takenaka *et al.*, 2013b).

Grundsätzlich könnte die Umwandlung von Cytidin in Uridin über folgender drei Prozesse ablaufen: einer Entfernung des Cytidinmonophosphates unter gleichzeitiger Insertion eines Uridinmonophosphates in die Nukleotidsequenz, ein Austausch eines Cytosins durch eine Uracil-Base mittels einer Transglycosylierung oder eine Deaminierung bzw. Transaminierung des Cytidins zu Uridin.

Es konnte gezeigt werden, dass α -³²Phosphat-markierte mRNA nach der Editierung weiterhin ³²P-beinhaltende Uridinmonophosphat-Reste enthielt. Dementsprechend kann der Austausch des Cytidinmonophosphates, durch die Deletion und Insertion eines kompletten Nukleotides, ausgeschlossen werden. Es ist kein Enzym bekannt ist, welches diesen Austausch vermittelt, ohne das 5'-Phosphat des Donors in die Polynukleotidkette zu integrieren (Rajasekhar und Mulligan, 1993). Während der Transglycosylierung würde das Phosphoribosyl-Rückrad der RNA erhalten bleiben und die Base würde ausgetauscht werden. Von Yu und Schuster (1995) konnte belegt werden, dass aus einem ³H-markierten Cytosin, im Anschluss an die Editierung, ein ³H-markiertes Uridin entsteht. Dies spricht einerseits deutlich gegen einen Austausch der Base, im Sinne einer Transglycosylierung, und für die Umwandlung der Base durch eine Substitution.

Das Enzym, welches RNA-Editing in den Mitochondrien der Pflanzen vermittelt, muss dementsprechend eine Deaminase oder Transaminase sein. Der Vorteil der Transaminase wäre, dass durch sie sowohl das C-zu-U-Editing, als auch das U-zu-C-Editing katalysiert werden könnte. Unter der Beteiligung einer Transaminase müsste die Aminogruppe auf ein Akzeptor- bzw. Donormolekül übertragen werden. Die Notwendigkeit eines solchen Moleküls, konnte bisher in einem in vitro-System nicht nachgewiesen werden (Takenaka und Brennicke, 2003). Die hydrolytische Deamination durch eine Cytidindeaminase scheint ein wahrscheinlicher Mechanismus für das C-zu-U-Editing zu sein (Yu und Schuster, 1995). Dieser Verdacht wird insbesondere dadurch gestärkt, dass ein Teil der PPR-Proteine, welche nachweislich an der spezifischen Erkennung von Editingstellen beteiligt sind, konservierte Motive bekannter Cytidindeaminasen beinhalten. Bei Deaminasen handelt es sich um zinkabhängige Enzyme. Die Bindungsfähigkeit dieser konservierten Sequenz in PPR-Proteinen gegenüber Zinkionen konnte nachgewiesen werden. Dementsprechend wird vermutet, dass das $HxE(x)_nCxxC$ -Motiv eine korrekte Zinkbindung und damit an einer Cytidindeaminase-ähnliche Funktion beteiligt ist (Hayes et al., 2013; Boussardon et al., 2014). Der spezifische Austausch der konservierten Histidin-, Glutamat- oder Cystein-Reste durch Alanin führt zu einem Verlust der Komplementationsfähigkeit des Editingdefektes in der Mutante *dyw1*. Die punktuelle Mutation von Aminosäuren außerhalb des $HxE(x)_nCxxC-Motiv$ führte nicht zur Beeinträchtigung der Wiederherstellung von Editing in der DYW1-Mutante. Dementsprechend wurde postuliert, dass diese Sequenz ebenfalls einen Einfluss auf die Editierungsfähigkeit hat (Boussardon et al., 2014).

Im Folgenden soll näher auf die einzelnen Proteine eingegangen werden, welche an der Bildung eines funktionellen Editosoms beteiligt sind.

1.2 PPR-Proteine und die Erkennung des *cis*-Elementes von Editingstellen

Peeters und Small beschrieben im Jahr 2000 erstmals eine neu Klasse von Proteinen, die in ihrer Struktur den bekannten TPR- Proteinen (TPR: *Tetratricopeptide Repeat*) ähnelten. Aufgrund dieser Ähnlichkeit etablierten sie die Bezeichnung PPR-Proteine (PPR: *Pentatricopeptide Repeat*). Ihr namensgebendes Charakteristikum stellen dabei die 2-30 repetitiv angeordneten Sequenzmotive dar, welche üblicherweise 35-Aminosäuren beinhalten. Diese werden als P-Motive bezeichnet.



Abbildung 1. Schematische Darstellung der verschiedenen Vertreter der PPR-Proteine. PPR-Proteine werden in zwei Familien unterteilt. Die P-Proteinfamilie, deren Vertreter ausschließlich P-Motive beinhalten, und die PLS-Proteinfamilie, deren Mitglieder durch eine typische Abfolge von $(P1-L1-S1)_n-P2-L2-S2$ -Motiven charakterisiert werden. Jedes Motiv beinhaltet zwei antiparallel angeordnete α -Helices. Die Länge der Motiv variiert zwischen 31-34 Aminosäuren (S), 35 Aminosäuren (P) und 37 Aminosäuren (L). Das erste Motiv der Reihe ist nicht zwangsläufig ein P-Motiv. Durch ihre C-terminale Extension lassen sich weitere Untergruppen der PLS-Proteine definieren. Zum einen die E-Domänen beinhaltenden PPR-Proteine (E1-, E2-, E+-Untergruppe). Die Motiv E1 und E2 stellen ebenfalls paarweise angeordnete α -Helices dar, die sich in ihrer Aminosäureausstattung von den PLS-Motiven unterscheiden. Die DYW-Domäne befindet sich am C-Terminus der E-Domäne und enthält die für die Zinkbindung und Deaminierung essentielle HxE(x)_nCxxC-Sequenz. Liegt die DYW-Domäne verkürzt oder degeneriert vor, so wird diese als E+-Domäne deklariert (Cheng *et al.*, 2016)

PPR-Proteine können in zwei Gruppen unterteilt werden. Zum einen die P-Klasse PPR-Proteine deren Motivabfolge ausschließlich aus P-Motiven besteht. Zum anderen die Gruppe der PLS-Klasse, die zusätzlich zu den P-Motiven (35 Aminosäuren) auch noch kürzere S-Motive (31-34 Aminosäuren) und längere L-Motive (37 Aminosäuren) beinhalten. Diese wiederholen sich typischerweise in der Reihenfolge (P1-L1-S1)_n-P2-L2-S2. Die Motivvarianten 1 und 2 unterscheiden sich per Definition meist leicht bezüglich der Aminosäuresequenz in der ersten Helix eines Motives. Zudem weisen manche PLS-Klasse PPR-Proteine an ihrem C-Terminus eine verlängerte Sequenz auf, die in einer weiteren Untergruppierung resultiert. Man unterscheidet zwischen E-Domänen- (E: Extended) und DYW-Domänen beinhaltenden PPR(PLS)-Proteinen (Cheng *et al.*, 2016). Auf diese Domänen wird unter 1.2.1 und 1.2.2 gesondert eingegangen.

Jedes dieser Motive beinhaltet zwei antiparallel verlaufende α -Helices. Aus der Abfolge der Motive und ihrer inkludierten Sekundärstrukturen bildet sich eine Superhelix die typisch für α -solenoid-Proteine ist. Zu diesen werden die TPR- und PPR-Proteine gezählt (Kobe und Kajava, 2000; Hammani *et al.*, 2014). Spezifische Aminosäuren an definierten Positionen der Motive werden durch ihre Ausrichtung innerhalb der Superhelix dazu befähigt, mit einzelnen Nukleotiden in RNA-Sequenzen zu interagieren (Barkan *et al.*, 2012). Dieses Bindungsmuster wurde aus den bekannten Ein-Motiv-Ein-Nukleotid-Interaktionsmuster, der ebenfalls zu den α -solenoid-Proteinen gehörenden PUF-(*Pumilio and FBF Homology Protein*) und TALE-Proteinen (*Transcription Activator-Like Effektor*) abgeleitet (Filipovska und Rackham, 2012; Boch *et al.*, 2009). Hierbei wurden von Barken *et al.* (2012) die an Position 6 der Aminosäuren als relevant deklariert. Die Aminosäuren an diesen Positionen vermitteln den spezifischen Kontakt der PPR-Proteine zur RNA wie folgt.

Befindet sich an Position 6 ein Asparagin, korreliert dieses mit Pyrimidinbasen der Nukleotidsequenz. Finden sich Serin oder Threonin an dieser Stelle, so weisen diese eine Präferenz in der Interaktion mit Purinbasen auf.

Bezüglich der zweiten Hauptdeterminante des Ein-Motiv-Ein-Nucleotid-Codes an Position 1', ergibt sich folgender Zusammenhang: Aspartat an Position 1' interagiert bevorzugt mit Ketobasen (U, G). Asparagin bindet bevorzugt Aminobasen (A, C). Die Interaktion zwischen den Basen der RNA und den Seitenketten der genannten Aminosäuren entspricht dabei vermutlich einer Wasserstoff-Brücken-Bindung (Barkan und Small, 2014).

Dieser für die P-Klasse postulierte Code wurde durch die Kristallographie des Proteins PPR10 als monomerer Protein-RNA-Komplex bestätigt (Yin *et al.*, 2013; Gully *et al.*, 2015).

Es ist bisher noch nicht gelungen, die Struktur von PLS- Proteinen kristallographisch zu belegen. Computergestützte Hochrechnungen und ausgedehnte Datenanalysen lassen jedoch eine Adaptation des α -solenoid-Helix-Modells der P-Klasse Proteinen für die PLS-Klasse PPR-Proteine zu.

Ein Abgleich der Motive bekannter PLS-Proteine und der davon betroffenen Editingstellen belegte, dass der beschriebene Code unter bestimmten Voraussetzungen auch für PLS-Klasse PPR-Proteine verwendet werden kann (Barkan und Small, 2014, Cheng *et al.*, 2016). Damit ist es möglich, im Sinne einer Vorhersage, von der Abfolge der PLS-Motive auf die betroffenen RNA-Sequenzen im *cis*-Element zu schließen und umgekehrt von der Nukleotidsequenz auf die Motiv-Struktur.

Aufgrund dieser Faktenlage wurden verschiedene Vorhersage-Programme entwickelt. Das für die folgende Datenanalyse verwendete Programm wurde von Takenaka *et al.* (2013) beschrieben und bezieht die Motive P, L, S, L2 und S2 in die Detektion der Nukleotidsequenz ein.

1.2.1 Die E-Domäne und ihr Rolle im Editing in Arabidopsis thaliana

Die E-Domäne stellt eine der C-terminalen Verlängerungen der PLS-Klasse PPR-Proteine dar. Sie setzt sich ihrerseits aus zwei PPR-ähnlichen Motiven zusammen, E1 und E2. Diese sind ebenfalls helikal strukturiert und umfassen jeweils 34 Aminosäuren. Schließt sich an das E2-Motiv noch eine verkürzte Sequenz der DYW-Domäne an, so wird die Struktur als E+-Domäne definiert. In diesem Fall wird die von Cheng *et al.* (2016) verwendete neuere Definition der terminalen Motive verwendet. Dies begründet sich darauf, dass in der folgenden Analyse, die auf dieser Motivdefinition beruhende Datenbank (PlantPPR) verwendet wurde.

Die C-terminalen Domänen der PPR-Proteine sind nicht an der Erkennung des *cis*-Elementes beteiligt. Dies bedeutet jedoch nicht, dass sie keine Funktion im Prozess des Editing hätten. Okuda *et al.* (2007, 2009) konnten durch die Deletion der E-Domäne der plastidären PPR-Proteine CRR4, CRR21 und CRR28 belegen, dass dies im Vergleich zum natürlichen Protein nicht mehr in der Lage waren, Editing in den entsprechenden Mutanten wieder herzustellen. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Austausch der E-Domäne von CRR4, durch die von CRR21, weder einen Effekt auf das Bindungsverhalten der PPR-Sequenz an die *cis*-Elemente, noch eine negative Auswirkung auf die Formierung des Editosoms, hat.

Damit war bewiesen, dass die E-Domänen, trotz ihrer unterschiedlichen Sequenzen (Lurin *et al.*, 2004) funktionsanalog agieren.

Dies gilt jedoch nur innerhalb eines Kompartimentes. Durch den Austausch der E-Domänen mitochondrialer Editingfaktoren (OTP71, OTP72) mit denen plastidärer PPR-Proteine (CRR4, CLB19) waren die betroffenen Hybridkonstrukte nicht mehr in der Lage, den Editingdefekt in den korrespondierenden Mutationslinien zu komplementieren.

Die E/E+-Domäne scheint demnach das Potential zu besitzen, die Interaktion mit weiteren editosombildenden Proteinen zu vermitteln. Dies schließt ebenfalls als *trans*-Faktoren agierende DYW-Domänen ein (Wagoner *et al.*, 2015; Chateigner-Boutin *et al.*, 2013). Die Spezifizierung der E-Domäne auf die verschiedenen Organellen, würde prinzipiell zu einer kompartimentspezifischen Ausstattung an weiteren editosombildenden Proteinen führen. Eine Spezialisierung, wie sie innerhalb der MORF-Proteine nachgewiesen wurde (Zehrmann *et al.* 2015, Takenaka *et al.*, 2012, Bentolila *et al.*, 2012).

1.2.2 Die DYW-Domäne und ihre putative Funktion im Editosom

Benannt wurde die DYW-Domäne nach dem charakteristischen, endständigen Peptidtriplet Asp-Tyr-Trp (Aubourg *et al.*, 2000).

Zum ersten Mal wurde die DYW-Domäne als katalytische Einheit des RNA-Editing, im Sinne einer Deaminase, von Salone *et al.* (2007) beschrieben. Diese Klassifizierung begründet sich darauf, sie für das konservierte Motiv $HxE(x)_nCxxC$ kodiert, welches dem Zink-bindenden Zentrum in bekannten Cytidindeaminasen entspricht.

Boussardon *et al.* (2014) konnten zeigen, dass der Austausch der relevanten Aminosäuren in der $HxE(x)_nCxxC$ -Sequenz durch Alanin $(HxA(x)_nCxxC, AxA(x)_nCxxC, HxE(x)_nAxxA)$ in DYW1 zu einem totalen Funktionsverlust führt. Die mutierten DYW1-Proteine waren nicht in der Lage, Editing an der korrespondierenden Editingstelle der Mutante *dyw1* wieder herzustellen. Zudem ging die Fähigkeit zur Zinkbindung, die in Deaminasen über die konservierten Aminosäuren Histidin und Cystein vermittelt wird, verloren (Boussardon *et al.*, 2014; MacGinnitie *et al.*, 1995).

Unabhängig davon, beschäftigten sich Wagoner *et al.* (2015) ebenfalls mit dem Austausch einzelner Aminosäuren im Zink-bindenden Zentrum des PPR-Proteins QED1. Sie ersetzten Histidin und Cystein durch Serin ($HxA(x)_nSxxSH$) und beobachteten ebenfalls den Verlust der Komplementationsfähigkeit von Editingdefekten, resultierend aus der Mutation des konservierten Deaminase-Motives. Dies lässt den Schluss zu, dass die DYW-Domäne die Deaminasefunktion ausübt oder als Teil einer Deaminase fungiert.

Über die Hälfte der am Editing beteiligten PPR-Proteine weisen eine DYW-Domäne auf. Dennoch beantwortet dies nicht die Frage, wie die Hydrolyse der Aminogruppe an Editingstellen bewerkstelligt wird, deren *cis*-Element von einem E-Klasse PPR-Protein erkannt wird.

Gemäß dem Fall, die E-Domäne sei die Bindungsstelle für das Editingenzym, so würde die Deaminase in beiden Organellen wahrscheinlich über Protein-Protein-Wechselwirkung rekrutiert werden (Okuda et al., 2007; Okuda et al., 2009). Dies setzt ein funktionelles Zusammenwirken von E- und DYW-Klasse PPR-Proteinen voraus.

Eine solche Koinzidenz konnte am Beispiel der beiden PPR-Protein CRR4 und DYW1 in Plastiden belegt werden. DYW1 beinhaltet keine PLS-Motive und ist dementsprechend nicht in der Lage *cis*-Elemente zu binden. Auf der anderen Seite kodiert *DYW1* für eine kurze Sequenz der E-Domäne und eine klar identifizierbare DYW-Domäne. *CRR4* exprimiert eine einzigartige E-Domäne deren C-Terminus zur Hälfte verkürzt ist. BiFc-Experimente konnten eine Interaktion der beiden Proteine *in planta* nachweisen. Eine synthetische Fusion der beiden Proteine erwies sich als funktional und konnte den Editingdefekt an der Stelle *ndhD-1* in der Doppelmutanten *crr4/dyw1* beheben (Boussardon *et al.*, 2012). Da die Interaktion der beiden Proteine in der Pflanze analysiert wurde, schließt dies das Vorhandensein von Co-Faktoren, welche diese Interaktion vermitteln, ein.

Zwei Vertreter einer anderen editosombildenden Proteinfamilie, MORF2 und MORF9, sind ebenfalls an der Editierung von *ndhD*-1 beteiligt (Takenaka *et al.*, 2012). Die Beteiligung von Co-Faktoren an der Interaktion zwischen E- und DYW-Domänen und der daraus resultierenden Formierung eines funktionellen Editosomkomplexes muss jedoch noch weiter analysiert werden.

1.3 MORF-Proteine als wichtige Co-Faktoren des Editing in *A. thaliana*

Die MORF-Proteine wurden erstmals durch Takenaka *et al.* (2012) beschrieben. Dabei handelt es sich um eine unabhängige Gruppe von RNA-Editingfaktoren, die einen Einfluss auf alle plastidären- und die meisten mitochondrialen Editingstellen ausübt. Dementsprechend wurde diese Proteinfamilie als *Multiple Organellar RNA Editing Factor*– Proteine (MORF-Proteine) bekannt.

Das Genom von Arabidopsis thaliana kodiert für 10 Mitglieder der MORF-Proteine.

Dabei konnte durch BiFc-Experimente belegt werden, dass MORF2 und MORF9 ausschließlich in Plastiden, MORF5 und MORF8 in beiden Organellen, und MORF1, MORF3, MORF4, MORF6 und MORF7 in Mitochondrien lokalisiert sind. Bei MORF10 handelt es sich um ein Pseudogen das durch eine Verkürzung der Sequenz am N-Terminus einen Teil der MORF-Box einbüßt. Alle Vertreter dieser Gruppe beinhalten einen für sie charakteristischen ~100 Aminosäuren umfassenden, konservierten Bereich, der seinerseits als die MORF-Box bezeichnet wird (Takenaka *et al.*, 2012; Bentolila *et al.*, 2012 hier als RIP-Proteine bezeichnet; Zehrmann *et al.*, 2015).

Phylogenetische Untersuchungen ergaben, dass in allen Blütenpflanzen kernkodierte Homologe der Proteine MORF1, MORF2, MORF3, MORF8 und MORF9 vorkommen. Die evolutionäre Entwicklung der MORF-Proteine verlief parallel zu der steigenden Zahl von Editingstellen und deren korrespondierenden PPR-Proteinen (Takenaka *et al.*, 2012; Takenaka, 2014).

MORF-Proteine interagieren mit PPR-Proteinen beider Unterklassen (Takenaka *et al.*, 2012; Takenaka, 2014). Aufgrund der hohen Anzahl der von ihnen betroffener Editingstellen in allen organellaren Transkripten, ist davon auszugehen, dass sie eine übergeordnete, vermittelnde Funktion im Editosom besitzen und an der Rekrutierung der Deaminase beteiligt sind.

Diese Sichtweise wird unter anderem dadurch gestützt, dass beispielsweise im Genom von *Physcomitrella patens*, ein Vertreter der Bryophyten, keine MORF-Proteine kodieren werden. Diese Moosart zeichnet sich jedoch dadurch aus, dass alle bisher nachgewiesenen, am RNA-Editing beteiligten PPR-Proteine dem DYW-Typ angehören. Eine Vermittlung des Kontaktes zwischen E- und DYW-Domäne durch Co-Faktoren wäre dementsprechend nicht notwendig und wird auf genomischer Ebene auch nicht unterstützt (Rüdinger *et al.*, 2011; Takenaka *et al.*, 2012).

Eine weitere These zur Funktion der MORF-Proteine ist, ihre Beteiligung an der Ausrichtung des Editingenzyms hin zu dem Cytidin, welches deaminiert werden soll (Takenaka, 2014).

Der in MORF-Proteinen konservierte Bereich weist keinerlei strukturelle Ähnlichkeit zu bindungsrelevanten Bereichen anderer Polypeptide auf (Takenaka et al., 2012; Takenaka, 2014). Die Beteiligung der MORF-Box an der Interaktion von MORF-Proteinen konnte jedoch von Zehrmann *et al.* (2015) belegt werden. In derselben Studie wurde, über diverse *in vivo* und *in vitro*-Analysen, bewiesen, dass MORF-Proteine als Dimer agieren.

Innerhalb der Mitochondrien sind dabei MORF1, MORF3 und MORF8 von besonderer Bedeutung. Sie sind an der Editierung von 20-77 % der Editingstellen beteiligt. Alle drei Proteine bilden sowohl Homomere, als auch Heteromere untereinander. So ist es nicht verwunderlich, dass die von Ihnen betroffenen Editingstellen teilweise identisch sind (Takenaka *et al.* 2012; Bentolila *et al.*, 2013; Zehrmann *et al.*, 2015).

Die Tatsache, dass ein und dieselbe Editingstelle, zugleich von einem PPR-Protein und ein, zwei oder sogar drei MORF-Proteinen betroffen wird, weist darauf hin, dass alle beteiligten Faktoren möglicherweise in einem Komplex miteinander interagieren.

Der Fakt, dass es bis heute nicht gelungen ist, *morf/morf*-Doppelmutanten ohne letalen Effekt herzustellen, weist auf den signifikanten Einfluss dieser Proteinfamilie im Editing hin. Die Interaktion der einzelnen Komponenten untereinander wurde bereits belegt. Diese Interaktionen müssen nun noch detaillierter untersucht werden.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es einerseits, die Sequenzabschnitte in MORF-Proteinen zu identifizieren, welche für die Interaktion mit weiteren Editingfaktoren relevant sind. Andererseits, sollte die Funktion die MORF-Proteine bzw. ihrer konservierten Motive und Termini analysiert werden. Ein Teil der Ergebnisse, bezüglich der Homo- bzw. Heteromerisierung von MORF-Proteinen (Zehrmann *et al.*, 2015), sowie der stabilen Interaktion von MORF3-MORF8-Heteromeren mit dem Editingfaktor MEF13 (Glass *et al.*, 2015), wurden publiziert und entsprechend gekennzeichnet.

In dieser Dissertation lag der Fokus auf die funktionelle Analyse chimärer MORF-Konstrukte in der Mutante morf1-1. Allen MORF-Proteinen ist die konservierte MORF-Box gemein. In den übrigen Aminosäuresequenzen variieren sie. Zudem weisen einige Vertreter der MORF-Familie eine lange C-terminale Extension auf, deren Funktion bisher ungeklärt war. Im Zuge der Analyse wurden verschiedene Teilbereiche der Proteine MORF1 und MORF3 miteinander fusioniert. Es konnten vier Motive innerhalb der MORF-Box identifiziert werden, die jeweils als potentielle Interaktionsareale für andere RNA-Editingfaktoren dienen könnten. Durch die Fusion unterschiedlich langer N- und C-terminaler Sequenzen sollte einerseits Aufschluss über den Einfluss des verlängerten C-Terminus der MORF-Proteine erlangt werden. Zum anderen wurden verschiedene konservierte Motive zwischen den Chimären ausgetauscht, um deren Beteiligung an der Formierung eines funktionellen Editosoms zu untersuchen. Diese Analyse wurde in planta getätigt um den Effekt auf den Prozess des RNA-Editing beurteilen zu können. Zudem sollte in vivo überprüft werden, ob bestimmte Motive der MORF-Box an deren Dimerisierung beteiligt sind und welchen Effekt die Verkürzung des C-Terminus auf die Homomerisierung von MORF-Proteinen hat.

2 Material und Methode

2.1 Material

2.1.1 Pflanzenmaterial

Als Modellorganismus wurde *Arabidopsis thaliana* Columbia-0 verwendet. Die T-DNA Insertionslinien *morf1-2* (WiscDsLox419C10) wurde über das NASC (*European Arabidopsis Stock Center*) bezogen. Die EMS Linien *mef13-1* und *morf1-1* mit Columbia-Hintergrund wurde von Lehle Seeds (USA) erworben.

2.1.2 Bakterien- und Hefestämme

Escherichia coli	K12/DH5α	fhuA2A (argF-lacZ)U169 phoA glnV44
(Taylor et al. 1993)	Derivat	Ф80Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Deblaere et al., 1985)	GV2260	<i>rpoB</i> ^r , pGV2260 (pTiB6S3∆T-DNA), <i>carb</i> ^r
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (James et al., 1996)	PJ69-4A	MATa trp1-901, leu2-3, leu2-112, ura3-52, ade2-101, his3Δ200, Δgal4, Δgal80, LYS2::GAL1-HIS3, GAL2-ADE2, met2::GAL7- lacZ

2.1.3 Plasmide

pAHG41 (AG Takenaka): ~10.3 kb, binärer Vektor (Ti-Plasmid) zur Transformationsund Komplementationsanalyse in *Arabidopsis thaliana*-Mutationslinien. Modifizierte Version von pMDC123 (Curtis und Grossniklaus; 2003). Die von attR1 und attR2 flankierte Kassette C1 (Cm^r – ccdB) wurde zwischen *Hinc*ll und *EcoR*l durch die GFP-Kassette aus psmGFP4 (Forner und Binder; 2007) ersetzt. An der Restriktionsstelle *BamH*l wurde mittels InFusion Teile der *Multiple Cloning Site* (MCS) des Vektors pET41 (Merck Millipore Novagen ®) integriert. Der implementierte Bereich umfasst die kodierende Sequenz des His-Tags bis zur BamHl Restriktionsstelle (150-241). CaMV Promotor und Terminator, NOS Terminator, pBR322ori, pBR322bom, pVS1sta pVS1rep, *kan^rE.coli, bar^rA.thaliana* (BASTA-Resistenz) (zur Verfügung gestellt von Mizuki Takenaka)

pGAD41 (AG Takenaka): Modifikation von pGADT7 (Clontech® Takara®): ~8kb, Vektor zur heterologen, rekombinanten Proteinexpression in *S. cerevisiae*. Die *Hind*lll Restriktionsstellen an Position 1480 und 2280 wurden folgendermaßen eliminiert. Die gesamte Sequenz zwischen dem yADH1 Promoter und Terminator wurde mit InFusion®- Adapterprimern amplifiziert, in deren Nukleotidabfolge die palindromische Sequenz von *Hind*lll nicht erhalten bleibt (pGADT Hd·(1480-2280)). Diese veränderte Sequenz von pGADT Hd·(1480-2280) wurde im Anschluss an einen *Hind*lll Verdau mittels InFusion® in den Vektor pGADT7 integriert (pGAD Hd⁻). Zudem wurde die MCS des Plasmid pET41(a+) per Infusion® in den Grenzen von EcoRl und Xhol in die MCS des intermediären Vektors pGAD Hd- kloniert. Die Deletionskonstrukte wurden mit den für die InFusion® benötigten Stul- respektive Hindlll-Adapterprimern amplifiziert, sodass sie rekombinant in die pET41(a+)-MCS des resultierenden Vektor pAD41 kloniert werden konnten. Das Plasmid pAD41 bietet die Möglichkeit zur Generierung von Fusionsproteinen aus der Aktivierungsdomäne des GAL4 Transkriptionsfaktors (GAL4-AD mit SV40 Nuclear Localisation Signal (NLS)) und einem beliebigen Prey-Protein. Dieses kann daraufhin innerhalb des Clontech Matchmaker[™] Gold Yeast Two-Hybrid Systems auf potentielle Interaktionspartner getestet werden. yADH1 Promotor Terminator S. GAL4 und cerevisiae, AD: Aktivierungsdomäne des GAL4 Transkriptionsfaktors (768-881), pUC ori, 2µ ori, Ampr_{E.coli}, LEU2^aS. cerevisiae</sup> (zur Verfügung gestellt von Mizuki Takenaka)

<u>pGBK41pst</u>: (AG Takenaka): Modifikation von pGBKT7 (Clontech® Takara®): ~7.3kb, Vektor zur heterologen rekombinante Proteinexpression in S. cerevisiae. Bereiche der MCS vom pGBKT7 wurde mittels *EcoR* bis *Not* restriktorisch entfernt. Ein Sequenzabschnitt basierend auf der MCS des Plasmides pET41(a+) wurden per InFusion® mittels entsprechender Adaptersequenzen (konstruktflankierende Sequenzen, komplementär zu den *EcoR*l und *Not*l beinhaltenden Sequenzen in pGBKT7) in pGBKT7 integriert. Durch die Klonierung einer Proteinkodierenden Sequenz in die Fusionsprotein aus der DNA-Bindungsdomäne MCS kann ein des GAL4-Transkriptionsfaktors (DNA-BD mit c-Myc Epitop tag) und dem einem Bait-Protein erzeugt werden. Innerhalb des Clontech Matchmaker[™] System kann das konstitutiv exprimierte Protein auf Interaktionspartnergetestet werden. yADH1 Promotor und Terminator S. cerevisiae, T7-Terminato GAL4 DNA BD: DNA bindende Domäne des GAL4 Transkriptionsfaktors (1–147), pUC ori, 2µ ori, Kan^r_{E.coli}, TRP1^a_{S. cerevisiae} (zur Verfügung gestellt von Mizuki Takenaka)

2.1.4 Enzyme

Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA)

Restriktionsendonukleasen Fast Digest® (Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA)

In-Fusion HD Enzyme Premix (Takara Bio Inc.; Shiga, Japan)

GoTaq® G2 DNA Polymerase (Promega GmbH; Mannheim, Germany)

RQ1 RNase-Free DNase (Promega GmbH; Mannheim, Germany)

M-MLV Reverse Transcriptase (H-) (Promega GmbH; Mannheim, Germany)

RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA)

2.1.5 Oligonukleotide

Tabelle 1. Liste der verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz (5´-3´)
At4g20020iFFATG	CGAATTCTGTACAGGCATGGCTATGATATCTCACCGTC
MOIN-MO3CiF/R1	AGTAGGTTTAGGATCTTTGGAGAAATCCATAGTGATAAGC
MO1N-MO3CiF/RE2	CTTGGCCTCTTCTTGGCTGATGCCAAGTCCTT
MO1N-MO3CiF/RE3	AACACCAGGCAATGCCTTGAACTTTTCTGATTCTTGTTC
MO1N-MO3CiF/RE4	TTCAACGTACAAGTCTCCATACTCTTTGTTCTGGGG
MO3CiFF1	GATCCTAAACCTACTGAAGAAGAG
MO3CiFF2	CAAGAAGAGGCCAAGAAGAAG
MO3CiFF3	GCATTGCCTGGTGTTCTC
MO3CiFFE4	GACTTGTACGTTGAAGGAAAGG
At3g06790iFRstop	GTGCGGCCGCAAGCTTGTTAAGCACTGGGCTTGTTG
At3g06790iFFATG	CGAATTCTGTACAGGCATGGCTCTTATCAGCACACG
MO3N-MO1CiF/R1	CTTAGGAGTTTCCTCAGTGAACTCCATGACGATGA
MO3N-MO1CiF/RE2	TAGCCTCTTCCACGCCCAGCCAAGGACGGAA
MO3N-MO1CiF/RE3	CACTCCGGGTAGATCTTTGACTTTGCAAGAGAGCT
MO3N-MO1CiF/RE4	CTCGTATTTATCTCCTCCGTAGTCTTTGTTTGGTAC
MO1C iFFE1	GAGGAAACTCCTAAGTCTCCA
MO1C iFFE2	GTGGAAGAGGCTAAGCAAAG
MO1CiFF3	GATCTACCCGGAGTGGTTTT
MO1CiFF E4	GGAGATAAATACGAGAATGGAGTG
At4g20020.2stopiFR	GTGCGGCCGCAAGCTTCTAGTACCTTCTTCCCTGTGGAA
At4g20020iFFATG	CGAATTCTGTACAGGCATGGCTATGATATCTCACCGTC
At4g20020E1iFF	CGAATTCTGTACAGGCGAGGAAACTCCTAAGTCTCCAG
At4g20020E2iFF	CGAATTCTGTACAGGCGTGGAAGAGGCTAAGCAAAG
At4g20020E3iFF*1	CGAATTCTGTACAGGCGATCTACCCGGAGTGGTTTT
At4g20020E4iFF	CGAATTCTGTACAGGCGGAGATAAATACGAGAATGGAGTG
At4g20020E1iFR	GTGCGGCCGCAAGCTTGCTGATGCCAAGTCCTTGGG
At4g20020E2iFR	GTGCGGCCGCAAGCTTCTTGAACTTTTCTGATTCTTGTTCAG
At4g20020E3iFR	GTGCGGCCGCAAGCTTTCCATACTCTTTGTTCTGGGG
At4g20020iFRc785stop	GTGCGGCCGCAAGCTTTTAGCCCTGTTGAGGACCATAG
At3g06790iFFATG	CGAATTCTGTACAGGCATGGCTCTTATCAGCACACG
At3g06790E1iFF	CGAATTCTGTACAGGCGATCCTAAACCTACTGAAGAAGAG
At3g06790E2iFF	CGAATTCTGTACAGGCCAAGAAGAGGCCAAGAAGAAG
At3g06790E3iFF	CGAATTCTGTACAGGCTTGCCTGGTGTTCTCTGG
At3g06790E4iFF	CGAATTCTGTACAGGCGGTGACTTGTACGTTGAAGGAAAGG
At3g06790E1iFR	GTGCGGCCGCAAGCTTACAGCCAAGGACGGAAG
At3g06790E2RiFR	GTGCGGCCGCAAGCTTTTGACTTTGCAAGAGA
At3g06790E3iFR	GTGCGGCCGCAAGCTTTCCGTAGTCTTTGTTTG
At3g06790iFRstop	GTGCGGCCGCAAGCTTGTTAAGCACTGGGCTTGTTG
T7 Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG
pGBKT7 rev	GAATTAGCTTGGCTGCAAGC
pACT up	CTATCTATTCGATGATGAAG
pACT rev	ACAGTTGAAGTGAACTTG
M13reverse	CAGGAAACAGCTATGAC

Die zur Herstellung der RT-PCR-Produkte verwendeten Oligonukleotide wurden durch Takenaka und Brennicke (2007) beschrieben.

2.1.6 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien stammen von den Firmen: Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany), Duchefa Biochemie B.V. (Haarlem, Netherlands), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Germany), VWR International GmbH (Darmstadt, Germany), Merck KGaA (Darmstadt, Germany), Bio-Budget Technologies GmbH (Krefeld, Germany), Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Germany), MP Biomedicals MP Biomedicals LLC (Santa Ana, USA), PanReac AppliChem (Darmstadt, Germany).

2.1.7 Kits

In-Fusion® HD Cloning Kit (Takara Bio Inc.; Shiga, Japan)

NucleoSpin® Gel/ PCR Clean-up Kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG; Düren, Germany)

NucleoSpin® Plasmid Kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG; Düren, Germany)

NucleoBond® Xtra Midi Plus-Kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG; Düren, Germany)

NucleoSpin® RNA Kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG; Düren, Germany)

2.1.8 Analyseprogramme

Die Überprüfung von plastidärer-DNA respektive cDNA-Sequenzen wurde mit dem Programm DNADynamo (Blue Tractor Software Ltd., North Wales, Großbritannien) durchgeführt.

Die Analyse von Gen- bzw. Proteinsequenzen, Expressionsdaten, sowie das Vorkommen bestimmter Domänen und Motive innerhalb der Proteine erfolgten über folgende Datenbanken.

TAIR - The Arabidopsis Information Resource; www.arabidopsis.org

FLAGdb⁺⁺ v6.1 - Integrative database around plant genomes; http://urgv.evry.inra.fr/FLAGdb

MEME Suite 4.11.1 - Motif-Based Sequence Analysis Tool; http://meme-suite.org/

PlantPPR - PPR (Pentatricopeptide Repeat Protein) Database; http://www.plantppr.com

AtGenExpress Visualization Tool (AVT); http://jsp.weigelworld.org/AtGenExpress

2.2 Methode

2.2.1 In-Fusion® HD Cloning

Die Grundlage der Klonierung per In-Fusion bildet die rekombinante Integration von PCR-Fragmenten in linearisierte Vektoren mittels einer 15bp-langen, sequenzhomologen Nukleotidabfolge an deren Termini. Vermittelt wird diese Reaktion von dem In-Fusion HD Enzym pre-Mix. Die Oligonukleotide der zu amplifizierenden Genabschnitte wurden so hergestellt, dass deren 5'-Ende fünfzehn komplementäre Nukleotide zu den Restriktionsstellen *Hind*lll oder *Stul* der MCS des Plasmides pET41 aufwiesen. Die 3'-Abschnitte der Primer umfassten 15-25 genspezifische Basen (GC-Gehalt 40-60%, T_m 58-65°C). Die unterschiedlichen Adapter-Sequenzen zu Hindlll und Stul garantieren die korrekte Integrationsrichtung des Amplifikates in die Vektoren. Die Sequenz wird ebenfalls ohne Verschiebung des Leserasters, in den Vektor integriert.

Verwendet wurde eine leicht abgewandelte Form des vom Hersteller empfohlenen Protokolls.

0.5 µl	5x In-Fusion HD Enzyme pre-Mix
10-200 ng	PCR-Produkt
<u>50-200 ng</u>	linearisierte Vektor
ad 2.5 µl	

Es folgt eine protokollgemäße Inkubation für 15 min bei 50°C. Von den zirkulären Vektoren wurden 50-100 ng mittels Hitzeschock in *E.coli* K12 transformiert. Im Anschluss an die Zugabe von 450 µl SOC für 1 h bei 250 rpm, 37°C inkubiert und auf 2YT-Platten mit entsprechendem Antibiotikum plattiert und bei 37°C ü.N. inkubiert. Die Identifizierung der Rekombinanten erfolgte dann entsprechend des GoTaq DNA Polymerase Protokolls zur *Colony*-PCR.

SOC-Medium		2YT-Medium	(pH 6.8)	
Trypton	2%	Trypton	16%	
Yeast Extract	0.5%	Yeast Extract	10%	
NaCl	10 mM	NaCl	5%	
KCl	2.5 mM	Agar	10%	
MgCl ₂	10 mM			
Glucose	20 mM			

2.2.2 Kultivierung, Transformation und Selektion von *Saccharomyces cerevisiae* Die Kultivierung des verwendeten Stammes *Saccharomyces cerevisiae* PJ69-4A erfolgte bei 28 °C (ggf. bei 250 rpm). Als Vollmedium wurde YPAD verwendet. Als Selektivmedium fungierte SD (*Synthetic Defined*)- Minimalmedium, welches alle supplementären Aminosäuren bzw. Nukleoside beinhaltet, mit Ausnahme derer, die für die Selektion der Auxotrophie respektive Prototrophie benötigt werden. PJ69-4A ist defizient für die Synthese von Tryptophan (*trp1-901*), Leucin (*leu2-3, leu2-112*), Histidin (*his3*Δ200), Adenin (*ade2-101*) und Uracil (*ura3-52*). Im Genom von PJ69-4A wurden durch James *et al.* (1996) die drei unabhängigen GAL4-responsiven Reportersysteme LYS2::GAL1-HIS3, GAL2-ADE2, *met2*::GAL7-lacZ etabliert.

YPAD	(pH 6.5)
Bacto Yeast Extract	10 %
Pepton	20 %
Adenin-Hemisulfat	0.0044 %
ad 900 ml*	

Quadruple Dropouts (QDO) SD- Minimalmedium Trp- Leu- Hi	s-Ade- (pH 5.8)**/***
Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren)	6.7 %
Complete Supplement Mix (CSM, ohne Histidin, Leucin, Tryptophan und Adenin)	0,61 %
ad 900 ml*	
Double Dropouts (DDO) SD- Minimalmedium Trp ⁻ Leu-	(pH 5.8)**
Quadruple Dropouts (QDO) SD-Minimalmedium	900 ml
Adenin-Hemisulfat	0.0044%

ad 900 ml*

L-Histidin Monohydrochlorid

* Zugabe von 100 ml 20 %-iger Dextrose-Lösung erfolgte nach dem Autoklavieren (15 min, 121 °C)

** Zur Herstellung des entsprechenden Festmediums wurden 20 g Micro-Agar vor dem autoklavieren

*** Zugabe von 2,5 mM 3-AT erfolgte in abgekühltes Medium (<55°C) nach dem autoklavieren

Die Verwendete Methode entspricht einem *Split-Hybrid* System. Hierbei werden Hybridproteine, die aus einem der beiden Teile des Hefe- GAL4- Transkriptionsfaktors und einem zu analysierenden Protein bestehen, auf ihre Interaktionsfähigkeit hin untersucht.

Interagieren die beiden zu untersuchenden Proteinteile, kann sich aus den beiden separaten Teilen ein funktionaler Transkriptionsfaktor rekonstruieren. Dies führt zur Expression eines Reportergens, welches unter der Kontrolle eines GAL-responsiven Promotors steht.

Das Plasmid pGBK41-pst kodiert für die DNA-Bindungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors (DNA-BD; 1-147) welche das *cis*-Element (Promotor: UAS und TATA-Box) *up stream* der Reportergene erkennt und somit den Start der Transkription lokalisiert. pGAD41 kodiert für die Transkriptionsaktivierungs-Domäne des GAL4-Transkriptionsfaktors (AD; 768-881).

Die die hier zu untersuchenden MORF1- Deletionskonstrukte wurden mittels InFusion® in pGAD41 oder pGBK41-pst kloniert. Das Plasmid pGAD41 wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Stu*l und *Hind*lll verdaut. Demgegenüber erfolgte die Linearisierung von pGBK41-pst mit *Stu*l und *Pst*l. Die Amplifikation der zu untersuchenden Gene erfolgte mit der Phusion® DNA Polymerase und nach deren Herstellerangaben. Als Matritze wurden bereits bestehende MORF1-Hefevektoren verwendet, deren Sequenzen keine Introns beinhalteten.

0.02 %

Die folgende Tabelle enthält einen Überblick über die hergestellten Hybrid-Konstrukte.

Tabelle 2.	Übersicht	der	Hergestellten	MORF1	Deletionskon	strukte	für	die	in	vivo-Interaktionsanalyse	in
PJ69-4A											

Transformanten	DNA-BD Hydride	Forward Primer	Reverse Primer
MORF1_C0	GAL4(1-147):MORF1(61-241)	At4g20020noTS	At4g20020stop
MORF1_C1	GAL4(1-147):MORF1(99-241)	At4g20020E1iFF	At4g20020stop
MORF1_C2	GAL4(1-147):MORF1(123-241)	At4g20020E2iFF	At4g20020stop
MORF1_C3	GAL4(1-147):MORF1(156-241)	At4g20020E3iFF	At4g20020stop
MORF1_C4	GAL4(1-147):MORF1(178-241)	At4g20020E4iFF	At4g20020stop
MORF1_N1	GAL4(1-147):MORF1(61-177)	At4g20020noTS	At4g20020E3iFR
MORF1_N2	GAL4(1-147):MORF1(61-155)	At4g20020noTS	At4g20020E2iFR
MORF1_N3	GAL4(1-147):MORF1(61-122)	At4g20020noTS	At4g20020E1iFR

Transformanten	AD Hybride	Forward Primer	Reverse Primer
MORF1_C0	GAL4(768-881):MORF1(61-241)	At4g20020noTS	At4g20020stop
MORF1_C1	GAL4(768-881):MORF1(99-241)	At4g20020E1iFF	At4g20020stop
MORF1_C2	GAL4(768-881):MORF1(123-241)	At4g20020E2iFF	At4g20020stop
MORF1_C3	GAL4(768-881):MORF1(156-241)	At4g20020E3iFF	At4g20020stop
MORF1_C4	GAL4(768-881):MORF1(178-241)	At4g20020E4iFF	At4g20020stop
MORF1_N1	GAL4(768-881):MORF1(61-177)	At4g20020noTS	At4g20020E3iFR
MORF1_N2	GAL4(768-881):MORF1(61-155)	At4g20020noTS	At4g20020E2iFR
MORF1_N3	GAL4(768-881):MORF1(61-122)	At4g20020noTS	At4g20020E1iFR

Einer funktionellen Analyse der Interaktion zweier Proteine können zwei Kriterien entgegenstehen.

Zum einen muss das Hybridprotein korrekt exprimiert werden. Um dies sicherzustellen wurde einerseits sequenzanalytisch kontrolliert, ob der gewünschte Genabschnitt ohne Nukleotidpolymorphismen und Leserasterverschiebung in pGBK41pst oder pGAD41 integriert wurde. Des Weiteren wurde die Expression über die Funktionalität des Systems nachgewiesen, indem bekannte Interaktionen als Kontrolle in die Kotransformation integriert wurden. Hierzu wurden die von Clontech bezogenen Kontrollplasmide pGADT7-T, pGBKT7-p53 und pGBKT7-LamC verwendet. Zum anderen kann die Analyse dadurch beeinflusst werden, dass das Fusionsprotein zwar korrekt exprimiert wird, jedoch ohne Interaktionspartner zur Expression des Reportergens führt. Dieser Vorgang wird als Autoaktivierung bezeichnet. Jedes Hybridprotein (z.B. DNA-BD:ProteinA) wurde mit der komplementären Domäne des Transkriptionsfaktors ohne kloniertes Amplifikat (z.B. AD:MCS) kotransformiert und auf Interaktion getestet (Bergman, 2001). Resultierte daraus unspezifisches Wachstum, wurden die autoaktivierenden Aminosäuresequenzen nicht zur weiteren Analyse herangezogen.

Saccharomyces cerevisiae PJ69-4A wurden mittels der LiAC/*SS-carrier* DNA/ PEG-Methode transformiert (Ito *et al.*, 1983; Schiestl & Gietz, 1989; Hill *et al.*, 1991; Gietz *et al.*, 1992). Hierbei wurde exakt nach dem Handbuch für Hefe-Protokolle (Clontech® Protokoll Nr. PT3024-1, Version Nr. PR973283) vorgegangen.

Die verwendeten Lösungen wurden nicht kommerziell bezogen. Ihre Zusammensetzung ist im Folgenden aufgeführt.

TE/LiAC -Lösung		PEG/LiAC - Lösung	
10 x TE Puffer	10 % (v/v)	10 x TE Puffer	10 % (v/v)
10 x LiAC - Lösung	10 % (v/v)	10 x LiAC - Lösung	10 % (v/v)
Bidest	80 % (v/v)	50% PEG (3350)-Lösung	80 % (v/v)
10 x TE Puffer Tris-HCl (pH 7.5) EDTA	(pH 7.5) 0.1 M 10 mM	50 % PEG (3350)-Lösung PEG (3350) Bidest	50 g ad 100 ml
10 x LiAC - Lösung LiAC	(pH 7.5) 1 M	100 % DMSO	

Die Zusammensetzung des Transformationsmixes entsprach der folgenden Auflistung:

Transformationsmix	
Kompetente <i>S. cerevisiae</i> PJ69-4A-Zellen	0.1 ml
Plasmid-DNA	0.25 μg
SS carrier-DNA (Heringsperma DNA)	0.1 mg
PEG/LiAC – Lösung	0.6 ml
100 % DMSO	0.045 ml

Die Zellen wurden im Anschluss an den Transfektionsprozess in TE-Puffer resuspendiert und auf den verschiedenen Selektionsmedien ausgebracht.

Transgene Hefen, die zur Analyse der erfolgreichen Transformation beider Plasmide (pGAD41 und pGBK41-pst) herangezogen werden sollten, wurden auf *Double Dropout* (DDO) SD- Minimalmedium Trp⁻ Leu⁻ kultiviert. Der Vektor pGAD41 codiert hierbei für LEU2, pGBK41-pst beinhaltet die Sequenz *TRP1*.

Der Nachweis der Transfektion beider Vektoren ergibt sich aus der Komplementation der Mutationen *trp1-901, leu2-*3 und *leu2-*112 durch die Expression von *TRP1* und *LEU2* und der daraus resultierenden Prototrophie.

Transformierte Hefen, aus deren Wachstum Rückschlüsse auf die Interaktion zweier Proteine gezogen werden sollten, wurden auf *Quadruple Dropout* (QDO) SD-Minimalmedium Trp⁻ Leu⁻ His⁻ Ade⁻ inkubiert. Hierbei wurde simultan auf zwei der drei möglichen Reportersysteme in PJ69-4A selektiert.

Es handelt sich zum einen um die Expression von *HIS3* unter der Kontrolle des GAL1-Promotors. Unter der Rekonstruktion des GAL4-Transkriptionsfaktors innerhalb des *Split Two-Hybrid* Systems, kommt es zur Bindung der GAL1-Promotors und zur Aktivierung der *HIS3*-Expression auf hohem Level. Das Vorkommen falsch-positiver Ergebnisse können durch den Einsatz von 3-Aminotriazol (3-AT) minimiert werden. 3-AT ist ein kompetitiver Inhibitor von HIS3, der Imidazolglycerol-phosphate-Dehydratase, welche den sechsten Schritt der Histidin Synthese katalysiert. Auf 3-AThaltigem Medium wird demnach ein höheres Expressionslevel an HIS3 benötigt, um die Histidin-Auxotrophie (*his3*Δ200) von PJ69-4A ausgleichen zu können. Die Promotoren der beiden verwendeten Reportergene werden unabhängig voneinander durch den GAL4-Transkriptionsfaktor affektiert. Dementsprechend kann auch Wiederherstellung der Fähigkeit zur autonomen Synthese, der beiden nicht im Medium enthaltenen Supplemente, unabhängig voneinander bewertet werden.

Als zweites Reportersystem wurde das durch einen *GAL2*-Promotor aktivierbare Gen *ADE2* verwendet. Durch die Transkription des artifiziellen Reportergens *ADE2* kann die Mutation *ade2-101* und die daraus resultierende Auxotrophie komplementiert werden. Die Fähigkeit zur Proliferation auf QDO SD- Minimalmedium Trp⁻ Leu⁻ His⁻ Ade⁻ ist ein Beleg der erfolgreichen Kotransformation beider Plasmide und der korrekten Expression der Fusionsproteine durch die Wiederherstellung der Prototrophie für HIS3 und ADE2.

2.2.3 Kultivierung, Transformation und Selektion von Arabidopsis thaliana

Die Kultivierung der verschiedenen *A. thaliana*-Linien erfolgte unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit), bei 21°C, einer Lichtstärke von 80-100 μmol/m²s und 65% Luftfeuchtigkeit.

Pflanzen, die zur Analyse einer T-DNA-Insertionslinie dienten, deren Ovulare nach der Kreuzung auf embryoletale Effekte untersucht oder die einer späteren Transformation durch *Agrobacterium tumefaciens* unterzogen werden sollten, wurden auf Substraterde herangezogen.

Pflanzen, deren Phänotyp im Vergleich zu einer Referenz (WT, Mutante) bestimmt oder die auf eine Herbizidresistenz selektioniert werden sollten, wurden auf Murashige und Skoog (MS)- respektive MS^{BASTA®}-Medium kultiviert.

Substraterde		MS Medium (pł	MS Medium (pH 5.7) *	
Ökohum® Topferde	800 ml	M+S Salz	4.3 %	
Vermiculite	200 ml	Plant-Agar	10 %	
Osmocote Exact Min Dünger	ⁱ⁻ 0.5 g	ad 1 Liter Bidest	-	

 \ast Die Zugabe von 50 μM DL-Phosphinotricin (BASTA®)-Lösung erfolgte bei gegebener Indikation nach dem autoklavieren des MS-Mediums.

Die Transfektion der Pflanzen erfolgte nach dem *"Arabidopsis Transformations-*Protokoll" nach Clough & Bent (1998) modifiziert von Bechtold *et al.* (1993). Hierbei handelt es sich um einen Agrobakterium-vermittelte Plasmidtransfer innerhalb eines binären Systems. Verwendet wurde *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 dessen Virulenzgene auf dem Helferplasmid pGV2260 codiert vorliegen. pGV2260 ist ein Derivat des Ti-Plasmides pTiB6S3, dessen komplette TL- bis TR-Region deletiert und durch Sequenzen aus pBR322 substituiert wurde (Deblaere *et al.*, 1985; Otten *et al.*, 1985).

Als Ti-Plasmid wurde pAHG41 verwendet. Dieses wurde mit *Hind*lll und *Stu*l linearisiert. Die zu transformierenden Gene wurden mittels InFusion® in pAHG41 kloniert. Zur Selektion und Charakterisierung wurden thermokompetente *E.coli* K12 mit dem resultierenden Vektor, wie in Sambrook und Russel (2001) beschrieben, transformiert. Die Selektion erfolgte auf Kanamycin-haltigem 2YT-Festmedium. Die Identifizierung der Transgene erfolgte zunächst per *Colony*-PCR.

Verwendet wurden die vektorspezifischen Primer, welche die MCS in pAHG41 flankieren. Die *Colony*-PCR wurde entsprechend den Vorgaben des Herstellers Promega durchgeführt. Verwendet wurde die GoTaq® G2 DNA-Polymerase. Aus der Länge der verschiedenen Amplifikate konnte auf die zu transformierende Sequenz geschlossen werden. Zur Vermehrung des Plasmides wurde eine Übernachtkultur der detektierten Kolonie in 2YT-Flüssigmedium, unter erneuter Selektion mit Kanamycin, bei 37 °C, 200 rpm inkubiert. Das Plasmid wurde nach Herstellerangaben mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit aus *E.coli* isoliert und aufgereinigt.

Im Anschluss wurden 5 μ l (80-200 ng/ μ l) Plasmid mit 5 μ l (5 pmol/ μ l) vektorspezifischem Primer zur Sequenzierung an Macrogen, Inc. (Amsterdam, Niederlande) gesendet. Lag die Nukleotidsequenz fehlerfrei und ohne Verschiebung des Translationsrasters in pAHG41 vor, wurden die Vektoren mittel Elektroporation in A. *tumefaciens* (Sambrook & Russel, 2001) transfiziert. Zur Überprüfung des Vorhandenseins beider Plasmide des binären Vekorsystems wurden die transformierten Agrobakterien auf Kanamycinund Carbenicillin-haltigem 2YT-Festmedium selektioniert. Pflanzen der Mutationslinien morf1-1 wurden stabil mit den diesen Agrobakterien transformiert (Clough & Bent 1998; Bechtold et al. 1993). Durch eine 14tägige Stratifikation der geernteten, reifen Samen bei 4 °C und Dunkelheit wurde Dormanz simuliert.

Es wurden ~50-200 Samen pro transformierter Pflanzenlinie sterilisiert. Die Samen wurden für jeweils 1 min und unter stetigem Schütteln mit 70% Ethanol, 8%-iger Hypochloridlösung und dreifach mit bidestilliertem Wasser gewaschen und anschließend einzeln auf MS^{BASTA®}-Medium ausgebracht.

Die Identifizierung der stabil transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen erfolgte nach der von Harrison *et al.* (2006) beschriebenen Methode. Hierbei wurden die Samen auf dem MS^{BASTA®}-Medium erneut für zwei Tage bei 4 °C stratifiziert und anschließend für 4-6 h, bei 21 °C belichtet. Dies dient der Germinationssynchronisation. Darauf folgten zwei Tage der Inkubation in Dunkelheit bei 21 °C. Da die Pflanzen ohne die Zufuhr von Licht weiter wachsen, weisen im Anschluss an diese Dunkelperiode alle Keimlinge eine Hypokotyllänge von ~ 0,8-1 cm, sowie gelbe, geschlossene Kotyledone auf. Die Pflanzen wurden darauf folgend für 24 h kontinuierlich mit Licht bestrahlt. Die grünen, geöffneten Kotyledonen der PTT- resistenten Pflanzen waren anhand ihres Phänotypes deutlich von denen der nicht transformierten Pflanzen (schwachgrüne, geschlossene Kotyledone) zu unterscheiden.

Nach zweiwöchiger Inkubation und Langtagbedingungen auf PPT-haltigem Medium wurden die resistenten Pflanzen auf Substraterde überführt. Nach weiteren 2-3 Wochen wurden ihnen Rosettenblätter entnommen. Diese Blätter wurden entweder bei -80 °C aufbewahrt oder entsprechend der folgenden Analyse direkt zur Gewinnung von DNA respektive RNA verwendet.

Sowohl die Isolation der DNA, als auch die Genotypisierung erfolgte leicht variiert nach der von Bolle *et al.* (2013) beschriebenen Methode. Abweichend vom Protokoll wurden die entnommenen Rosettenblätter vor der Zugabe des DNA-Extraktionspuffers durch Mörsern zerstört. Zudem wurde die DNA mit 100 %-igem Ethanol anstatt Isopropanol präzipitiert und im Anschluss an ihre Isolation in 1x TE-Puffer resuspendiert.

DNA-Extraktionspuffer	10x TE-Puffer	(pH 7.5)	
Tris-HCl(pH 7.5)	200 mM	Tris-HCl(pH 7.5)	0,1 M
NaCl	250 mM	EDTA	10 mM
EDTA	25 mM		
SDS	0.5 %		

2.2.4 Präparation von Ovularen für die Differenzialinterferenzkontrast (DIC)-Mikroskopie

Die Analyse der Embryonalentwicklung in der T-DNA-Insertionslinie WiscDsLox419C10 (*morf1-2*) erfolgte durch die Mikroskopie der Ovularen, die aus manuell bestäubten Blüten hervorgegangen waren.

Zu diesem Zweck, wurden bis dahin ungeöffnete Blüten der Mutante *morf1-2* polliniert. Dazu wurden unter einem Binokular zunächst die Petale und Sepale der Infloreszenzen entfernt. Die so freigelegten Megasporophylle wurden mindesten 24 h bei 21°C unter Langtagbedingungen inkubiert, um die Rezeptivität des maturierten Stigmas zu garantieren.

Im Anschluss wurde der Pollen auf die stigmatische Papille aufgetragen. Die aus den manuell befruchteten Blüten entstandenen Schoten wurden im Abstand von 24-120 h entnommen. Aus ihnen wurden die fertilisierten Ovulare präpariert und auf einen Objektträger überführt, mit 20 μ l Hoyers-Lösung benetzt und unter einem Deckglas luftdicht verschlossen. Im Anschluss an eine 16-stündige Inkubation bei 21 °C erfolgte die Dokumentation der embryonalen Entwicklungsstadien mittels eines Differenzialinterferenzkontrast-Mikroskops (Nikon).

Hoyers-Lösung	
Gum arabicum	7.5 g
Chloralhydrat	100 g
Glycerin BioXtra≥99%	5 ml
ad 60 ml Bidest	

2.2.5 Analyse des Editing-Phänotyps und statistische Auswertung

RNA-Editing stellt einen posttranskriptionellen Prozess dar, in dem definierte Cytidine (C) innerhalb der Nukleotidsequenz der RNA zu Uridinen (U) deaminiert werden. Diese Cytidine werden als Editingstellen bezeichnet. Analysiert wird der Deaminierungsstatus an den betroffenen Editingstellen, bezogen auf die Gesamt-RNA. Die Gesamt-RNA beinhaltet mehrere Kopien der gleichen Transkripte.

Die Editingstelle kann editiert, in dem Fall befindet sich ein U an dieser Position, oder als uneditiertes Cytidin im Transkript vorliegen.

Aus dem Verhältnis der editierten und uneditierten Transkripte ergibt sich die Effizienz mit der die Editingstelle deaminiert wird.

Wird die betroffene Editingstelle in allen Transkripten deaminiert, spricht man von einer Editingeffizienz von 100%. Wird beispielsweise die Hälfte der Transkripte editiert, würde in 50% der analysierten Transkripte ein C und an den übrigen 50% der Editingstellen ein U detektiert werden. Die Editingeffizienz der Gesamt-RNA betrüge demnach im Verhältnis 50 %. Die Editierung der Cytidine ist abhängig von der Formierung eines funktionellen Editosoms aus verschiedenen RNA-Editingfaktoren. Die Rolle dieser *trans*-Faktoren kann, mit Hilfe der Untersuchung ihres Einflusses auf die Editingeffizienz, analysiert werden.

Zu diesem Zweck wurden die zu untersuchenden Transgene in die entsprechende *Arabidopsis*-Mutante transformiert.

Wie bereits erörtert, wurden von den selektionierten, transformierten Pflanzen Rosettenblätter geerntet Aus diesen wurden mittels des NucleoSpin® RNA Kit die Gesamt-RNA isoliert. Im Zuge dessen wurde der Anteil nicht RNA-basierter Nukleinsäuren, durch die Behandlung mit RQ1 RNase-freier DNase, minimiert. Aus dieser RNA wurde mittels der M-MLV reversen Transkriptase und unter Verwendung der von RNA-spezifischen Primer, cDNA synthetisiert (Takenaka und Brennicke, 2007).

Die entsprechenden Transkripte wurden per PCR, mit der GoTaq® G2 DNA-Polymerase amplifiziert. Im Anschluss wurden 5 μ l (100 ng/ μ l) des RT-PCR-Produktes mit 5 μ l (5 pmol/ μ l) transkriptspezifischem Primer zur Sequenzierung an Macrogen, Inc. versandt. Macrogen stellt die Ergebnisse der Sequenzanalyse als Graphen der Funktion der vier Nukleinbasen (A, T, C, G) zur Verfügung. Dies ist exemplarisch in Abbildung 2 dargestellt. Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte mit dem Programm DNADynamo (Blue Tractor Software Ltd.). Die Erhebung der Effizienzdaten erfolgte unter meiner Betreuung und in Zusammenarbeit mit meinem Bachelorstudent Jan Reinert (2016).

Durch die reverse Transkription und die anschließende RT-PCR, entspricht der Graph von Thymin (T) dem ursprünglichen Uracil-Vorkommen. Über das Integral der Funktionen, werden die Flächen unterhalb der Graphen, in den Integrationsgrenzen der Editingstelle, angegeben (Abbildung 2A). Aus dem Verhältnis der Flächen von C und T wird mit der folgenden Formel, die Editingeffizienz berechnet. Sie beschreibt dabei, dass prozentuale Verhältnis der Fläche von T zu der Summe der Flächen von C und T (Abbildung 2B).

Die so ermittelten Editingeffizienzen gingen in die Analyse der Funktionalität der untersuchten Transgene ein. Da der Effekt verschiedener Proteinchimären in der Mutante *morf1-1* miteinander verglichen werden sollte, wurden die folgenden drei Kriterien definiert, um eine einheitliche Interpretation zu ermöglichen.



 $\varepsilon = \frac{T * 100}{T + C}$

 ϵ = Editingeffizienz

T = Fläche unter dem Graphen von T, in den Grenzen der Editingstelle

C = Fläche unter dem Graphen von C, in den Grenzen der Editingstelle

Abbildung 2. Berechnung der Editingeffizienz. (A) Exemplarische Darstellung der von Macrogen zur Verfügung gestellten Sequenzgraphen. Unterhalb der Graphen sind die dazugehörigen Flächen zwischen dem Graphen und der Abszisse aufgelistet. Beide Sequenzabschnitte bilden dieselbe Editingstelle ab. Diese liegt in der linken Darstellung zu ~8% teilweise editiert vor. 92 % der Transkripte wurden dementsprechend nicht editiert. Daraus ergibt sich der offensichtlich größere Anteil an detektierten Cytosinen. In der rechten Abbildung wurde die Editingstellen in allen Transkripten der gesamten, isolierten RNA-Population deaminiert. Die Fläche unter dem Graphen von C entspricht demnach 0. Alle Transkripte beinhalten an dieser Position ein U = T. Die Editingeffizienz beträgt in diesem Beispiel 100 %. **(B)** Formel zur Berechnung der prozentualen Editingeffizienz.

Zum einen sollte die Überexpression des Transgenes in *morf1-1* zu einer statistisch, signifikanten Erhöhung der Editingeffizienz, in Vergleich zu dem ursprünglichen Wert der Mutante, führen. Als Transgene fungierten einerseits MORF1 (Positivkontrolle), MORF2 (Negativkontrolle), MORF3 und MORF8 (Kontrolle auf redundante Effekte der mitochondrialen MORF-Proteine). Zum anderen wurden chimäre Konstrukte aus MORF1 und MORF3 als Transgene in *morf1-1* exprimiert und auf ihre Fähigkeit zur Wiederherstellung des Editing untersucht.

Berechnet wurde die statistische Abweichung der Mittelwerte der Editingeffizienzen untereinander berechnet.

Hierzu wurde der T-Test verwendet. Die Daten bezüglich der Editingeffizienz im Wildtyp Columbia und der Mutante *morf1-1* wurden von Takenaka *et al.* (2012) übernommen. Aus diesen statischen Werten kann keine Standardabweichung entnommen werden. Für die im Anschluss an die Transformation mit den Transgenen ermittelten Editingeffizienzen wurde der Mittelwert (\bar{X}) und die Standardabweichung (σ^2) bestimmt. Diese wurden mittels eines Einstichproben- T-Test auf signifikante Abweichungen von den Referenzwerten in *morf1-1* hin untersucht. Die folgende Formel dient zur Ermittlung des kritischen t-Wertes. Als Signifikanzniveau wurde 5 % angenommen ($\alpha = 0.05$). Bei Schwankungen in N, die eine Ermittlung der Standardabweichung verhinderten, wurde $\sigma^2 = 5.72$ gesetzt. Aus dem t-Wert wurde mit der Excel-Funktion T.VERT der p-Wert berechnet. Überschritt |*P*| das α -Niveau nicht, wurde die Abweichung der beiden Mittelwerte als signifikant angesehen. Kriterium 1 lag somit erfüllt vor und der der beobachtete Effekt galt nicht mehr als zufällig.

t
$$\frac{\overline{X}\varepsilon_{Transgen} - \mu_0}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}}$$
 $t = kritischer t-Wert der Mutante morf1-1
 $\mu_0 = Editingeffizienz in der Mutante morf1-1
 $\sigma = Standardabweichung der Stichprobe$$$

Die signifikante Erhöhung der Editingeffizienz, als Folge der Transformation mit einem Editingfaktor, ist jedoch nicht gleichbedeutend mit der Wiederherstellung des Editinglevels in einem funktionellen Maß. Diesbezüglich wurde ein zweites Kriterium definiert. Dieses besagt, dass $\bar{X} \varepsilon_{Transgen}$ mindestens die Hälfte der Differenz zwischen den Editingeffizienzen des Wildtyp und der Mutante überschreiten muss. Dieser Grenzwert wird im Folgenden als Kappa (κ) bezeichnet.

Das arithmetische Mittel der Editingeffizienz nach der Transformation sollte den definierten Grenzwert Kappa überschreiten ($\kappa < \overline{X} \varepsilon_{Transgen}$). War dies der Fall, galt Kriterium 2 als erfüllt. Um die Auswertung zu erleichtern wurde der K-Wert berechnet.

Dieser stellt die Ration aus κ und $\overline{X} \varepsilon_{Transgen}$ dar. Ergaben sich aus dieser Berechnung Wert < 1, überschritt $\overline{X} \varepsilon_{Transgen}$ den jeweiligen Grenzwert.

	μ ₀ = 1	Referenzwert der Editingeffizienz der Mutante morf1-
$\kappa < ar{X} arepsilon_{Transgen}$	$\mu_{Col} =$	Referenzwert der Editingeffizienz in Columbia
$\mathbf{K} = \frac{\kappa}{\bar{X}\varepsilon_{Transgen}}$	<i>X</i> ε _{Tran} Transf	<pre>sgen = Mittelwert der Editingeffizienz nach der formation mit einem Transgen in morf1-1</pre>
	κ = Transf	Mindestwert der Editingeffizienz nach der formation ($\kappa < \overline{X}$ E) mit einem Transgen

Waren beide Kriterien erfüllt, war einerseits belegt, dass der Effekt, der durch die Transformation hervorgerufen wurde, nicht zufällig sondern signifikant war. Zum anderen war nachgewiesen, dass dieser Effekt ausreichte um Editing innerhalb der definierten Grenzen wieder herzustellen. Der Editingdefekt wurde folglich als komplementiert angesehen.

Zur Auswertung des Effektes der chimären MORF-Konstrukte wurde zusätzlich ein drittes Kriterium eingeführt. In diesem Fall wurden die Mittelwerte der Editingeffizienz, die in Folge der Transformation mit dem Protein MORF1 erhalten wurden ($\overline{X} \varepsilon_{MORF1}$), mit denen der MORF1-MORF3-Chimären ($\overline{X} \varepsilon_{Chim}$) verglichen. Diese statistische Analyse wurde mittels des T-Tests für unabhängige Stichproben durchgeführt. Die Berechnung erfolgt über die nachfolgende Formel.

$$t = \frac{\overline{X} \varepsilon_{MORF1} - \overline{X} \varepsilon_{Chim}}{\sum \overline{X} \varepsilon_{MORF1}^2 - \frac{(\Sigma \overline{X} \varepsilon_{MORF1})^2}{n MORF1} + \Sigma \overline{X} \varepsilon_{Chim}^2 - \frac{(\Sigma \overline{X} \varepsilon_{Chim})^2}{n Chim} * \frac{1}{n MORF1} + \frac{1}{n Chim}$$

$$n MORF1 + n Chim - 2$$

 $\bar{X} \varepsilon_{MORF1}$ = Mittelwert der Editingeffizienz nach der Transformation mit MORF1 in *morf1-1*

- $\overline{X} \varepsilon_{Chim}$ = Mittelwert der Editingeffizienz nach der Transformation mit einem chimären Konstrukt aus verschiedenen N- und C-Terminalen Sequenzen der Proteine MORF1 und MORF3
- n MORF1 = Größe der Stichprobe der Kontrollgruppe MORF1
- n *Chim* = Größe der Stichprobe der Chimärengruppe

|P| wurde mit der Excel-Funktion T.TEST unter direkter Verwendung der Messdaten als Matrizes erhoben.

Das Signifikanzniveau betrug wiederum 5 % ($\alpha = 0.05$). Lag der ermittelte *p*-Wert über 0.05, galten die Mittelwerte der Editingeffizienzen als nicht signifikant voneinander abweichend. Dies bedeutet, dass sich $\bar{X} \varepsilon_{MORF1}$ und $\bar{X} \varepsilon_{Chim}$ so ähnlich waren, dass es zu einer Überschneidung ihrer Normalverteilungsfunktionen im Bereich von 1- α kam. Aufgrund dieser signifikanten Übereinstimmung wurde in Folge dessen von einer annähernd analogen Funktion ausgegangen.

Die Erfüllung dieses dritten Kriteriums gilt als Approximation der durch die Chimäre herbeigeführten Funktionalität, im Vergleich zur Komplementationsfähigkeit von MORF1.

3 Ergebnisse

3.1 MORF-Dimere als Interaktionspartner spezifischer PPR-Proteine

In der von Glass *et al.* (2015) publizierte Veröffentlichung wurde der neue Editingfaktor MEF13 (*Mitochondrial Editing Factor* 13, At3g02330) vorgestellt. Über eine Sequenzvarianz im Gen At3g02330 des *A. thaliana* Ökotyp C24 konnte ein PPR-Protein identifiziert werden, welches an der Editierung des Transkriptes *nad7* beteiligt ist. Durch die Überexpression von At3g02330 als Transgen in C24 konnte Editing an der Stelle *nad7*-213 wieder hergestellt werden. Dieser neu entdeckte Editingfaktor wurde MEF13 genannt.

Zur Untersuchung des Einflusses von MEF13 auf das Editing mitochondrialer Transkripte wurden zwei Mutationslinien analysiert. Zum einen die T-DNA-Insertionslinie *mef13-2*. In Folge der T-DNA-Insertion werden 67 Aminosäuren am C-Terminus der E-Domäne nicht translatiert. Die Verkürzung dieser Domäne führt nicht zu einer Reduktion der Editingeffizienz an der untersuchten Stelle *nad7-213*. Aufgrund dieses fehlenden Phänotypes wurde die EMS-Mutationslinie *mef13-1* analysiert. In dieser führt eine SNP an Nukleotid 200, der kodierenden Sequenz von At3g02330, zu einer Veränderung der resultierenden Aminosäuresequenz von MEF13. Dies führt zu einer Abänderung der Aminosäuresequenz des N-terminalen L-Motives der PLS-Domäne (dieser Teil der Analyse wurde von Dr. Barbar Härtel durchgeführt).

Die PLS-Motive sind an der spezifischen Bindung des *cis*-Elementes in 5'-Richtung des zu editierenden Cytidin beteiligt. Als Resultat der veränderten Bindungsaffinität der PLS-Domäne konnte acht Editingstellen detektiert werden, an deren Deaminierung MEF13 beteiligt ist. Dabei handelt es sich um *ccb452*-50, *ccb452*-415, *cox3*-314, *nad2*-59, *nad4*-158, *nad5*-1665, *nad5*-1916 und *nad7*-213. In diesen Transkripten führt das mutierte *MEF13* zu einem kompletten Ausfall der Deaminierung an den besagten Cytidinresten (diese Analyse wurde von Dr. Barbar Härtel begonnen und von Franziska Glass überprüft und komplettiert).

Als Folge der stabilen Transformation mit dem Konstrukt 35S:*MEF13*, konnte das Editinglevel an allen benannten Stellen mindestens auf Wildtypniveau angehoben werden. Dies indiziert, dass MEF13 am Editing dieser acht Stellen beteiligt ist.

Der bei *mef13-1* beobachtete Makrophänotyp des verlangsamten Wachstums konnte ebenfalls durch die transgene Überexpression von *MEF13* ausgeglichen werden.

Ein Vergleich der von MEF13 betroffenen Editingstellen mit anderen *trans*-Faktoren belegte, dass an der Editierung aller acht Cytidine ebenfalls MORF3 (RIP3) und MORF8 (RIP1) beteiligt sind. Demgegenüber konnte in der *Knock-Down*-Linie von MORF1 keine ausführliche Beeinträchtigung des Editing an *ccb452*-50, *ccb452*-415, *cox3*-314, *nad2*-59, *nad4*-158, *nad5*-1665 und *nad7*-213 nachgewiesen werden.

Diese Beobachtung legte einen funktionellen Zusammenhang zwischen den Editingfaktoren MEF13, MORF3 und MORF8 nahe.

Die Interaktion zwischen MORF3 respektive MORF1 und MEF13 konnte mittels BiFc-Experimenten *in planta* nachgewiesen werden. Zudem konnte innerhalb einer *Yeast Three-Hybrid*-Analyse ein stabilisierender Effekt auf die Interaktion von MORF3 und MEF13 beobachtet werden, der aus der zusätzlichen Expression des Proteins MORF8 resultierte. Eine vergleichbare Stabilisation des Trimers wurde durch die Überexpression von MORF1 nicht erzielt. Dies weist auf eine funktionelle Einheit eines MORF3-MORF8-Heteromers mit MEF13 hin. Die Ergebnisse dieser *in vivo*-Analyse stützen sowohl die BiFc-Daten, als auch die sich überschneidenden Editingdefekte in den *morf3-, morf8-* und *mef13-*Mutationslinien.

Dies könnte ein Hinweis auf eine generelle funktionelle Korrelation zwischen PPR- und MORF-Proteinen sein. Die Anwesenheit mehrerer MORF-Proteine würde in diesem Fall einen stabilisierenden Effekt auf die Formierung des putativen Editosoms ausüben.

3.2 Analyse der bindungsrelevanten Sequenzareale von MORF-Proteinen *in planta*

An der Assemblierung des Editosoms in Mitochondrien und Plastiden in *Arabidopsis thaliana* sind diverse Proteinfamilien beteiligt. Im Folgenden soll besonders auf die Rolle der *Multiple Organellar RNA Editing Factor* (MORF)-Proteine eingegangen werden. Alle MORF-Proteine beinhalten einen ca. 100 Aminosäuren umfassenden konservierten Bereich, der als MORF-Box bezeichnet wird. Dieser konservierte Bereich beinhaltet jeweils vier Sequenzmotive. Sowohl die Position der Motive innerhalb der MORF-Box, als auch deren Aminosäuresequenz variiert leicht innerhalb der Proteinfamilie (Abbildung 3A).

Einige Aminosäuren liegen strikt über alle MORF-Proteine konserviert vor. Dies könnte auf eine strukturelle oder funktionelle Bedeutung hinweisen. Des Weiteren ist unter den nicht strikt konservierten Aminosäuresequenzen zu beobachten, dass meist der chemische Charakter eines Bereiches erhalten bleibt (Abbildung 3B). So beinhalten alle Motive hydrophobe Abschnitte, die potentielle Interaktionsareale darstellen könnten. Grundsätzlich würde dieser Kontakt demnach keiner chemischen Bindung entsprechen, sondern auf polaren Wechselwirkungen beruhen.

Dennoch gibt die geschilderte Ausstattung mit potentiell interagierenden Arealen im Protein keine Auskunft darüber, ob die konservierten Motive an der Interaktion der MORF-Proteine mit anderen editosombildenden Proteinen beteiligt sind. Des Weiteren ist unklar, ob sich der Interaktionsbereich ausschließlich auf die MORF-Box beschränkt. Zudem galt es zu klären, welche Areale der MORF-Proteine an der transienten Interaktion mit unterschiedlichen Proteinfamilien beteiligt sind und weswegen es trotz der strukturellen und sequenziellen Ähnlichkeit innerhalb dieser Proteinfamilie, zu höchst divergenten Effekten auf das Editing der RNA in *Arabidopsis thaliana* kommt.





Länge der Aminosäuresequenz

Motiv 1	Motiv 4	Motiv 3	Motiv 2
81-95	108-122	124-144	157-177
78-92	104-118	119-139	152-172
88-102	113-127	128-148	161-181
76-90	102-116	118-138	151-171
87-101	113-127	128-148	161-181
90-104	116-130	131-151	164-184
48-62	73-87	88-108	121-141
91-105	116-130	131-151	164-184
81-95	107-121	122-142	155-175

Motiv 2

В

Motiv 1



MORF6MAPLFPGCDYEHWLIVMEKPGMORF5MAPLFPGCDYEHWLIVMDKPGMORF2MAPLFPGCDYEHWLIVMDKPGMORF3ETILLDGCDYEHWLIVMEFTDMORF1DTVLFEGCDYNHWLITMDFSKMORF9ETIMLPGCDYNHWLIVMEFPKMORF8ETILLDGCDFEHWLVVEPPQMORF7VPSLVEGCDYKHWLVLMKPPNMORF4FMPDNEGCDFNHWLITMNFPK



MORF9FKGLPGVLWVLPDSTIDVKNKDTG GDKMORF2LEGLPGVLFVLPDSYVDPENKDYG AELMORF3VKALPGVLFVLPDSYVDQENKDYG AELMORF5LEGLPGVLFVLPDSYVDPEFKDYG AELMORF6LEGLPGVVFILPDSYVDPEFKDYG AELMORF1FKDLPGVVFILPDSYIDPQNKEYG GDKMORF8LKELSNVRWVLPDSYLDVRNKDYG GEPMORF4FRDLPGVQYIIPDSYIDVENKVYG GDKMORF7IRSLPDVKWVLPDSFIVDGDNRYG VFF

Ĩ <mark>ĔĔĊĊŰŜĔŴ</mark> ĬŜĔĔĊĊĔĔĨĬĔŔĬŎŔ

Motiv 3

MORF5	IGS	EEEAKKKIYNVSCERYFGFGC EID
MORF2	VGS	EEEAKKRIYNVSCERYLGFGC EID
MORF6	VGS	EEEARKKIYNVSCERYFGFGC EID
MORF3	LGW	QEEAKKKIYSVCTSTYTGFGA LIS
MORF4	AIS	LEEAKKKIYAICTTSYQGFQA TMT
MORF9	LGS	MEEAKKNMYAFSTTTYTGFQC TID
MORF7	LGS	EEEAKRSIYSVSTKYYYAFGC RIH
MORF1	GIS	VEEAKQRMYACSTTTYQGFQA IMT
MORF8	VGS	EDEARMKIYSVSTRCYYAEGA LVS



Motiv 4

MORF6KQQMIDCYVQTLAKIVGS EEEMORF5KQQMIDCYVQTLAKIIGS EEEMORF2KQQMIDCYIQTLAKVVGS EEEMORF9RDQMIDTYLNTLATVLGS MEEMORF8RDEIIDSYIKTLAQIVGS EDEMORF3EEEMINSYVKTLTSVLGW QEEMORF1PEEMVAAYEETCAQGLGI SVEMORF4REEMISIFEQTCAKGLAI SLEMORF7RNHIVQSFVETLAMALGS EEE

Abbildung 3. MORF Proteine enthalten vier konservierte Aminosäuremotive. (A) Motivdiagramm nach MEME (Version 4.11-1). Der Vergleich der Aminosäuresequenzen von MORF1-9 ergab vier konservierte Motive in allen neun Proteinen. Die exakte Position der Motive ist der nebenstehenden Tabelle zu entnehmen. Motiv 1-4 besitzen hohe Signifikanz (e-Wert: 6.1e-084, 8.8e-082, 7.6e-076; Motiv 4 e-value:1.1e-037) (B) (obere Abbildung) Darstellung der konservierten Motive unter Berücksichtigung der Häufigkeit des Vorkommens bestimmter Aminosäuren im Vergleich mit allen betrachteten Sequenzen. Die proteinogenen Aminosäuren sind in folgendem Farbcode dargestellt; dunkelblau – hydrophob, hellblau – aromatisch, nicht hydrophil, orange – nicht hydrophil, gelb – nicht hydrophob, grün – polar, ungeladen hydrophil, dunkelrot – stark positiv geladen, hydrophil, hellrosa – schwach positiv geladen, hydrophil, pink – negativ geladen, hydrophil; (untere Abbildung) Klassement der Motive in verschiedenen MORF Proteinen, zuzüglich dreier flankierender Aminosäuren, entsprechend des Grades der Konservierung der Aminosäuren (MEME). In grau dargestellt sind stark- und schwach hydrophobe bzw. nicht hydrophile Aminosäuren.

Betrachtet werden sollte der Effekt chimärer MORF-Konstrukten in der *Knock Out* – Mutante. Für die T-DNA-Insertionslinie WiscDsLox419C10, künftig als *morf1-2* bezeichnet, konnten auch nach eingehender genotypischer Untersuchungen keine Pflanze identifiziert werden, bei der die besagte Insertion auf beiden Allelen nachweisbar war (Takenaka *et al.*, 2012). Zur Klärung dieses Sachverhaltes wurden die Ovulare heterozygoter *morf1-2*-Pflanzen makrophänotypisch untersucht.

Bei der makrophänotypischen Untersuchung der Ovulare der Linie *morf1-2*, im Vergleich zum Wildtyp, wurden untypisch geformte Samenanlagen beobachtet. Daneben waren auch dem Columbiaphänotyp entsprechende Ovulare, aber kein besonderes Vorkommen an nichtfertilisierten Gametophyten ersichtlich (Abbildung 4).



Colmorf1-2Abbildung 4. Makrophänotypisierung der Ovulare von morf1-2. (A) Im Vergleich zum Wildtyp Columbia (Col)weisen Schoten der Mutanten morf1-2 amorph gestaltete Ovulare auf (Pfeil). Größenstandard 500 µm.

Verschiedene Individuen der *morf1-2*-Population wurden manuell polliniert, um die Möglichkeit einer Embryoletalität oder den Einfluss von MORF1 auf die Gametogenese zu taxieren. Die sich in verschiedenen Stadien der Embryogenese befindlichen Ovulare wurden mikroskopisch analysiert. Die Embryogenese wurde im Abstand von 24 h-120 h dokumentiert (Abbildung 5).

Hierbei konnte 24 h nach der manuellen Pollinierung festgestellt werden, dass der Pollenschlauch das Megasporangium erreicht hat. Es kam jedoch nicht zu einer sichtbaren Fertilisierung, im Sinne der Differenzierung einer Zygote (Abbildung 5A). Üblicherweise hat sich im Anschluss an den Erstkontakt von Pollen und Stigma binnen eines Tages ein Embryo im 4-Zell-Stadium ausgebildet.

Nach 48 h der Inkubation verblieb ein Teil der Gametophyten in infertilem Zustand (Abbildung 5B links). Den höchsten Entwicklungsgrad, der zu diesem Zeitpunkt beobachtet werden konnte, stellten Embryonen im Vierzellstadium dar (Abbildung 5B Mitte, rechts). Zu diesem Zeitpunkt sollten im Wildtyp bereits globuläre Embryonen vorliegen.



Abbildung 5. Bestimmung des Mikrophänotypes heterozygoter morf1-2 Pflanzen. (A) Darstellung zweier Ebenen desselben Archegoniums 24 h nach der Bestäubung. Neben der Mikropyle sind die Synergiden (SY, gelb), der sekundäre Embryosackkern (ESK, blau) und die Eizelle (E, grün) hervorgehoben. Der Pollenschlauch hat das Funiculus erreicht (Pfeil). Eine Fusion der Gameten ist nicht ersichtlich. (B) Abgebildet sind zwei der drei Entwicklungsstadien welche 48 h nach der Pollinierung observiert werden konnten. Von links nach rechts: infertiles Megasporangium, Komplettansicht des fertilen Gametophyten mit Embryo im Vierzellstadium, vergrößerte Darstellung des Embryos im Vierzellstadium mit hervorgehobenen Zellkernen (pink). (C) 72 h nach der Bestäubung sind folgende Embryonalstadien beobachtet worden (von links nach reicht); abgestorbenes Megasporangium (Abortion); Achtzellstadium (Zellkerne in pink) globuläre-; dermatogene-; frühe herzförmige Embryonen; exemplarische Übersicht über das gleichzeitige Vorkommen von der minimalsten Entwicklungsstufe (Abortion) und dem Grad der weitesten Entwicklung (Herzembryo). Diese Varianzen der Stadien wurden alle innerhalb derselben Schote beobachtet. (D) 120 h nach der Bestäubung lagen die Ovulare degeneriert vor, oder es hatten sich Embryonen in folgenden Entwicklungsgraden vor (von links nach rechts) globuläre-, dermatogene, sich im Herzstadium, im späten Herzstadium, im frühen und späten Torpedostadium befindlichen Embryonen. Die Präparation wurde mit Hoyer's Lösung durchgeführt. Die Abbildungen wurden mit einem Differenzialinterferenzkontrast-Mikroskop hergestellt. Größenstandard 0.05 mm

72 h nach der Pollinierung konnten diverse Stadien der Embryogenese beobachtet werden. Die zuvor detektierten nicht fertilisierten, aber vitalen Megasporen, gingen ab diesem Zeitpunkt in abgestorbene Megasporangien über (Abbildung 5C, links, im Folgenden als Abortionen bezeichnet). Die Spanne der embryonalen Entwicklungsstufen reicht hier von Individuen im Achtzellstadium bis zu einem beginnenden Herzstadium (Abbildung 5C).
Nach fünftägiger Inkubation lagen wiederum diverse lebensfähige Embryonalstadien zwischen einem globulären Embryo und dem Torpedostadium vor. Zudem traten ebenfalls wieder Abortionen auf (Abbildung 5D). Nach diesen 120h sollten sich die Embryonen im *"walking stick"*-Stadium befinden (Pagnussat *et al.,* 2005; Xiang *et al.,* 2011).

Als Fazit kann festgehalten werden, dass sowohl im Makro- als auch im Microphenotyp eine Verzögerung der Entwicklung beobachtet wurde. Es ist zu vermuten, dass diejenigen Megasporen, welche nicht zur Entwicklung fähig waren, zu den homozygotmutierten Individuen zählen.



Abbildung 6. Erhöhte Expression des Proteins MORF1 in fertilisierbaren Blüten. Verglichen werden die Expressionslevel (normalisiert) von MORF1 vor und während der Embryogenese. Die Primärachse (links) bildet den betrachteten Zeitraum nach der Bestäubung ab. Die korrespondierenden Embryonalstadien umfassen globuläre Embryonen (48h) bis Embryonen im *"walking stick"*-Stadium (120h), dargestellt in blau (Smyth *et al.*, 1990). Die quantil-normalisierten Expressionsdaten (Intensität der Expression) wurden dem AtGenExpress Visualization Tool entnommen. Die Intensität der normalisierten Expressionslevel sind in rot dargestellt und beziehen sich auf die Sekundärskala (rechts).

Abbildung 6 kann die vergleichende Gegenüberstellung des zeitlichen Ablaufes der Embryogenese mit dem Expressionslevel von MORF1 vor und wärend der Anthese entnommen werden (Schmid *et al.*, 2005). Bei den analysierten Blütenorganen handelt es sich um die Karpelle inklusive des Ovarium, dem Stylus und dem Stigma. Betrachtet wurden zwei Stadien der frühen Blütenentwicklung in *Arabidopsis thaliana*. Dabei ist Stadium 12 unter anderem durch das rapide Wachstum der Petale und des Gynözeums gekennzeichnet. Am oberen Ende des Stylus bildet sich die stigmatische Papille aus. Nach Öffnung der Blüte bildet sich daraus das mature Stigma, welches mit Pollen bestäubt werden kann. Im darauf folgenden Stadium brechen die elongierten Petale durch die bisher verschlossenen Sepale. Dies stellt den Beginn der Anthese dar. Das zweite betrachtete Stadium (Stadium 15) ist durch die Verlängerung des Stigmas über die Stäubblätter hinaus charakterisiert (Smyth *et al.*, 1990). Unterschieden wird hier demnach zwischen noch nicht fertilisierbaren Blüten (Stadium 12) und Blüten die durch Pollen bestäubt werden können (Stadium 15). Die Betrachtung der Embryogenese reicht vom Stadium globulärer Embryonen bis hin zum erreichen des *"walking stick"*-Stadiums.

Es zeichnet sich ab, dass die normalisierten Expressionswerte vor- und im Übergang zur Fertilisierbarkeit der Blüte deutlich höher sind, als zum Zeitpunkt der Embryogenese. Die Werte bleiben über einen großen Teil der frühen Embryonalentwicklung relativ konstant, um dann mit der zunehmenden Ausprägung der Kotyledonen anzusteigen. Dies bedingt im weiteren Sinne, dass Megasporangien im Blütenstadium 15 noch einen erhöhte Expression an MORF1 aufweisen. Das Fehlen eines funktionalen MORF1 hätte demnach einen hohen Effekt zum Zeitpunkt der Fertilisierung. Dies bedingt die Möglichkeit der Abortion homozygoter *morf1-2* Megasporangien.

Um die Analyse einer MORF1-Mutante zu ermöglichen, wurde daraufhin die EMS-Mutationslinie *morf1-1* benutzt (Abbildung 7).



Abbildung 7. Exonstruktur von *MORF1***.** Dargestellt ist die schematisierte Struktur von *MORF1* inklusive der konservierten Motive. Motiv 1 rot, Motiv 2 blau, Motiv 3 grün, Motiv 4 lila. Die Positionen der T-DNA Insertion und des EMS-bedingten Nukleotidpolymorphismus innerhalb der konservierten MORF-Box sind angegeben.

Die Mutagenese des Gens mit EMS führt in diesem Fall zu einem Austausch von Prolin zu Serin an Position 165 der Aminosäuresequenz von MORF1. Abbildung 3 kann entnommen werden, dass es sich bei dem Prolin um ein über alle MORF-Proteine konservierte Aminosäure handelt. Durch Takenaka *et al.* (2012) wurde belegt, dass ein Serin an dieser Stelle einen negativen Effekt auf die Assemblierung des Editosoms ausübt. Dies resultiert in der Verminderung der Editingeffizienz an diversen Stellen mitochondrialer Transkripte.

3.2.1 Verifizierung der Komplementierbarkeit der in der Mutante *morf1-1* betroffenen Editingstellen

Vor der Charakterisierung des Effektes einzelner chimärer MORF-Konstrukte in der Mutante *morf1-1* sollte zunächst sichergestellt werden, dass die Transformation einer Pflanze mit dem hier verwendeten Vektorkonstrukt zu einer Wiederherstellung des Editing innerhalb definierter Kriterien führt.



Abbildung 8. Schematische Darstellung der Kontrollkonstrukte für die Transformation in morf1-1.
(A) Proteinstruktur der Columbia-DNA-basierte MORF-Konstrukte. Alle amplifizierten Sequenzen (ATG - Stopp-Codon) beinhalteten das target-Peptid zur Translokation in die entsprechenden Kompartimente. Die Position der konservierten Motive innerhalb der MORF Box ist dargestellt. Motiv 1 rot; Motiv 2 blau; Motiv 3 grün; Motiv 4 lila.
(B) pAHG41: Plasmid pMDC123 modifiziert mit der GFP-Kassette aus psmGFP4 (eingefügt zwischen *Hincl*l und *EcoR*l) inklusive der MCS aus pET41 (mittels InFusion eingefügt über die *BamH*l-Restriktionsstelle). Die amplifizierten MORF-Sequenzen wurden zwischen Stul und Hindlll kloniert. smGFP4 wurde nicht als Fusionsprotein exprimiert. CaMV 35S: cauliflower mosaic virus 35S Promoter; MORF: MORF-Protein kodierende Sequenz; smGFP4: Sequenz zur Kodierung des modifizierten GFP; NOS T: Terminator der Nopalinsynthase aus *A. tumefaciens*; bar: Phosphinotricin-Acetyltransferase aus *Streptomyces hygroscopicus* (BASTA-Resistenz); CaMV T: Polyadenylierungssignal des cauliflower mosaic virus (Terminator); BR, BL: T-Border rechts und links. Die zur Klonierung genutzten Schnittstellen sind angegeben: Hc: *Hincl*l; B: *BamH*l; S: *Stu*l; Hd: *Hind*lll; E: *EcoR*l.

Da die Bildung des Editosoms an viele der von MORF1 betroffenen Editingstellen ebenfalls unter dem Einfluss anderer MORF-Proteine (MORF3, MORF8) steht, sollte zudem überprüft werden, ob durch deren Überexpression redundante Effekte, bezüglich der Komplementation des Editingdefektes, beobachtet werden können. Des Weiteren wurde kontrolliert, ob der Prozess der Transformation und die Überexpression eines MORF-Proteins in der Pflanze einen Einfluss auf die Wiederherstellung der Editingeffizienz ausüben. Als Transgen wurde in diesem Fall das ausschließlich in Plastiden lokalisierte MORF2 verwendet.

Um die Komplementierbarkeit der verminderten Editingeffizienzen in der *Knock Down*-Linie *morf1-1* zu überprüfen, wurden folgende Konstrukte mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* stabil in die Mutante transfiziert: als Transgene wurden *MORF1*, *MORF2*, *MORF3* oder *MORF8* verwendet. Diese standen unter dem Einfluss des 35S-Promotors (siehe Abbildung 8). Der folgenden Abbildung können die Mittelwerte der analysierten Editingeffizienzen, sowie deren Standardabweichungen entnommen werden. Die dazugehörigen Daten sind im Anhang hinterlegt.



Abbildung 9. Überprüfung der Komplementationsfähigkeit verschiedener mitochondrialer MORF Proteine in *morf1-1* in den Transkripten von atp4 bis cox3. Dargestellt sind die Mittelwerte \bar{x} und die Standardabweichung σ^2 der aus der Sequenzierung der RT-Produkte verschiedener transformierter Linien gewonnenen RNA. (A) Vergleich der Editingeffizienzen zwischen dem WT Columbia (grau) und der durch einen SNP mutierten Version des Proteins MORF1 in *morf1-1* (hellblau) (Takenaka *et al.*, 2012). (B) Editingeffizienz in *morf1-1* nach stabiler Transformation mit MORF1 unter dem Einfluss des 35S-Promotores (dunkelblau). (C) Editingeffizienz in *morf1-1* nach stabiler Transformation mit MORF3 unter dem Einfluss des 35S-Promotores (grün). (D) Editingeffizienz in *morf1-1* nach stabiler Transformation mit MORF8 unter dem Einfluss des 35S-Promotores (rot). In (B)-(D) ist das ursprüngliche Editingniveau in Columbia als graue Linie dargestellt. Die korrespondierenden Zahlenwerte sind tabellarisch im Anhang aufgeführt.



Abbildung 10. Überprüfung der Komplementationsfähigkeit verschiedener mitochondrialer MORF Proteine in *morf1-1* in den Transkripten von matR bis rps4. Dargestellt sind die Mittelwerte \overline{x} und die Standardabweichung σ^2 der aus der Sequenzierung der RT-Produkte verschiedener transformierter Linien gewonnenen RNA. Hierbei ist N=2 oder 1. (A) Vergleich der Editingeffizienzen zwischen dem WT Columbia (grau) und der durch einen SNP mutierten Version des Proteins MORF1 in *morf1-1* (hellblau) (Takenaka *et al.*, 2012) (B) Editingeffizienz in *morf1-1* nach stabiler Transformation mit MORF1 unter dem Einfluss des 35S-Promotores (dunkelblau). (C) Editingeffizienz in *morf1-1* nach stabiler Transformation mit MORF3 unter dem Einfluss des 35S-Promotores (grün). (D) Editingeffizienz in *morf1-1* nach stabiler Transformation mit MORF8 unter dem Einfluss des 35S-Promotores (rot). In (B)-(D) ist das ursprüngliche Editingniveau in Columbia als graue Linie dargestellt. Die korrespondierenden Zahlenwerte sind tabellarisch im Anhang aufgeführt.

Hierbei sind in den Abbildungsabschnitten A jeweils die in *morf1-1* ermittelten reduzierten Editingeffizienzen und deren Zahlenwerte im Vergleich zu Columbia (WT) abgebildet (Takenaka *et al.*, 2012). Den Abschnitten B-D können die arithmetischen Mittel der gemessenen Editingeffizienzen nach der stabilen Transformation der verschiedenen MORF-Sequenzen unter der Kontrolle des 35S-Promotors entnommen werden.

Zur Verifizierung der erhobenen Editingeffizienzen wurde *morf1-1* mit einem Konstrukt, welches die kodierende Sequenz des Transgens *MORF2* beinhaltete, transformiert. Bei MORF2 handelt es sich um einen ausschließlich in Plastiden lokalisiert Editingfaktor. Hierbei beinhaltet 35S::*MORF2* das *Target*-Peptid und sollte dementsprechend in die Chloroplasten transloziert werden. Die Transformation mit diesem Konstrukt sollte keinen Einfluss auf das Editing der mitochondrialen RNA haben.



Abbildung 11. Überprüfung der Komplementationsfähigkeit des plastidären Proteins MORF2 in morf1-1. Dargestellt sind die Mittelwerte \bar{x} und die Standardabweichung σ^2 der aus der Sequenzierung der RT-Produkte verschiedener transformierter Pflanzen gewonnenen RNA. Hierbei ist N=2. Vergleich der Editingeffizienzen zwischen der durch einen SNP mutierten Version des Proteins MORF1 in morf1-1 (hellblau). (Takenaka *et al.*, 2012) und der mit dem plastidär-lokalisierten Protein MORF2 transformierten EMS-Linie morf1-1: 35S::*MORF2*. Das ursprüngliche Editingniveau in Columbia wird durch die graue Linie repräsentiert. **(A)** Komplementationsanalyse für die Transkripte atp4 bis cox3. **(B)** Komplementationsanalyse für die Transkripte matR bis rps4.

Um eine einheitliche Interpretation zu ermöglichen, wurden die Daten statistisch ausgewertet. Dabei erfolgte die Auswertung der Messdaten nach zwei Kriterien. Hierbei beschreibt Kriterium 1 die signifikante Abweichung der Messwerte nach der Transformation vom Referenzwert der Mutante. Kriterium 2 gibt Auskunft über die Wiederherstellung einer ausreichend hohen Editingeffizienz in Folge der Transformation mit den MORF-Konstrukten. Kriterium 1: Signifikante Abweichung vom Referenzwert der Mutante nach der Transformation

> H_{0.1}: $\mu_0 = \bar{X} \varepsilon_{Transgen}$ H_{1.1}: $\mu_0 \neq \bar{X} \varepsilon_{Transgen}$ P $\leq \alpha$

Kriterium 2: Wiederherstellung des Editing durch Transformation

$$\kappa = \mu 0 + (\frac{1}{2} (\mu \text{Col} - \mu 0))$$
$$\kappa < \overline{X} \varepsilon_{Transgen}$$
$$K = \frac{\kappa}{\overline{X} \varepsilon_{Transgen}}$$

 μ_0 = Referenzwert der Editingeffizienz der Mutante *morf1-1*

 μ_{Col} = Referenzwert der Editingeffizienz im Wildtyp Columbia

 $\bar{X} \epsilon_{Transgen}$ = Mittelwert der Editingeffizienz nach der Transformation mit einem Transgen

p –Wert = Maß für signifikante Abweichungen bezogen auf das α –Niveau (5%)

K = Ratio der im Minimum wieder herzustellenden Editingeffizienz und der tatsächlich ermittelten Editingeffizienz

Unter der Annahme, dass die ermittelten Werte der Editingeffizienz (ε) analog zur Standardnormalverteilung vorliegen, wurde die Daten mittels eines Einstichproben-T-Test auf signifikante Abweichungen hin untersucht. Dabei wurde der *p*-Wert der Messpopulation berechnet. Verglichen wurde die Abweichung der Mittelwerte der gemessenen Editingeffizienz nach der Transformation von *morf1-1* mit einem MORF-Konstrukten ($\overline{X}\varepsilon_{Transgen}$) mit dem Referenzwert der Editingeffizienz in der Mutationslinie *morf1-1* (µ₀).

Die Effizienzdaten bezüglich der Mutante *morf1-1* wurden aus Takenaka *et al.* (2012) übernommen. Als Nullhypothese (H_{0.1}) wurde angenommen, dass sich die Editingeffizienzen der Mutationslinie (μ_0) nicht von denen der Transformationslinien ($\bar{X}\varepsilon_{Transgen}$) unterscheide (H_{0.1}: $\mu_0 = \bar{X}\varepsilon_{Transgen}$). Das Signifikanzniveau wurde auf 5% ($\alpha =$ 0.05) festgelegt. Der Freiheitsgrad (df) betrug hierbei meist Eins. Unterschreitet der *p*-Wert das α -Niveau (P $\leq \alpha$) gilt die Nullhypothese als widerlegt. Daraufhin wurde die Alternativhypothese (H_{1.1}: $\mu_0 \neq \bar{X}\varepsilon_{Transgen}$) als Faktum angesehen.

Als Folge dessen galt der Effekt, der aus der Transformation der Mutationslinie mit den columbiabasierten MORF-Proteinen resultierte, nicht als zufällig. Dies ist jedoch nicht grundsätzlich gleichbedeutend mit einer ausreichenden Komplementation, also einer Wiederherstellung des Editinglevels verglichen mit Columbia. Zu diesem Zweck wurde der Grenzwert κ festgelegt. Kappa ist definiert als die Editingeffizienz der Mutationslinie μ_0 , zuzüglich 50% der Differenz der Editingeffizienzen des Wildtyp μ_{Col} und der Mutationslinie μ_0 . Dieser Grenzwert sollte durch den gemessenen Mittelwert der Editingeffizienzen nach der Transfektion $\overline{X} \varepsilon_{Transgen}$ überschritten werden ($\kappa < \overline{X} \varepsilon_{Transgen}$).

Tabelle 3. Komplementationsanalyse der Editingeffizienz zwischen der Mutante morf1-1 und der mit den Transgenen MORF1, MORF2, MORF3 oder MORF8 transformierten Linie morf1-1. Dargestellt sind die *p*- und K-Werte der statistischen Analyse der Mittelwerte und Standardfehler.

		<i>morf1-1</i> : 35S :: MORF1		<i>morf1-1</i> : 35S :: MORF3		<i>morf1-1</i> : 35S :: MORF8		<i>morf1-1</i> : 35S :: MORF2	
Transkript	Locus	p-Wert	K-Wert	p-Wert	K-Wert	p-Wert	K-Wert	p-Wert	K-Wert
atp4	138	9.36E-05	0.77	0.0068	2.87	0.4082	5.12	0.0573	4.00
atp9	167	0.0003	0.86	0.0036	0.92	0.0127	0.93	9.5622	1.00
	93	0.0179	2.23	0.0068	1.97	6.5649	1.53	16.4223	1.58
ccb203	176	0.0145	0.95	0.0007	1.99	3.6274	1.57	3.0670	1.51
	208	0.0006	0.81	0.0004	10.21	0.3539	8.47	1.1945	4.48
	80	0.0064	0.79	-	0.74	24.066	2.47	1.8586	1.35
	164	0.2217	3.68	0.0540	16.01	27.732	7.61	25.3098	8.29
	193	0.0205	2.28	0.2432	1.25	0.5296	1.24	1.6296	1.19
1000	367	4.89E-05	1.65	1.28E-07	12.20	0.6268	9.26	-	-
ccb206	379	0.0004	1.18	0.0213	12.31	0.2967	4.62	0.4003	9.04
	380	4.52E-06	0.87	0.1512	1.97	2.3077	1.05	5./883	3.40
	424 EE1	1.44E-05	0.91	0.0506	1.00	5.8435	1.42	4.44/1	1.35
	551	1.93E-00	0.70	0.0254	1.30	4.7020	1.33	2.5729	1.19
	104	0.0003	0.07	0.0033	1.33	2.9040	1.20	1.9337 E 0247	1.22
	104	0.0043	0.59	0.0219	0.12	13.11/1	1.37	5.0347 21.1771	1.57
cch256	421	0.0003	0.01	0.0333	1 30	5 6275	1 70	0.9577	1.4.4
110250	624	0.2415	1 1 1	0.0200	1.37	1 1061	3 51	0.1655	3 38
	673	0.0066	0.81	0.045	5.95	1.1001	4 70	3 2103	2 54
	103	0.0821	1.02	2 16F-10	1 77	1 3743	3.03	8 1661	1.54
	103	0.2842	1.02	1.87E-10	3.27	0.0070	3.00	20 7178	1.03
	175	0.0024	3.04	5.11E-07	1.18	0.0008	3.24	30.3501	1.25
ccb452	333	0.0031	0.94	1.08E-10	0.94	31.6524	1.31	31.8055	1.34
	406	0.0048	3.74	4.97E-09	1.73	27.3462	1.85	0.8182	2.96
	1280	0.0013	0.64	0.1950	1.66	0.9143	0.93	2.1345	0.96
cox2	138	0.0244	1.00	0.0219	1.61	0.0135	2.91	2.0754	1.97
cox3	257	0.0003	0.83	0.0120	1.54	0.1824	1.93	14.3688	1.47
matR	1807	0.0086	0.72	0.0020	4.57	0.1548	6.12	0.5661	5.11
nad1	500	0.0005	0.77	0.0232	2.25	0.1011	3.28	0.0044	2.02
nad2	995	-	0.75	0.0008	0.88	23.0796	1.72	30.3785	1.63
nad4	836	0.0001	0.98	0.1599	2.00	5.9312	2.15	20.9382	1.65
nad5	1895	-	0.95	0.0294	1.21	0.0152	0.98		0.95
	446	_	0.95	0.0125	1.13	21.0112	1.09	14.7183	1.00
nadb	463	0.0009	0.78	0.0380	2.06	5.5723	2.12	3.5452	2.16
	795	0.0004	0.67	0.0773	2.79	-	5.20	0.9055	2.36
naa7	1137	7.49E-09	0.65	0.3051	1.33	0.0014	1.67	2.1169	1.03
	97	0.0028	0.73	0.1235	2.51	9.2705	1.47	30.1148	1.82
	144	0.0014	3.08	0.3056	0.80	16.4581	0.75	0.0970	0.75
	361	0.0023	0.87	0.0035	0.91	0.1247	0.91	0.0239	0.92
	377	0.0013	0.80	0.0305	0.90	30.9785	1.20	4.3853	1.14
	387	0.1236	1.53	0.3182	2.55	3.6355	6.63	1.3481	7.51
orfX	406	0.2852	1.17	0.0065	0.95	0.0697	0.95	0.1928	1.07
orjx	407	1.12E-06	0.90	0.0779	0.98	5.5462	0.98	0.1551	0.96
	409	4.75E-06	0.75	0.0054	0.88	1.4809	0.97	0.0458	1.05
	412	0.0001	0.91	0.0132	0.97	0.2630	0.95	0.1118	1.01
	440	0.0006	0.68	0.0031	2.55	1.5667	4.66	0.2812	4./6
	4/4	9.14E-05	0.38	0.1276	2.69	21.0919	2.35	0.1602	2.41
	000	0.0069	0.94	5.10E-05	0.80	0.5191	10.69	0.0254	1/.0/
rp15	64	0.0004	0.51	0.0680	1.06	0.3315	12.22	0.0001	2./8
	603	0.0046	0.92	0.0002	0.90	0.5612	0.92	9.4448	0.98
rps3	14/0	0.0004	0.59	0.2708	0.//	30.816/	5.4/	0.1/11	4.18
rnc4	524	2825-05	0.91	0.0011	1.24	0.0290	1.37	2 7260	1.40
1 /254	544	2.026-03	0.90	0.1020	1.4/	0.0113	1.40	2.7300	1.47

Zur Veranschaulichung von Kriterium 2 wurde die Ratio aus dem Grenzwert κ und dem Mittelwert der Editingeffizienzen der transfizierten Pflanzen $\overline{X} \varepsilon_{Transgen}$ berechnet. Diese wird im Folgenden als K-Wert bezeichnet. Ergibt diese Rechnung einen Wert, der kleiner als Eins ist, liegt der ermittelte Wert $\overline{X} \varepsilon_{Transgen}$ über dem definierten Grenzwert κ .

Unter der Kombination beider Kriterien kann folglich davon ausgegangen werden, dass (a) die Transformation einen signifikanten Effekt auf das Editing mitochondrialer Transkripte ausübt, und (b) dieser Effekt zur Wiederherstellung des Editingniveaus innerhalb der definierten Grenzen führt.

Die in Tabelle 3 grau unterlegten Werte markieren Editingstellen, bei denen beide oben erläuterten Kriterien erfüllt waren. Die Editierung der Cytidine an diesen Stellen gilt demnach als ausreichend wieder hergestellt.

Die fehlende Angabe des *p*-Wertes resultiert aus dem Fakt, dass die ermittelten Editingeffizienzen den identischen Wert annahmen. Dies kam üblicherweise nur vor, wenn durch die Transformation ein Editingniveau von 100 % hervorgerufen wurde. Unter diesen Bedingungen kann keine Standardabweichung ermittelt werden. Als Folge dessen war es nicht möglich einen t-Wert und den daraus resultierenden *p*-Wert zu ermitteln. Waren die Werte, im Falle eines fehlenden *p*-Wertes, auf das Columbia-Niveau angehoben, wurde davon ausgegangen, dass Kriterium 1 erfüllt war. Die exakten Zahlenwerte der observierten Mittelwerte zuzüglich der korrespondierenden t- und *p*-Werte, können dem Anhang entnommen werden.

Aus den zuvor dargestellten arithmetischen Mitteln der gemessenen Editingeffizienzen und den in Tabelle 3 dargestellten *p*- und K-Werten, werden folgende Rückschlüsse für die weitere Analyse getroffen:

Die Transformation von *morf1-1* mit *MORF1* führte bei einem Großteil der betrachteten Editingstellen zur Einhaltung beider Kriterien. Wurde das Editing von Cytidinen nicht in ausreichendem Maße wiederhergestellt, werden diese Editingstellen in dem gegebenen Vektorkontext als nicht komplementierbar angesehen. Diese Stellen werden im Folgenden von der Analyse des Effektes einer Transformation mit chimären MORF-Konstrukten ausgeschlossen. Es handelt sich dabei um *ccb203-*93, *ccb206-*164, *ccb206-*193, *ccb206-*367, *ccb206-*379, *ccb256-*624, *ccb452-*103, *ccb452-*123, *ccb452-*175, *ccb452-*406, *cox2-*138, *orfX-*144, *orfX-*387 und *orfX-*406 (siehe Tabelle 3). Die restlichen ~71% der betrachteten Editingstellen gelten demnach, als Folge der Transformation mit MORF1, als komplementierbar.

Bezüglich der Transformation von *morf1-1* mit *MORF2* werden alle Editingstellen, an denen beide Kriterien erfüllt vorlagen, von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Folgende Editingstellen sind dabei durch den Effekt der Transformation mit MORF2 betroffen: *ccb452-*1280, *nad5-*1895, *orfX-*144, *orfX-*361, *orfX-*407.

Unter Ausschluss der oben genannten Editingstellen, treten durch die Transformation von *morf1-1* mit MORF3 an \sim 22 % der zu editierenden Cytidine Editierungsreaktionen

auf. Wohingegen der Effekt des mutierten MORF1-1(P165S), durch ein induziertes Überangebot von MORF8, an \sim 11 % der besagten Stellen zur Komplementation führt.

Am Editing derjenigen Cytidine, an denen durch die Überexpression von MORF8 in *morf1-1* Editing wieder hergestellt werden konnte, sind MORF1 und MORF8 nachweislich beteiligt (Abbildung 12).



Abbildung 12. Editingstellen die durch die Transformation mit 35S::MORF8 in morf1-1 komplementiert werden, sind ebenfalls in rip1 (morf8) betroffen. Am Editing dieser vier in die Analyse einbezogenen Editingstellen, sind sowohl MORF1 als auch MORF8 (RIP1) beteiligt. Beide Mutationslinien (morf1-1, rip1(morf8) weisen im Vergleich mit dem Wildtyp Columbia (Col) einen Defizit in der Editingeffizienz auf, der aus dem knock down bzw. den knock out des entsprechenden Proteine resultiert. Takenaka et al. (2012), Bentolila et al. (2012)

Von den durch die Transformation mit MORF3 komplementierten Editingstellen ist *orfX*-377 ebenfalls in *morf3-1*betroffen. Weshalb, in Folge eines Überangebotes von MORF3 innerhalb der Mitochondrien, sieben weiteren Cytidine editiert werden, verbleibt innerhalb dieser Analyse vorerst unklar.

3.2.1.1 In vivo -Interaktionsanalyse der mitochondrialen Proteine MORF1 und MORF3 mittels Yeast Two-Hybrid

Die Editingfaktoren MORF1 und MORF3 sind in der Lage Homo- und Heteromere zu bilden. Dies wurde von Zehrmann *et al.* (2015) in ausführliche *Yeast Two-Hybrid, Pull down* und *BiFc*-Experimenten belegt. Eine funktionelle Austauschbarkeit der MORF-Proteine innerhalb der Dimere ist unter den gegebenen Beobachtungen jedoch vorstellbar. Grundvoraussetzung für den Austausch eines MORF-Proteins durch ein anderes, innerhalb eines variabel zusammensetzbaren Editosoms, wäre eine ähnliche Interaktion untereinander. Der Grad der Konservierung innerhalb der Motive nimmt entsprechend ihrer Nummerierung ab. Besteht Motiv 1 noch aus 40% Aminosäuren, die über alle MORF-Proteine konserviert vorliegen, sinkt dieses Verhältnis bis auf 7% in Motiv 4 (Motiv 2 33%, Motiv 3 24%). Die übrigen Aminosäuren liegen meist teilkonserviert über einige MORF-Proteine vor. Sie variieren zuweilen und besitzen zumeist hydrophobe Seitenketten. Um die Ähnlichkeit der Interaktion einzuschätzen, wurde eine Interaktionsanalyse anberaumt. Um den Einfluss der MORF-Box inklusive ihrer konservierten Motive an der Bildung von Homo- und Heteromeren interpretieren

zu können, wurden verschiedene MORF1-Deletionskonstrukte hergestellt. Jedes Deletionskonstrukte beinhaltete eine unterschiedliche Kombination an konservierten Motiven und peripheren Bereichen (Abbildung 13).



Abbildung 13. Schematische Darstellung der Konstrukte für die Transformation in S. cerevisiae PJ69-4A (A) Deletionskonstrukte der Proteine MORF1 und MORF3 zur Co-Transformation in PJ69-4A. Der schematischen Darstellung kann die Position der konservierten Sequenzmotive im Bezug zur restlichen Aminosäuresequenz (grau) in MORF1 entnommen werden. Die MORF-Konstrukte beinhalten verschiedene N- bzw. C-terminale Bereiche der MORF-Box. Angegeben ist die Läge der jeweiligen Aminosäuresequenz, deren Ausstattung und Positionierung bezüglich der potentiell an einer Interaktion beteiligten Motive. Farbcodierung: Motiv 1 rot; Motiv 2 blau; Motiv 3 grün; Motiv 4 lila. Die amplifizierten Sequenzen beinhalteten kein target-Peptid und keine Introns. Die C-terminalen Konstrukte von MORF1 beinhalten den Bereich von Aminosäure 242-407 nicht. (B) Plasmid pGBK41-pst: modifizierter Vektor pGBKT7. Die MCS in pGBKT7 wurde durch die MCS von pET41(a+) im Bereich von EcoRl bis Notl ersetzt. pGBK41pst wurde mit Stul und Pstl linearisiert. Die amplifizierten MORF-Sequenzen wurden über die flankierenden Adapter mittels InFusion zwischen Stul und Pstl kloniert. Dies führt zu einer Expression eines Fusionsproteins der GAL4 DNA-Bindungsdomäne und einem der MORF-Konstrukte (C) Plasmid pGAD41: modifizierter Vektor pGADT7. Die MCS in pGBKT7 wurde durch die MCS von pET41(a+) im Bereich von EcoRl bis Xhol ersetzt. Die Hindlll Restriktionsstellen an Position 1480 und 2280 wurden eliminiert. Die Deletionskonstrukte wurden mit den für die InFusion benötigten Stul- respektive Hindlll-Adapterprimern amplifiziert, sodass sie rekombinant in die MCS des Plasmides pAD41 kloniert werden konnten. yADH1^p: S. cerevisiae ADH1 Promotor; T7: T7 RNA Polymerase Promotor; NLS: SV40 Nuclear Localization Signal; GAL4 DNA BD: DNA bindende Domäne des GAL4 Transkriptionsfaktors (1–147); GAL4 AD: Aktivierungsdomäne des GAL4 Transkriptionsfaktors (768–881); HA Tag: Hemagglutinin Epitop Tag; c-Myc: c-Myc Epitop Tag; MCS: Multiple Cloning Site MORF: MORF-Deletion kodierende Sequenz; yADH1^T: S. cerevisiae ADH1 Terminator; T7^T: T7 Terminator; Die zur Klonierung genutzten Schnittstellen sind angegeben: E: EcoRl; Hd: Hindlll; N: Notl; P: Pstl; S: Stul; X: Xhol

Der Endpunkt der MORF1- Deletionskonstrukte wurde so gewählt, dass dessen Position kongruent zu der des Stopp-Codons in MORF3 gelegen war. Somit fehlt ein Teil des nichtkonservierten C-Terminus von MORF1 (Aminosäure 242-407). Damit sollte dessen Einfluss auf die Interaktion zwischen MORF-Proteinen herausgestellt werden.

Innerhalb des *Yeast Two-Hybrid* Systems basierend auf dem GAL4-Transkriptionsfaktor wurden die Konstrukte auf ihre Interaktionsfähigkeit, in physikalischer, nicht funktionaler Hinsicht untersucht.

Für die heterologe Expression der rekombinanten Proteine in *S. cerevisiae* PJ69-4A wurden die modifizierten Plasmide pGAD41 und pGBK41-pst verwendet. pGAD41 kodiert dabei für ein Fusionsprotein aus der GAL4-Transkriptionsaktivierungsdomäne und dem zu untersuchenden Konstrukt. Der transfizierte Vektor pGBK41-pst beinhaltet die Sequenz zur Expression eines Hybridkonstruktes aus der DNA-Bindungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors und dem zu untersuchenden MORF-Protein bzw. MORF-Deletionskonstrukt.

In Abbildung 9 und Abbildung 10 ist das Wachstum transgener Hefen auf QDO SD-Minimalmedium, in An- und Abwesenheit von 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT) dargestellt. Die Proliferation der Zellen stellt einen Beleg der Prototrophie für LEU2, TRP1, HIS3 und ADE2, durch die Transkriptionsaktivierung an den GAL4-responsiven Promotoren, dar.

Auf QDO SD-Medium konnte unabhängig davon, mit welchem Teil des GAL4-Transkriptionsfaktors die verkürzten MORF1-Sequenzen fusioniert wurden, Interaktion beobachtet werden. Dies betrifft alle C-terminalen Konstrukte, sowie MORF1_N1 und MORF1_N2 (Abbildung 14). Eine Beteiligung an der Bildung von Dimeren mit MORF1 kann, unter dem Einfluss von 3-AT, für die Konstrukte MORF1_C1, MORF1_C2 und MORF1_C3 in pGBK41-pst und MORF1_C0, MORF1_C1 und MORF1_C2 in pGAD41 beobachtet werden. Demnach würde die Bildung von MORF1-Homomeren grundsätzlich unter der Beteiligung von Motiv 2 (blau) und/oder Motiv3 (grün) ablaufen.

Das Deletionskonstrukt MORF1_C4 kann mit MORF1 interagieren. Da jedoch sowohl AD-MORF1_C0 und AD-MORF1_N1 unter strikteren Selektionsbedingungen (QDO SD-Medium + 3-AT) mit MORF1 dimerisieren, scheint die von *morf1_C4* kodierte Sequenz keinen stabilisierenden Einfluss auf diese Interaktionen auszuüben.

Die Hybridproteine DNA-BD-MORF1_C0 und DNA-BD-MORF1_N1 führen zur Autoaktivierung der Reportergenexpression (Abbildung 14, oben)

An der Bildung von MORF1-MORF3-Heteromeren ist Motiv 3 maßgeblich beteiligt. Sowohl in Kombination mit der DNA-Bindedomäne (DNA-BD), als auch der Transkriptionsaktivierungsdomäne (AD) interagieren MORF1_C0, MORF1_C1, MORF1_C2, MORF1_N1 und MORF1_N2 mit MORF3 (Abbildung 14, QDO SD-Medium).



Abbildung 14. Interaktionsanalyse zwischen den MORF1-Deletionskonstrukten, MORF1 und MORF3. Dargestellt ist das Proliferationsverhalten kotransformierter Hefe-Zellen, als Folge der Transkriptionsaktivierung der Reportergene *HIS3* und *ADE2*. pGAD41 und pGBK41-pst (inklusive des angegebenen MORF-Sequenz) wurden in PJ69-4A-Zellen kotransformiert, selektioniert und als Suspension mit einer O.D.₆₀₀ von 0,3 auf QDO SD-Minimalmedium (+/- 2.5 mM 3-AT) kultiviert (9 d, 28 °C). Das getropfte Volumen betrug 10 µl. Die Deletionskonstrukte (MORF1_CO – MORF1_N3), sowie *MORF1* und *MORF3* wurden auf ihre Interaktion hin untersucht. Alle Konstrukte beinhalteten weder Introns noch das mitochondriale Translokationssignal. QDO SD: Minimalmedium ohne Zusatz von Tryptophan, Leucin, Histidin und Adenin; QDO SD + 3-AT: Minimalmedium ohne Zusatz der genannten Supplemente und mit 2.5 mM 3-Aminotriazol. MCS: *Multiple Cloning Site* ohne ein zu untersuchendes Gen (Autoaktivierungskontrolle). This research was originally published in [JBC. Zehrmann A, Härtel B, Glass F, Bayer-Császár E, Obata T, Meyer E, Brennicke A, Takenaka M. Selective Homo- and Heteromer Interactions between the Multiple Organellar RNA Editing Factor (MORF) Proteins in *Arabidopsis thaliana*. The Journal of Biological Chemistry. 2015; 290, 6445-6456.] © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Modifikation und Übesetzung mit Genehmigung von American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

Der C-Terminus in- und exklusive Motiv 2 (blau) reichen einerseits nicht aus, um ein stabiles MORF1-MORF3-Dimer zu bilden. Dies betrifft die Interaktion mit MORF1_C3 und MORF1_C4. Andererseits können, durch das Hinzukommen der Aminosäuren 123-156 (Motiv3 124-144, grün), MORF1_C2 und MORF3 miteinander interagieren.

Auf N-terminaler Seite interagiert AD-MORF1_N3 nicht mehr mit MORF3. Dies spricht dafür, dass der N-Terminus ab Aminosäure 61 inklusive Motiv 1 (rot) und Motiv 4 (lila) nicht zur Heterodimerisierung ausreicht. MORF1_N2 beinhaltet Motiv 3, welches das Deletionskonstrukt zur Dimerisierung befähigt. Unter dem Einfluss von 2.5 mM 3-AT konnte keines der N-terminalen MORF1-Konstrukte mit MORF3 interagieren. Dies gilt für beide Richtungen der Interaktion.

Unter dem Einfluss von 3-AT proliferieren die Zellen als Folge der Interaktion von MORF3 mit AD-MORF1_C0 und MORF1_C1, MORF1_C2 und MORF1_C3 in pGBK41-pst. Interessant ist, dass AD-MORF1_N1 nicht mit MORF3 dimerisiert. Das bedeutet, dass die fehlende Aminosäuresequenz von 178 bis 241 in MORF1_N1 einen destabilisierenden Effekt auf die Heterodimerbildung ausübt. Dieser Effekt ist bei der Interaktion zwischen MORF3 und MORF1_C0 nicht zu beobachten.

Das Interaktionsverhalten der Deletionskonstrukte untereinander wurde ebenfalls analysiert. Die Ergebnisse können Abbildung 15 entnommen werden.

Zunächst fällt auf, dass im Vergleich mit MORF1 (61-407, ebenfalls in Abbildung 15 dargestellt) keine Dimerisierung mit AD-MORF1_C3 respektive AD-MORF1_C4 auftritt (Abbildung 15, oben). Diesbezüglich verhalten sich die um den Sequenzabschnitt 242-407 verkürzten MORF1-Konstrukte MORF3-ähnlich. Der C-Terminus (242-407) des Proteins MORF1 könnte einen schwachen stabilisierenden Effekt auf die Bildung von MORF1-Homomeren ausüben. Die beiden kürzeren C-terminalen Sequenzen MORF1_C3 und MORF1_C4 interagieren nicht bzw. minimal mit den Deletionskonstrukten MORF1_C3, MORF1_C4, MORF1_N1, MORF1_N2 und MORF1_N3.

Dieser Effekt war unabhängig davon, mit welchem Part des Transkriptionsfaktors sie fusioniert wurden, zu beobachten.

Dieses Interaktionsverhalten weitet sich, unter dem Einfluss von 3-AT, auf alle überprüften MORF-Konstrukte aus (Abbildung 15, unten). Der Aminosäuresequenzbereich von Position 156 bis 241 reicht demnach nicht zur Bildung von Homodimeren aus. Unter der Selektion mit Histidin und Adenin interagierten die Konstrukte AD-MORF1_C1 und AD-MORF1_C2 mit DNA-BD-MORF1_C1, DNA-BD-MORF1_C3, DNA-BD-MORF1_N2, DNA-BD-MORF1_N3.

Zur Homodimerisierung waren ebenfalls AD-MORF1_N1 und AD-MORF1_N2 mit DNA-BD-MORF1_C2, DNA-BD-MORF1_N2 und DNA-BD-MORF1_N3 fähig.



Abbildung 15. Interaktionsanalyse der MORF1-Deletionskonstrukten. Dargestellt ist das Proliferationsverhalten kotransformierter Hefe-Zellen, als Folge der Transkriptionsaktivierung der Reportergene *HIS3* und *ADE2*. pGAD41 und pGBK41-pst (inklusive des angegebenen MORF-Deletionskonstrukte) wurden in PJ69-4A-Zellen kotransformiert, selektioniert und als Suspension mit einer O.D.₆₀₀ von 0,3 auf QDO SD-Minimalmedium (oben) und QDO SD-Minimalmedium + 2.5 mM 3-AT (unten) kultiviert (9 d, 28 °C). Das getropfte Volumen betrug 10 μl. Die Deletionskonstrukte (MORF1_CO – MORF1_N3) wurden auf ihre Interaktion hin untersucht. Die Ergebnisse der Interaktionsanalyse mit MORF1 in pGBK41-pst wurden aus übersichtsgründen erneut aufgeführt. Alle Konstrukte beinhalteten weder Introns noch das mitochondriale Translokationssignal. QDO SD: Minimalmedium ohne Zusatz von Tryptophan, Leucin, Histidin und Adenin; QDO SD + 3-AT: Minimalmedium ohne Zusatz der genannten Supplemente und mit 2.5 mM 3-Aminotriazol. MCS: *Multiple Cloning Site* ohne ein zu untersuchendes Gen (Autoaktivierungskontrolle).

Folglich würde eine Interaktion zwischen MORF-Proteinen sowohl durch die Interaktion der C-Termini untereinander ermöglicht werden. Dies würde unter der Beteiligung von Motiv 3 (grün) und/oder Motiv 2 (blau) geschehen. Das Vorhandensein des N-Terminus wäre dabei nicht zwingend notwendig. Unter der strikteren Selektion mit 3-AT erweitert sich der für eine Interaktion der verkürzten C-Termini benötigte Bereich um Motiv 4 (lila). Auch die Interaktionen zwischen den C- und N-Termini kann durch eine Kombination von Wechselwirkungen zwischen den Motiven 3 und 4 abgeleitet werden.

Aufgrund dieser strukturellen Analyse tritt die Schlussfolgerung ein, dass die MORF-Box an der Interaktion zwischen MORF-Proteinen beteiligt ist. Unter strikter Selektion können MORF1-Homomere unter Beteiligung der C-terminalen Konstrukte und dem längsten N-terminalen Deletionskonstrukte ausgebildet werden. Auch MORF3 und die verkürzten MORF1- Deletionskonstrukte sind zur Heterodimerisierung fähig. Die Nterminalen MORF1-Konstrukte sind unter der Inhibierung mit 3-AT nicht mehr in der Lage Dimere mit MORF3 zu bilden. Bezüglich der Interaktion der Deletionskonstrukte untereinander führt das Fehlen der Aminosäuresequenz im Bereich von 242-407 am C-Terminus zu einem MORF3-ähnlichen Interaktionsmuster. Diesem C-Terminus könnte folglich ein stabilisierender Effekt in der Bildung von MORF- Dimeren zukommen.

3.2.2 Funktionalitätsanalyse der MORF1-MORF3-Chimären in der Mutante *morf1-1*

Analog zu den unter 3.1.1. erhobenen Daten, wurden chimäre Konstrukte aus den Proteinen MORF1 und MORF3 auf ihre Fähigkeit zur Komplementation von Editingdefekten in *morf1-1* hin untersucht. Ein Schema der verwendeten Chimären ist der folgenden Abbildung zu entnehmen. Die Positionen des Übergangs zwischen den *MORF1-* respektive *MORF3-*basierten Sequenzen wurden so gewählt, dass jeweils mindestens eines der konservierten Motive zwischen den schlussendlich exprimierten Proteinen ausgetauscht wurde (Abbildung 16).



		Position ab Start-Codon								
	Motiv 1		Motiv 4	X	Motiv 3		Motiv 2			
MORF 1	81-95		108-122		124-144		157-177			
MORF 3	88-102		113-127		128-148		161-181			

Abbildung 16. Schematische Darstellung der chimären MORF1-MORF3-Konstrukte. Abgebildet sind die beiden Proteine, aus deren Sequenzen sich die Chimären zusammensetzten. Es handelt sich um MORF1 und MORF3. Die zusammengesetzten Proteinkonstrukte bestehen aus einem MORF1-basierten N-Terminus und einem MORF3-basiertem C-Terminus. Darauf bezieht sich die Nomenklatur M1M3. Der zweite, namensgebende Teil der Bezeichnung bezieht sich auf den Übergang, von den MORF1- zu den MORF3-basierten Sequenzen. Die Übergangsposition 2 befindet sich hinter dem 2. konservierten Motiv. Übergangsposition 3 hinter dem dritten- und Übergangsposition 4 hinter dem vierten konservierten Motiv. Darauf bezieht sich die Nomenklatur N2C2, N3C3, N4C4. So ergeben sich chimäre Konstrukte, die sich jeweils um die Sequenz eines konservierten Motives (zuzüglich des korrespondierenden N- oder C-Terminus) voneinander unterschieden. In der MORF3-basierten Sequenz kam es an Position 128 zu einem Austausch von E zu Q in M1M3N2C2. G an Position 182 (MORF3) wurde durch die Fusion von M1M3N4C4 deletiert. Die Länge der jeweiligen Aminosäuresequenz ist angegeben. Die Position der konservierten Motive kann dem oberen Teil der Abbildung und der Tabelle entnommen werden. Die jeweiligen Konstrukte wurden in das Plasmid pAHG41 kloniert.

Im Anschluss an die Transfektion mit den entsprechenden chimären Konstrukten wurde die cDNA diverser Individuen einer Pflanzenpopulation auf die Editierung der entsprechenden Transkripte hin untersucht.

In Abbildung 17 sind die arithmetischen Mittel und Standardabweichungen der Messreihen dargestellt. Die zugehörigen Daten sind im Anhang hinterlegt. Diese Daten wurden zur Ermittlung der signifikanten Abweichung vom Referenzwert in *morf1-1* (μ_0) herangezogen (Kriterium 1, *p*-Wert). Zudem wurde die Wiederherstellung einer geeignet hohen Editingeffizienz überprüft (Kriterium 2, K-Wert). Die p- und K-Werte der statistischen Analyse der Komplementationsfähigkeit von M1M3N2C2, M1M3N3C3 und M1M3N4C4 in *morf1-1* können Tabelle 4 entnommen werden.



Abbildung 17. Überprüfung der Komplementationsfähigkeit verschiedener MORF1-MORF3-Chimären in *morf1-1* in den Transkripten von *atp4* bis *rps4*. Dargestellt sind die Mittelwerte \overline{x} und die Standardabweichung σ^2 der aus der Sequenzierung der RT-Produkte verschiedener transformierter Linien gewonnenen RNA. (A) Editingeffizienz in *morf1-1* nach stabiler Transformation mit dem chimären Konstrukt M1M3N2C2 unter dem Einfluss des 35S-Promotor (hellgrau). (B) Editingeffizienz in *morf1-1* nach stabiler Transformation mit dem chimären Konstrukt M1M3N3C3 unter dem Einfluss des 35S-Promotor (grau). (C) Editingeffizienz in *morf1-1* nach stabiler Transformation mit dem chimären Konstrukt M1M3N4C4 unter dem Einfluss des 35S-Promotor (dunkelgrau). In (A)-(C) ist das ursprüngliche Editingniveau in Columbia als graue Linie dargestellt. Die Editingeffizienz der durch einen SNP mutierten Version des Proteins MORF1 in *morf1-1* kann den hellblauen Balken entnommen werden.

Tabelle 4. Analyse der Komplementationsfähigkeit der chimären Konstrukte M1M3N2C2, M1M3N3C3 und M1M3N4C4 in *morf1-1*. Auswertung der statistischen Abweichung der Editingeffizienz vom Referenzwert in *morf1-1* (p-Wert, Kriterium 1) und der Wiederherstellung des Editing der spezifischen Cytidine (K-Wert, Kriterium 2). Grau unterlegte Daten erfüllen beide Kriterien. Der p-Wert überschreitet das Signifikanzniveau α (0.05%) demnach nicht. Kriterium 2 lag erfüllt vor, wenn der definierte Grenzwert κ durch die ermittelte Editingeffizienz überschritten wurde. Die Ratio beider Werte ergab einen K-Wert ≤ 1 (K= $\kappa/\overline{X}\epsilon_{Transgen}$).

		morj 35S :: M1	f1-1: .M3N2C2	<i>morf1-1</i> : 35S :: M1M3N3C3		<i>morf1-1</i> : 35S :: M1M3N4C4	
Transkript	Locus	p-Wert	K-Wert	<i>p</i> -Wert	K-Wert	<i>p</i> -Wert	K-Wert
atp4	138	5.15E-05	0.85	0.0003	0.78	0.0003	0.79
atp9	167	0.0133	0.91	0.0077	0.90	4.69E-06	0.86
ccb203	176	0.0005	0.94	0.2941	1.07	0.0119	1.00
ccb203	208	0.0022	0.71	0.0658	1.05	0.0034	1.00
ccb206	80	0.0003	0.81	2.65E-05	0.83	0.0003	0.74
ccb206	380	0.1322	1.00	0.0163	0.93	3.65E-05	0.89
ccb206	424	0.1164	1.02	0.0983	1.09	0.0091	0.93
ccb206	551	0.0002	0.78	0.0001	0.77	0.0005	0.80
ccb206	566	0.0071	0.90	0.0014	0.83	0.0001	0.82
ccb256	184	4.16E-07	0.55	4.54E-05	0.56	8.57E-05	0.57
ccb256	421	6.94E-07	0.60	7.45E-06	0.61	6.25E-08	0.60
ccb256	458	0.0699	0.99	0.0546	0.96	0.0014	0.99
ccb256	673	0.0018	0.81	0.0003	0.83	8.56E-05	0.82
сох3	257	4.23E-05	0.85	9.30E-05	0.84	1.72E-05	0.85
matR	1807	1.83E-05	0.67	4.20E-05	0.65	0.0025	0.74
nad1	500	-	0.75	-	0.75	-	0.75
nad2	995	-	0.75	-	0.75	2.19E-05	0.76
nad6	446	0.0013	0.96	0.0002	0.95	6.15E-05	0.95
nad6	463	0.3090	2.23	0.3134	2.21	0.3055	2.31
nad7	795	0.0543	0.91	8.92E-05	0.97	0.1774	1.28
nad7	1137	0.2995	1.76	0.0387	0.80	0.0039	0.73
orfX	97	1.31E-09	0.71	1.67E-07	0.60	0.0016	0.77
orfX	377	0.1148	1.03	0.0023	0.71	0.1524	0.89
orfX	409	0.0126	0.86	1.24E-05	0.78	0.0002	0.80
orfX	412	0.3417	1.20	0.0004	0.94	0.0869	0.99
orfX	440	0.0030	0.73	6.38E-06	0.66	4.61E-05	0.68
orfX	474	0.0045	0.58	0.0018	0.43	0.0032	0.51
orfX	666	0.0337	0.90	0.1616	0.96	0.1107	0.97
rpl5	64	0.0027	0.67	0.0074	0.75	0.0031	0.65
rps3	603	0.0060	0.98	0.2513	1.21	0.2509	1.03
rps3	1470	0.0004	0.68	1.16E-06	0.67	1.99E-05	0.60
rps3	1534	0.0509	0.92	0.0284	1.16	0.2583	1.32
rps4	524	0.0439	0.98	0.0323	0.94	0.0065	0.94

Bezüglich der Zusammensetzung des Editosoms an den verschiedenen Editingstellen werden offenkundig unterschiedliche Sequenzareale der Proteine MORF1 bzw. MORF3 benötigt. Bei ~ 61 % der Editingstellen führt die Transformation mit allen drei Chimären zur Erfüllung von Kriterium 1 und 2. Dementsprechend könnten einerseits die ersten beiden konservierten Motive der MORF-Box ausreichen, um ein funktionales Editosom in *morf1-1* zu bilden. Andererseits könnten die C-terminalen Motive der MORF-Box zwischen MORF1 und MORF3 austauschbar sein. 12 % der beobachteten Stellen können ausschließlich durch M1M3N3C3, nicht aber durch M1M3N2C2 oder M1M3N4C4, editiert werden. Dies würde einerseits auf eine elementare Bedeutung von Motiv 3 basierend auf MORF1 hinweisen. Andererseits spricht es für eine Infunktionalität der kompletten MORF1-MORF-Box in Kombination mit dem verkürzten MORF3-basierten C-

Terminus in Bezug auf diese Editingstellen. Grundsätzlich könnten diese beiden Interaktionsmodi ein Hinweis auf eine unterschiedliche Funktionsweise von kurzen und langen MORF-Proteinen innerhalb des Editosoms sein. Jeweils 3-6 % der verbleibenden Editingstellen können durch verschiedene Kombinationen an Motiven editiert werden.

Aufgrund dieser unterschiedlichen Interaktionsmuster sollte geklärt werden, ob es Ähnlichkeiten in der Funktionsweise der MORF1-MORF3-Chimären, MORF1 oder MORF3 gäbe.

Zu diesem Zweck wurde zuzüglich zu den in 3.1.1. beschriebenen Kriterien (Kriterium 1: Signifikante Abweichung vom Referenzwert der Mutante nach der Transformation; Kriterium 2: Wiederherstellung des Editing durch Transformation) ein drittes Kriterium eingeführt.

Kriterium 3 trifft eine Aussage darüber, ob sich die Editingergebnisse der Komplementation mit den MORF1-MORF3-Chimären von denen der Transformation mit MORF1, respektive MORF3 in *morf1-1* unterscheiden.

Dieses Kriterium wurde mit Hilfe eines T-Test für unabhängige Stichproben ermittelt. Es handelt sich demnach um einer vergleichende Analyse der Differenz der ermittelten Editingeffizienzen. Der analytische Mehrgehalt dieser Erhebung besteht darin, dass nicht nur unterschieden wird, ob und wie gut das Editing rekonstruiert wurde, sondern wie ähnlich das funktionelle Verhalten der Chimären zum Referenz-MORF ist. Im Sinne der statistischen Analyse musste eine weitere Nullhypothese H_{0.2} für dieses Kriterium erhoben werden. Diese besagt, dass sich die Editingergebnisse der Komplementation mit den MORF1-MORF3-Chimären von denen der Transformation mit MORF1 oder MORF3 in *morf1-1* unterscheiden. Demnach lautet die Alternativhypothese, dass beide Transformationen zu ähnlichen Ergebnissen führen.

Kriterium 3: Ungleichheit der Editingeffizienzen ε bezüglich MORF1 und den MORF1-MORF3-Chimären nach der Transformation in *morf1-1*

 $H_{0.2}: \quad \overline{X} \varepsilon \text{ MORF} \quad \neq \quad \overline{X} \varepsilon \text{ Chimäre}$ $H_{1.2}: \quad \overline{X} \varepsilon \text{ MORF} \quad = \quad \overline{X} \varepsilon \text{ Chimäre}$ P ≤ α

 $\overline{X} \varepsilon_{MORF}$ = Mittelwert der Editingeffizienz nach der Transformation mit MORF1 oder MORF3 in *morf1-1*

 $\overline{X} \varepsilon_{Chimäre}$ = Mittelwert der Editingeffizienz nach der Transformation mit einer MORF1-MORF3-Chimäre in *morf1-1*

P = p-Wert

 α = Signifikanzniveau 5 %

Greift die Alternativhypothese H_{1.2} bedeutet dies, dass sich die posttransformativ ermittelte Editingeffizienzen ε nicht mit statistischer Signifikanz voneinander unterscheiden. Aus dem Signifikanzniveau α von 5% und dem sich aus der Kurvenmodulation des Freiheitsgerades n₁+n₂-2 (df=3-5) ergebenden kritischen t-Wert, ergibt sich folgender Zusammenhang:

Alle Werte die sich im Bereich 1- α bewegen, weichen um einen geringeren Betrag als den jeweiligen kritischen t-Wert voneinander ab. Folglich sind sich die ermittelten Editingeffizienzen so ähnlich, dass von einer hinreichend gleichen Funktionalität ausgegangen werden kann. Das Ausmaß der Ähnlichkeit korreliert mit dem ermittelten |P|. Demnach gilt Kriterium 3 als erfüllt, wenn der *p*-Wert sich oberhalb des Signifikanzniveaus α bewegt. Das bedeutet, dass sich die beiden T-Verteilungen der Editingeffizienzen überschneiden. Der zur Ermittlung des *p*-Wertes verwendete T-Test war zweiseitig. Die Verteilung der Varianz wurde als heteroskedatisch deklariert. Diese Schlussfolgerung erging aus der vorab durchgeführten ANOVA (Varianzanalyse; Daten nicht gezeigt). Aufgrund des Vorhandenseins von zwei unabhängigen Matrizes, war eine gesonderte Berechnung des T-Wertes *a priori* nicht notwendig.

Im Folgenden werden die Komplementationsfähigkeit, sowie die Funktionsanalogie der einzelnen chimären Konstrukte im Vergleich zu MORF1 bzw. MORF3 besprochen.



Abbildung 18. Übersicht der statistischen Analyse der Komplementationsfähigkeit von M1M3N2C2 in *morf1-1* entsprechend der Kriterien 1 und 2. Verhältnis der Editingstellen, an denen durch die Transformation mit M1M3N2C2 Editing erzeugt werden konnte oder die Veränderung der Aminosäuresequenz in einem Funktionsverlust resultierte.

Durch die Transformation mit M1M3N2C2 konnten 70 % der betrachteten Editingstellen komplementiert werden. Das bedeutet, durch die Transformation mit M1M3N2C2 in *morf1-1* konnte eine Editingeffizienz erzeugt werden, die mindestens 50% der Differenz des Editinglevels zwischen *Columbia* und *morf1-1* erzeugt. Diese wich gleichzeitig signifikant vom verminderten Referenzwert in *morf1-1* ab (Abbildung 17, Tabelle 4).

M1M3N2C2 beinhaltet den *MORF1*- kodierte N-Terminus, Motiv 1 und Motiv 4. Der C-Terminus dieser Chimäre, inklusive Motiv 3 und Motiv 2, entspricht den Sequenzen in MORF3. Die vorgenommene Sequenzveränderung hat an diesen 70 % der betrachteten Editingstellen keinen negativen Effekt auf die Funktionalität des Proteins im Editosoms. Folgende Stellen sind betroffen: *atp4*-138, *atp9*-167, *ccb203*-176, *ccb203*-208, *ccb206*-80, *ccb206*-551, *ccb206*-566, *ccb256*-184, *ccb256*-421, *ccb256*-673, *cox3*-257, *matR*-1807, *nad1*-500, *nad2*-995, *nad6*-446, *orfX*-97, *orfX*-409, *orfX*-440, *orfX*-474, *orfX*-666, rpl5-64, *rps3*-603 und *rps4*-524.

Nichts desto trotz ergibt sich ebenfalls, dass der Austausch der entsprechenden Sequenzabschnitte für Motiv 2, Motiv 3 zuzüglich des C-Terminus in M1M3N1C1 einen Einfluss auf 30 % der betreffenden Editingstellen hat (Abbildung 17, Tabelle 4).

Editingstelle in deren statistischer Analyse ausschließlich Kriterium 1 nicht erfüllt vorlag, jedoch eine Funktionalität und Ähnlichkeit nach Kriterium 2 belegt werden konnte, entstehen meist aus einer erhöhten Varianz bei eingeschränktem Differenzbereich zwischen Columbia und *morf1-1*. Dies war beispielsweise bei den Editingstellen *ccb206-*380, *ccb256-*458 und *nad7-*795 zu beobachten.

An den verbleibenden Editingstellen lagen sowohl Kriterium 1, als auch Kriterium 2 nicht erfüllt vor. Es ist hinreichend ersichtlich, dass eine geringe Abweichung vom Referenzwert in *morf1-1* (Kriterium 1; *p*-Wert (*morf1-1* - *morf1-1*: 355 ::: M1M3N2C2)) nicht zu einer Wiederherstellung des Editinglevels vergleichbar dessen in *Columbia* (Kriterium2; K-Wert) führt. Dies betraf die Editingstellen *ccb206-*424, *nad6-*463, *nad7-*1137, *orfX-*377 und *orfX-*412.

Es folgt die Auswertung der Ähnlichkeit der posttransformativ ermittelten Editingeffizienzen untereinander. Dies ermöglicht eine Abschätzung der funktionellen Analogie nach Kriterium 3 zwischen M1M3N1C1 und MORF1 bzw. MORF3. In der folgenden Tabelle 5 wurden die zu diesem Zweck erhobenen p-Werten der Editingeffizienzanalysen von MORF1, MORF3 und M1M3N2C2 in *morf1-1* dargestellt.

Es wurde einerseits verglichen, ob die ermittelten Editingeffizienzen nach der Transformation mit M1M3N2C2 signifikant von MORF1 in *morf1-1* abweichen. In der Spalte *p*-Wert (*morf1-1*:MORF1 – *morf1-1*:M1M3N2C2) sind die dazu berechneten Signifikanzniveaus aufgelistet. Andererseits wurde analysiert, ob sich die posttransformativ ermittelten Editingeffizienzen von M1M3N2C2 im Vergleich zu MORF3 unterscheiden. Die dazugehörigen Daten können der Spalte *p*-Wert (*morf1-1*:MORF3- *morf1-1*:M1M3N2C2) entnommen werden.

Die hellgrau hervorgehobenen *p*-Werte unterschreiten das Signifikanzniveau ($\alpha = 0.05$ %). Dementsprechend sind die Mittelwerte der verglichenen Editingeffizienzen als signifikant abweichend voneinander anzusehen. War dies der Fall, galt die Nullhypothese als erfüllt. Es konnte nicht von einer funktionellen Analogie zwischen der Chimäre und dem Referenz-MORF ausgegangen werden. Wurde das Signifikanzniveau überschritten, korreliert der Grad der Ähnlichkeit der Editingeffizienzen mit |*P*|.

Tabelle 5. Analyse der Funktionsanalogie der artifiziellen Chimäre M1M3N2C2 in morf1-1 im Vergleich zu MORF1 und MORF3. Grau unterlegte *p*-Werte markieren Editingergebnisse, die das Signifikanzniveau von 5 % unterschreiten. In diesem Fall liegt die Nullhypothese erfüllt vor (H_{0.2}: $\overline{X}_{\varepsilon \ MORF} \neq \overline{X}_{\varepsilon \ Chimare}$). Befanden sich die gemittelten Editingeffizienzen im Verhältnis zueinander im Bereich von 1- α , lag die Alternativhypothese erfüllt vor (H_{1.2}: $\overline{X}_{\varepsilon \ MORF} = \overline{X}_{\varepsilon \ Chimare}$). Der Grad der funktionellen Analogie entspricht |*P*|.

Transkript	Locus	p-Wert morf1-1: MORF1 morf1-1: M1M3N2C2	p-Wert morf1-1: MORF3 morf1-1: M1M3N2C2
atp4	138	0.0309	0.0004
atp9	167	0.3797	0.8789
ccb203	176	0.8800	0.0003
ccb203	208	0.3767	0.0044
ccb206	80	0.7627	-
ccb206	380	0.2814	0.3248
ccb206	424	0.3361	0.0766
ccb206	551	0.3020	0.0005
ccb206	566	0.6816	0.0348
ccb256	184	0.2435	0.0500
ccb256	421	0.5590	0.0302
ccb256	458	0.4304	0.0249
ccb256	673	0.9903	0.0010
сох3	257	0.2649	7.78E-06
matR	1807	0.5739	9.24E-06
nad1	500	0.5000	0.0446
nad2	995	-	0.0018
nad6	446	0.3968	0.0092
nad6	463	0.1776	0.9481
nad7	795	0.2390	0.0747
nad7	1137	0.3371	0.8011
orfX	97	0.6869	0.0063
orfX	377	0.6016	0.4498
orfX	409	0.2313	0.8647
orfX	412	0.3298	0.4512
orfX	440	0.2473	0.0016
orfX	474	0.0298	0.0134
orfX	666	0.8017	0.0336
rpl5	64	0.0627	0.1811
rps3	603	0.1558	0.0472
rps3	1470	0.1673	0.0003
rps3	1534	0.9358	0.0883
rps4	524	0.1926	0.1160

An ~58 % der betrachteten Cytidine waren die Editingeffizienzen, welche unter dem Einfluss von M1M3N2C2 ermittelt wurde, gleichzeitig signifikant unterschiedlich von den durch MORF3 hervorgerufenen Werten und nicht signifikant unterschiedlich zu den MORF1 induzierten Editingeffizienzen. An diesen Stellen kann die Alternativhypothese in Bezug auf MORF1 (Kriterium 3) als gegeben angesehen werden. Die Schlussfolgerung wäre, dass die Funktion von MORF1 und M1M3N2C2 im Editosom der spezifischen Stellen analog wäre. Zur Veranschaulichung dient die folgende Abbildung.



Abbildung 19. Approximative Funktionsanalogie zwischen MORF1 und M1M3N2C2. Die im Anschluss an die Transformation mit M1M3N2C2 ermittelten Editingeffizienzen der aufgeführten Stellen *ccb203*-176 – *rps3*-603 unterscheiden sich signifikant von den Editingeffizienzen, welche unter dem Einfluss von MORF3 ermittelt wurden. Dementsprechend lag die Nullhypothese $H_{0.2}$ erfüllt vor. Die Normalverteilungsfunktionen der gemittelten Editingeffizienzen unter der Beteiligung von MORF1 bzw. M1M3N2C2 waren gleichzeitig nicht signifikant unterschiedlich zueinander. Dementsprechend galt die Alternativhypothese $H_{1.2}$ der funktionellen Analogie als erfüllt.

Bei den Editingstellen, an denen sich M1M3N2C2 annähernd analog zu MORF1, nicht aber zu MORF3 verhält, handelt es sich um *ccb203*-176, *ccb203*-208, *ccb206*-80, *ccb206*-551, *ccb206*-566, *ccb256*-421, *ccb256*-458, *ccb256*-673, *cox3*-257, *matR*-1807, *nad1*-500, *nad2*-995, *nad6*-446, *orfX*-97, *orfX*-440, *orfX*-666, *rps3*-603 und *rps3*-1470.

Im Transkript *ccb206* an Position 80 und an der Editingstelle *rps3*-603 überschreitet die Editingeffizienz, welche unter dem Einfluss von MORF3 ermittelt wurde, das durch MORF1 respektive M1M3N2C2 rekonstruierte Effizienzlevel. Dennoch weisen deren gemittelte Editingeffizienzen mit 88,7 % (MORF1) und 86,7 % (M1M3N2C2) an *ccb206*-80, mit einer Überschneidung der Normalverteilungsfunktionen von 76 %, eine hohe funktionelle Ähnlichkeit zueinander auf. Dies wird insbesondere im Vergleich mit dem unter dem MORF3-Einfluss ermittelten Wert $\bar{X} \varepsilon_{MORF3}$ von 95.8 % deutlich. Selbiges gilt für *rps3*-603. An den verbleibenden Editingstellen, welche in Abbildung 19 dargestellt wurden, liegt keine funktionelle Analogie zwischen M1M3N2C2 und MORF3 vor.

Die Chimäre M1M3N2C2 beinhaltet einen MORF1-basierten N-Terminus (inklusive der Motive 2 und 3). Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der, unter dem Einfluss von MORF1 oder M1M3N2C2, ermittelten Editingeffizienzen könnte angenommen werden, dass die beobachtete funktionelle Analogie auf diesen Sequenzbereich zurückgeht. Der MORF3 basierte C-Terminus führt nicht zu einem MORF3-ähnlichen Verhalten der Chimäre im Editosom. Es kann nicht unterschieden werden, ob die MORF3-basierten Motive in der Formierung des Editosoms toleriert werden, oder nicht an der Interaktion der beteiligten *trans*-Faktoren mitwirken. Der Verlust des verlängerten MORF1-basierten C-Terminus hat keinen negativen Effekt auf die Funktionalität der Chimäre.

An den Editingstellen *atp4*-138 und *orfX*-474 unterscheiden sich die ermittelten Editingeffizienzen, unter dem Einfluss von MORF1, MORF3 oder M1M3N2C2, jeweils signifikant voneinander. Ein Vergleich mit Tabelle 4 belegt, dass an beiden Editingstellen, durch die Transformation mit M1M3N2C2, Kriterium 1 und 2 erfüllt vorlagen. Folglich erfüllt M1M3N2C2 die Funktion eines MORF-Proteins im Editosom hinreichend, jedoch nicht äquivalent zum Transgen *MORF1*. Diesbezüglich scheint die

Veränderung des C-Terminus tatsächlich zu einer signifikanten Verringerung der Editingeffizienz zu führen. Durch den Austausch des C-Terminus in M1M3N2C2 tritt an Position *atp4*-138 eine strikte Verminderung des Editing um 8.44 % auf. Die MORF3-basierten C-terminalen Sequenzen der Chimäre bewirken an *orfX*-474 eine Verringerung der Editingeffizienz um exakt 30.35 % im Vergleich zu MORF1 (Abbildung 20).



Abbildung 20. Der Austausch der konservierten Motive 2 und 3 und des C-Terminus in M1M3N2C2 hat einen spezifischen Effekt auf die Fähigkeit dieser Chimäre Editing an atp4-138 und orfX-474 zu rekonstruieren. Unter dem Einfluss von M1M3N2C2 wird an atp4-138 eine Editingeffizienz von ~ 83 % erreicht. Dieser Wert ist signifikant unterschiedlich von dem Referenzwert der Mutanten ($\varepsilon_{morf1-1}$: 40) und dem durch MORF1 rekonstruierten Wert (*Emorf1-1:: MORF1*: 91). Die Editingstelle orfX-474 liegt in ~ 61 % der Transkripte editiert vor. Auch dieser Wert erfüllt Kriterium 1 und 2 ($\varepsilon_{morf1-1}$: 20, ε_{Col} : 50) und weicht spezifisch von dem Wert ab, der nach der Transformation mit MORF1 ermittelt wurde (εmorf1-1:: MORF1: 91). Die mittels des T-Testes errechneten p-Werte überschreiten 5 % nicht. Demzufolge weichen diese Editingeffizienzen signifikant voneinander ab. Die Differenz zwischen Emorf1-1:MORF1 und *Emorf1-1:*м1M3N2C2 beträgt an *atp4*-138 8.4 %, an *orfX*-474 30,4 %. (ε: Editingeffizienz).

Bei 36,4 % der hier untersuchten Editingstellen konnte kein signifikanter Unterschied der Editingeffizienzen nach der Transformation von *morf1-1* mit M1M3N2C2, MORF1 oder MORF3 festgestellt werden. Bei den betroffenen Stellen handelt es sich um *atp9-167, ccb206-380, ccb206-424, nad6-463, nad7-795, nad7-1137, orfX-377, orfX-409, orfX-412, rps3-1534, rps4-524* und *rp15-64*.

Die spezifisch Analyse der p-Werte belegt, dass an den Stellen *atp9*-167 und *orfX*-409 eine hohe funktionelle Analogie zwischen M1M3N2C2 und MORF3 besteht. An beiden Stellen liegen Kriterium 1 und 2 ebenfalls durch die Transformation mit MORF3 und M1M3N2C2 erfüllt vor.

Die größte Überschneidung der Normalverteilungsfunktionen der Editingeffizienzen von MORF1, im Vergleich zu M1M3N2C2, war an den Editingstellen *orfX*-377 bzw. *rps3*-1534 zu beobachten.

Das artifizielle Protein M1M3N3C3 umfasst *MORF1*-basierte Sequenzen, welche für den N-Terminus, Motiv 1, Motiv 3 und Motiv 4 kodieren. Motiv 2 und der verbleibende C-Terminus entsprechen ihren Sequenzanaloga in MORF3. Das bedeutet M1M3N3C3 beinhaltet, im Vergleich zu M1M3N2C2, einen größeren N-terminalen Anteil an MORF1-stämmigen Sequenzen.



Abbildung 21. Übersicht der statistischen Analyse der Komplementationsfähigkeit von M1M3N3C3 in morf1-1 entsprechend der Kriterien 1 und 2. Verhältnis der Editingstellen, an denen durch die Transformation mit M1M3N3C3 Kriterium 1 und 2 erfüllt vorlagen oder an denen M1M3N3C3 nicht zu einer Komplementation des Editingdefektes in morf1-1 führte.

Bezüglich der Transformation mit M1M3N3C3 lagen an 79 % der betrachteten Editingstellen Kriterium 1 und 2 gleichzeitig erfüllt vor. Die Verlängerung des MORF1basierten N-Terminus in M1M3N3C3 wirkte sich im Vergleich zu M1M3N2C2 positiv auf die Komplementierung von ~ 10 % der betrachteten Editingstellen aus (Tabelle 4, Abbildung 21).

Ein Vergleich der Ergebnisse unter der Transformation mit M1M3N2C2 und M1M3N3C3 offenbarte, dass an folgenden Editingstellen, bezogen auf die Erfüllung von Kriterium 1 und 2, identische Ergebnisse vorlagen. Betroffen waren einerseits *atp4*-138, *atp9*-167, *ccb206*-80, *ccb206*-551, *ccb206*-566, *ccb256*-184, *ccb256*-421, *ccb256*-673, *cox3*-257, *matR*-1807, *nad1*-500, *nad2*-995, *nad6*-446, *orfX*-409, *orfX*-97, *orfX*-409, *orfX*-440, *orfX*-474, *rpl5*-64, *rps3*-1470 und *rps4*-527. An diesen Stellen lagen jeweils beide Kriterien erfüllt vor. Der Austausch von Motiv 3 blieb effektfrei, da bereits der kürzere MORF1-basierte N-Terminus in M1M3N2C2 ausreichte, um den Editingdefekt in *morf1-1* zu komplementieren. Da die Aminosäuresequenzen in dem ausgetauschten Motiv 3 größtenteils konserviert, aber nicht identisch sind, könnte eine Konservierung der chemisch-physikalischen Eigenschaften bezüglich der Aminosäureseitenketten vermutet werden.

Identische Ergebnisse konnten ebenfalls an *ccb206*-424, *ccb256*-458 und *nad6*-463 beobachtet werden. Der Unterschied zu den zuvor beschriebenen Zusammenhängen besteht darin, dass diese Stellen weiterhin uneditiert bzw. teileditiert blieben. Das MORF1-basierte Motiv 3 befähigte die Chimäre M1M3N3C3 nicht zur Rekrutierung eines funktionalen Editosoms. Die Chimären waren ohne den MORF1-basierten C-Terminus nicht kompetent genug sind, um Editing an den genannten Stellen zu erzeugen.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Editingeffizienzen, welche im Anschluss an die Transformation mit MORF1, MORF3 und M1M3N3C3 gemessen wurden, können dem Anhang entnommen werden. Die arithmetischen Mittel wurden statistisch

analysiert. Die resultierenden *p*-Werte können der folgenden Tabelle entnommen werden.

Tabelle 6. Analyse der Funktionsanalogie der artifiziellen Chimäre M1M3N3C3 in *morf1-1* im Vergleich zu MORF1 und MORF3. Grau unterlegte *p*-Werte markieren Editingergebnisse, die das Signifikanzniveau von 5 % unterschreiten. Dementsprechend liegt die Nullhypothese erfüllt vor (H_{0.2}: $\overline{X} \varepsilon _{MORF} \neq \overline{X} \varepsilon _{Chimare}$). Befanden sich die gemittelten Editingeffizienzen im Verhältnis zueinander im Bereich von 1- α , lag die Alternativhypothese erfüllt vor (H_{1.2}: $\overline{X} \varepsilon _{MORF} = \overline{X} \varepsilon _{Chimare}$). Der Grad der funktionellen Analogie entspricht |*P*|.

Transkript	Locus	p-Wert morf1-1: MORF1 morf1-1: M1M3N3C3	p-Wert morf1-1: MORF3 morf1-1: M1M3N3C3
atp4	138	0.8120	0.0002
atp9	167	0.3767	0.6675
ccb203	176	0.2111	0.0069
ccb203	208	0.4319	0.0470
ccb206	80	0.5203	-
ccb206	380	0.4672	0.3010
ccb206	424	0.0622	0.1389
ccb206	551	0.5306	0.0003
ccb206	566	0.3860	0.0102
ccb256	184	0.2709	0.0419
ccb256	421	0.7815	0.0231
ccb256	458	0.8043	0.0211
ccb256	673	0.7694	0.0033
cox3	257	0.4465	2.54E-05
matR	1807	0.4517	4.31E-05
nad1	500	0.5000	0.0446
nad2	995	-	0.0018
nad4	836	0.0127	0.0410
nad6	446	0.4226	0.0253
nad6	463	0.1882	0.9469
nad7	795	0.0003	0.0073
nad7	1137	0.1887	0.0669
orfX	97	0.0487	0.0403
orfX	377	0.1849	0.1788
orfX	409	0.2160	0.0753
orfX	412	0.0625	0.4244
orfX	440	0.2128	0.0123
orfX	474	0.2354	0.0051
orfX	666	0.9504	0.0988
rpl5	64	0.0654	0.4554
rps3	603	0.0515	0.0547
rps3	1470	0.0424	0.0019
rps3	1534	0.0356	0.0144
rps4	524	0.4270	0.2297

An 52 % der betrachteten Editingstellen wichen die MORF3– bzw. M1M3N3C3bedingten Editingeffizienzen signifikant voneinander ab, während kein signifikanter Unterschied zu den Ergebnissen unter dem Einfluss von MORF1 zu beobachten war. Im speziellen handelt es sich dabei um folgende Editingstellen: *atp4*-138, *ccb203*-176, *ccb203*-208, *ccb206*-80, *ccb206*-551, *ccb206*-566, *ccb256*-184, *ccb256*-421, *ccb256*-458, *ccb256*-673, *cox3*-257, *matR*-1807, *nad1*-500, *nad2*-995, *nad6*-446, *orfX*-409, *orfX*-97, *orfX*-409, *orfX*-440 und *orfX*-474 (Tabelle 6, Abbildung 22).



Abbildung 22. Funktionsanalogie zwischen MORF1 und M1M3N3C3. Die im Anschluss an die Transformation mit M1M3N2C2 ermittelten Editingeffizienzen der aufgeführten Stellen *atp4-*138 – *ccb206-*80 unterscheiden sich signifikant von den Editingeffizienzen, welche unter dem Einfluss von MORF3 ermittelt wurden. Dementsprechend lag die Nullhypothese $H_{0,2}$ erfüllt vor. Die Normalverteilungsfunktionen der gemittelten Editingeffizienzen unter der Beteiligung von MORF1 bzw. M1M3N3C3 waren gleichzeitig nicht signifikant unterschiedlich zueinander. Dementsprechend galt die Alternativhypothese der funktionellen Analogie als erfüllt.

Entsprechend des vergleichenden T-Testes war an den besagten Editingstellen die Alternativhypothese H_{1.2}, in Bezug auf MORF1 und M1M3N3C3, erfüllt. Die unter dem Einfluss der beiden Proteine ermittelten Editingeffizienzen konnten folglich als hinreichend ähnlich erachtet werden. Bezüglich des statistischen Vergleiches der Editingeffizienzen, welche unter der Beteiligung von MORF3 oder M1M3N3C3 im Editosom ermittelt wurden, musste die Nullhypothese H_{0.2} als gegeben angesehen werden. Von einer funktionellen Analogie war nicht auszugehen (Tabelle 6).

Die Ausprägung der Funktion, welche von M1M3N3C3 vermittelt wird, verbleibt in 94 % der hier aufgeführten Editingstellen auf dem Stand von M1M3N2C2. Die mittige Teilung der MORF-Box und die daraus folgende Determination der N- und C-Termini scheinen hauptsächlich für die Wiederherstellung des Editing verantwortlich zu sein.

Die Formierung des Editosoms unter der Beteiligung von M1M3N3C3 führte, im Vergleich mit MORF1 oder MORF3, an folgenden Stellen zu signifikanten Abweichungen der Editingeffizienzen: *nad7-795, rps3-1470, rps3-1534, nad4-836* und *orfX-97.* Dieser Effekt ist auf die geringe Standardabweichung innerhalb mancher Messreihen zurück zu führen.

An den ersten drei genannten Editingstellen führte der Austausch des konservierten Motives 3 verglichen mit MORF1 zu einer signifikanten Verschlechterung der ermittelten Editingeffizienz. Dabei weichen die Werte an *nad7*-795 um 22,7 %, an *rps3*-1470 um 10.7 % und an *rps3*-1534 um 14.26 % ab. An den Editingstellen *nad4*-836 und *orfX*-97 konnten nach der Transformation mit M1M3N3C3 höhere Editingeffizienzen detektiert werden, als sie unter der Beteiligung von MORF1 auftraten. Die Differenz belief sich an *nad4*-836 auf 10 % und an *orfX*-97 auf 17,5 % (Abbildung 23).



morf1-1: 35S::MORF1 morf1-1: 35S::M1M3N3C3 morf1-1: 35S::MORF3

Abbildung 23. Die C-terminale Modifikation von M1M3N3C3 führt zu signifikant unterschiedlichen Editingeffizienzen im Vergleich mit MORF1 und MORF3. Unter dem Einfluss von M1M3N3C3 werden die Editingstellen *nad7-*795, *rps3-*1470 und *rps3-*1534 signifikant schlechter editiert, als unter der Beteiligung von MORF1 im Editosom. Der Austausch des konservierten Motives 3 hat einen inhibierenden Effekt auf die Funktionalität der Chimäre. Durch die Verlängerung der N-terminalen MORF1-basierten Sequenz in M1M3N3C3 wurde, an den Editingstellen *nad4-*836 und *orfX-*97, die Fähigkeit zur Rekonstruktion von RNA-Editing im Vergleich zu MORF1 verbessert. Die mittels des T-Testes errechneten p-Werte überschreiten 5 % nicht. Demzufolge weichen diese Editingeffizienzen signifikant voneinander ab.

Für 35,3 % der betrachteten Editingstellen, ergaben sich aus den, im Anschluss an die Transformation mit M1M3N3C3, MORF1 oder MORF3, ermittelten Editingeffizienzen keine signifikanten Unterschiede untereinander. Dies begründet sich einerseits aus der Ähnlichkeit der gemessenen Editingeffizienzen, wie beispielsweise an der Stelle *atp9*-167 ($\bar{X}\epsilon_{MORF1}$ 99; $\bar{X}\epsilon_{MORF3}$ 92; $\bar{X}\epsilon_{M1M3N3C3}$ 94) oder *orfX*-412 ($\bar{X}\epsilon_{MORF1}$ 99; $\bar{X}\epsilon_{MORF3}$ 92; $\bar{X}\epsilon_{M1M3N3C3}$ 96). Andererseits können nicht signifikant unterscheidbare Normalverteilungsfunktionen durch hohe Varianzen innerhalb einer Messreihe bedingt sein.

Das artifizielle Protein M1M3N4C4 umfasst die *MORF1*-basierte Sequenzen, welche für den N-Terminus und die konservierten Motive 1-4 kodieren. Der verbleibende C-Terminus repräsentiert die Aminosäuren 183-245 des Editingfaktors MORF3.



Komplementationsfähigkeit der Chimäre M1M3N4C4 in morf1-1

Abbildung 24. Übersicht der statistischen Analyse der Komplementationsfähigkeit von M1M3N4C4 in *morf1-1* **entsprechend der Kriterien 1 und 2.** Verhältnis der Editingstellen, an denen der Editingdefekt in *morf1-1* durch die Transformation mit M1M3N4C4 ausgeglichen werden konnte oder an denen durch die Expression des chimären Proteins keine Editingeffizienz erzeugt werden konnte, durch die Kriterium 1 und 2 erfüllt wurden.

Als Folge der Expression von *M1M3N4C4* in *morf1-1* konnte an 79 % der betrachteten Editingstellen die Wiederherstellung einer geeignet hohen Editingrate beobachtet werden. Dieser Wert unterscheidet sich nicht von dem prozentualen Anteil an Editingstellen, deren Editingdefekt unter der Beteiligung von M1M3N3C3 komplementiert werden konnte. Jedoch führt die Überexpression von M1M3N4C4 im Vergleich zu M1M3N3C3 nur an 76 % der Editingstellen zu identischen Komplementationsergebnissen (Tabelle 4). Diese Editingstellen können in zwei Gruppen unterteilt werden.

An folgenden Editingstellen blieb die durch M1M3N3C3 und M1M3N4C4 hervorgerufene Komplementationsfähigkeit erhalten: *atp4*-138, *atp9*-167, *ccb206*-80, *ccb206*-308, *ccb206*-551, *ccb206*-566, *ccb256*-184, *ccb256*-421, *ccb256*-673, *cox3*-257, *matR*-1807, *nad1*-500, *nad2*-995, *nad6*-446, *nad7*-1137, *orfX*-97, *orfX*-409, *orfX*-440, *orfX*-474, *rpl5*-64, *rps3*-1470 und *rps4*-524. Die Verlängerung der MORF1- basierten Sequenzen hat an diesen Editingstellen keinen negativen Effekt auf die Fähigkeit von M1M3N4C4 ein funktionsfähiges Editosom zu bilden.

An den Editingstellen *nad6-463, orfX-666* und *rps3-603* führte die Transformation von *morf1-1* mit M1M3N4C4 nicht zu einer Wiederherstellung einer geeignet hohen Editingeffizienz. Das Vorhandensein aller konservierten Motive, basierend auf MORF1, führte nicht zur Formierung eines funktionalen Editosoms. Die Verlängerung des *MORF1*-kodierten Sequenzabschnittes in M1M3N4C4 konnte das Fehlen des restlichen C-Terminus nicht ausgleichen. An diesen Editingstellen könnte der verlängerte MORF1-Terminus (Aminosäure 241-407) einen Einfluss auf die Bildung eines funktionalen Editingkomplexes ausüben.

Die verbleibenden 24 % der genannten Editingstellen umfassen einerseits *ccb203*-176, *ccb203*-208, *ccb206*-424 und *ccb256*-458, bei denen unter der Beteiligung aller vier MORF1-basierter Motive der Editingdefekt in *morf1-1* ausgeglichen werden konnte. Dieser Effekt war im Anschluss an die Transformation von *morf1-1* mit M1M3N3C3 nicht zu beobachten. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass das MORF1-basierte Motiv 2 einen Einfluss auf die Interaktion mit weiteren *trans*-Faktoren hat, welche den Editingkomplex an diesen Stellen bilden. Der verlängerte C-Terminus des Editingfaktor MORF1 scheint keine Relevanz für die Bildung zu haben.

Des Weiteren konnte an den Editingstellen *nad7*-795, *orfX*-377, *orfX*-412 und *rps3*-1534 beobachtet werden, dass die bestehende Fähigkeit zur Komplementation von M1M3N3C3, durch den Austausch von Motiv 2 in M1M3N4C4, verloren ging.

In der folgenden Auswertung soll erörtert werden, ob die zuvor beschriebenen Effekte auf eine funktionelle Analogie zwischen MORF1, MORF3 und M1M3N4C4 zurückgingen. Die im Anschluss an die Transformation mit MORF1, MORF3 und M1M3N4C4 gemessenen Mittelwerte und Standardabweichungen der entsprechenden Editingeffizienzen, zur Berechnung der zugehörigen *p*-Werte heran gezogen. Die p-

Werte können Tabelle 7 entnommen werden. Die Messdaten Mittelwerte und Standardabweichungen sind im Anhang hinterlegt.

Tabelle 7. Analyse der Funktionsanalogie der artifiziellen Chimäre M1M3N4C4 in *morf1-1* im Vergleich zu MORF1 und MORF3. Grau unterlegte *p*-Werte markieren Editingergebnisse, die das Signifikanzniveau von 5 % unterschreiten. Dementsprechend liegt die Nullhypothese erfüllt vor (H_{0.2}: $\overline{X} \varepsilon _{MORF} \neq \overline{X} \varepsilon _{Chimäre}$). Befanden sich die gemittelten Editingeffizienzen im Verhältnis zueinander im Bereich von 1- α , lag die Alternativhypothese erfüllt vor (H_{1.2}: $\overline{X} \varepsilon _{MORF} = \overline{X} \varepsilon _{Chimäre}$). Der Grad der funktionellen Analogie entspricht |*P*|.

Transkript	Locus	p-Wert morf1-1: MORF1 morf1-1: M1M3N4C4	p-Wert morf1-1: MORF3 morf1-1: M1M3N4C4
atp4	138	0.7198	0.0002
atp9	167	0.9888	0.0681
ccb203	176	0.2489	0.0001
ccb203	208	0.1217	0.0105
ccb206	80	0.3909	-
ccb206	380	0.3922	0.2857
ccb206	424	0.8222	0.0094
ccb206	551	0.3050	0.0018
ccb206	566	0.0621	0.0008
ccb256	184	0.3801	0.0388
ccb256	421	0.4777	0.0319
ccb256	458	0.2618	0.0040
ccb256	673	0.9492	0.0090
cox3	257	0.1015	7.60E-05
matR	1807	0.8752	0.0026
nad1	500	0.5000	0.0446
nad2	995	0.4226	0.0331
nad4	836	0.0067	0.3631
nad6	446	0.4226	0.0354
nad6	463	0.0897	0.9120
nad7	795	0.0128	0.1160
nad7	1137	0.1858	0.0130
orfX	97	0.5034	0.0066
orfX	377	0.9203	0.9916
orfX	409	0.2247	0.1588
orfX	412	0.2179	0.7892
orfX	440	0.8722	0.0003
orfX	474	0.0666	0.0052
orfX	666	0.9321	0.0285
rpl5	64	0.1008	0.3004
rps3	603	0.3124	0.2616
rps3	1470	0.6924	2.40E-05
rps3	1534	0.0201	0.6343
rps4	524	0.3059	0.0370

Die vergleichende Analyse der Normalverteilungsfunktionen ergab, dass an 62 % der Editingstellen, welche durch M1M3N4C4 komplementiert werden konnten, signifikante Abweichung der Editingeffizienzen im Vergleich zu MORF3, aber nicht zu MORF1, beobachtet werden konnten.

An folgenden Editingstellen führe die Transformation mit M1M3N4C4 zur Wiederherstellung einer Editingeffizienz, welche keinen signifikanten Unterschied zu den Werten aufwies, die unter der Beteiligung von MORF1 detektiert wurden: *atp4*-138, *atp9*-167, *ccb203*-176, *ccb203*-208, *ccb203*-424, *ccb206*-551, *ccb206*-566, *ccb256*-184,

ccb256-421, *ccb256*-458, *ccb256*-673, *cox3*-257, *matR*-1807, *nad1*-500, *nad2*-995, *nad6*-446, *nad7*-1137, *orfX*-97, *orfX*-440, *orfX*-474, *orfX*-666 und *rps3*-1470. An diesen Stellen gilt im Vergleich zu MORF1 die Alternativhypothese als erfüllt. Es kann von einer funktionellen Analogie ausgegangen werden. Innerhalb des chimären Konstruktes M1M3N4C4 basieren alle konservierten Motive der MORF-Box auf *MORF1*. Es ist davon auszugehen, dass das MORF1-ähnlich Verhalten der Chimäre innerhalb des Editosoms auf diese Sequenz zurück zu führen ist. Der vergleichende T-Test bezüglich der ermittelten Editingeffizienzen unter der Beteiligung von M1M3N4C4 und MORF3 belegte deren statistische Abweichung voneinander. Eine funktionelle Analogie ist nicht anzunehmen (Tabelle 7, Abbildung 25).



Abbildung 25. Funktionsanalogie zwischen MORF1 und M1M3N4C4. Die im Anschluss an die Transformation mit M1M3N2C2 ermittelten Editingeffizienzen der aufgeführten Stellen *atp4*-138 – *rps3*-1470 unterscheiden sich signifikant von den Editingeffizienzen, welche unter dem Einfluss von MORF3 ermittelt wurden. Dementsprechend lag die Nullhypothese H_{0.2} erfüllt vor. Die Normalverteilungsfunktionen der gemittelten Editingeffizienzen unter der Beteiligung von MORF1 bzw. M1M3N4C4 waren gleichzeitig nicht signifikant unterschiedlich zueinander. Dementsprechend galt die Alternativhypothese der funktionellen Analogie als erfüllt.

Durch die Transformation von *morf1-1* mit M1M3N4C4 erstmals Editingeffizienzen erzeugt wurden, die ein analoges Verhalten der Chimäre zu MORF3 nahe legen. Die unter der Beteiligung von M1M3N4C4 ermittelten Editingeffizienzen wichen gleichzeitig signifikant von den Werten ab, welche unter der Expression des Transgens *MORF1* gemessenen wurden. Dieser Effekt war an den Editingstellen *nad4-*836 und *rps3-*1534 zu beobachten. An der Stelle *nad4-*836 beruht die fehlende Signifikanz der Editingeffizienzen, unter dem Einfluss von M1M3N4C4 respektive MORF3, auf die hohe Standardabweichung der Messreihe des Transgens *MORF3*.

Die Transformation der Mutante mit M1M3N4C4 bzw. MORF3 führt an *rps3*-1534 nicht zur Erfüllung von Kriterium 1. Das bedeutet, dass sich die gemessene Editingeffizienz nicht signifikant von dem Referenzwert in *morf1-1* unterscheidet. Die Editingeffizienz in *morf1-1* beträgt an der Stelle *rps3*-1534 50 %. MORF3 und M1M3N4C4 verhalten sich analog, da beide nicht zur Komplementation des Editingdefektes befähigt sind ($\varepsilon_{morf1-1:MORF3}$: 48,2, $\varepsilon_{morf1-1:M1M3N4C4}$: 45,6). Im Wildtyp Columbia wird diese Stelle mit einer Effizienz von 70 % editiert. Durch die Transformation mit transgenem MORF1 konnte dieser Wert annähernd wieder hergestellt werden ($\varepsilon_{morf1-1:MORF1}$: 66,0). M1M3N4C4 und MORF1 unterscheiden sich ausschließlich in der C-terminalen Sequenz. Die Chimäre beinhaltet die MORF3-basierten Aminosäuresequenz 183-245. Ihr fehlt der *MORF1*-

kodierte Aminosäurebereich von 178-407. Es ist möglich, dass dieser Sequenzunterschied zu dieser Ausprägung der Editingeffizienzen beitrug.

Bei 29,4 % der hier untersuchten Editingstellen konnte kein signifikanter Unterschied der Editingeffizienzen nach der Transformation von *morf1-1* mit M1M3N4C4, MORF1 oder MORF3 festgestellt werden. Bei den betroffenen Stellen handelt es sich um *ccb206-*80, *ccb206-*380, *nad6-*463, *nad7-*795, *orfX-*377, *orfX-*409, *orfX-*412, *rps3-*603, *rps4-*524 und *rpl5-*64.

Auch dieses Ergebniss geht einerseits auf die hohe Ähnlichkeit der ermittelten Editingefizienzen zurück. Ein Beispiel hierführ stellt die anzunehmende funktionelle Analogie zwischen MORF3 und M1M3N4C4 an der Stelle *ccb206*-80 dar. Die Editingeffizienz, welche unter dem Einfluss von MORF1 ermittelt werden konnte, betrug 88.8 %. Demgegenüber wurde im Anschluss an die Transformation mit MORF3 oder M1M3N4C4 jeweils eine Editingeffizienz von 95.2 % ermittelt. Dennoch war die statistische Abweichung im Vergleich zu ε_{MORF1} nicht ausreichend hoch, als dass die Werte für signifikant unterschiedlich erklärt worden wären. Andererseits können hohe Varianzen innerhalb der Messreihen zu diesen Ergebnissen führen. Dies ist beispielsweise an der Auswertung der Editingstelle *nad6*-463 zu erkennen.

3.2.3 Funktionalitätsanalyse der MORF3-MORF1-Chimären in der Mutante morf1-1

Auch diese Analyse befasst sich mit dem Einfluss verschiedener Termini der Proteine MORF3 und MORF1 auf die Fähigkeit zur Formierung eines funktionalen Editosoms. Die hier betrachteten Konstrukte weisen, im Vergleich zu den unter 3.2.2. beschriebenen Proteinchimären, die konträre Orientierung der N- und C-Termini auf. Folglich werden die N-terminalen Sequenzen von MORF3 kodiert. Der C-Terminus basiert auf MORF1. Die Nomenklatur der Chimären folgt der Orientierung der Termini, indem die Zugehörigkeit der Sequenzen durch die Bezeichnung M3M1 signalisiert wird. Ein Schema der verwendeten Chimären kann der folgenden Abbildung entnommen werden. Die Positionen der Verbindungsstellen zwischen den MORF3- respektive MORF1basierten Sequenzen wurden so gewählt, dass jeweils mindestens eines der konservierten Motive, zwischen den schlussendlich exprimierten Proteinen, ausgetauscht wurde. Dies führt dazu, dass die drei untersuchten M3M1-Chimären, im Gegensatz zu den M1M3-Chimären, über den verlängerten C-Terminus des MORF1-Proteins verfügen (Abbildung 26). Die MORF3-MORF1-Chimären wurden auf ihre Fähigkeit zur Komplementation von Editingdefekten in *morf1-1* hin untersucht.



	Position ab Start-Codon								
	Motiv 1	Motiv 4 🛛 📓	Motiv 3 🛛 🔛	Motiv 2 🛛 🗖					
MORF 1	81-95	108-122	124-144	157-177					
MORF 3	88-102	113-127	128-148	161-181					

Abbildung 26. Schematische Darstellung der MORF3-MORF1 Chimären. Dargestellt sind die schematisierten Proteinsequenzen von MORF1 und MORF3 ohne Introns. Die Position der konservierten Motive, Motiv1 (rot), Motiv 2 (blau), Motiv 3 (grün) und Motiv 4 (lila) in Bezug zu den umgebenden Aminosäuresequenzen ist angegeben. Die M3M1-Chimären beinhalten unterschiedlich lange MORF3 basierte N-terminale Aminosäuresequenzen. Jede Verlängerung des N-Terminus beinhaltet ein weiteres *MORF3*-kodiertes Motiv. In der MORF3-basierten Sequenz kam es an Position 127 zu einem Austausch von W zu C in M3M1N2C2. Um die chimären Proteine in die Mitochondrien zu transportieren wurde das Translokationssignal erhalten. Der C-Terminus der Chimären entspricht *MORF1*- Sequenzen. Der unterhalb dargestellten Auflistung können die exakten Positionen der Motive entnommen werden. Die jeweiligen Konstrukte wurden in das Plasmid pAHG41 kloniert.

Die im Anschluss an die Transformation von *morf1-1* mit den M3M1-Chimären ermittelten Daten, können der folgenden Abbildung 27 entnommen werden. Diese sind ebenfalls im Anhang hinterlegt. Aus den arithmetischen Mittel und Standardabweichungen der Editingeffizienzen wurden die zugehörigen *p*- und K-Werte berechnet.



Abbildung 27. Überprüfung der Komplementationsfähigkeit verschiedener MORF3-MORF1-Chimären in morf1-1 in den Transkripten von atp4 bis rps4. Dargestellt sind die Mittelwerte \bar{x} und die Standardabweichung σ^2 der aus der Sequenzierung der RT-Produkte transformierter Linien gewonnenen RNA. Hierbei ist n=3 bezüglich der Transformation mit den chimären Proteine. (A) Editingeffizienz in morf1-1 nach stabiler Transformation mit dem chimären Konstrukt M3M1N1C1 unter dem Einfluss des 35S-Promotores (schwarz). (B) Editingeffizienz in morf1-1 nach stabiler Transformation mit dem chimären Konstrukt M3M1N2C2 unter dem Einfluss des 35S-Promotores (dunkelgrau). (C) Editingeffizienz in morf1-1 nach stabiler Transformation mit dem chimären Konstrukt M3M1N3C3 unter dem Einfluss des 35S-Promotores (grau). In (A)-(C) ist das ursprüngliche Editingniveau in Columbia als graue Linie dargestellt. Die Editingeffizienz der durch einen SNP mutierten Version des Proteins MORF1 in morf1-1 kann den hellblauen Balken entnommen werden.

Die Berechnung der p- und K-Werte wurde analog zu dem unter 3.1.2. beschriebenen Vorgehen durchgeführt. Die statistische Analyse bezieht sich auf Kriterium 1 und 2. Diese Werte sind in der folgenden Tabelle aufgelistet. Hellgrau unterlegte Daten erfüllen gleichzeitig Kriterium 1 und Kriterium 2.

Tabelle 8. Analyse der Komplementationsfähigkeit der chimären Konstrukte M3M1N1C1, M3M1N2C2 und M3M1N3C3 in *morf1-1*. Auswertung der statistischen Abweichung der Editingeffizienz vom Referenzwert in *morf1-1* (p-Wert, Kriterium 1) und der Wiederherstellung des Editing der spezifischen Cytidine (K-Wert, Kriterium 2). Grau unterlegte Daten erfüllen beide Kriterien. Der p-Wert überschreitet das Signifikanzniveau α (0.05%) demnach nicht. Kriterium 2 lag erfüllt vor, wenn der definierte Grenzwert κ durch die ermittelte Editingeffizienz überschritten wurde. Die Ratio beider Werte ergab einen K-Wert ≤ 1 (K= $\kappa/\overline{X}\epsilon_{Transgen}$).

		morj 35S :: M3	f1-1: M1N1C1	<i>morf1-1</i> : 35S :: M3M1N2C2		<i>morf1-1</i> : 35S :: M3M1N3C3	
Transkript	Locus	<i>p</i> -Wert	K-Wert	<i>p</i> -Wert	K-Wert	<i>p</i> -Wert	K-Wert
atp4	138	0.1342	2.28	0.0338	3.50	0.0121	3.00
atp9	167	0.2030	1.02	0.1652	1.08	0.0396	1.06
ccb203	176	0.0181	1.63	0.0354	1.76	0.0024	1.79
ccb203	208	0.1908	5.84	0.0085	8.13	0.2551	5.57
ccb206	80	1.80E-10	0.00	0.2003	1.97	0.1629	1.98
ccb206	380	0.3134	1.41	0.0983	1.11	0.1773	1.14
ccb206	424	0.0622	1.50	0.0026	1.81	0.0049	1.82
ccb206	551	0.0942	1.30	0.2922	1.57	0.3498	1.49
ccb206	566	0.2180	1.36	0.0610	1.63	0.2356	1.60
ccb256	184	0.0004	1.96	0.0277	1.48	0.0203	1.51
ccb256	421	0.0158	9.21	0.0215	10.67	0.0301	7.22
ccb256	458	0.2146	1.23	0.1503	1.43	0.1935	1.18
ccb256	673	0.1627	2.57	0.0774	3.72	0.0532	2.27
cox3	257	0.0346	1.94	0.0177	1.89	0.0009	4.55
matR	1807	0.0369	2.51	0.0310	4.24	0.0001	3.75
nad1	500	0.3514	1.48	0.0025	2.48	0.0025	3.19
nad2	995	0.0088	0.88	0.2964	1.22	0.0237	1.13
nad4	836	0.2071	1.65	0.0314	3.75	8.47E-09	1.69
nad6	446	0.2594	1.02	0.2182	1.01	0.1687	1.11
nad6	463	0.2131	2.40	0.0952	3.07	0.0362	1.23
nad7	795	0.0858	3.06	0.1703	2.70	0.3535	1.66
nad7	1137	0.3674	1.30	0.3116	1.28	0.3536	1.30
orfX	97	0.2905	2.25	0.1830	2.70	0.3461	1.73
orfX	377	0.3088	1.24	0.3233	1.20	0.0331	0.94
orfX	409	1.22E-06	0.87	0.0207	1.05	0.0198	0.88
orfX	412	0.0014	0.95	0.2027	1.19	0.1635	1.01
orfX	440	0.1386	1.92	0.0315	1.99	0.3121	1.13
orfX	474	0.0286	1.95	0.1575	1.36	0.0144	4.73
orfX	666	0.2866	1.53	0.1705	3.29	4.72E-07	13.95
rpl5	64	0.0613	2.71	0.2889	3.89	0.2206	5.37
rps3	603	0.0248	0.95	0.0196	0.95	0.2684	1.04
rps3	1470	2.63E-06	2.44	0.3129	6.17	0.3304	6.27
rps3	1534	0.3124	1.25	0.0587	1.03	0.2895	1.25
rps4	524	0.0077	1.00	0.0668	0.99	0.0132	1.41

Innerhalb der MORF3-MORF1-Chimären verlängert sich der MORF3-basierte N-Terminus von M3M1N1C1 zu M3M1N3C3. Der *MORF1*-kodierte Teil nimmt jeweils um eines der konservierten Motive ab.

An einem Großteil der betrachteten Stellen reichte bereits die kürzeste N-terminale MORF3-Sequenz aus, um die Wiederherstellung einer geeignet hohen Editingeffizienz
zu verhindern. An ~80 % der betrachteten Stellen konnte der Editingdefekt nicht durch die transgene Expression von M3M1N1C1, M3M1N2C2 oder M3M1N3C3 ausgeglichen werden (Tabelle 8). Kriterium 1 und Kriterium 2 lagen nicht erfüllt vor. Bei den besagten Editingstellen handelte es sich um *atp4*-138, *atp9*-167, *ccb203*-176, *ccb203*-208, *ccb206*-380, *ccb206*-424, *ccb206*-551, *ccb206*-566, *ccb256*-184, *ccb256*-421, *ccb256*-458, *ccb256*-673, *cox3*-257, *matR*-1807, *nad1*-500, *nad4*-836, *nad6*-446, *nad6*-463, *nad7*-795, *nad7*-1137, *orfX*-97, *orfX*-440, *orfX*-474, *orfX*-666, *rpl5*-64, *rps3*-1470 und *rps3*-1534.

An den Editingstellen *ccb206*-80, *nad2*-995 und *orfX*-412 führt der Austausch des MORF1-basierten Motives 4 dazu, das Kriterium 1 und 2 nicht mehr erfüllt vorlagen. Dieser Effekt, konnte nach der Transformation von *morf1-1* mit M1M3N2C2 und M3M1N3C3 beobachtet werden.

Durch die Verlängerung des *MORF3*-kodierten N-terminalen Sequenzabschnittes in M3M1N3C3 wurde die Bildung eines funktionalen Editosoms, an den Stellen *rps3*-603 und *rps4*-524, behindert. Beide Stellen konnten in Folge der Transformation von *morf1-1* mit M3M1N1C1 und M3M1N2C2 editiert werden. Demgegenüber führte erst der *MORF3*-kodiert N-Terminus in M3M1N3C3 an *orfX*-377 zur Komplementation des Editingdefektes in *morf1-1*. Ein Effekt der nicht unter der Beteiligung von M3M1N1C1 und M3M1N2C2 im Editosom zu beobachten war.

Editing an der Stelle *orfX*-409 konnte durch die Transformation von *morf1-1* mit M3M1N1C1 und M3M1N3C3 wieder hergestellt werden.

Im Folgenden soll auf die Komplementationsfähigkeit, sowie die Funktionsanalogie der einzelnen MORF3-MORF1-Chimären, im Vergleich zu MORF1 bzw. MORF3, eingegangen werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst auf die prozentuale Verteilung der, im Anschluss an die Transformation mit der entsprechenden M3M1-Chimäre, ermittelten Editingeffizienzen innerhalb der Messreihe eingegangen (Kriterium 1 und 2, 3.2.1.). Daraufhin wurden die signifikanten Unterschiede der Normalverteilungsfunktionen der posttransformativ ermittelten Editingeffizienzen von MORF1, MORF3 und der jeweiligen M3M1-Chimäre betrachtet (Kriterium 3, 3.2.2.).

Die Chimäre M3M1N1C1 beinhaltete einen MORF3-basierten N-Terminus, inklusive des Bereiches der MORF-Box, welcher für Motiv 1 kodierte. Die restlichen drei konservierten Motive, zuzüglich des verlängerten C-Terminus, entsprachen den Sequenzbereichen in *MORF1*. Durch die Transformation von *morf1-1* mit der Chimäre M3M1N1C1 konnte, an 17.6 % der betrachteten Editingstellen, eine geeignet hohe Editingeffizienz erzeugt werden. Dies betraf die Cytidine an den Editingstellen *ccb206*-80, *nad2-*995, *orfX-*409, *orfX-*412 und *rps3-*603. Im Umkehrschluss verbleiben 82.4 % der Editingstellen uneditiert. Zu diesen 82.4 % zählten folgende Stellen: *atp4-*138, *atp9-*167, *ccb203-*176, *ccb203-*208, *ccb206-*380, *ccb206-*424, *ccb206-*551, *ccb206-*566, *ccb256-*184, *ccb256-*421, *ccb256-*458, *ccb256-*673, *cox3-*257, *matR-*1807, *nad1-*500, *nad4-*836, *nad6*-446, *nad6*-463, *nad7*-795, *nad7*-1137, *orfX*-97, *orfX*-377, *orfX*-440, *orfX*-474, *orfX*-666, *rpl5*-64, *rps3*-1470 und *rps3*-1534 (Tabelle 8, Abbildung 28).



Abbildung 28. Übersicht der statistischen Analyse der Komplementationsfähigkeit von M3M1N1C1 in *morf1-1* entsprechend Kriterium 1 und 2. Verhältnis der Editingstellen, an denen durch die Transformation mit M3M1N1C1 Editing erzeugt werden konnte oder bei denen die Modifikation der Aminosäuresequenz zu einem Funktionsverlust führte.

Der Chimäre fehlen, nach Abzug des putativen mitochondrialen Translokationssignales, die ersten 37 Aminosäuren des Proteins MORF1. Mit Ausnahme von Motiv 1 existieren in diesem Bereich keine zusammenhängenden konservierten Areale (Abbildung 29).

MORF1 (At4g20020)	-	-	-	-	М	A	М	I	s	H	R	L	R	R	A	L	L	т	A	т	16	
MORF3 (At1g06790)	М	A	L	I	S	т	R	R	т	L	S	т	L	L	N	ĸ	т	L	s	s	20	
MORF1 (At4g20020)	S	Y	v	N	R	S	-	-	-	I	S	S	s	I	т	Ρ	Α	S	D	F	33	
MORF3 (At1g06790)	S	т	S	Y	S	-	-	S	S	F	Ρ	т	L	S	S	R	S	R	F	A	38	
MORF1 (At4g20020)	P	s	v	s	A	A	v	L	к	R	s	v	I	G	R	s	т	Е	v	A	53	
MORF3 (At1g06790)	М	Ρ	L	I	Е	к	v	s	s	s	R	т	s	L	G	Ρ	С	Y	I	S	58	
MORF1 (At4g20020)	т	R	A	Р	A	R	L	F	S	т	R	Q	Y	к	-	-	L	-	Y	к	70	
MORF3 (At1g06790)	т	R	Ρ	к	т	S	G	s	G	Y	s	Ρ	L	N	D	Ρ	s	Ρ	N	W	78	
MORF1 (At4g20020)	Е	G	D	Е	I	т	Е	D	т	v	L	F	Е	G	С	D	Y	N	H	Ŵ	90	
MORF3 (At1g06790)	S	N	R	Ρ	Ρ	к	Е	т	I	-	L	L	D	G	С	D	Y	Е	H	W	97	
MORF1 (At4g20020)	L	Ι	т	М	D	F	s	к													98	
MORF3 (At1g06790)	L	I	v	М	Е	F	т	-													104	

Abbildung 29. Aminosäuresequenz des N-Terminus der Proteine MORF1 und MORF3 inklusive Motiv 1. Das konservierte Motiv 1 umfasst in MORF1 die Aminosäuren 81-95, in MORF3 die Aminosäuren 88-102. Das putative, mitochondriale Translokationssignal endet bezüglich MORF bei Aminosäure 60, innerhalb der Sequenz von MORF3 an Aminosäure 45. Aminosäuren die in der Sequenz von über 60% aller MORF-Proteine konserviert vorliegen sind schwarz unterlegt. Außerhalb von Motiv 1 ergeben sich keine zusammenhängenden konservierten Bereiche. Modifiziert nach Takenaka *et al.* (2012)

Die im Anschluss an die Transformation mit der Chimäre M3M1N1C1, MORF1 oder MORF3 detektierten Mittelwerte und Standardabweichungen der entsprechenden Editingeffizienzen sind im Anhang hinterlegt. Die zugehörigen *p*-Werte können der folgenden Tabelle entnommen werden (Kriterium 3).

Tabelle 9. Analyse der Funktionsanalogie der artifiziellen Chimäre M3M1N1C1 in *morf1-1* im Vergleich zu MORF1 und MORF3. Grau unterlegte *p*-Werte markieren Editingergebnisse, die das Signifikanzniveau von 5 % unterschreiten. Dementsprechend liegt die Nullhypothese erfüllt vor (H_{0.2}: $\overline{X} \varepsilon_{MORF} \neq \overline{X} \varepsilon_{Chim\tilde{a}re}$). Befanden sich die gemittelten Editingeffizienzen im Verhältnis zueinander im Bereich von 1- α , lag die Alternativhypothese erfüllt vor (H_{1.2}: $\overline{X} \varepsilon_{MORF} = \overline{X} \varepsilon_{Chim\tilde{a}re}$). Der Grad der funktionellen Analogie entspricht |*P*|.

Transkript	Locus	p-Wert morf1-1: MORF1 morf1-1: M3M1N1C1	p-Wert morf1-1: MORF3 morf1-1: M3M1N1C1
atp4	138	0.0079	0.3821
atp9	167	0.2354	0.3854
ccb203	176	0.0100	0.2240
ccb203	208	0.0008	0.3708
ccb206	80	0.0192	-
ccb206	380	0.0804	0.6312
ccb206	424	0.0102	0.6542
ccb206	551	0.0084	0.4812
ccb206	566	0.0179	0.9247
ccb256	184	0.0005	0.9644
ccb256	421	1.89E-06	0.9935
ccb256	458	0.0227	0.3095
ccb256	673	0.0027	0.1780
cox3	257	0.0089	0.2150
matR	1807	0.0035	0.0215
nad1	500	0.0104	0.1087
nad2	995	0.1490	0.9947
nad4	836	0.0809	0.7535
nad6	446	0.0890	0.0486
nad6	463	0.0304	0.7909
nad7	795	0.0094	0.8744
nad7	1137	0.0030	0.9109
orfX	97	0.0013	0.7292
orfX	377	0.2510	0.1642
orfX	409	0.1015	0.8367
orfX	412	0.0666	0.5473
orfX	440	0.0071	0.4679
orfX	474	5.16E-07	0.5443
orfX	666	0.1451	0.0285
rpl5	64	0.0084	0.3409
rps3	603	0.5834	0.3511
rps3	1470	0.0077	0.4261
rps3	1534	0.0449	0.9712
rps4	524	0.0597	0.3356

Unter dem Einfluss von M3M1N1C1 wichen die ermittelten Editingeffizienzen an 67.6 % der betrachteten Editingstellen, gleichzeitig signifikant von den Referenzwerten der Transformation mit MORF1 ab und nicht signifikant von den posttransformativ gemessenen Effizienzen unter der Expression von transgenem MORF3 (Tabelle 9, Abbildung 30).

Betroffen waren die Editingstellen *atp4*-138, *ccb203*-176, *ccb203*-208, *ccb206*-424, *ccb206*-551, *ccb206*-566, *ccb256*-184, *ccb256*-421, *ccb256*-458, *ccb256*-673, *cox3*-257, *matR*-1807, *nad1*-500, *nad6*-463, *nad7*-795, *nad7*-1137, *orfX*-97, *orfX*-440, *orfX*-474, *rpl5*-64, *rps3*-1470 und *rps3*-1534 (Abbildung 30).



Abbildung 30. Funktionsanalogie zwischen MORF3 und M3M1N1C1. Die im Anschluss an die Transformation mit M3M1N1C1 ermittelten Editingeffizienzen der aufgeführten Stellen *atp4-*138 – *rps3-*1534 unterschieden sich signifikant von den Editingeffizienzen, welche unter dem Einfluss von MORF1 ermittelt wurden. Dementsprechend lag die Nullhypothese H_{0.2} erfüllt vor. Die Normalverteilungsfunktionen der gemittelten Editingeffizienzen unter der Beteiligung von MORF3 bzw. M3M1N1C1 waren gleichzeitig nicht signifikant unterschiedlich zueinander. Dementsprechend galt die Alternativhypothese der funktionellen Analogie als erfüllt.

An den hier genannten Stellen galt die Nullhypothese H_{0.2} bezüglich des Vergleiches von M3M1N1C1 und MORF1 als erfüllt. Die nach der Transformation mit M3M1N1C1 ermittelten Editingeffizienzen wichen signifikant von den Werten ab, welche unter der Beteiligung von MORF1 gemessen wurden. Diese Chimäre verhielt sich innerhalb des Editosoms nicht analog zu MORF1. Von einer funktionellen Analogie zwischen M3M1N1C1 und MORF1 kann nicht ausgegangen werden. Da die unter der Expression von *M3M1N1C1* detektierten Editingeffizienzen nicht signifikant von den Referenzwerten der Transformation MORF3 abwichen, mit konnte die Alternativhypothese H_{1.2} als erfüllt angesehen werden. Ein analoges Verhalten von MORF3 und M3M1N1C1 könnte vermutet werden. Dieses könnte durch den in Abbildung 29 dargestellten MORF3-basierten N-Terminus vermittelt werden.

Innerhalb der laut Kriterium 1 und 2 komplementierbaren Editingstellen wiesen 20 % der betrachteten Ereignisse signifikante Unterschiede der ermittelten Editingeffizienzen zwischen M3M1N1C1, MORF1 und MORF3 auf (Tabelle 8, Tabelle 9). Bei der unter dem Einfluss von M3M1N1C1 ermittelten Editingrate an *ccb206*-80 traten nur geringe Schwankungen bezüglich der Standardabweichung auf. Dies weist darauf hin, dass die Differenz zwischen den Editingeffizienzen auf dem Austausch des N-Terminus in M3M1N1C1 beruhte. Die spezifische Abweichung der unter dem Einfluss von M3M1N1C1 detektierten Editingeffizienzen betrug im Vergleich zu MORF1 40.7 %. In der Gegenüberstellung der Editingraten, welche unter der Beteiligung von M3M1N1C1 und MORF3 detektiert wurden, betrug die spezifische Differenz 47.1 % (*ccb206*-80: $\varepsilon_{morf1-1::MORF1}$: 89, $\varepsilon_{morf1-1::MORF3}$: 95, $\varepsilon_{morf1-1::M3M1N2C2}$: 48) Bei den restlichen 80 % der komplementierbaren Editingstellen wichen die Editingeffizienzen, welche nach den Transformationen mit MORF1, MORF3 oder M3M1N1C1 ermittelt wurden, nicht signifikant voneinander ab. Betroffen waren *nad2*-995, *orfX*-409, *orfX*-412 und *rps3*-603 (Tabelle 8, Tabelle 9, Abbildung 31).



morf1-1: 35S::MORF1 morf1-1: 35S::M3M1N1C1 morf1-1: 35S::MORF3

Das Editing an diesen genannten Stellen konnten durch die Transformation mit MORF1 und MORF3 (Abbildung 10 B-C; morf1-1:35S::MORF1; morf1-1:35S::MORF3) wieder hergestellt werden. Mittels des Zweistichproben- T-Test wurde die Ähnlichkeit der Normalverteilungsfunktionen, bezogen auf die Mittelwerte und Standardabweichungen der Editingeffizienzen nach der Transformation mit MORF3 respektive MORF1 und M3M1N1C1, ermittelt. Die berechneten *p*-Werte beschreiben hierbei die prozentuale Abweichung der Graphen voneinander. Ein Vergleich der, durch den Einfluss von MORF1 und M3M1N1C1, wieder hergestellten Editingeffizienzen offenbarte, eine Überlagerung der Verteilungsfunktionen im Bereich von 6.6 – 58.3 % (p-Wert morf1-1:MORF1 vs. morf1-1: M3M1N1C1; Tabelle 9). Die prozentuale Ähnlichkeit bezüglich der ermittelten Editinglevels nach der Transfektion mit MORF3 verglichen mit M3M1N1C1 betrug 35.1 - 99.5 % (p-Wert morf1-1:MORF3 vs. morf1-1:M3M1N1C1; Tabelle 9). An den Stellen *nad2*-995, *orfX*-409 und *orfX*-412 überschritten die berechneten p-Werte des T-Testes zwischen MORF3 und M3M1N1C1 die p-Werte des Vergleiches zwischen MORF1 und M3M1N1C1. Dementsprechend könnte eine höhere funktionelle Analogie zwischen MORF3 und M3M1N1C1 vermutet werden. Dieser Effekt konnte ebenfalls in dem direkten Vergleich der ermittelten Editingeffizienzen beobachtet werden (Abbildung 31).

Im Fall von *rps3*-603 fiel die Überschneidung der Normalverteilungsfunktionen zwischen den Messwerten der Transformation mit MORF1 und M3M1N1C1 höher aus, als sie es im Vergleich zu MORF3 tat. Dies spiegelte sich in den berechneten p-Werten wieder ($|P|_{morf1-1: MORF1 vs. morf1-1: M3M1N1C1}$: 0.58; $|P|_{morf1-1: MORF3 vs. morf1-1: M3M1N1C1}$: 0.35) und konnte ebenfalls anhand des Vergleiches der Editingeffizienzen beobachtet werden (Abbildung 31). Alle drei Proteine konnten den Editingdefekt in *morf1-1* ausgleichen. Die Transformation mit MORF1 respektive M3M1N1C1 führte an *rps3*-603 zu

Abbildung 31. Die Transformationsergebnisse der Chimäre M3M1N1C1 weisen funktionelle Analogien zu der Komplementation des Editing durch MORF1 und MORF3 an *nad2-995, orfX-409, orfX-412 und rps3-603 auf.* MORF1, MORF3 und M3M1N1C1 sind in der Lage Editing in den Transkripten *nad2-995, orfX-409, orfX-412 und rps3-603 zu erzeugen.* Die posttransformativ ermittelten Editingeffizienzen weisen auf eine ähnlichere Funktion im Bezug auf MORF3 und M3M1N1C1 hin.

ähnlicheren Editingeffizienzen. Der MORF3-basierte N-Terminus hatte an dieser Stelle keinen negativen Effekt auf die Funktionalität der Chimäre.

Bezüglich der Editingstellen *atp9*-167, *ccb206*-380, *nad4*-836, *orfX*-377 und *rps4*-524 konnten ebenfalls keine signifikante Abweichung zwischen den ermittelten Effizienzdaten der drei Protein festgestellt werden (Tabelle 9). Eine dezidiertere Betrachtung der Daten offenbarte jedoch hohe Varianzen in mindestens einer der Messreihen pro T-Test. Auf dieser Tatsache beruhten die Überschneidungen der jeweiligen Normalverteilungsfunktionen und damit auch die Höhe der p-Werte (Abbildung 27).

Am Anschluss an die Transformation von *morf1-1* mit M3M1N1C1 konnten an den Editingstellen *nad6-*446 und *orfX-*666 Editingeffizienzen beobachtet werden, die signifikant von den Editingraten der MORF3-Transformanten abwichen. Gleichzeitig überschritten die unter dem Einfluss der Chimäre ermittelten Editingeffizienzen das Signifikanzniveau im Vergleich zur Transformation mit MORF1 (Tabelle 9). Zur Veranschaulichung dient die folgende Abbildung.



Abbildung 32. Der Austausch des konservierten Motives 1 und des N-Terminus in M3M1N1C1 führt an den Editingstellen nad6-446 und orfX-666 nicht zu einem MORF3-ähnlichen Verhalten im Editosom. Unter dem Einfluss von M3M1N1C1 wurde an nad6-446 eine Editingeffizienz von ~ 93 % erreicht. Dieser Wert ist nicht signifikant abweichend von dem durch MORF1 rekonstruierten Wert (ε_{morf1-1:: MORF1}: 100). Eine signifikante Abweichung gegenüber der unter dem Einfluss von MORF3 ermittelten Editingeffizienz ist zu erkennen (Emorf1-1:: MORF3: 84). Unter dem Einfluss der Chimäre M3M1N1C1 wurden ~26 % der Cytidine an der Editingstelle orfX-666 editiert. Dieser Wert weicht spezifisch von dem Wert ab, der nach der Transformation mit MORF3 ermittelt wurde (ε_{morf1-1:: MORF3}: 6). Es konnte keine signifikante Abweichung zwischen den posttransformativ ermittelten Editingeffizienzen von MORF1 und M3M1N1C1 festgestellt weren (Emorf1-1:: *M3M1N1C1*: 43). (ɛ: Editingeffizienz)

Abweichend von der allgemeinen Tendenz führte die Transformation von *morf1-1* mit M3M1N1C1, an den Editingstellen *nad6-*446 und *orfX-*666, nicht zu ähnlichen Editingeffizienzen im Vergleich zu der Transformation mit MORF3. An beiden Editingstellen konnte mittels des T-Tests belegt werden, dass die gemessenen Editingeffizienzen nicht signifikant von den Werten abwichen, welche unter der Beteiligung von MORF1 im Editosom ermittelt wurden. Demgegenüber konnten mittels der vergleichenden, statistischen Analyse der Editingeffizienzen signifikante Unterschiede zwischen den Werten detektiert werden, die unter dem Einfluss von MORF3 und M3M1N1C1 ermittelt wurden. Die signifikante Abweichung der Editingeffizienzen der mit M3M1N1C1 bzw. MORF3 transformierten Pflanzen betrug an der Editingstelle *nad6-*446 8.8 %. An Position 666 im Transkript *orfX* führte die

Expression von *M3M1N1C1* respektive *MORF3* zu Editingeffizienzen, die um 26.5 % voneinander abwichen. Da das Signifikanzniveau nicht überschritten wurde, sind beide Abweichungen als spezifisch anzusehen.

Das chimäre Konstrukt M3M1N2C2 beinhaltete einen *MORF3*-kodierten N-Terminus einschließlich der konservierten Motive 1 und 4. Der C-terminale Bereich der Chimäre beinhaltete sowohl die konservierten Motive 2 und 3, als auch den verbleibenden Part des *trans*-Faktors MORF1.



Abbildung 33. Übersicht der statistischen Analyse der Komplementationsfähigkeit von M3M1N2C2 in *morf1-1* entsprechend der Kriterien 1 und 2. Verhältnis der Editingstellen, an denen es durch die Transformation mit dem chimären Konstrukt M3M1N2C2 zu einer Wiederherstellung von Editing kam oder an denen die Modifikation des N-Terminus zu einem Verlust der Komplementationsfähigkeit führte.

Durch die Verminderung der MORF1-basierten Sequenz innerhalb der Proteinchimäre M3M1N2C2 minimierte sich die Fähigkeit zur Komplementation des Editingdefektes in *morf1-1*, in Bezug auf alle betrachteten Editingstellen, auf 6 % (Tabelle 8, Abbildung 33). Bei den zwei Editingstellen an denen, durch die transgene Expression von *M3M1N2C2*, Editing erzeugt werden konnte, handelte es sich um *rps3*-603 und *rps4*-524. Die Verlängerung des *MORF3*-kodierten N-Terminus um Motiv 4 übte an diesen Stellen keinen negativen Effekt auf die Komplementationsfähigkeit der Chimäre M3M1N2C2 aus.

An 94 % der betrachteten Editingstellen lagen Kriterium 1 und 2, in Folge der Transformation mit M3M1N2C2, nicht erfüllt vor. Im Vergleich zu M3M1N1C1 ging an den Editingstellen *ccb206*-80, *nad2*-995 und *orfX*-412 die Fähigkeit zur Komplementation verloren.

An den verbleibenden Stellen führte weder die Transformation mit M3M1N1C1, noch mit M3M1N2C2 zur Wiederherstellung einer geeignet hohen Editingeffizienz nach Kriterium 1 und Kriterium 2. Bei den besagten Editingstellen handelt es sich um *atp4*-138, *atp9*-167, *ccb203*-176, *ccb203*-208, *ccb206*-380, *ccb206*-424, *ccb206*-551, *ccb206*-566, *ccb256*-184, *ccb256*-421, *ccb256*-458, *ccb256*-673, *cox3*-257, *matR*-1807, *nad1*-500, *nad4*-836, *nad6*-446, *nad6*-463, *nad7*-795, *nad7*-1137, *orfX*-97, *orfX*-377, *orfX*-440, *orfX*-474, *orfX*-666, *rpl5*-64, *rps3*-1470 und *rps3*-1534.

Dem Anhang können die Mittelwerte und Standardabweichungen der, im Anschluss an die Transformation mit M3M1N2C2, MORF1 oder MORF3 detektierten Editingeffizienzen, entnommen werden. Die Einschätzung der funktionellen Analogie zwischen den drei Proteinen wurde entsprechend des dritten Kriteriums vorgenommen. Die p-Werte, welche diesem Vergleich zugrunde lagen, können Tabelle 10 entnommen werden.

Tabelle 10. Analyse der Funktionsanalogie der artifiziellen Chimäre M3M1N2C2 in *morf1-1* im Vergleich zu MORF1 und MORF3. Grau unterlegte *p*-Werte markieren Editingergebnisse, die das Signifikanzniveau von 5 % unterschreiten. Dementsprechend liegt die Nullhypothese erfüllt vor (H_{0.2}: $\overline{X} \varepsilon_{MORF} \neq \overline{X} \varepsilon_{Chimare}$). Befanden sich die gemittelten Editingeffizienzen im Verhältnis zueinander im Bereich von 1- α , lag die Alternativhypothese erfüllt vor (H_{1.2}: $\overline{X} \varepsilon_{MORF} = \overline{X} \varepsilon_{Chimare}$). Der Grad der funktionellen Analogie entspricht |*P*|.

Transkript	Locus	p-Wert morf1-1: MORF1 morf1-1: M3M1N2C2	p-Wert morf1-1: MORF3 morf1-1: M3M1N2C2
atp4	138	0.0010	0.5194
atp9	167	0.0387	0.1016
ccb203	176	0.0246	0.6231
ccb203	208	0.0049	0.3773
ccb206	80	0.0114	-
ccb206	380	0.0258	0.4106
ccb206	424	0.0032	0.6952
ccb206	551	0.0048	0.1924
ccb206	566	0.0002	0.0176
ccb256	184	0.0006	0.3458
ccb256	421	0.0001	0.8872
ccb256	458	0.0483	0.8695
ccb256	673	0.0064	0.5339
cox3	257	0.0041	0.1333
matR	1807	0.0379	0.8466
nad1	500	0.0003	0.6331
nad2	995	0.1808	0.3325
nad4	836	0.0216	0.5142
nad6	446	0.3017	0.1230
nad6	463	0.0249	0.4479
nad7	795	0.0196	0.9597
nad7	1137	0.0010	0.7855
orfX	97	0.0021	0.8369
orfX	377	0.3199	0.2354
orfX	409	3.09E-05	0.0691
orfX	412	0.0002	0.0972
orfX	440	0.0007	0.2062
orfX	474	0.0002	0.2678
orfX	666	0.0193	0.3840
rpl5	64	0.0027	0.2868
rps3	603	0.4563	0.2694
rps3	1470	1.58E-05	0.8640
rps3	1534	0.1362	0.0848
rps4	524	0.1950	0.2826

Durch die Transformation von *morf1-1* mit M3M1N2C2 konnten an 76,5 % der Stellen Editingeffizienzen erzeugt werden, deren Normalverteilungsfunktionen gleichzeitig nicht signifikant von den MORF3-bedingten Editingeffizienzen abwichen und signifikante Unterschiede zu den Daten aufwiesen, welche unter der Expression des Transgens *MORF1* in *morf1-1* erfasst wurden (Tabelle 10, Abbildung 34).

Folgende Editingstellen waren von diesem Effekt betroffen: *atp4*-138, *atp9*-167, *ccb203*-176, *ccb203*-208, *ccb206*-380, *ccb206*-424, *ccb206*-551, *ccb256*-184, *ccb256*-421, *ccb256*-458, *ccb256*-673, *cox3*-257, *matR*-1807, *nad1*-500, *nad4*-836, *nad6*-463, *nad7*-795, *nad7*-1137, *orfX*-97, *orfX*-409, *orfX*-412, *orfX*-440, *orfX*-474, *orfX*-666, *rpl5*-64 und *rps3*-1470.



Abbildung 34. Funktionsanalogie zwischen MORF3 und M3M1N2C2. Die im Anschluss an die Transformation mit M3M1N1C1 ermittelten Editingeffizienzen der aufgeführten Stellen *atp4-*138 – *rps3-*1470 unterscheiden sich signifikant von den Editingeffizienzen, welche unter dem Einfluss von MORF1 ermittelt wurden. Dementsprechend lag die Nullhypothese H_{0.2} erfüllt vor. Die Normalverteilungsfunktionen der gemittelten Editingeffizienzen unter der Beteiligung von MORF3 bzw. M3M1N1C1 waren gleichzeitig nicht signifikant unterschiedlich zueinander. Dementsprechend galt die Alternativhypothese der funktionellen Analogie als erfüllt.

Entsprechend der statistischen Analyse mittels des T-Testes (Kriterium 3) konnte für obige Editingstellen festgestellt werden, dass keine beträchtlich Überlagerung der Normalverteilungsfunktionen zwischen MORF1- und M3M1N2C2-basierten Daten bestand. Das Signifikanzniveau wurde nicht überschritten. Folglich konnte für diesen Vergleich die Alternativhypothese $H_{1.2}$ als erfüllt angesehen werden. Von einer funktionellen Analogie der beiden Proteine war nicht auszugehen. Demgegenüber konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Editingeffizienzen beobachtet werden, welche unter dem Einfluss von MORF3 bzw. M3N1N2C2 in *morf 1-1* ermittelt wurden. Die Nullhypothese $H_{0.2}$ war erfüllt. Es konnte vermutet werden, dass diese beiden Proteine, innerhalb des Editosoms, ähnlich agieren.

Im Vergleich zu der Analyse der Funktionsanalogie zwischen MORF3 und M3N1N1C1 fiel auf, dass bedingt durch die Verlängerung des MORF3-basierten N-Terminus in M3M1N2C2, an einigen Stellen geringere Editingeffizienzen detektiert wurden. An den Editingstellen *atp9*-167, *nad4*-836, *orfX*-409, *orfX*-412 und *orfX*-666 führte dies zu signifikanten Unterschieden der Editingeffizienzen zwischen MORF1 und M3M1N2C2.

An zwei Editingstellen konnten signifikant abweichende Editingeffizienzen zwischen M3M1N2C2, MORF1 und MORF3 ermittelt werden. Hierbei waren *ccb206*-80 und *ccb206*-566 betroffen (Abbildung 35). An *ccb206*-80 betrug die Abweichung der Editingeffizienzen, welche unter dem Einfluss von MORF1 oder M3M1N2C2 ermittelt wurden, 53.2 % (*ccb206*-80: $\varepsilon_{morf1-1::MORF1}$: 89, $\varepsilon_{morf1-1::MORF3}$: 95, $\varepsilon_{morf1-1::M3M1N2C2}$: 36, $\varepsilon_{morf1-1::MORF1}$: 40). Die Differenz zu MORF3 belief sich auf 59.6 %. An der Editingstelle *ccb206*-566 konnte ein Unterschied der Editingeffizienzen, die nach der Transformation mit MORF1 oder M3M1N2C2 detektiert wurden, von 39.9 % beobachtet werden. Die Differenz zu MORF3 betrug 9.6 % (*ccb206*-566 : $\varepsilon_{morf1-1::MORF1}$: 86, $\varepsilon_{morf1-1::MORF3}$: 56,

εmorf1-1:: M3M1N2C2: 46, εmorf1-1: 50). Die Nullhypothese H_{0.2} galt, aufgrund der Unterschreitung des Signifikanzniveaus, für beide Editingstellen und alle drei Proteine als erfüllt. Es bestand offenkundig keine funktionelle Analogie. An beiden Editingstellen näherte sich das nach der Transformation mit M3M1N2C2 ermittelte Editinglevel dem Referenzwert der Mutante morf1-1 an.



Abbildung 35. Der Austausch der konservierten Motive 1 und 4, sowie des N-Terminus in M3M1N2C2 führt an den Editingstellen ccb206-80 und *ccb206*-566 zu abweichenden Editingeffizienzen im signifikant Vergleich zu MORF1 und MORF3. Unter dem Einfluss von M3M1N2C2 wurde an *ccb206*-80 eine Editingeffizienz von ~ 36 % erreicht. Dieser Wert ist signifikant abweichend von dem Referenzwert, der unter dem Einfluss von MORF1 detektiert wurde (ɛmorf1-1:: MORF1: 89). Eine signifikante Abweichung gegenüber der unter dem Einfluss von MORF3 ermittelten Editingeffizienz ist ebenfalls zu erkennen (Emorf1-1:: MORF3: 95). Unter dem Einfluss der Chimäre M3M1N2C2 wurde an der Editingstelle ccb206-566 eine Editingeffizienz von 45.9 % detektiert. Dieser Wert weicht spezifisch von den Editingeffizienzen ab, die nach der Transformation mit MORF3 (ε_{morf1-1:: MORF3}: 55) oder MORF1 (εmorf1-1:: MORF1: 86) ermittelt wurde. (ε: Editingeffizienz)

An den verbleibenden 17.6 % der Editingstellen konnte keine signifikante Abweichung bezüglich der p-Werte beobachtet werden. Dies betraf nad2-995, nad6-446, orfX-377, rps3-603, rps3-1534 und rps4-524. Aufgrund der relativen Ähnlichkeit der Editingeffizienzen und geringen Standardabweichungen war an den Stellen nad6-446, rps3-603, rps3-1534 und rps4-524 von einer approximativen analogen Funktionalität entsprechend der Alternativhypothese H_{1.2} auszugehen (*nad6*-446: *\varepsilon_morf1-1::MORF1*: 100, εmorf1-1::MORF3: 84, εmorf1-1:: M3M1N2C2: 94; rps3-603: εmorf1-1::MORF1: 98, εmorf1-1::MORF3: 100, εmorf1-1:: M3M1N2C2: 94: 46; rps3-1534: εmorf1-1::MORF1: 66, εmorf1-1::MORF3: 48, εmorf1-1:: M3M1N2C2: 58; rps4-524: ε_{morf1-1::MORF1}: 100, ε_{morf1-1::MORF3}: 71, ε_{morf1-1:: M3M1N2C2}: 91). Die Varianzen innerhalb der Messreihen, an den Editingstellen nad2-995 und orfX-377, war zu ausgeprägt, als das diese Daten sinnvoll in die Auswertung einbezogen werden sollten.



Komplementationsfähigkeit der

Diagramm 1. Übersicht der statistischen Analyse der Komplementationsfähigkeit von M3M1N3C3 in morf1-1 entsprechend der Kriterien 1 und 2. Verhältnis der Editingstellen, an denen es durch die Transformation mit dem chimären Konstrukt M3M1N3C3 zu einer Wiederherstellung von Editing kam oder an denen die Modifikation des N-Terminus zu einem Verlust der Komplementationsfähigkeit führte.

Die Chimäre M3M1N3C3 beinhaltete den längsten N-terminalen Sequenzbereich basierend auf MORF3. Dieser kodierte unter anderem für die konservierten Motiv 1, Motiv 4 und Motiv 3. Motiv2 und der gesamte C-Terminus entsprachen *MORF1*-kodierten Sequenzen.

Die vorgenommene Sequenzveränderung führte an den Editingstellen *rps3*-603 und *rps4*-524 zu einem Verlust der Komplementationsfähigkeit nach Kriterium 1 und 2 (Tabelle 8). Bei den 6 % der Editingstellen, an denen durch die Transformation mit M3M1N3C3 der Editingdefekt in *morf1-1* ausgeglichen werden konnte, handelt es sich um *orfX*-377 und *orfX*-409 (Tabelle 8, Abbildung 36). An den restlichen 94 % der betrachteten Editingstellen konnte, durch die Transformation mit M3M1N3C3, keine geeignet hohe Editingeffizienz erreicht werden. Mit Ausnahme der oben genannten Editingstellen, führte die Verlängerung des MORF3-basierten N-Terminus in M3M1N3C3 nicht zu einer Veränderung des Komlementationsstatuses verglichen mit M3M1N2C2 (Tabelle 8).

Der folgenden Tabelle 11 können die aus den ermittelten Editingeffizienzdaten berechneten p-Werte zu Kriterium 3 entnommen werden. Die arithmetischen Mittel und Standardabweichungen der Messreihen, zu der Transformation von *morf1-1* mit M3M1N3C3, wurden im Anhang hinterlegt.

Für die folgenden Editingstellen konnte keine signifikante Überschneidung zwischen den Editingeffizienzen, welche in Folge der Transformation mit M3M1N3C3 oder MORF1 detektiert wurden, nachgewiesen werden: *atp4*-138, *atp9*-167, *ccb203*-176, *ccb203*-208, *ccb206*-380, *ccb206*-424, *ccb206*-551, *ccb206*-566, *ccb256*-184, *ccb256*-421, *ccb256*-458, *ccb256*-673, *matR*-1807, *nad1*-500, *nad4*-836, *nad6*-446, *nad6*-463, *nad7*-795, *nad7*-1137, *orfX*-97, *orfX*-440, *orfX*-474, rpl5-64, *rps3*-1470, *rps3*-1534 und *rps4*-524. Gleichzeitig wurden in dem Vergleich der Normalverteilungsfunktionen der Editingeffizienzen, welche unter der Beteiligung von MORF3 oder M3M1N3C3 ermittelt wurden, keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen (Tabelle 11).



Abbildung 36. Funktionsanalogie zwischen MORF3 und M3M1N3C3. Die im Anschluss an die Transformation mit M3M1N1C1 ermittelten Editingeffizienzen der aufgeführten Stellen *atp4*-138 – *rps4*-524 unterscheiden sich signifikant von den Editingeffizienzen, welche unter dem Einfluss von MORF1 ermittelt wurden. Dementsprechend lag die Nullhypothese H_{0.2} erfüllt vor. Die Normalverteilungsfunktionen der gemittelten Editingeffizienzen unter der Beteiligung von MORF3 bzw. M3M1N3C3 waren gleichzeitig nicht signifikant unterschiedlich zueinander. Dementsprechend galt die Alternativhypothese der funktionellen Analogie als erfüllt.

An den besagten Editingstellen lag die Nullhypothese H_{0.2}, in Bezug auf MORF1 und M3M1N3C3, erfüllt vor. Auch über den direkten Vergleich der Editingeffizienzen konnte ersehen werden, dass diese beiden Proteine keine identische Funktion im Editosom ausüben (Abbildung 36). Bezüglich des statistischen Vergleiches der Editingeffizienzen, welche unter der Expression von MORF3 und M3M1N3C3 detektiert wurden, konnte die Alternativhypothese H_{1.2} als gegeben angesehen werden. Eine funktionelle Analogie zwischen MORF3 und der M3M1-Chimäre konnte nicht ausgeschlossen werden.

Tabelle 11. Analyse der Funktionsanalogie der artifiziellen Chimäre M3M1N3C3 in *morf1-1* im Vergleich zu MORF1 und MORF3. Grau unterlegte *p*-Werte markieren Editingergebnisse, die das Signifikanzniveau von 5 % unterschreiten. Dementsprechend liegt die Nullhypothese erfüllt vor (H_{0.2}: $\overline{X} \varepsilon_{MORF} \neq \overline{X} \varepsilon_{Chimäre}$). Befanden sich die gemittelten Editingeffizienzen im Verhältnis zueinander im Bereich von 1- α , lag die Alternativhypothese erfüllt vor (H_{1.2}: $\overline{X} \varepsilon_{MORF} = \overline{X} \varepsilon_{Chimäre}$). Der Grad der funktionellen Analogie entspricht |*P*|.

Transkript	Locus	p-Wert morf1-1: MORF1 morf1-1: M3M1N3C3	p-Wert morf1-1: MORF3 morf1-1: M3M1N3C3
atp4	138	0.0001	0.7369
atp9	167	0.0017	0.0262
ccb203	176	0.0035	0.2024
ccb203	208	0.0247	0.0397
ccb206	80	0.0113	-
ccb206	380	0.0029	0.4364
ccb206	424	7.47E-06	0.6844
ccb206	551	0.0016	0.2026
ccb206	566	0.0184	0.0414
ccb256	184	0.0052	0.4078
ccb256	421	0.0005	0.7755
ccb256	458	0.0233	0.2193
ccb256	673	0.0098	0.1117
cox3	257	0.0002	0.0008
matR	1807	0.0020	0.1085
nad1	500	0.0002	0.2443
nad2	995	0.0076	0.0117
nad4	836	0.0075	0.7816
nad6	446	-	0.4906
nad6	463	0.0452	0.1288
nad7	795	0.0106	0.2852
nad7	1137	0.0001	0.8694
orfX	97	0.0436	0.5771
orfX	377	0.9040	0.7405
orfX	409	0.1361	0.9756
orfX	412	0.1633	0.5721
orfX	440	0.0202	0.0818
orfX	474	3.40E-05	0.4970
orfX	666	0.0047	0.0167
rpl5	64	0.0221	0.2709
rps3	603	0.1732	0.1457
rps3	1470	0.0009	0.8767
rps3	1534	0.0244	0.1710
rps4	524	1.80E-05	0.6219

Im Anschluss an die Transformation von *morf1-1* mit M3M1N3C3 konnten an den Editingstellen *ccb206-*80, *cox3-*257, *nad2-*995 und *orfX-666* Editingeffizienzen ermittelt werden, welche signifikant von den Werten abwichen, die in Folge der Beteiligung der Proteine MORF1 und MORF3 im Editosom detektiert werden konnten. Die errechneten

p-Werte überschritten das Signifikanzniveau von 5 % nicht. Die Normalverteilungsfunktionen überschnitten sich minimal. Dies war auf die geringe Standardabweichung innerhalb der Messreihen zurück zu führen (Abbildung 37). Dementsprechend ist die Nullhypothese $H_{0.2}$ als korrekt anzusehen. MORF1, M3M1N3C3 und MORF3 agieren nicht identisch innerhalb des Editosoms dieser besagten Stellen.



Abbildung 37. Die N-terminale Modifikation von M3M1N3C3 führt zu signifikant unterschiedlichen Editingeffizienzen im Vergleich mit MORF1 und MORF3. Die Transformation von *morf1-1* mit M3M1N3C3 führt an den Editingstellen *ccb206-*80, cox3-257, nad2-995 und *orfX-*666 zu signifikant abweichenden Editingeffizienzen im Vergleich zu MORF1 und MORF3. Der Austausch der drei N-terminalen konservierten Motive hat einen inhibierenden Effekt auf die Funktionalität der Chimäre. Die mittels des T-Testes errechneten p-Werte überschreiten 5 % nicht. Demzufolge war die Nullhynothese Hag als erfüllt anzusehen

Bezüglich der verbleibenden Editingstellen konnte belegt werden, dass die ermittelten Editingeffizienzen zwischen M3M1N3C3, MORF3 und MORF1 nicht signifikant voneinander abwichen (Abbildung 38). Die Alternativhypothese H_{1.2} lag demnach erfüllt vor. An der Editingstelle *orfX*-377 schwankten die Editinglevel lediglich um 4 % (*orfX*-377: $\varepsilon_{morf1-1::MORF1}$: 71, $\varepsilon_{morf1-1::MORF3}$: 69, $\varepsilon_{morf1-1::M3M1N3C3}$: 73). An *orfX*-409 und *orfX*-412 wiesen die Normalverteilungsfunktionen der Editingeffizienzdaten von M3M1N3C3 und MORF3 eine höhere Überschneidung, im Vergleich zu den p-Werten des T-Testes mit MORF1, auf (Tabelle 11). Anhand der ermittelten Editingeffizienzen könnte eine funktionelle Analogie zwischen M3M1N3C3 und MORF3 vermutet werden (*orfX*-409: $\varepsilon_{morf1-1::MORF1}$: 99, $\varepsilon_{morf1-1::MORF3}$: 85, $\varepsilon_{morf1-1::M3M1N3C3}$: 85; *orfX*-412: $\varepsilon_{morf1-1::MORF1}$: 99, $\varepsilon_{morf1-1::MORF3}$: 89, $\varepsilon_{morf1-1::MORF3}$: 92). Dies konnte an diesen Stellen jedoch nicht statistisch belegt werden.



Abbildung 38. Die Transformation von *morf1-1* **mit M3M1N3C3 weist funktionelle Analogien zu der Komplementation des Editing durch MORF1 und MORF3 an** *orfX-***377**, *orfX-***409**, *orfX-***412 und** *rps3-***603 auf.** MORF1, MORF3 und M3M1N1C1 sind in der Lage Editing in den Transkripten *orfX-*377, *orfX-*409, *orfX-*412 und *rps3-*603 zu erzeugen. Eine signifikante Abweichung der Editingeffizienzen war nicht zubeobachten. Die Alternativhypothese H_{1.2} lag erfüllt vor. Ein analoge Funktionsweise von MORF1, MORF3 und M3M1N1C1 kann vermutet werden.

4 Diskussion

4.1 Trimere aus MORF- und PPR-Proteinen als funktionelle Einheit im Editosom

Von Glass *et al.* (2015) wurde der neue Editingfaktor MEF13 (*Mitochondrial Editing Factor 13, At3g02330*) vorgestellt. Bei MEF13 (At3g02330) handelt es sich um ein PPR-Protein der E-Untergruppe, welches an der Deaminierung überdurchschnittlich vieler Editingstellen beteiligt ist. Dies betrifft die Editingstellen *ccb452*-50, *ccb452*-415, *cox3*-314, *nad2*-59, *nad4*-158, *nad5*-1665, *nad5*-1916 und *nad7*-213.

Das Genom der EMS-Mutante *mef13-1* kodiert für eine Version von MEF13, bei der die Aminosäuresequenz des N-terminalen L-Motives innerhalb der PLS-Domäne modifiziert vorliegt. Daraus resultiert wahrscheinlich eine Destabilisierung der Bindung des *cis*-Elementes, sodass an allen acht Editingstellen kein Deaminierung der Transkripte mehr nachgewiesen werden konnte. Zudem führt das verminderte Editing an diesen Stellen zu einem verlangsamten Wachstum der Mutante. Sowohl der Editingdefekt, als auch die Wachstumsverzögerung konnten durch die Überexpression des Transgens *MEF13* komplementiert werden. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass MEF13 an der Detektion und Editierung dieser acht Stellen beteiligt ist.

Da MEF13 keine DYW-Domäne beinhaltet, welche möglicherweise das Editingenzym bzw. einen Teil davon darstellt, ist es auf die Rekrutierung einer DYW-Domäne innerhalb des Editosoms angewiesen (Boussardon *et al.*, 2014; Glass *et al.*, 2015).

Dem derzeitigen Modell des Editosoms liegt die These zugrunde, dass die PPR-Proteine spezifisch an das *cis*-Element der RNA binden, um das zu editierende Cytidin zu markieren. Dabei agieren sie gleichzeitig als Plattform zur Rekrutierung weiterer *trans*-Faktoren des Editosoms (Zhang *et al.*, 2014). Zu diesen weiteren Faktoren gehören die MORF-Proteine. Die Interaktion zwischen mitochondrialen und plastidären PPR- und MORF- Proteinen ist spezifisch. Beispiele hierfür sind die Bildung von Heteromeren zwischen MEF10 und MORF8, im Gegensatz zu anderen mitochondrialen MORF-Proteinen, oder die gerichtete Interaktion zwischen MORF2 oder MORF9 mit den PPR-Proteinen CRR28, OTP82 und DYW1 (Härtel *et al.*, 2013; Zhang *et al.* 2014).

Eine weitere Ebene der spezifischen Interaktion konnte anhand der Analyse des Editingfaktors MEF13 beobachtet werden. Die hohe Anzahl der betroffenen Stellen ermöglichte eine vergleichende Gegenüberstellung der Editingdefekte diverser *trans*-Faktoren. Hierbei zeigte sich, dass die in *mef13-1* betroffenen Editingstellen, ebenfalls Verringerungen der Editingeffizienz in den Mutationslinien *morf3* bzw. *morf8/rip1* aufwiesen. Vergleichbare Effekte konnten in *morf1-1* nicht beobachtet werden (Takenaka *et al.*, 2012; Bentolila *et al.*, 2013).

Dementsprechend lag ein funktionelles Zusammenwirken von MEF13, MORF3 und MORF8 in der Bildung des Editingkomplexes an diesen Editingstellen nahe. Mittels BiFC-

Experimenten konnte belegt werden, dass MEF13 sowohl mit MORF3 als auch MORF1 interagiert. Die Interaktion zwischen MORF1 und MEF13 wurde mittels der *Yeast Two-Hybrid*-Analysen bestätigt. Demgegenüber führte die Kotransformation von *MEF13* und *MORF3* nicht zu einer Proliferation der Zellen. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die Bildung der MEF13-MORF3-Heteromere, so wie sie *in planta* detektiert wurde, von weiteren Kofaktoren abhängen könnte. Der einzige weitere mitochondriale Faktor, mit dem MEF13 *in vivo* interagierte, war MORF8. Daraufhin wurde diese MORF-MEF-Interaktionsanalyse, im Zuge eines *Yeast Three-Hybrid*-Experiments, um die Expression von *MORF8* erweitert. Mit dieser Analyse konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Anwesenheit von MORF8 einen stabilisierenden Effekt auf die Interaktion von MEF13 und MORF3 ausübt. Selbst unter der Selektion mit 10 mM 3-AT, dies entspricht der vierfachen Menge der üblicherweise eingesetzten Inhibitorkonzentration, war eine klare Interaktion zwischen MEF13, MORF3 und MORF8 zu erkennen (Glass *et al.*, 2015).

Die Bildung von Dimeren aus MORF3 und MORF8 konnte von Zehrmann (2015) per *Yeast Two-Hybrid-, Pulldown-* und BiFC-Experimenten nachgewiesen werden. Diese fundierte Interaktion untereinander, der nachweislich stabilisierende Effekt von MORF8 auf die MEF-MORF-Interaktion, sowie der Fakt, dass alle in *mef13-1* betroffenen Editingstellen ebenfalls in MORF3- und MORF8-Mutanten beeinträchtigt sind, weisen auf einen funktionellen Komplex der drei Proteine hin.

4.2 Analyse der bindungsrelevanten Sequenzareale von MORF-Proteinen

Die Beteiligung von MORF-Proteinen an der Formierung des Editosoms ist unstrittig. Ebenso wie ihre Interaktion mit diversen Proteinfamilien, deren Vertreter als Editingfaktoren deklariert werden (Takenaka, 2014; Bentolila *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2015, 2016). Es konnte gezeigt werden, dass MORF-Proteine als Dimere agieren. Ebenso konnte belegt werden, dass die MORF-Box an der Bildung dieser Homo- oder Heteromere beteiligt ist (Zhang *et al.*, 2014; Zehrmann *et al.*, 2015). Dennoch blieben die Funktion der einzelnen konservierten Motive innerhalb der MORF-Box, sowie die Rolle der unterschiedlich ausgeprägten Termini innerhalb der MORF-Familie, unklar. Die Relevanz der verschiedenen Sequenzbereiche bezüglich der Interaktion mit unterschiedlichen editosombildenden Proteinen wird im Folgenden, am Beispiel der MORF1 und MORF3, erörtert.

4.2.1 Der MORF1-basierte N-Terminus der M1M3-Chimären ist an der Bildung eines funktionellen Editosoms beteiligt

Die Mutation der Aminosäure 165 (P>S) in der konservierte Region des Proteins MORF1 führt, in der Mutante *morf1-1*, zur Verminderung der Editingeffizienz an zahlreichen Editingstellen (Takenaka *et al.*, 2012). Betroffen sind nahezu alle mitochondrialen Transkripte. Durch die Transformation mit den chimären Konstrukten M1M3N2C2,

M1M3N3C3 und M1M3N4C4 sollte überprüft werden, ob der Austausch bestimmter Motive und Termini einen Einfluss auf die Fähigkeit der Proteine ausübte, ein funktionales Editosom zu bilden. M1M3N2C2 beinhaltete hierbei die MORF1-basierten Motive 1 und 4. Der MORF1-kodierte N-Terminus wurde in M1M3N3C3 um das konservierte Motiv 3 verlängert. M1M3N4C4 kodierte für alle vier konservierten Motive der MORF-Box des *trans*-Faktors MORF1.

Die im Anschluss an die Transformation von *morf1-1* ermittelten Editingeffizienzen wurden entsprechend der definierten Kriterien analysiert und statistisch ausgewertet. Es wurde zunächst überprüft, ob die entsprechende Editingeffizienz signifikant von dem Referenzwert der Mutante *morf1-1* abwich (Kriterium 1). Des Weiteren wurde untersucht, ob die wiederhergestellte Editingeffizienz ausreichend hoch war (Kriterium 2).

An ~ 61 % der betrachteten Editingstellen führte die Transformation von *morf1-1* mit M1M3N2C2, M1M3N3C3 und M1M3N4C4 zu einer Wiederherstellung des Editing. Kriterium 1 und 2 lagen, unabhängig davon mit welcher der drei M1M3-Chimären transformiert wurde, erfüllt vor. Dies traf auf folgende Stellen zu: atp4-138, atp9-167, ccb206-80, ccb206-551, ccb206-566, ccb256-184, ccb256-421, ccb256-673, cox3-257, matR-1807, nad1-500, nad2-995, nad6-446, orfX-97, orfX-409, orfX-440, orfX-474, rpl5-64, rps3-1470 und rps4-524.

Zu den verbleibenden 39 % der betrachteten Editingstellen zählten *ccb203*-176, *ccb203*-208, *ccb206*-380, *ccb206*-424, *ccb256*-458, *nad6*-463, *nad7*-795, *nad7*-1137, *orfX*-377, *orfX*-412, *orfX*-666, *rps3*-603 und *rps3*-1534.

An den Editingstellen ccb206-80, ccb206-551, ccb206-566, ccb256-184, ccb256-421, *ccb256-673, cox3-257, matR-1807, nad1-500, nad2-995, nad6-446* und *orfX-440* wichen die, durch die Transformation mit allen drei Chimären erhaltenen Editingeffizienzen signifikant von den Werten ab, welche durch ein induziertes Überangebot an MORF3 in *morf1-1* erzeugt werden konnten. Da die Nullhypothese H_{0,2} in diesem Fall erfüllt vorlag, konnte nicht von einer funktionellen Analogie zwischen M1M3N2C2, M1M3N3C3 und M1M3N4C4 und MORF3 ausgegangen werden. Gleichzeitig lagen die, unter dem Einfluss von MORF1 und den M1M3-Chimären ermittelten Editingeffizienzen so nah beieinander, dass die statistische Analyse keinen signifikanten Unterschied ergab. Die unter Kriterium 3 definierte Alternativhypothese H_{1.2} konnte als Faktum angesehen werden. Die Funktion, welche MORF1 oder die jeweilige Chimäre im Editosom ausführte, wurde daraufhin als analog betrachtet. Da sich die Chimären während der Assemblierung des Editosoms MORF1-ähnlich verhielten, kann davon vermutet werden, dass diese Analogie auf den MORF1-basierten Sequenzabschnitten der Chimären beruhte. Offenkundig scheinen der N-Terminus, sowie die ersten beiden konservierten Motive der MORF-Box auszureichen, um eine MORF1-ähnliche Funktion zu vermitteln. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die C-terminalen Motive 2 und 3, aufgrund ihres hohen Grades an konservierten Aminosäuren respektive hydrophoben Interaktionsarealen,

ohne einen negativen Effekt zwischen MORF1 und MORF3 ausgetauscht werden könnten.

Laut Kriterium 3 wichen die im Anschluss an die Transformation mit MORF1, MORF3 oder den M1M3-Chimären ermittelten Editingeffizienzen an den Stellen atp9-167 und orfX-409 nicht signifikant voneinander ab. Durch die Expression von MORF1 bzw. MORF3 in morf1-1 konnte, an beiden genannten Editingstellen, ein funktionelles Editosom entsprechend der ersten beiden Kriterien gebildet werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese beiden MORF-Proteine sich im Editingkomplex dieser beiden Editingstellen ersetzen können. Die Editingstellen atp9-167 und orfX-409 konnten in der Mutante morf3-1 nicht als betroffen detektiert werden (Takenaka et al., 2012). Wie jedoch unter 3.2.1. belegt werden konnte, wurden keineswegs alle in *morf1-1* betroffenen Editingstellen durch die Anwesenheit von MORF3 editiert. Diese Fähigkeit muss selektiv von den anderen trans-Faktoren abhängen, welche das Editosom an den betroffenen Editingstellen bilden. Dementsprechend ist es vorstellbar, das MORF1 die Funktion von MORF3 an *atp9*-167 und *orfX*-409 übernimmt, sodass die Beteiligung von MORF3 am Editingkomplex unentdeckt blieb. Da beide Referenzproteine zur Komplementation des Editingdefektes in morf1-1 befähigt waren, können keine definitiven Rückschlüsse auf den Sequenzbereich gemacht werden, der die Chimären zur Wiederherstellung des Editing an diesen Stellen befähigte.

Wie bereits erwähnt, wurden bei allen oben genannten Editingstellen Kriterium1 und 2 erfüllt. Der kürzeste MORF1-basierte N-Terminus war ausreichend, um eine geeignet hohe Editingeffizienz zu erzeugen. Dennoch konnte an den Editingstellen atp4-138 und orfX-474 folgender Effekt beobachtet werden (3.2.2., Tabelle 5-7, Abbildung 20). Die unter dem Einfluss der M1M3-Chimären erzeugten Editingeffizienzen wichen über alle Analysen, mit statistischer Signifikanz, von den Werten ab, welche unter der Beteiligung von MORF3 im Editosom detektiert wurden. In der Folge werden demnach nur die Unterschiede zwischen MORF1 und den M1M3-Chimären betrachtet. Im Anschluss an die Transformation mit M1M3N2C2 wichen die ermittelten Editingeffizienzen signifikant von den Referenzwerten ab, die unter der Expression von MORF1 in morf1-1 gemessen wurden. Diese Abweichung war als strikt anzusehen. Es gab keine großen Standardabweichungen innerhalb der Messreihen. Der messbare Unterschied der Editingeffizienzen zwischen M1M3N2C2 und MORF1 betrug an der Stelle atp4-138 8.4 % und an orfX-474 30.4 %. In beiden Fällen galt die Nullhypothese H_{0.2} als erfüllt. M1M3N2C2 verhielt sich dementsprechend nicht MORF1-ähnlich im Editosom. Die Funktionalität dieser Chimäre war beeinträchtigt. Es konnte vermutet werden, dass sich die Einschränkung der Funktionalität aus dem MORF3-basierten C-Terminus der Chimäre ergab. Die anschließende statistische Analyse der, unter dem Einfluss von M1M3N3C3, M1M3N4C4 und MORF1 erhobenen Effizienzdaten belegt, dass keine signifikante Abweichung zwischen den Werten mehr bestand. Die Werte der Editingeffizienzen mussten sich folglich angenähert haben. Betrug die nach der Transformation mit M1M3N2C2 ermittelte Editingeffizienz an der Stelle *atp4*-138 noch 82.4 %, so stieg sie unter dem Einfluss von M1M3N3C3 auf 89.7 %. Die unter der Beteiligung von MORF1 im Editingkomplex ermittelte Editingrate betrug 90.8 %. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass die Verlängerung der MORF1-basierten Sequenz in M1M3N3C3 für diesen Effekt verantwortlich ist. Aufgrund des Vorhandenseins des MORF1-basierten Motivs 3 galt die Alternativhypothese H_{1.2} als erfüllt. Es konnte von einer funktionellen Analoge zwischen MORF1, M1M3N3C3 und M1M3N4C4 ($\epsilon_{M1M3N4C4}$: 89.2 %) ausgegangen werden. Diese Abhängigkeit der Funktionsanalogie von dem *MORF1*-kodierten Motiv 3 konnte ebenfalls an der Editingstelle *orfX*-474 beobachtet werden. Motiv 3 scheint in der Assemblierung des Editosoms dieser beiden Editingstellen eine Funktion zu haben und konnte nicht ohne negativen Effekt zwischen den M1M3-Chimären ausgetauscht werden.

Dieser stabilisierende Effekt konnte ebenfalls anhand der unter 3.2.1.1 getätigten *in vivo*-Analyse nachgewiesen werden. Die Interaktion der N- und C-terminalen MORF1-Deletionskonstrukte untereinander war maßgeblich von dem Vorhandensein des konservierten Motives 3 abhängig (MORF1_C2, MORF1_N2). Eine Interaktion mit den Deletionskonstrukten, welche Motiv 3 nicht beinhalteten (MORF1_C3, MORF1_C4, MORF1_N3) führte nicht zur Proliferation der Hefezellen. Motiv 3 könnte einen entscheidenden Einfluss auf die Interaktion von kurzen MORF-Proteinen, wie MORF3 oder den MORF1-MORF3-Chimären, ausüben.

Editingstellen, deren statistische Analyse durch hohe Varianzen in einer der mittels des T-Testes verglichenen Normalverteilungsfunktionen verfälscht vorlag, wurden nicht in diese Auswertung einbezogen.

4.2.2 Der verlängerte C-Terminus des Proteins MORF1 ist nicht an der Bildung eines funktionellen Editosoms mit PPR –Proteinen der E-Subklasse beteiligt

Die MORF1-MORF3-Chimären verfügen über unterschiedliche Ausstattungen von konservierten Motiven. Allen gemein ist jedoch der an Motiv 2 anschließende kürzere C-Terminus des Proteins MORF3 (Aminosäuren 182-245) im Vergleich zu der längeren Sequenz in MORF1 (Aminosäuren 177-407). Die Rolle dieses C-Terminus kann insbesondere an der Chimäre M1M3N4C4 beurteilt werden, da diese die komplette N-Terminale Sequenz, inklusive aller konservierten Proteine, basierend auf MORF1 beinhaltet und nur die Aminosäuren 183-245 *MORF3*-kodiert sind.

Das Editosom von Cytidinen, die nicht durch ein induziertes Überangebot von M1M3N4C4 editiert werden können, könnte einerseits aus einer strikten Assoziation mit einem der konservierten Motive heraus nicht gebildet werden. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass das Fehlen des verlängerten MORF1-C-Terminus zu einer fehlerhaften Assemblierung des Editingkomplexes führt. Bei den Editingstellen handelt es sich um *nad6*-463, *nad7*-795, *orfX*-377, *orfX*-412, *orfX*-666, *rps3*-603 und *rps3*-1534.

Ein Vergleich dieser nicht editierten Stellen, mit allen untersuchten Editingstellen offenbarte, dass in gleichen Transkripten unterschiedliche Interaktionsmuster zu erkennen sind. So führt beispielsweise die Transformation von *morf1-1* mit M1M3N4C4

nicht zu einer Wiederherstellung der Editingfähigkeit an den Stellen rps3-603 und rps3-1534. Das bedeutet selbst unter dem Vorhandensein von allen MORF1-basierten Motiven der MORF-Box scheint eine Funktionsfähigkeit ohne den C-Terminus (MORF1 177-407) nicht gegeben zu sein. Andererseits führt an Position rsp3-1470 bereits die Bereitstellung des kürzesten *MORF1*-kodierten N-Terminus in M1M3N2C2 zur Wiederherstellung der Editierungsfähigkeit. Diese bleibt auch währen der Transformation mit M1M3N3C3 und M1M3N4C4 bestehen. Folglich reicht diese Nterminale Sequenz inklusive der Motive 1 und 4 aus, um mit weiteren editosombildenden Proteinen zu interagieren. Am Editing aller drei genannten Stellen sind sowohl MORF1 als auch MORF8 beteilig (Takenaka et al., 2012, Bentolila et al., 2012).

Unter der Annahme, dass diese beiden MORF-Proteine in allen drei Fällen identisch miteinander agieren und in Anbetracht des Faktes, das die Beobachtungen Konsistent über die M1M3-Chimären vorlagen, könnte die Diversität in der Interaktion mit PPR-Proteinen begründet sein. Dieser Zusammenhang wurde mit folgendem Ergebnis überprüft.

Für zwei der genannten Stellen im Transkript *rps3* sind PPR-Proteine bekannt. Die Editingstelle *rsp3*-1470 wird von MEF37 (At5g08310, unpublizierte Daten PhD. habil. Mizuki Takenaka) erkannt. MEF37 beinhaltet an seinem C-Terminus eine EE+-Domäne. Das *cis*-Element des zu editierenden C's an Position *rsp3*-1534 von REME2 (At4g 15720, Bentolila *et al.*, 2013b) detektiert. REME2 gehört zu der DYW-Untergruppe.

Es ergibt sich eine Korrelation zwischen den C-terminalen Domänen der PPR-Proteine und der Funktionalität der MORF1-MORF3-Chimären. In Bezug auf die Interaktion mit PPR-Proteinen der E+-Untergruppe wird erstens deutlich, dass der Verlust des C-Terminus von MORF1 keinen negativen Effekt auf die Ausbildung eines funktionellen Editosoms hat. Des Weiteren wird klar, dass der N-terminale Sequenzbereich (inklusive Motiv 1 und Motiv 4) von MORF1 in M1M3N2C2 ausreicht, um die statistischen Kriterien 1 und 2 an der Stelle *rsp3*-1470 zu erfüllen. Die durch die Transformation mit M1M3N2C2 ermittelten Editingeffizienzen weichen signifikant von den Werten ab, die unter der Expression von MORF3 als Transgen detektiert wurden. Dieser Effekt konnte ebenfalls für die beiden anderen Chimären beobachtet werden. Dementsprechend führt die MORF3-basierte Sequenz nicht zu einer MORF3-ähnlichen Funktion der Chimären im Editosom. In Folge der Transformation mit MORF1 konnte die resultierende Editingeffizienz an dieser Stelle auf 93 % angehoben werden. M1M3N2C2 und M1M3N3C3 führen zur Bildung eines funktionsfähigen Editosoms. Die posttransformativ ermittelten Editingeffizienzen belaufen sich auch jeweils ~ 82 %. Durch die Transformation der Mutante mit M1M3N4C4 konnte ein MORF1-ähnlicher Wert von 91 % erreicht werden. Dies entspricht einer Überschneidung der Normalverteilungsfunktionen von ~ 70 %. Die Alternativhypothese $H_{1,2}$ kann dementsprechend als erfüllt angesehen werden und es kann von einer annähernden, funktionellen Analogie ausgegangen werden.

Demgegenüber steht *rsp3*-1534, dessen *cis*-Element von REME2 erkannt wird. An dieser Editingstelle werden die Transkripte in Columbia zu 70 % editiert. Innerhalb der Mutante *morf1-1* sinkt die Effizienz, mit der dieses Cytidin editiert wird, auf 50 % ab (Takenaka *et al.*, 2012). Durch die Komplementation mit dem Transgen *MORF1* konnte dieser Editingdefekt ausgeglichen werden ($\varepsilon_{morf1-1:MORF1}$: 66 %). Die Effizienzdaten, welche in Folge der Transformation mit MORF3 erhoben wurden, blieben auf dem Stand der Mutante *morf1-1* ($\varepsilon_{morf1-1:MORF3}$: 48,2 %). Aus der Transformation von *morf1-1* mit M1M3N4C4 ergab sich eine Editingeffizienz von 45,6 %. Der Editingdefekt konnte dementsprechend nicht durch M1M3N4C4 ausgeglichen werden. Für die Interaktion mit PPR-Proteinen, die eine DYW-Domäne beinhalten, scheint der komplette N-Terminus inklusive aller vier konservierter Motive nicht auszureichen, um ein funktionales Editosom zu formen. Dies bedeutet, dass ein Sequenzbereich nach Motiv 4 existieren könnte, der Relevanz bezüglich der Interaktion zwischen MORF1, MORF8 und Proteinen der DYW-Untergruppe aufweist.

Eine Beteiligung der MORF-Proteine an der Ausrichtung des Editingenzyms hin zu dem Cytidin, welches editiert werden soll, ist von Takenaka (2014) bereits vermutet worden. Das die zinkbindende Motive, welche in der DYW-Domäne konserviert vorliegen, an der Editierung von Cytidinen beteiligt sind, wurde für plastidäre PPR-Proteine bereits nachgewiesen (Boussardon et al., 2014; Wagoner et al., 2015). Die Funktion der DYW-Domäne als Deaminase (oder Teil der Deaminase) gilt als wahrscheinlich (Chateigner-Boutin et al., 2013, 2014; Boussardon et al., 2014). Ebenso gesichert ist die Fähigkeit der beiden Proteinen MORF1 und MORF8 Dimere zu bilden und in dieser Form zu agieren (Zehrmann *et al.*, 2015). Beide Proteine beinhalten eine lange C-terminale Sequenz nach dem letzten konservierten Motiv der MORF-Box (MORF1: 177-407; MORF8: 184-396). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Interaktion von MORF1 und MORF8 in vivo, unter der Vermittlung der konservierten Sequenzen der MORF-Box, auch ohne den verlängerten C-Terminus von MORF1, möglich ist (Zehrmann et al., 2015). Die Interaktion kurzer MORF-Proteine kann, durch die Anwesenheit von MORF-Proteinen mit verlängerten C-Terminus, stabilisiert werden (Glass et al., 2015). Der an die MORF-Box anschließende Sequenzbereich ist dementsprechend frei für Interaktionen mit weiteren editosombildenden Proteinen. Dies inkludiert auch die Option, an der Ausrichtung der DYW-Domäne beteiligt zu sein.

Dementsprechend resultieren für Cytidine, an deren Editing MORF1 und MORF8 beteiligt sind, folgende Thesen:

- 1) Die Bildung eines funktionalen Editosoms unter der Beteiligung von M1M3-Chimären und E-Klasse PPR-Proteinen ist nicht von dem Vorhandensein des langen MORF1-C-Terminus abhängig.
- 2) Das Fehlen des langen MORF1-C-Terminus führt, trotz des Vorhandenseins aller vier konservierter Motive der MORF-Box (M1M3N4C4), nicht zur Editierung von Cytidinen, deren *cis*-Element von PLS-Proteinen der DYW-Untergruppe erkannt werden.

Die folgende Auswertung beschränkt sich auf Editingstellen, deren korrespondierende PPR-Proteine bekannt sind.

Ein weiteres Transkript in dem unterschiedliche Interaktionsmuster zu beobachten sind, ist *orfX*. Bei den Editingstellen, die auf eine Beteiligung von MORF1 und MORF8 angewiesen sind, handelt es sich um *orfX*-409 und *orfX*-412.

Die hier erhobenen Messungen belegen, dass Editingdefektes in *morf1-1* an Position *orfX*-409 durch M1M3N2C2 komplementiert werden kann.

Hierbei gehört orfX-409 zu denjenigen Editingstellen, an denen die Transformation mit allen drei M1M3-Chimären zur Erfüllung von Kriterium 1 und 2 führte. Die in Folge dieser Transformationen ermittelten Editingeffizienzen wiesen keine signifikante Abweichung zu den Werten der Komplementation mit den Transgenen MORF1 oder MORF3 auf (Kriterium 3). Die Überschneidung der Normalverteilungsfunktionen ergab sich aus der geringe Abweichungen der Effizienzdaten zu den Referenzwerten, welche durch die Transformation von morf1-1 mit MORF1 oder MORF3 erhalten wurden. Die Editingstelle *orfX*-409 wird im Wildtyp Columbia mit einer Effizienz von 100 % editiert. In morf1-1 liegen 50 % der Transkripte modifiziert vor (Takenaka et al., 2012). In Folge der Transformation mit MORF1 konnte eine Editingeffizienz von 99,4 % erzeugt werden. Die Komplementation der Mutante mit dem Transgen MORF3 erhöhte die Editingeffizienz an *orfX*-409 auf 85,3 %. Die im Anschluss an die Transformation durch die MORF1-MORF3-Chimären ermittelten Editingeffizienzen bewegen sich im Bereich von 86,8 – 96,6% ($\varepsilon_{morf1-1:M1M3N2C2}$: 86,8; $\varepsilon_{morf1-1:M1M3N3C3}$: 96,6; $\varepsilon_{morf1-1:M1M3N4C4}$: 93,9). Aufgrund der Ähnlichkeit der erhaltenen Messwerte untereinander, konnte mittels des T-Tests kein signifikanter Unterschied zwischen den Editingeffizienzen ermittelt werden. Festgehalten werden kann, dass die Transformation mit allen Chimären zur Komplementation der des Editingdefektes führt. Bekannt ist, dass orfX-409 von MEF43 affektiert wird, welches eine E-Domäne besitzt (At2g36730, unpublizierte Daten, zur Verfügung gestellt von Dr. Anja Jörg). Diese entspricht der Interaktionshypothese, welche bereits für die bekannten Faktoren des Transkriptes rps3 postuliert wurde.

Am Editing von *orfX*-412 ist nachweislich MEF1 beteiligt (At5g52630, MEF1 Zehrmann *et al.*, 2010; *orfX*-412 unpublizierte Daten Dr. Anja Jörg). MEF1 beinhaltet eine DYW-Domäne. Das Cytidin an dieser Position kann nicht durch die Transformation mit M1M3N4C4 editiert werden. Hierbei entspricht die posttransformativ ermittelte Editingeffizienz 90,7 %. Dieser Wert weicht nicht signifikant von dem Referenzwert der Mutante *morf1-1* ab ($\varepsilon_{morf1-1}$: 80), erreicht jedoch ebenfalls nicht die Editingeffizienz von 98,8 %, welche durch die Transformation mit MORF1 erzeugt wurde. Demzufolge könnte angenommen werden, dass das Fehlen des langen MORF1-C-Terminus in M1M3N4C4, in der Interaktion mit MEF1, nicht zur Editierung dieses Cytidins führt. Diejenigen Transkripte an deren Editierung MORF1 und MORF8 beteiligt sind, erfüllen auch in *orfX* die für das Transkript *rps3* beschriebenen Thesen.

Auch im Transkript *ccb203* kann das Cytidin an Position 176 bereits durch die Expression von *M1M3N2C2* editiert werden. Das bekannte PPR-Protein OTP71, welches diese Editingstelle erkennt, entspricht der E2-Untergruppe (Chateigner-Boutin *et al.*,

2013). Somit gilt die zuvor beschriebene Annahme, dass E-Domänen beinhaltende PPR-Proteine ohne den MORF1-basierten C-Terminus editiert werden können, als erfüllt. Mittels des T-Tests konnte nachgewiesen werden, dass die Editingeffizienzen, welche nach der Transformation der Mutante mit den M1M3-Chimären ermittelt wurden, signifikant von den Referenzwerten von MORF3 abweichen (Tabelle 5-7). Die Nullhypothese H_{0.2} musste als gegeben angesehen werden. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass an diesen Editingstellen keine Funktionsanalogie zwischen M1M3N2C2, M1M3N3C3 und M1M3N4C4 und MORF3 vorliegt. Die Komplementation des Editingdefektes geht wahrscheinlich auf die MORF1-basierten Sequenzareale innerhalb der Chimären zurück.

Eine weitere Editingstelle, die sowohl in der Mutante morf1-1, als auch in morf8/rip1 verminderte Editingeffizienzen aufweist, ist cox3-257 (Takenaka et al., 2012, Bentolila et *al.*, 2012). Das PPR-Protein, welches an das *cis*-Element von *cox3*-257 bindet ist bekannt. Es handelt sich dabei um MEF21 (At2g20540, Takenaka et al., 2010). Die PLS-Domäne von MEF21 wird durch eine E+-Domäne terminiert. Dementsprechend überrascht es nicht, dass durch die Transformation mit M1M3N2C2, M1M3N3C3 und M1M3N4C4 der Editingdefekt in morf1-1 komplementiert werden konnten (Tabelle 4). Durch die Transformation mit dem Transgen MORF1 wird eine Editingeffizienz von 96,7 % erzeugt. Die Komplementation mit den Chimären führt in allen Fällen zu einer Editingeffizienz von \sim 94 %. Die Auswertung mittels des T-Testes entsprechend des dritten Kriteriums belegte, das die besagten Werte nicht signifikant voneinander abwichen. Demgegenüber konnte im Vergleich der Editingeffizienzen, welche im Anschluss an die Transformation mit MORF3 oder den M1M3-Chimären ermittelt wurden, signifikante Unterschiede festgestellt werden. Die unter dem Einfluss von MORF3 ermittelte Editingeffizienz betrug 51,8 %. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass die Bildung eines funktionellen Editosoms, unter der Beteiligung der MORF1-MORF3-Chimären, nicht durch den MORF3-basierten Sequenzabschnitt vermittelt wird. Diese Fähigkeit muss demzufolge durch den MORF1-kodierten Part vermittelt werden. Die Editingeffizienz von 94 % erhöht sich durch die Verlängerung des MORF1-basierten N-Terminus nicht. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass der N-Terminus, inklusive der konservierten Motive 2 und 3 in M1M3N2C2 ausreichen, um diese MORF1-ähnliche Funktion hervor zu rufen. An dieser Editingstelle liegt die zuvor beschriebene Hypothese erfüllt vor. Der fehlende MORF1basierte C-Terminus hat keinen Einfluss auf die Fähigkeit der M1M3-Chimären mit PPR-Proteinen der E-Klasse zu interagieren. Die Bildung eines funktionsfähigen Editingkomplexes wird, durch das Fehlen des verlängerten C-Terminus, nicht beeinträchtigt.

An dem Cytidin an Position 1807 im Transkript *matR* kann, durch die Transformation mit M1M3N2C2, M1M3N3C3 und M1M3N4C4, Editing erzeugt werden. An der Editierung dieser Stelle sind MORF1 und MORF8 beteiligt (Takenaka *et al.*, 2012, Bentolila *et al.*, 2012). Das *cis*-Element von *matR*-1807 wird spezifisch von dem PPR-Protein MEF48 erkannt (At4g31070, unpublizierte Daten Franziska Glass). Dieser

Editingfaktor gehört der E2-Untergruppe der PLS-Proteine an. Diese Editingstelle wird in Columbia zu 90 % editiert. In der Mutante *morf1-1* werde 30 % der Cytidine an dieser Position modifiziert. Im Anschluss an die Transformation der Mutante mit dem Transgen *MORF1* wurde eine Editingeffizienz von 92,9 % ermittelt. Demgegenüber erhöhte die Expression von MORF3 die resultierende Editingeffizienz nicht ($\varepsilon_{morf1-1:MORF3}$: 12,5). Diese Editingstelle wurde nach der Komplementation von morf1-1 mit M1M3N2C2, M1M3N3C3 und M1M3N4C4 zwischen 80,9 % und 92,8 % editiert (ε_{morf1} -1:M1M3N2C2: 89,8; εmorf1-1:M1m3N3C3: 92,8; εmorf1-1:M1M3N4C4: 80,9). Diese Editinglevel wichen signifikant von den Editingeffizienzen ab, welche unter der Beteiligung von MORF3 ermittelt wurden. Es besteht dementsprechend keine funktionelle Analogie zwischen MORF3 und den MORF1-MORF3-Chimären. Da die ermittelten Werte nicht signifikant von den 92,9 % abweichen, welche unter der Beteiligung von MORF1 detektiert wurden, kann geschlussfolgert werden, dass die Komplementationsfähigkeit der Chimären auf den MORF1-kodierten Sequenzbereich zurück zu führen ist. Die Hypothese, dass die Bildung eines funktionalen Editosoms unter der Beteiligung von M1M3-Chimären und E-Klasse PPR-Proteinen nicht von dem Vorhandensein des langen MORF1-C-Terminus abhängig ist, liegt erfüllt vor. Eine MORF1-ähnliche Funktion liegt bereits ab dem kürzesten MORF1-kodierten N-Terminus in M1M3N2C2 vor.

An der Editierung der Stellen *atp4*-138 und *ccb206*-566 ist MORF8 nicht beteiligt (Bentolila *et al.*, 2012). Mit Ausnahme von MORF1 konnten bisher kein weiterer Faktor determiniert werden, welcher einen Effekt auf die Editingeffizienz dieser Stelle hätten (Takenaka *et al.*, 2012, Bentolila *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2015; 2016). Die Zuordnung der E-Domänen enthaltenden PPR-Proteine bleibt jedoch eindeutig. Der kürzeste hier betrachtete N-Terminus von MORF1 reicht bereits aus, um den Editing an den Stellen *atp4*-138 und *ccb206*-566 zu komplementieren. Dieses Interaktionsmuster ändert sich, in Folge der Transformation mit den anderen beiden Chimären, M1M3N3C3 und M1M3N4C4, nicht. Das Muster ist diesbezüglich kongruent zu dem, unter dem Einfluss von MORF1 und MORF8, beobachteten Interaktionsverhalten.

Das Gen At5g08310 kodiert für das PPR-Protein MEF37, welches als Interaktionspartner des *cis*-Elementes der Editingstelle *atp4*-138 agiert (unpublizierte Daten, zur Verfügung gestellt von Dr. Mizuki Takenaka). Die repetitiv angeordneten PLS-Motive werden in diesem Protein durch eine E+-Domäne terminiert. Auf die Funktionsanalogie der Chimären wurde zuvor bereits eingegangen. Diese Betrachtung wird an dieser Stelle nicht wiederholt. Es kann festgehalten werden, dass die Hypothese welche bezüglich des Transkriptes rps3 aufgestellt wurde, ebenfalls für Editingkomplexe gilt, welche unter der Beteiligung von E-Klasse PLS-Protein MEF37 und M1M3N2C2, M1M3N3C3 und M1M3N4C4 assembliert werden.

An der Editierung von *ccb206*-566 ist MEF19, ein PPR-Protein der E2-Untergruppe, beteiligt (At3g05240, Takenaka *et al.*, 2010). Wie bereits erwähnt, wurde bis heute keine Beteiligung weiterer MORF-Proteine, als At4g20020 (MORF1), an der Editierung dieser Stelle nachgewiesen (Takenaka *et al.*, 2012, Bentolila *et al.*, 2012). Das Editinglevel,

welches durch die Transformation mit MORF1 erzeugt werden konnte ($\varepsilon_{morf1-1:MORF1}$: 85,9), konnte ebenfalls durch die Expression der drei Chimären in *morf1-1* hervorgerufen werden ($\varepsilon_{morf1-1:M1M3N2C2}$: 83,3; $\varepsilon_{morf1-1:M1M3N3C3}$: 90; $\varepsilon_{morf1-1:M1M3N4C4}$: 91,6). Entsprechend der statistischen Analyse galt die Alternativhypothese H_{1.2} als erfüllt. Die Werte wichen nicht signifikant voneinander abwichen. Gleichzeitig konnte ein signifikanter Unterschied zu der Editingeffizienz nachgewiesen werden, welche durch die Transformation mit MORF3 hervorgerufen wurden. Dieser Wert betrug 55,5 %. Innerhalb dieses Vergleiches konnte die Nullhypothese H_{0.2} als wahr angesehen werden. Die MORF1-basierten Bereiche sind wahrscheinlich für die Wiederherstellung der Editingeffizienz an dieser Stelle verantwortlich.

Die Fähigkeit zur Komplementation des Editingdefektes durch den N-terminalen MORF1-Part ist charakteristisch für die Interaktion von E2- bzw. E+-Domänen beinhaltenden PPR-Proteinen, in Kombination mit MORF1 und MORF8. In diesem Zusammenhang konnte belegt werden, dass die zuvor aufgestellten Thesen ebenfalls auf Editingstellen zutrifft, die nicht durch MORF8 betroffen werden.

Das für *rps3* beschriebene Interaktionsmuster liegt ebenfalls für die Stelle *nad7*-795 erfüllt vor. Durch die Beteiligung von M1M3N4C4 im Editosom konnte an dieser Stelle kein Editing erzeugt werden. MORF1 und MORF8 sind an der Bildung des Editosoms an *nad7*-795 beteiligt (Takenaka *et al.,* 2012; Bentolila *et al.,* 2012). Die Stelle wird von MEF23 (At2g33760, unpublizierte Daten, zur Verfügung gestellt von Dr. Mizuki Takenaka) erkannt, welches der DYW-Unterklasse der PPR-Proteine angehört.

Nach der Transformation von *morf1-1* mit M1M3N4C4, konnte eine gemittelte Editingeffizienz von 39,1 % gemessen werden. Der Referenzwert im Wildtyp Columbia beträgt 70 %, während das entsprechende Transkript in *morf1-1* zu 30 % editiert wird (Takenaka *et al.*, 2012). In Folge der Komplementation mit MORF1 konnte eine Editingeffizienz von 74,6 % erzeugt werden. Demzufolge wurde das Wildtyplevel erreicht. Es ist leicht ersichtlich, dass der unter dem Einfluss der Expression von *M1M3N4C4* ermittelte Wert von 39,1 % nicht der Editingeffizienz entspricht, welche durch die Transformation mit MORF1 erzeugt werden konnte. Demzufolge sind alle vier konservierten Motive innerhalb der MORF-Box von M1M3N4C4 nicht in der Lage, eine MORF1-ähnliche Funktion hervor zu rufen. Diese Infunktionalität könnte in diesem Fall ebenfalls, auf einer gestörten Formierung des Editosoms, unter Beteiligung eines DYW-Typ PPR-Protein (MEF23) und dem verkürzten MORF1-C-Terminus beruhen.

An der Editierung dieser Stelle ist ein weiterer *trans*-Faktor beteiligt. Es handelt sich dabei um ORRM2, welches zu den RRM-beinhaltenden Proteinen gehört (RRM: *RNA Recognition Motif*). Eine Interaktion von ORRM2 mit MORF8, MORF3 und MEF1, welches ebenfalls zu der DYW-Untergruppe gehört, konnte *in vivo* nicht beobachtet werden. Die Dimerisierung von ORRM2 mit MORF1 wurde nicht untersucht. Interaktionen zwischen ORRM- und PPR-Proteinen werden üblicherweise über die RIP-RIP-Domäne vermittelt. Diese ist in der Sequenz von ORRM2 nicht enthalten (Sun *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2015). Eine Interaktion mit MEF23 ist demzufolge unwahrscheinlich. M3M1N4C4 führt in Kombination mit MEF23 nicht zu einer Bildung des funktionalen Editosoms. Von einem

stabilisierenden Effekt durch ORRM2 in der Interaktion mit allen konservierten Motiven aus MORF1 kann dementsprechend nicht ausgegangen werden. Die Chimären M1M3N2C2 und M1M3N3C3 beinhalten ihrerseits einen größeren Sequenzbereich des Proteins MORF3, mit dem ORRM2 nicht interagiert (Shi *et al.*, 2015). Folglich findet sowohl über die MORF1- als auch über die MORF3- basierten Sequenzen keine Interaktion zwischen den Chimären und ORRM2 statt. Auf einen stabilisierenden Einfluss durch ORRM2 auf die Interaktion von M1M3N2C2, M1M3N3C3 und der DYW-Domäne ist demnach nicht zu schließen.

Zu Beginn dieser Analyse wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Verhältnis von editierten- zu uneditierten Cytidinen, nach der Transformation mit den verschiedenen Chimären, auf der Abhängigkeit der Bildung des Editosoms vom verlängerten MORF1-C-Terminus oder der spezifischen Notwendigkeit bestimmter konservierter Motive beruht. Als Resultat dieser Auswertung kann vermutet werden, dass das Fehlen des verlängerten, MORF1-basierte C-Terminus in den M1M3-Chimären einen spezifischen Effekt auf die Wiederherstellung der Editingeffizienz in morf1-1 ausübt. Wobei sich dieser Effekt ausschließlich auf die Interaktion mit PPR-Proteine der DYW-Untergruppe bezieht. Die Beteiligung der MORF-Proteine an der Ausrichtung der Deaminase hin zur Editingstelle, so wie sie durch Takenaka (2014) bereits angedeutet wurde, könnte für Editingkomplexe die unter der Beteiligung von MORF1, MORF8 und DYW-beinhaltenden PPR-Proteinen zutreffen. Es ist denkbar, dass die verlängerten C-Termini der beiden MORF-Proteine diese spezifische Funktionsweise vermitteln.

Die Beobachtung, die bezüglich der Chimären in Kombination mit E-Domänen beinhaltenden PPR-Proteinen gemacht wurde, weist ebenfalls hohe innere Kongruenz auf. Es konnte belegt werden, dass zur Wiederherstellung des Editing an den Stellen, deren *cis*-Elemente von E-Klasse PPR-Proteinen erkannt werden, meist bereits der kürzeste N-Terminale Part von MORF1 (M1M3N2C2) ausreichte. Dieser Effekt war sowohl an Editingstellen die nur von MORF1, als auch von MORF1 und MORF8 betroffen werden, zu beobachten. Die Funktion die MORF1 in einem Editosom ausübt, welches ein E-Klasse PPR-Protein beinhaltet, würde laut dieser Analyse nicht von dem C-Terminus nach der MORF-Box beeinflusst werden.

4.2.3 Motiv 1 ist an der Determinierung der Interaktionspartner von MORF-Proteinen beteilig

Dieser Teil der Diskussion befasst sich mit den M3M1-Chimären. Wie durch die Nomenklatur angedeutet wird, basieren die N-terminalen Sequenzen der chimären Konstrukte auf MORF3. Der C-Terminus wurde aus *MORF1* generiert.

Um zwischen dem Effekt von Motiv1 und Motiv 4 unterscheiden zu können, wurde ein weiterer Übergangspunkt zwischen den Sequenzen deklariert. Der Schnittpunkt befindet sich zwischen Motiv 1 (MORF1: 81-95; MORF3: 88-102) und Motiv 4 (MORF1: 108-122; MORF3: 113-127). Die zweiten und dritten Übergangspunkte zwischen *MORF3*- bzw. *MORF1*-kodierten Sequenzen entsprachen denen in M1M3N2C2 und

M1M3N3C3. Auf die Auswertung des Effektes von M3M1N4C4 in *morf1-1* wurde, aufgrund der unter M3N1N3C3 zu beobachtenden Tendenz zur nicht stattfindenden Komplementation des Editingdefektes in *morf1-1*, verzichtet.

Die Auswertung der Editingeffizienzen unter dem Einfluss von M3M1N1C1 ergab, dass es bei 82 % der Cytidine nicht zu einer Wiederherstellung eines geeignet hohen Editingniveaus kam. An diesen Stellen wurde der N-Terminus des Editingfaktors MORF1 durch Sequenzen des Proteins MORF3 ersetzbar. Wie bereits unter 4.2.2. beschrieben, gehören die zu den Editingstellen korrespondierenden PPR-Proteinen den verschiedensten Unterklassen bezüglich ihrer C-terminalen Extension an. Es war nicht erkenntlich, dass sich die fehlende Komplementationsfähigkeit aus der Interaktion mit den PPR-Proteinen ableitete. Da außer den bereits aufgeführten MORF-Proteinen, mit Ausnahme von *nad7*-795, keine weiteren editosombildenden Proteine bekannt sind, die am Editing dieser Stelle beteiligt wären, ist folgendes anzunehmen (Takenaka *et al.*, 2012; Bentolila *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2015):

Da sich keine weiteren konservierten Sequenzen im N-Terminus befinden ist davon auszugehen, dass Motiv 1 einen elementaren Einfluss auf Dimerisierung von MORF-Proteinen ausübt.

Motiv 1 determiniert, mit welchem Protein MORF1 interagiert. MORF3 kann MORF1 an diesen Stellen nicht ersetzen. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich das Editosom an diesen Stellen nicht korrekt bildet.

An der Editierung der Stelle *nad7*-795 ist neben MORF1 und MORF8 zusätzlich ORRM2 beteiligt. Die Transfektion von *morf1-1* mit den Chimären M3M1N1C1, M3M1N2C2, M3M1N3C3 führte nicht zu einer Widerherstellung eines geeignet hohen Editinglevels (μ_{Col} : 70; $\bar{X} \varepsilon_{M3M1N1C1}$: 16; $\bar{X} \varepsilon_{M3M1N2C2}$: 19; $\bar{X} \varepsilon_{M3M1N3C3}$: 30). Diese Editingstelle ist Teil der 82 % uneditierten Cytidine, von denen angenommen wird, dass die Formierung eines funktionellen Editosoms nicht stattfindet. Mitochondriale ORRM-Proteine interagieren nicht mit PPR-Proteinen. Sie sind auf die vermittelnde Rolle von MORF-Proteinen angewiesen, die den Kontakt zu den beteiligten PLS-Proteinen herstellen (Shi *et al.*, 2015, 2016). Da dieser Erstkontakt durch den MORF3-basiereten N-Terminus der Chimären nicht vermittelt werden kann, wird davon ausgegangen dass ORRM2 keinen Einfluss auf die hier gemessenen Ergebnisse hat.

Nichts desto weniger gibt es Stellen, die im Zuge der Transformation mit M3M1N1C1 deaminiert werden. Dabei handelte es sich um *ccb206*-80, *nad2*-995, *orfX*-409, *orfX*-412 und *rps3*-603. Der Editingdefekt konnte an allen genannten Stellen auch durch die Transformation mit MORF3 in *morf1-1* komplementiert werden. Der vergleichende T-Test der ermittelten Editingeffizienzen unter der Überexpression von M1M3N1C1 und MORF3 offenbarte Folgendes. Die Normalverteilungen der Editingeffizienzen weisen eine Überschneidung von ~ 35-99 % auf. Dieser hohe Grad an Ähnlichkeit konnte im Vergleich mit MORF1 nicht beobachtet werden. Hier überschnitten sich die Graphen der M3M1N1C1-Ergebnisse, mit denen unter dem Einfluss von MORF1 erhobenen Daten zu

 \sim 7-58 %. Dementsprechend kann von einer höheren funktionellen Analogie zwischen MORF3 und M3M1N1C1 ausgegangen werden.

Da der Aminosäuresequenzbereich 46-104 (MORF3) die einzige Schnittmenge zwischen MORF3 und M3M1N1C1 darstellt, ist anzunehmen, dass diese Funktionsanalogie auf der besagten Sequenz beruht. Das bedeutet, dass die Interaktionspartner im Editosom sowohl Motiv 1 auf Basis von MORF3 tolerieren können, ebenso wie Motiv 1 basierend auf MORF1. So erklärt sich der Effekt, dass die Überexpression von MORF3 in einer MORF1-Mutante zur Komplementation des Editingdefektes führt (Tabelle 3).

Das MORF3 die Funktion von MORF1 ersetzen kann, weist darauf hin, dass der verlängerte MORF1-C-Terminus an diesen Stellen nicht für die Bildung eines funktionellen Editosoms benötigt wird. Dies konnte innerhalb der vorherigen Analyse (4.2.1.) für die Editingstellen *ccb206*-80, *nad2*-995 und *orfX*-409 bestätigt werden. Wie bereits erläutert wurde, ist die Editierung in diesem Fall nicht von dem verlängerten C-Terminus des Proteins MORF1 abhängig. MORF1 und MORF3 können einander an *ccb206*-80, *nad2*-995, *orfX*-409, *orfX*-412 und *rps3*-603 ersetzten. Dementsprechend überrascht es nicht, dass diese Stellen nicht in der MORF3-Mutante nachgewiesen werden konnten (Takenaka *et al.*, 2012).

Demgegenüber stehen orfX-412 und rps3-603. Wie bereits erwähnt wird das cis-Element der Stelle orfX-412 von MEF1 (At5G52630) erkannt. Mit Hilfe des von Takenaka et al. (2013) beschriebenen Algorithmus zur Vorhersage von PPR-Proteinen anhand der Nukleotidsequenz der *cis*-Elemente, wurde eine PPR-Protein für *rsp3*-603 determiniert. Dabei handelt es sich um At4g18520. Beide Editingfaktoren gehört zur Unterfamilie der DYW-Domänen besitzenden PLS-Proteine. Die Deaminierung dieser Editingstellen läuft unter Beteiligung der DYW-beinhaltenden PPR-Proteine, MORF1 und MORF8 ab (Zehrmann et al. 2015, Takenaka et al., 2012, Bentolila et al., 2012). Es konnte ganz klar gezeigt werden, dass die Verkürzung des C-Terminus von MORF1 an dieser Editingstelle, nicht zur Wiederherstellung der Editingeffizienz führt. Die Interaktion der beiden Cterminal verlängerten Proteine MORF1 und MORF8 ist elementar, um die DYW-Domäne richtig zu positionieren. Der Fakt, dass durch die Überexpression von MORF3, Editing wieder hergestellt werden kann, bedingt, dass mehr als zwei MORF-Proteine an der Bildung des Editosoms beteiligt sein müssen. Im Minimalfall MORF1 und MORF8 als funktionelle Einheit und ein weiteres MORF1, welches nicht an der Ausrichtung der DYW-Domäne beteiligt ist und dementsprechend auch durch kurze MORF-Proteine, wie MORF3, ersetzt werden kann.

Im Vergleich zwischen M3M1N1C1 und M3M1N2C2, hat der Austausch von Motiv 4, durch Sequenzen aus *MORF3*, eine inhibierende Wirkung auf 12 % aller betrachteten Editingstellen. Der Haupteffekt, der Unfähigkeit zur Bildung eines funktionalen Editosoms, bleibt dementsprechend durch das Motiv 1 begründet.

Es zeigt sich im Vergleich der Editingeffizienzen, welche nach der Transformation mit M3M1N1C1 respektive M3M1N2C2 ermittelt wurden, folgendes:

Die Funktionsanalogie zu MORF3 nimmt ab. Dies führt an *nad2*-995, *orfX*-409 und *orfX*-412 zu einer Verminderung der Editingeffizienz. Die Folge war, dass Kriterium 2 (Herstellung einer geeignet hohen Editingeffizienz) nicht mehr erfüllt vorlag (Tabelle 8). Auf die Editierung der Stelle *rps3*-603 und *rps4*-524 hat der Austausch des Motives 4 einen vernachlässigbar kleinen Effekt (*rps3*-603: $\bar{X} \varepsilon_{M3M1N1C1}$: 95; $\bar{X} \varepsilon_{M3M1N2C2}$: 94; *rps4*-524: $\bar{X} \varepsilon_{M3M1N1C1}$: 90; $\bar{X} \varepsilon_{M3M1N2C2}$: 91). Dieser geringe Effekt basiert auf einem Mischverhalten der Chimäre M3M1N2C2, deren Editingeffizienz zwischen den ermittelten Werten von MORF1 und MORF3 einzuordnen ist.

Durch den Austausch von Motiv 3 (M3M1N3C3) bricht die Fähigkeit zur Komplementation an allen untersuchten Stellen, mit Ausnahme von *orfX*-377 und *orfX*-409, ein. An 96 % der Editingstellen wird der Editingdefekt in *morf1-1*, durch die Transformation mit M3M1N3C3, nicht ausgeglichen. Dies könnte auf den unter 3.2.1.1. beobachteten Effekt zurückgehen, der die notwendige Anwesenheit des Motives 3 für eine stabile Interaktion unter Abwesenheit des C-Terminus von MORF1 umreißt. Ein Effekt, der beispielsweise ebenfalls unter der Transformation mit M1M3N3C3 zu beobachten war (3.2.2.).

Das Editosom an Stelle *orfX*-409 kann sowohl durch die Transformation mit MORF1, MORF3, MORF8 und allen drei M3M1-Chimären gebildet werden. Dies weist auf keinerlei Präferenz in der Interaktion der MORF-Proteine untereinander und mit dem korrespondierenden E-Klasse PLS-Protein (MEF41) hin. Die letztere Feststellung geht aus den unter 4.2.2. geschilderten Sachverhalten hervor. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Kombination von MORF-Proteinen innerhalb des Editosoms variabel ist, das mehr als zwei MORF-Proteine an diesem Komplex beteiligt sein können und das durch die Austauschbarkeit der MORF-Proteine untereinander die Anzahl der von MORF3 betroffenen Editingstellen unterschätzt werden kann.

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass der Austausch des MORF1basierten Motiv 1, durch die analogen Sequenzabschnitte aus MORF3, elementaren Einfluss auf die Formierung des Editosoms hat. Dieses Motiv besitzt eine deterministische Funktion bezüglich der Auswahl möglicher Interaktionspartner für MORF1.

Diejenigen Editingstellen, an denen durch die Transformation mit den M3M1-Chimären, Editing hergestellt werden konnte, wurden zumeist auch in Folge der Überexpression von MORF3 und MORF8 editiert. Dies spricht für eine gewisse Tendenz zur Austauschbarkeit der MORF-Proteine innerhalb des Editosoms. Aufgrund dessen, das sich die MORF-Proteine nicht in den Editosomen aller Editingstellen ersetzen können, scheint die variable Zusammensetzung des Editingkomplexes abhängig von den beteiligten *trans*-Faktoren zu sein.

4.2.4 Ausblick

Seit der Entdeckung der MORF-Proteine stellt sich die Frage nach ihrer konkreten Funktion im RNA-Editing. Die im Anschluss an diese Auswertung zu vermutende Beteiligung des C-Terminus von MORF1 an der Positionierung der DYW-Domäne, sowie die deterministische Funktion der N-terminalen Motive der MORF-Box, in Bezug auf die Interaktionsfähigkeit mit weiteren editosombildenden Proteinen, stellen Hinweise auf die Funktion der MORF-Proteine dar.

Natürlich muss mit Hilfe von Pulldown-, Yeast Two-Hybrid- oder BiFC-Analysen, die eingeschränkte Dimerisierungsfähigkeit der MORF- bzw. PPR-Proteine nachgewiesen werden, welche dieser funktionellen Beeinträchtigung vermutlich zugrunde liegt. Des Weiteren ist immer noch unklar, welche Beteiligung die MORF-Proteine an der Vermittlung der Interaktion zwischen E-Domänen beinhaltenden PPR-Proteinen und einem potentiellen DYW-Domänen-Donor haben. Klar geworden ist, dass für die Wiederherstellung der Editierungsfähigkeit in der Mutante zumeist die ersten beiden Nterminalen Motive von MORF1 ausreichen. Da das Editinglevel durch die Komplementation mit den Chimären signifikant gestiegen ist, muss es zu einer Rekrutierung der DYW-Domäne gekommen sein. Aufgrund der erhobenen Ergebnisse kommen für diese Bindung der DYW-Donoren in Mitochondrien nur die längeren MORF-Proteine MORF1, MORF4 und MORF8 in Frage. Zunächst müsste die Interaktion des C-Terminus mit der DYW-Domäne und verschiedener Teile der assoziierten E-Domäne, beispielsweise über CoIP-Experimente, belegt werden. Der Nachweis der spezifischen Interaktion zwischen den MORF-Proteinen in planta wurde bereits getätigt (Zehrmann et al., 2015). Die funktionelle Analyse in Arabidopsis thaliana wäre nur über MORF-Doppelmutanten möglich. Da T-DNA-Insertionslinien, aufgrund der hohen Anzahl betroffener Editingstellen, häufig zu embryoletalen Effekten führen, dürfte die Expression der MORF-Proteine nicht komplett inhibiert werden. Eine Untersuchung von EMS-Linien und Mutanten in denen die Expression beispielsweise durch artifiziellemiRNA reduziert wurde, wäre sinnvoll.

5 Zusammenfassung

Durch den Prozess des RNA-Editing werden in mitochondrialen Transkripten der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* 400-600 Cytidine zu Uridinen umgewandelt. Möglich wird diese Veränderung der RNA-Sequenz durch einen Proteinkomplex, der sich aus verschiedenen Editingfaktoren zusammensetzt. Zwei Hauptinteraktionspartner stellen dabei die PPR-Proteine (PPR: *Pentatricopeptide Repeat*) und die MORF-Proteine (MORF: *Multiple Organellar RNA Editing Factor*) dar.

Es war bereits bekannt, dass das PPR-Protein MEF13 am Editing der betreffenden Cytidine in den Transkripten *ccb452*-50, *cox3*-314, *nad2*-59, *nad4*-158, *nad5*-1665, *nad5*-1916 und *nad7*-213 beteiligt ist. Durch die Analyse der EMS-Linie *mef13-1* konnte bewiesen werden, dass dieser Editingfaktor ebenfalls an der Modifikation der Editingstelle *ccb452*-415 teilhat. Im Vergleich zum Wildtyp Columbia wies die Mutante *mef13-1* ein verlangsamtes Wachstum auf. Dieser Makrophänotyp konnte durch die Transformation von *mef13-1* mit dem Transgen MEF13 aufgehoben werden. Alle genannten Editingstellen weisen ebenfalls verminderte Editingeffizienzen in den Mutationslinien *morf3/rip3* und *morf8/rip1* auf. Mittels einer *Yeast Three-Hybrid*-Analyse konnte belegt werden, dass die zusätzliche Expression des Proteins MORF8 einen stabilisierenden Effekt auf die Interaktion von MORF3 und MEF13 ausübt. Diese Stabilisierung konnte nicht durch die Expression des Editingfaktors MORF1 beobachtet werden. Dies weist auf eine funktionelle Einheit des PPR-Proteins MEF13 mit einem MORF3-MORF8-Heteromer hin.

Alle MORF-Proteine beinhalten einen ca. 100 Aminosäuren umfassenden konservierten Bereich, der als MORF-Box bezeichnet wird. Dieses Areal kann wiederum in vier Sequenzmotive unterteilt werden, welche innerhalb dieser Proteinfamilie, bezüglich ihrer Position und Aminosäureausstattung, leicht variieren. Jedes dieser konservierten Motive stellt ein potentielles Interaktionsareal für die Bildung von Homo- und Heteromeren mit weiteren Editingfaktoren dar.

Mittels einer *Yeast Two-Hybrid*-Analyse wurde untersucht, ob verschiedene Deletionskonstrukte des *trans*-Faktors MORF1 zur Bildung von Homo- respektive Heteromeren fähig waren. Hierbei konnte belegt werden, dass die Interaktion zwischen MORF1 und MORF3 hauptsächlich über die konservierten Motive 2 und 3 vermittelt wird. Diese beiden Motive befinden sich in der C-terminalen Hälfte der MORF-Box.

In der EMS-Linie *morf1-1* wurde untersucht, ob chimäre Konstrukte aus MORF1 und MORF3 in der Lage waren, Editing an den betroffenen Cytidinen wieder herzustellen. Zu diesem Zweck wurden die Chimären als Transgene in *morf1-1* exprimiert. Die cDNA verschiedener Transkripte wurde auf die Effizienz des C-zu-U-Editing hin überprüft. Die Positionen der Verbindungsstellen zwischen den MORF1- bzw. MORF3-basierten Sequenzen der chimäre Konstrukte wurden so gewählt, dass jeweils mindestens eines der konservierten Motive, zwischen den schlussendlich exprimierten Proteinen, ausgetauscht wurde. Mit wenigen Ausnahmen konnte gezeigt werden, dass Chimären deren N-Terminus MORF3-basiert war, nicht in der Lage sind, den Editingdefekt in

morf1-1 auszugleichen. Es wurden ebenfalls Chimären hergestellt, deren Termini in umgekehrter Orientierung angeordnet waren. Folglich basierten die N-terminalen Sequenzen auf MORF1 und der C-Terminus war MORF3-kodiert. Diese chimären Konstrukte waren größtenteils in der Lage, den Editingdefekt in *morf1-1* auszugleichen. Ein Vergleich mit bekannten Editingfaktoren belegte, dass die Wiederherstellung einer geeignet hohen Editingeffizienz an Stellen auftrat, deren *cis*-Elemente von PPR-Proteinen der E-Unterklasse erkannt werden. Demgegenüber waren Vertreter dieser Chimären nicht in der Lage Editing an Stellen zu erzeugen, die von PPR-Proteinen der DYW-Untergruppe erkannt werden.

6 Summary

RNA editing is a process altering the mitochondrial transcripts by changing 400-600 cytidines to uridines in the model plant *Arabidopsis thaliana*. This change of the mRNA sequence is possible due to a protein complex, composed of different RNA editing *trans* factors. The two main interaction partners are the PPR proteins (PPR: pentratricopeptide repeat) and the MORF proteins (MORF: multiple organellar RNA editing factor).

It is known, that the PPR protein MEF13 is involved in the editing of specific cytidines in the transcripts *ccb452*-50, *cox3*-314, *nad2*-59, *nad4*-158, *nad5*-1665, *nad5*-1916 und *nad7*-213. Analysis of the EMS mutant line *mef13-1* showed, that MEF13 is also involved in the editing of the site *ccb452*-415. Compared to the wildtype Columbia the mutant plants showed slowed growth. The wildtype phenotype could be restored by transformation of MEF13 into the *mef13-1* mutants. All the editing sites mentioned showed also reduced editing in the mutant lines *morf3/rip3* and *morf8/rip1*. Using an *yeast three hybrid* assay it could be shown, that MORF8 is able to exert the interaction between MORF3 and MEF13. This stabilising effect was not observed in the presence of MORF1. This indicates that there is a functional unit of the PPR protein MEF13 with a MORF3-MORF8 heterodimer.

All MORF proteins contain a conserved 100 amino acid region, which is called MORF box. This region can be subdivided into four sequence motives, which slightly vary in view of their amino acid composition. Each of these conserved motives represents a potential interaction surface for the creation of homo- and heterodimers with further editing factors.

Using *yeast two hybrid* analysis it was investigated, whether different deletion constructs of MORF1 are able to create homo- or heterodimers. It was shown, that interaction between MORF1 and MORF3 mainly happens with the motive 2 and 3. Both motives are located in the C-terminal part of the MORF box.

Furthermore the ability of chimeric MORF1-MORF3 constructs to restore editing in the EMS mutant line *morf1-1* was analysed by expression of the chimeric protein in the mutant. The positions of the juncture between the MORF1 and MORF3 sequence was selected so that in each chimeric protein at least one of the conserved motives was exchanged. With a few exceptions it could be shown, those chimeras with a MORF3 N-terminus were not able to restore editing in the *morf1-1* mutant. Chimeric proteins with a MORF1 N-terminus and MORF3 C-terminus however were for the most part able to complement the editing in the mutant. This editing restoration occurred at editing sites which are recognized by PPR proteins of the E subclass whereas editing sites whose *cis* elements are recognized by DYW subclass PPR proteins could not be complemented by the chimeric proteins. This leads to the conclusion, that the MORF proteins are an essential part of the editing complex at editing sites recognized by E class PPR proteins.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Schematische Darstellung der verschiedenen Vertreter der PPR-Proteine	. 7
Abbildung 2. Berechnung der Editingeffizienz 2	25
Abbildung 3. MORF Proteine enthalten vier konservierte Aminosäuremotive	30
Abbildung 4. Makrophänotypisierung der Ovulare von morf1-2	31
Abbildung 5. Bestimmung des Mikrophänotypes heterozygoter morf1-2 Pflanzen	32
Abbildung 6. Erhöhte Expression des Proteins MORF1 in fertilisierbaren Blüten	33
Abbildung 7. Exonstruktur von MORF1	34
Abbildung 8. Schematische Darstellung der Kontrollkonstrukte für die Transformation in morf1	1-
1	35
Abbildung 9. Überprüfung der Komplementationsfähigkeit verschiedener mitochondrialer	
MORF Proteine in <i>morf1-1</i> in den Transkripten von atp4 bis cox3	36
Abbildung 10. Überprüfung der Komplementationsfähigkeit verschiedener mitochondrialer	
MORF Proteine in <i>morf1-1</i> in den Transkripten von matR bis rps4	37
Abbildung 11. Überprüfung der Komplementationsfähigkeit des plastidären Proteins MORF2 in marf1 1	1
Abbildung 12 Editingstellen die durch die Transformation mit 255. MODES in marf1 1	50
Abbildung 12. Eultingstellen die durch die Transformation mit 555.:MORF6 in <i>morj1-1</i>	12
Abbildung 12. Schemetische Deretellung der Konstrukte für die Transformetion in S. sereuisige	+2
DIGO 4 A	12
Abbildung 14. Interaktionsanalyse zwischen den MORE1-Deletionskonstrukten MORE1 und	+J
MORF3	15
Abhildung 15 Interaktionsanalyse der MORF1-Deletionskonstrukten	47
Abhildung 16. Schematische Darstellung der chimären MORF1-MORF3-Konstrukte Abgehildet	.,
sind die beiden Proteine, aus deren Sequenzen sich die Chimären zusammensetzten. Es handelt	t
sich um MORF1 und MORF3.	49
Abbildung 17. Überprüfung der Komplementationsfähigkeit verschiedener MORF1-MORF3-	
Chimären in <i>morf1-1</i> in den Transkripten von <i>atp4</i> bis <i>rps4</i> 5	50
Abbildung 18. Übersicht der statistischen Analyse der Komplementationsfähigkeit von	
M1M3N2C2 in <i>morf1-1</i> entsprechend der Kriterien 1 und 2.	53
Abbildung 19. Approximative Funktionsanalogie zwischen MORF1 und M1M3N2C2	56
Abbildung 20. Der Austausch der konservierten Motive 2 und 3 und des C-Terminus in	
M1M3N2C2 hat einen spezifischen Effekt auf die Fähigkeit dieser Chimäre Editing an <i>atp4</i> -138	
und <i>orfX</i> -474 zu rekonstruieren.	57
Abbildung 21. Übersicht der statistischen Analyse der Komplementationsfähigkeit von	
M1M3N3C3 in <i>morf1-1</i> entsprechend der Kriterien 1 und 2	58
Abbildung 22. Funktionsanalogie zwischen MORF1 und M1M3N3C36	60
Abbildung 23. Die C-terminale Modifikation von M1M3N3C3 führt zu signifikant	
unterschiedlichen Editingeffizienzen im Vergleich mit MORF1 und MORF36	61
Abbildung 24. Übersicht der statistischen Analyse der Komplementationsfähigkeit von	
M1M3N4C4 in <i>morf1-1</i> entsprechend der Kriterien 1 und 26	51
Abbildung 25. Funktionsanalogie zwischen MORF1 und M1M3N4C46	54
Abbildung 26. Schematische Darstellung der MORF3-MORF1 Chimären	56

Abbildung 27. Überprüfung der Komplementationsfähigkeit verschiedener MORF3-MORF1-
Chimären in <i>morf1-1</i> in den Transkripten von atp4 bis rps467
Abbildung 28. Übersicht der statistischen Analyse der Komplementationsfähigkeit von
M3M1N1C1 in <i>morf1-1</i> entsprechend Kriterium 1 und 270
Abbildung 29. Aminosäuresequenz des N-Terminus der Proteine MORF1 und MORF3 inklusive
Motiv 1
Abbildung 30. Funktionsanalogie zwischen MORF3 und M3M1N1C1
Abbildung 31. Die Transformation von <i>morf1-1</i> mit M3M1N1C1 weist funktionelle Analogien zu der Komplementation des Editing durch MORF1 und MORF3 an <i>nad2-</i> 995, <i>orfX</i> -409, <i>orfX</i> -412
und <i>rps3</i> -603 auf
Abbildung 32. Der Austausch des konservierten Motives 1 und des N-Terminus in M3M1N1C1
führt an den Editingstellen <i>nad6</i> -446 und <i>orfX</i> -666 nicht zu einem MORF3-ähnlichen Verhalten
im Editosom
Abbildung 33. Übersicht der statistischen Analyse der Komplementationsfähigkeit von
M3M1N2C2 in <i>morf1-1</i> entsprechend der Kriterien 1 und 2
Abbildung 34. Funktionsanalogie zwischen MORF3 und M3M1N2C2. Die im Anschluss an die
Transformation mit M3M1N1C1 ermittelten Editingeffizienzen der aufgeführten Stellen atp4-
138 – <i>rps3</i> -1470 unterscheiden sich signifikant von den Editingeffizienzen, welche unter dem
Einfluss von MORF1 ermittelt wurden77
Abbildung 35. Der Austausch der konservierten Motive 1 und 4, sowie des N-Terminus in
M3M1N2C2 führt an den Editingstellen <i>ccb206</i> -80 und <i>ccb206</i> -566 zu signifikant abweichenden
Editingeffizienzen im Vergleich zu MORF1 und MORF378
Abbildung 36. Funktionsanalogie zwischen MORF3 und M3M1N3C3
Abbildung 37. Die N-terminale Modifikation von M3M1N3C3 führt zu signifikant
unterschiedlichen Editingeffizienzen im Vergleich mit MORF1 und MORF3
Abbildung 38. Die Transformation von <i>morf1-1</i> mit M3M1N3C3 weist funktionelle Analogien zu
der Komplementation des Editing durch MORF1 und MORF3 an <i>orfX</i> -377, <i>orfX</i> -409, <i>orfX</i> -412
und <i>rps3</i> -603 auf

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Liste der verwendeten Oligonukleotide 1	٤5
Tabelle 2. Übersicht der Hergestellten MORF1-Deletionskonstrukte für die in vivo-	
Interaktionsanalyse in PJ69-4A 1	٤9
Tabelle 3. Komplementationsanalyse der Editingeffizienz zwischen der Mutante morf1-1 und	
der mit den Transgenen MORF1, MORF2, MORF3 oder MORF8 transformierten Linie morf1-1 4	10
Tabelle 4. Analyse der Komplementationsfähigkeit der chimären Konstrukte M1M3N2C2,	
M1M3N3C3 und M1M3N4C4 in <i>morf1-1</i> 5	51
Tabelle 5. Analyse der Funktionsanalogie der artifiziellen Chimäre M1M3N2C2 in <i>morf1-1</i> im	
Vergleich zu MORF1 und MORF3 5	55
Tabelle 6. Analyse der Funktionsanalogie der artifiziellen Chimäre M1M3N3C3 in <i>morf1-1</i> im	
Vergleich zu MORF1 und MORF3 5	59
Tabelle 7. Analyse der Funktionsanalogie der artifiziellen Chimäre M1M3N4C4 in <i>morf1-1</i> im	
Vergleich zu MORF1 und MORF36	53
Tabelle 8. Analyse der Komplementationsfähigkeit der chimären Konstrukte M3M1N1C1,	
M3M1N2C2 und M3M1N3C3 in <i>morf1-1</i> 6	58
Tabelle 9. Analyse der Funktionsanalogie der artifiziellen Chimäre M3M1N1C1 in <i>morf1-1</i> im	
Vergleich zu MORF1 und MORF37	1/
Tabelle 10. Analyse der Funktionsanalogie der artifiziellen Chimäre M3M1N2C2 in morf1-1 im	
Vergleich zu MORF1 und MORF37	76
Tabelle 11. Analyse der Funktionsanalogie der artifiziellen Chimäre M3M1N3C3 in morf1-1 im	
Vergleich zu MORF1 und MORF3 8	30

9 Literaturverzeichnis

Aubourg S, Boudet N, Kreis M and Lecharny A (2000). In Arabidopsis thaliana, 1% of the genome codes for a novel protein family unique to plants. *Plant Mol. Biol*; 42, 603–613

Barkan A, Rojas M, Fujii S, Yap A, Chong YS, Bond CS, Small I (2012). A combinatorial amino acid code for RNA recognition by pentatricopeptide repeat proteins. *PLoS Genet*; 8, e1002910

Barkan A und Small I (2014). Pentatricopeptide repeat proteins in plants. *Annu Rev Plant Biol*; 65, 415–442

Bartsch K & Tebbe CC (1989). Initial steps in the degradation of phosphinothricin (glufosinate) by soil bacteria. *Appl Environ Microbiol*; 55, 711–716

Bergman L, MacDonald P (*Editor) (2001). Two-Hybrid Systems, Humana Press; ch. 2 vol. 177, 9-14

Bechtold N, Ellis J, and Pelletier G (1993). In planta Agrobacterium-mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants. *Life Sciences*; 316, 1194-1199

Benne R, Van Den Burg J, Brakenhoff JPJ, Sloof P, Van Boom JH, Tromp MC (1986). Major transcript of the frameshifted coxII gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell*; 46, 819 – 826

Bentolila S, Heller WP, Sun T, Babina AM, Friso G, van Wijk KJ, Hanson MR (2012). RIP1, a member of an *Arabidopsis* protein family, interacts with the protein RARE1 and broadly affects RNA editing. *Proceedings* of the National Academy of Sciences of the United States of America; 109(22), E1453–E1461

Bentolila S, Oh J, Hanson MR, Bukowski R (2013). Comprehensive High-Resolution Analysis of the Role of an Arabidopsis Gene Family in RNA Editing. *PLoS Genet*; 9(6); e1003584

Bentolila S, Babina AM, Germain A, Hanson MR (2013b). Quantitative trait locus mapping identifies REME2, a PPR-DYW protein required for editing of specific C targets in Arabidopsis mitochondria. *RNA Biology*; 10(9), 1520-1525

Binder S, Marchfelder A, Brennicke A (1994). RNA editing of tRNAPhe and tRNACys in mitochondria of Oenothera berteriana is initiated in precursor molecules. *Molecular and General Genetics MGG*; 244(1), 67-74

Block MD, Botterman J, Vandewiele M, Dockx J, Thoen C, Gosselé V, Roa Mowa N, Thompson C, Van Montagu M, Leemans J (1987). Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *The EMBO Journal*; 6(9), 2513–2518.

Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U (2009). Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. Science; 326, 1509-1512

Bolle C, Gunnar Huep G, Nils Kleinbölting N, Georg Haberer G, Klaus Mayer K, Dario Leister D, Weisshaar B (2013). GABI-DUPLO: a collection of double mutants to overcome genetic redundancy in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*; 75(1): 157–171

Boussardon C, Salone V, Avon A, Berthome R, Hammani K, Okuda K, Shikanai T, Small I, Lurin C (2012). Two interacting proteins are necessary for the editing of the ndhD-1 site in Arabidopsis plastids. *Plant Cell*; 24, 3684–3694

Boussardon C, Avon A, Kindgren P, Bond CS, Challenor M, Lurin C, Small I (2014). The cytidine deaminase signature HxE(x)n CxxC of DYW1binds zinc and is necessary forRNAediting of ndhD-1. *New Phytol*; 203, 1090–1095
Börner GV, Mörl M, Wissinger B, Brennicke A, Schmelzer C (1995). RNA editing of a group II intron in Oenothera as a prerequisite for splicing. *Molecular & General Genetics*; 246, 739–744

Chateigner-Boutin A-L, Colas des Francs-Small C, Fujii S, Okuda K, Tanz SK, Small I (2013). The E domains of pentatricopeptide repeat proteins from different organelles are not functionally equivalent for RNA editing. *The Plant Journal*; 74, 935–945

Cheng YW, Visomirski-Robic LM and Gott JM (2001). Nontemplated addition of nucleotides to the 3' end of nascent RNA during RNA editing in Physarum. *The EMBO Journal*; 20, 1405 – 1414

Cheng S, Gutmann B, Zhong X, Ye Y, Fisher MF, Bai F, Castleden I, Song Y, Song B, Huang J, Liu X, Xu X, Lim BL, Bond CS, Yiu S-M and Small I (2016). Redefining the structural motifs that determine RNA binding and RNA editing by pentatricopeptide repeat proteins in land plants. *The Plant Journal*; 85, 532–547

Clough SJ und Bent AF (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*; 16, 735-43

Covello PS and Gray MW (1990). Differences in editing at homologous sites in messenger RNAs from angiosperm mitochondria. *Nucl. Acids Res.*; 18, 5189-5196

Covello PS, and Gray MW (1993). On the evolution of RNA editing. Trends Genet.; 9, 265 - 268

Curtis MD and Grossniklaus U (2003). A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta. *Plant Physiology*; vol. 133 (2), 462-469

Deblaere R, Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Research*; 13(13), 4777–4788

Filipovska A, Rackham O. (2012). Modular recognition of nucleic acids by PUF, TALE and PPR proteins. *Molecular Biosystems*; 8(3), 699-708

Forner J und Binder S (2007). The red fluorescent protein eqFP611: application in subcellular localization studies in higher plants. *BMC Plant Biol*; 7, 28

Franco AR, Lopez-Siles FJ, Cardenas J (1996). Resistance to Phosphinothricin (Glufosinate) and Its Utilization as a Nitrogen Source by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl Environ Microbiol* 62, 3834–3839.

Gedvilaite A und Sasnauskas K (1994). Control of the expression of the ADE2 gene of the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Curr Genet;* 25(6), 475-479

Giegé P and Brennicke A (1999). RNA editing in Arabidopsis mitochondria effects 441 C to U changes in open reading frames. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; 96, 15324–15329

Gietz D, St. Jean A, Woods RA, Schiestl RH (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res*; 20, 1425

Glass F, Härtel B, Zehrmann A, Verbitskiy D, Takenaka M (2015). MEF13 Requires MORF3 and MORF8 for RNA Editing at Eight Targets in Mitochondrial mRNAs in Arabidopsis thaliana. *Molecular plant*; 8(10), 1466-1477

Gray MW (2003). Diversity and evolution of mitochondrial RNA editing systems. *IUBMB Life*; 55(4–5),227–233

Gray MW (2009). RNA editing in plant mitochondria: 20 years later. IUBMB Life; 61(12): 1101-1104

Grewe F, Viehoever P, Weisshaar B, Knoop V (2009). A trans-splicing group I intron and tRNAhyperediting in the mitochondrial genome of the lycophyte *Isoetes engelmannii*. *Nucleic Acids Research*; 37(15), 5093–5104

Gualberto JM, Lamattina L, Bonnard G, Weil JH, Grienenberger JM (1989). RNA editing in wheat mitochondria results in the conservation of protein sequences. *Nature*; 341(6243),660–662

Gualberto JM, Weil JH, Grienenberger JM (1990). Editing of the wheat coxIII transcript: evidence for twelve C to U and one U to C conversions and for sequence similarities around editing sites. *Nucleic Acids Research*; 18(13), 3771–3776

Gully BS, Cowieson N, Stanley WA, Shearston K, Small I, Barkan A, Bond CS (2015). The solution structure of the pentatricopeptide repeat protein PPR10 upon binding *atpH* RNA. *Nucleic Acids Research*; 43(3), 1918–1926

Gully BS, Shah KR, Lee M et al. (2015). The design and structural characterization of a synthetic pentatricopeptide repeat protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*; 71, 196–208

Guthrie C und Fink GR (1991). Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods in Enzymology* (Academic Press, San Diego, CA); 194, 1–932

Hammani K, Bonnard G, Bouchoucha A, Gobert A, Pinker F, Salinas T, Giege P (2014). Helical repeats modular proteins are major players for organelle gene expression. *Biochimie*; 100, 141–150

Harrison SJ, Mott EK, Parsley K, Aspinall S, C Gray JC, Cottage A (2006). A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods*; 2, 19

Heslot H und Gaillardin C eds. (1992). Molecular Biology and Genetic Engineering of Yeasts. CRC Press, 245-277

Hiesel R, Wissinger B, Schuster W, Brennicke A (1989). RNA editing in plant mitochondria. Science; 246, 1632 – 1634

Hill J, Donald KA, Griffiths DE (1991). DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. Nucleic Acids ; 19: 5791

Ito H, Fukada Y, Murata K, Kimura A (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol*; 153, 163–168

James P, Halladay J, Craig EA (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient twohybrid selection in yeast. *Genetics*; 144, 1425-1436

Knoop V und Rüdinger M (2010). DYW-type PPR proteins in a heterolobosean protist: plant RNA editing factors involved in an ancient horizontal gene transfer?. *FEBS Lett*; 584, 4287-4291

Kobe B und Kajava AV (2000). When protein folding is simplified to protein coiling: The continuum of solenoid protein structures. *Trends Biochem Sci*; 25, 509–515

Lea PJ und Ridley SM (1989). Glutamine synthetase and its inhibition. "Society for Experimental Biology Seminar Series (United Kingdom)". *Cambridge University Press*

Leason M, Cunliffe D, Parkin D, Lea PJ, Miflin BJ (1982). Inhibition of pea leaf glutamine synthetase by methionine sulfoximine, phosphinothricin and other glutamine analogs. *Phytochemistry*; 21, 855–857

Lurin C, Andrés C, Aubourg S, Bellaoui M, Bitton F, Bruyère C, Caboche M, Debast C, Gualberto J, Hoffmann B, Lecharny A, Le Ret M, Martin-Magniette M-L, Mireau H, Peeters N, Renou J-P, Szurek B, Taconnat L,

Small I (2004). Genome-Wide Analysis of Arabidopsis Pentatricopeptide Repeat Proteins Reveals Their Essential Role in Organelle Biogenesis. *The Plant Cell*; 16(8), 2089–2103

MacGinnitie AJ, Anant S, Davidson NO (1995). Mutagenesis of *apobec*-1, the catalytic subunit of the mammalian apolipoprotein B mRNA editing enzyme, reveals distinct domains that mediate cytosine nucleoside deaminase, RNA binding, and RNA editing activity. *Journal of Biological Chemistry*; 270, 14768–14775

Mahadevan S und Struhl K (1990). Tc, an unusual promoter element required for constitutive transcription of the yeast HIS3 gene. *Mol Cell Biol*; 10, 4447–55

Malek O, Lättig K, Hiesel R, Brennicke A, Knoop V (1996). RNA editing in bryophytes and a molecular phylogeny of land plants. *The EMBO Journal*; 15(6), 1403–1411

Okuda K, Nakamura T, Sugita M, Shimizu T, Shikanai T (2006). A pentatricopeptide repeat protein is a site recognition factor in chloroplast RNA editing. *J Biol Chem*; 281, 37661–37667

Okuda K, Myouga F, Motohashi R, Shinozaki K, Shikanai T (2007). Conserved domain structure of pentatricopeptide repeat proteins involved in chloroplast RNA editing. *Proc Natl Acad Sci USA*; 104, 8178–8183

Okuda K, Habata Y, Kobayashi Y, Shikanai T (2008). Amino acid sequence variations in Nicotiana CRR4 orthologs determine the species-specific efficiency of RNA editing in plastids. *Nucleic Acids Research*; 36(19), 6155–6164

Okuda K, Chateigner-Boutin AL, Nakamura T, Delannoy E, Sugita M, Myouga F, Motohashi R, Shinozaki K, Small I, Shikanai T (2009). Pentatricopeptide repeat proteins with the DYW motif have distinct molecular functions in RNA editing and RNA cleavage in Arabidopsis chloroplasts. *Plant Cell*; 21, 146–156

Okuda K und Shikanai T (2012). A pentatricopeptide repeat protein acts as a site-specificity factor at multiple RNA editing sites with unrelated cis-acting elements in plastids. *Nucleic Acids Res*; 40, 5052–5064

O'Toole N, Hattori M, Andres C, Iida K, Lurin C, Schmitz-Linneweber C, Sugita M, Small I (2008). On the expansion of the pentatricopeptide repeat gene family in plants. *Mol Biol Evol*; 25, 1120–1128

Otten L, Piotrowiak G, Hooykaas P, Dubois M, Szegedi E, Schell J (1985). Identification of an Agrobacterium tumefaciens pTiB6S3 vir region fragment that enhances the virulence of pTiC58. *MGG Molecular & General Genetics*; 199(2), 189

Pagnussat GC, Yu HJ, Ngo QA, Rajani S, Mayalagu S, Johnson CS, Capron A, Xie LF, Ye D, Sundaresan V (2005). Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in *Arabidopsis*. Development; 132, 603–614

Peeters N und Small I (2000). The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem Sci*; 25, 46–47

Powell LM, Wallis SC, Pease RJ, Edwards YH, Knott TJ, Scott J (1987). A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell*; 50, 831–840

Rajasekhar VK, Mulligan RM (1993). RNA Editing in plant mitochondria: α-phosphate is retained during C-to-U conversion in mRNAs. *Plant Cell*; 5, 1843–1852

Reinert J (2016). Phänotypisierung von MORF1-MORF3 und MORF3-MORF1 Chimären Klonierung von MORF8-Deletionen und MORF-Chimären in Überexpressions- und Hefevektoren. Bachelorarbeit. Universität Ulm

Rüdinger M, Polsakiewicz M, Knoop V (2008). Organellar RNA editing and plant-specific extensions of pentatricopeptide repeat proteins in jungermanniid but not in marchantiid liverworts. *Mol Biol Evol*; 25,1405–1414

Rüdinger M, Szövényi P, Rensing SA, Knoop V (2011). Assigning DYW-type PPR proteins to RNA editing sites in the funariid mosses *Physcomitrella patens* and *Funaria hygrometrica*. *The Plant Journal*; 67, 370–380

Rüdinger M, Volkmar U, Lenz H, Groth-Malonek M, Knoop V (2012). Nuclear DYW type PPR gene families diversify with increasing RNA editing frequencies in liverwort and moss mitochondria. *J Mol Evol*; 74, 37–51

Salone V, Rüdinger M, Polsakiewicz M, Hoffmann B, Groth-Malonek M, Szurek B, Small I, Knoop V, Lurin C (2007). A hypothesis on the identification of the editing enzyme in plant organelles. *FEBS Lett*; 581, 4132–4138

Schiestl RH und Gietz RD (1989). High efficiency transformation of intact cells using single stranded nucleic acids as as carrier. *Curr Genet*; 16, 339–346

Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Schölkopf B, Weigel D, Lohmann JU(2005). A gene expression map of Arabidopsis thaliana development. *Nature Genetics*; 37, 501 - 506

Schuster W, Hiesel R, Wissinger B, Brennicke A (1990). RNA editing in the cytochrome b locus of the higher plant Oenothera berteriana includes a U-to-C transition. *Molecular and Cellular Biology*; 10(5), 2428–2431

Schuster W, Ternes R, Knoop V, Hiesel R, Wissinger B, Brennicke A (1991). Distribution of RNA editing sites in Oenothera mitochondrial mRNAs and rRNAs. *Curr. Genet*; 20, 397–404

Shi X, Hanson MR, Bentolila S. (2015). Two RNA recognition motif-containing proteins are plant mitochondrial editing factors. *Nucleic Acids Research*. 43(7), 3814-3825

Shi X, Germain A, Hanson MR, Bentolila S (2016). RNA Recognition Motif-Containing Protein ORRM4 Broadly Affects Mitochondrial RNA Editing and Impacts Plant Development and Flowering. *Plant Physiology*; 170(1), 294-309

Smyth DR, Bowman jL, Meyerowitz EM (1990). Early Flower Development in Arabídopsis. *The Plant Cell*; 2, 755-767

Steinhauser S, Beckert S, Capesius I, Malek O, Knoop V (1999). Plant mitochondrial RNA editing. *J. Mol. Evol.*; 48, 303–312

Struhl K und Davis RW (1977). Production of a functional eukaryotic enzyme in Escherichia coli: cloning and expression of the yeast structural gene for imida-zole-glycerolphosphate dehydratase (his3). *Proc Natl Acad Sci USA;* 74, 5255–5259

Sun T, Germain A, Giloteaux L, Hammani K, Barkan A, Hanson MR, Bentolila S (2013). An RNA recognition motif-containing protein is required for plastid RNA editing in *Arabidopsis* and maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America;* 110(12), E1169–E1178

Takenaka M and Brennicke A (2003). In vitro RNA editing in pea mitochondria requires NTP or dNTP, suggesting involvement of an RNA helicase. *J. Biol. Chem*; 278, 130-136

Takenaka M, Brennicke A (2007). RNA editing in plant mitochondria: Assays and biochemical approaches. *Meth Enzymol*; 424, 439-458

Takenaka M, Verbitskiy D, Zehrmann A, Brennicke A (2010). Reverse genetic screening identifies five Eclass PPR proteins involved in RNA editing in mitochondria of Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem*; 285, 27122–27129

Takenaka, M (2010b). MEF9, an E subclass PPR protein, is required for an RNA editing event in the nad7 transcript in mitochondria of Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol*; 152, 939-947

Takenaka M, Zehrmann A, Verbitskiy D, Kugelmann M, Härtel B, Brennicke A (2012). Multiple organellar RNA editing factor (MORF) family proteins are required for RNA editing in mitochondria and plastids of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 109(13), 5104-5109

Takenaka M, Zehrmann A, Brennicke A, Graichen K (2013). Improved Computational Target Site Prediction for Pentatricopeptide Repeat RNA Editing Factors. *PLoS ONE*; 8(6), e65343

Takenaka M, Zehrmann A, Verbitskiy D, Härtel B, Brennicke A (2013b). RNA editing in plants and its evolution. *Annu Rev Genet*; 47: 335–352

Takenaka, M (2014). How complex are the editosomes in plant organelles?. Mol Plant; 7, 582–585

Taylor RG, Walken DC, Mc Innes RR (1993). E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparation used for sequencing. *Nucleic Acids Res*; 21, 1677-1678

Thompson CJ, Movva NR, Tizard R, Crameri R, Davies JE, Lauwereys M, Botterman J (1987). Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *The EMBO Journal*; 6(9), 2519–2523

Wagoner JA, Sun T, Lin L, Hanson MR (2015). Cytidine deaminase motifs within the DYW domain of two pentatricopeptide repeat-containing proteins are required for site-specific chloroplast RNA editing. *J Biol Chem*; 290, 2957–2968

Wolf PG, Rowe CA, Hasebe M (2004). High levels of RNA editing in a vascular plant chloroplast genome: analysis of transcripts from the fern Adiantum capillus-veneris. *Gene*; 339, 89-97

Xiang D, Venglat P, Tibiche C, Yang H, Risseeuw E, Cao Y, Babic V, Cloutier M, Keller W, Wang E, Selvaraj G, Datla R (2011). Genome-Wide Analysis Reveals Gene Expression and Metabolic Network Dynamics during Embryo Development in Arabidopsis. *Plant Physiology*; 156(1), 346–356

Yin P, Li Q, Yan C, Liu Y, Liu J, Yu F, Wang Z, Long J, He J, Wang HW, et al. (2013). Structural basis for the modular recognition of single-stranded RNA by PPR proteins. *Nature*; 504, 168–171.

Yu W, Schuster W (1995). Evidence for a site-specific cytidine deamination reaction involved in C to U RNA editing of plant mitochondria. *J. Biol. Chem.*; 270, 18227–18233

Zehrmann A, Verbitskiy Dl, Härtel B, Brennicke A, Takenaka M (2010). RNA editing competence of *trans*factor MEF1 is modulated by ecotype-specific differences but requires the DYW domain. *FEBS Letters*, 584

Zehrmann A, Härtel B, Glass F, Bayer-Császár E, Obata T, Meyer E, Takenaka M (2015). Selective Homoand Heteromer Interactions between the Multiple Organellar RNA Editing Factor (MORF) Proteins in *Arabidopsis thaliana. The Journal of Biological Chemistry*, 290(10), 6445–6456

10 Anhang

rps4

524

99.85

Transkript	Locus	Mittelwert Editingeffizienz $\overline{X}_{(morfl-1)}$ (355: MORE1)	Standardabweichung σ ²	t-Wert	<i>p</i> -Wert
atn4	138	90.80	1 23	58.29	93652F-05
atp9	167	98.80	1 31	30.29	0.0003
utp y	93	17.93	4 17	-4.09	0.0179
ccb203	176	94 76	4 56	4 57	0.0145
	208	49.37	2.32	24.02	0.0006
	80	88.77	9.91	6.96	0.0064
	164	14.95	10.61	0.66	0.2217
	193	28.50	7.99	-3.81	0.0205
	367	36.46	0.29	80.65	4.8934E-05
ccb206	379	50.91	1.48	29.61	0.0004
	380	97.29	0.15	265.29	4.5227E-06
	424	92.96	0.22	148.68	1.44E-05
	551	99.02	0.17	405.87	1.9323E-06
	566	85.86	1.59	31.85	0.0003
	184	92.52	7.03	8.55	0.0043
	421	98.05	3.38	32.63	0.0003
ccb256	458	95.82	5.34	4.19	0.0172
	624	54.25	10.66	0.56	0.2415
	673	86.04	9.51	6.85	0.0066
	103	93.37	2.81	1.70	0.0821
	123	85.38	18.84	-0.35	0.2842
cch452	175	21.35	3.51	-11.53	0.0024
000 102	333	85.12	3.52	10.08	0.0031
	406	18.72	3.71	-8.12	0.0048
	1280	54.72	4.09	15.46	0.0013
cox2	138	69.86	4.01	3.47	0.0244
cox3	257	96.73	1.50	34.73	0.0003
matR	1807	82.91	12.46	6.01	0.0086
nad1	500	98.03	2.78	24.44	0.0005
nad2	995	100.00	0.00	-	-
nad4	836	81.91	0.59	52.89	0.0001
nad5	1895	100.00	0.00	-	-
nad6	446	100.00	0.00	-	-
	463	96.63	3.61	18.29	0.0009
nad7	795	74.62	2.16	29.16	0.0004
	1137	99.99	0.01	6516.00	7.497E-09
	97	82.49	6.94	10.70	0.0028
orfX	144	19.45	4.74	-15.09	0.0014
	361	97.46	3.29	11.82	0.0023
	3//	81.35	2.89	15.35	0.0013
	307	76.72	12 59	1.25	0.1250
	406	/0./3	13.58	-0.34	0.2852
	407	99.93	0.03	252.27	1.1255E-00
	412	98 77	0.27	49 17	0,0001
	440	95.92	2 92	22.24	0.0001
	474	91.20	1 71	59.00	91409F-05
	666	42.49	4.72	6.74	0.0069
rnl5	64	68.67	3.06	27.13	0.0004
1913	603	97.83	3.00	873	0.0004
rns?	1470	93.01	4 27	27 51	0,0004
1,522	1534	65.97	5.00	4 52	0.0149

Tabelle 12. Signifikanzanalyse der abweichenden Editingeffizienz zwischen morf1-1 und der mit dem
Konstrukt (35S::MORF1) transformierten Linie morf1-1. ' σ^2 wurde bei N=1 aus der Kürzung auf die zweite
Nachkommastelle erstellt

2.8242E-05

106.16

0.26

Tabelle 13. Signifikanzanalyse der abweichenden Editingeffizienz zwischen morf1-1 und der mit dem Konstrukt (35S::MORF3) transformierten Linie morf1-1. ' σ^2 wurde bei N=1 aus der Kürzung auf die zweite Nachkommastelle erstellt

Translariat	Logue	Mittelwert Editingeffizienz	Standardabweichung	t Wort	<i>p</i> -Wert
Transkript	Locus	\overline{X} (morf1-1 : 35S::MORF3)	σ^2	t-wert	
atp4	138	24.37	3.27	-6.76	0.0068
atp9	167	92.07	3.34	9.35	0.0036
	93	20.29	2.03	-6.76	0.0068
ccb203	176	45.20	2.32	-21.20	0.0007
	208	3.92	0.29	-29.84	0.0004
	80	95.18′	0.00	23043.86	0.0033
	164	3.44	4.19	-2.21	0.0540
	193	51.83	4.65	0.56	0.2432
	367	4.92	0.01	-1575.52	1.28E-07
ccb206	379	4.87	5.73	-3.73	0.0213
	380	43.18	36.07	-1.05	0.1512
	424	51.24	11.54	-2.30	0.0506
	551	54.51	1.87	3.40	0.0254
	566	55.50	0.80	9.71	0.0033
	184	28.45	8.28	-3.68	0.0219
	421	6.57	6.71	-2.83	0.0353
ccb256	458	64.95	5.60	-3.80	0.0206
	624	34.98	8.61	-2.47	0.0450
	673	11.76	4.80	-8.33	0.0045
	103	53.71′	0.00	-38364.71	2.16E-10
	123	29.04′	0.00	-41149.00	1.87E-10
cch452	175	54.99´	0.01	789.00	5.11E-07
000102	333	84.83´	0.00	54104.26	1.08E-10
	406	40.36'	0.00	7999.00	4.97E-09
	1280	21.05	19.65	0.80	0.1950
cox2	138	43.45	6.36	-3.68	0.0219
cox3	257	51.82	2.29	-5.06	0.0120
matR	1807	13.13	1.90	-12.53	0.0020
nad1	500	33.35	6.61	-3.56	0.0232
nad2	995	85.69	2.56	19.69	0.0008
nad4	836	40.10	28.28	-1.00	0.1599
nad5	1895	78.24	5.31	-3.13	0.0294
nad6	446	84.23	1.65	-4.94	0.0125
	463	36.43	7.07	-2.72	0.0380
nad7	795	17.95	9.65	-1.77	0.0773
	1137	48.86	7.75	-0.21	0.3051
	97	23.95	6.81	-1.26	0.1235
	144	74.96	34.33	0.20	0.3056
	361	93.05	3.43	9.51	0.0035
	3//	/2.56	10.39	3.07	0.0305
	387	9.80	13.10	-0.02	0.3182
orfX	400	95.02	0.44	0.94	0.0005
	407	91.73	9.44	1.70	0.0779
	409	02.25	2.62	7.03	0.0034
	412	25 4.6	3.03 2.4.5	-10.07	0.0132
	474	13.02	9.45 8.07	-1007	0.0031
	666	5.02	0.07	-78.97	5 10F-05
rn15	64	33 1/	17.06	1 92	0.0680
100	602	00 52	0.66	<u>1.72</u> <u>1.1 Q7</u>	0.0000
rne?	1470	<u>97.55</u> <u>8</u> 12	6 21	-0.42	0.0002
1432	1534	48.23	0.31	-16.66	0.0011
rncA	521	71 15	15 21	-0.82	0.1808
трэт	547	/ 1.1.J	13.61	0.02	0.1070

Tabelle 14. Signifikanzanalyse der abweichenden Editingeffizienz zwischen morf1-1 und der mit dem Konstrukt (35S::MORF8) transformierten Linie morf1-1. ' σ^2 wurde bei N=1 aus der Kürzung auf die zweite Nachkommastelle erstellt

Translamint	Logue	Mittelwert Editingeffizienz	Standardabweichung	t Wort	n Mont
Transkript	Locus	\overline{X} (morf1-1 : 35S::MORF8)	σ^2	t-wert	<i>p</i> -wert
atp4	138	13.67	4.24	-8.77	0.0041
atp9	167	91.09	0.60	50.06	0.0001
	93	26.20	2.74	-1.96	0.0656
ccb203	176	57.31	11.51	-2.79	0.0363
	208	4.73	0.79	-9.43	0.0035
	80	28.35	29.02	-0.57	0.2407
	164	7.22	10.21	-0.38	0.2773
	193	52.34	0.43	7.69	0.0053
	367	6.48	2.71	-7.06	0.0063
ccb206	379	12.99	0.96	-10.31	0.0030
	380	81.01	4.35	3.58	0.0231
	424	59.66	6.94	-2.11	0.0584
	551	56.55	3.88	2.38	0.0476
	566	58.55	3.87	3.12	0.0296
	184	35.13	17.60	-1.19	0.1312
	421	4.86	4.48	-4.78	0.0134
ccb256	458	52.96	17.72	-2.16	0.0563
	624	17.08	8.83	-5.27	0.0111
	673	14.89	8.75	-4.06	0.0182
	103	31.40	17.61	-4./1	0.0137
	123	30.53	1.25	-67.39	7.00/9/E-05
ccb452	1/5	20.07	0.21	-204.02	7.64/35E-06
	333	61.02	7.24	0.08	0.3105
	1200	27.90	6.77	-0.40	0.2735
	1200	24.02	1.05	3.02 49 E6	0.0091
COX2	257	41.48	1.05	-40.30	0.0001
matR	1807	980	2 00	-13.17	0.0015
nad1	500	22.84	2.00	-17.71	0.0010
nad2	995	43.64	14.61	-0.62	0.2308
nad4	836	37.13	15.48	-2.09	0.0593
nad 5	1895	96.85	0.21	45.78	0.0002
nuuo	446	87.33	5.27	-0.72	0.2101
nad6	463	35.43	9.49	-2.17	0.0557
1-	795	9.61	0.00	-	-
nad7	1137	38.93	0.10	-151.59	1.3852E-05
	97	40.88	9.86	1.56	0.0927
	144	80.47	15.32	0.97	0.1646
	361	93.68	2.10	15.94	0.0012
	377	54.13	35.20	0.17	0.3098
	387	3.77	3.16	-2.78	0.0364
orfX	406	94.46	0.96	21.35	0.0007
OFIX	407	91.59	7.53	2.18	0.0555
	409	77.00	8.43	4.53	0.0148
	412	94.52	1.87	10.96	0.0026
	440	13.94	11.60	-4.40	0.0157
	474	14.92	10.07	-0.71	0.2109
1-	666	3.74	2.96	-7.77	0.0052
rp15	64	2.86	1.04	-9.75	0.0033
	603	97.48	3.31	7.46	0.0056
rps3	14/0	10.06	0.49	0.18	0.3082
4	1534	43.69	0.27	-33.10	0.0003
rps4	524	61.91	0.48	-52.96	0.0001

Tabelle 15. Signifikanzanalyse der abweichenden Editingeffizienz zwischen morf1-1 und der mit dem Konstrukt (35S::MORF2) transformierten Linie morf1-1. ' σ^2 wurde bei N=1 aus der Kürzung auf die zweite Nachkommastelle erstellt

$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	Translamint	Logue	Mittelwert Editingeffizienz	Standardabweichung	t Wort	n Wort
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	Transkript	Locus	\overline{X} (morf1-1 : 35S::MORF2)	σ^2	t-wert	<i>p</i> -wert
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	atp4	138	17.50	1.35	-23.54	0.0006
ccb203 93 25.34 6.80 -0.97 0.1642 ccb203 176 59.46 9.48 -3.06 0.0307 208 8.92 0.30 -5.06 0.0119 80 51.93 4.20 4.02 0.0186 193 54.70 1.54 4.31 0.0163 367 95.58 5.00 21.38 0.0007 380 25.00 30.00 -2.12 0.0579 424 62.99 4.00 -2.48 0.0445 551 63.02 5.46 3.37 0.0257 566 61.36 4.09 3.93 0.0194 424 62.99 4.31 -5.66 0.0095 421 14.61 10.75 -0.71 0.2117 ccb256 458 62.70 4.31 -5.66 0.0096 624 17.78 3.29 -13.83 0.0017 673 27.59 5.88 -2.99 0.0321 </td <td>atp9</td> <td>167</td> <td>84.85</td> <td>13.76</td> <td>1.53</td> <td>0.0956</td>	atp9	167	84.85	13.76	1.53	0.0956
ccb203 176 59.46 9.48 -3.06 0.0307 208 8.92 0.30 -5.06 0.0119 80 51.93 4.20 4.02 0.0186 193 54.70 1.54 4.31 0.0163 367 95.58 5.00 21.38 0.0007 380 25.00 30.00 -2.12 0.0579 424 62.99 4.00 -2.48 0.0457 551 63.02 5.46 3.37 0.0257 566 61.36 4.09 3.93 0.0194 421 14.61 10.75 -0.71 0.2117 cb256 458 62.70 4.31 -5.68 0.0096 624 17.78 3.29 -13.83 0.0017 103 57.55 26.966 -1.70 0.2072 175 52.04 13.04 0.22 0.3035 ccb452 123 66.20 45.95 -0.73 0.2072		93	25.34	6.80	-0.97	0.1642
208 8.92 0.30 -5.06 0.0119 80 51.93 4.20 4.02 0.0186 164 6.64 9.37 -0.51 0.2531 367 95.58 5.00 21.38 0.0007 379 6.64 2.13 -8.86 0.0040 380 25.00 30.00 -2.12 0.0579 424 62.99 4.00 -2.48 0.0445 551 63.02 5.46 3.37 0.0257 566 61.36 4.09 3.93 0.0194 424 62.99 4.00 -2.48 0.0445 551 63.02 5.46 3.37 0.0257 566 61.36 4.09 3.93 0.0194 421 14.61 10.75 -0.71 0.2117 ccb256 673 27.59 5.88 -2.99 0.0321 103 57.55 26.96 -1.70 0.0817 123 66.2	ccb203	176	59.46	9.48	-3.06	0.0307
80 51.93 4.20 4.02 0.0186 164 6.64 9.37 -0.51 0.2531 193 54.70 1.54 4.31 0.0163 367 95.58 5.00 21.38 0.0007 379 6.64 2.13 -8.86 0.0040 380 25.00 30.00 -2.12 0.0579 424 62.99 4.00 -2.48 0.0445 551 63.02 5.46 3.37 0.0257 566 61.36 4.09 3.93 0.0144 421 14.61 10.75 -0.71 0.2117 458 62.70 4.31 -5.68 0.0096 624 17.78 3.29 -1.383 0.017 103 57.55 26.96 -1.70 0.0817 123 66.20 45.95 -0.73 0.2072 175 52.04 13.04 0.22 0.3035 333 59.77 11		208	8.92	0.30	-5.06	0.0119
information information information information ccb206 information information information information ccb206 information information information information information information information information information information information information information information information information information ccb256 information information information information information information ccb256 information information information information information information information		80	51.93	4.20	4.02	0.0186
infty infty infty infty infty ccb206 infty infty infty infty infty infty infty infty infty infty		164	6.64	9.37	-0.51	0.2531
ccb206 367 95.58 5.00 21.38 0.0007 380 25.00 30.00 -2.12 0.0579 424 62.99 4.00 -2.48 0.0445 551 63.02 5.46 3.37 0.0257 566 61.36 4.09 3.93 0.0194 421 14.61 10.75 -0.71 0.2117 cb256 458 62.70 4.31 -5.68 0.0096 624 17.78 3.29 -13.83 0.0017 673 27.59 5.88 -2.99 0.0321 103 57.55 26.96 -1.70 0.0817 123 66.20 45.95 -0.73 0.2072 333 59.77 11.48 -0.03 0.3181 406 23.65 3.75 -6.16 0.0082 ccw3 257 54.59 6.94 -1.10 0.1437 matR 1807 11.74 3.47 -7.43		193	54.70	1.54	4.31	0.0163
ccb206 379 6.64 2.13 -8.86 0.0040 380 25.00 30.00 -2.12 0.0579 424 62.99 4.00 -2.48 0.0445 551 63.02 5.46 3.37 0.0257 566 61.36 4.09 3.93 0.0194 184 35.04 9.17 -2.31 0.0503 421 14.61 10.75 -0.71 0.2117 624 17.78 3.29 -13.83 0.0016 673 27.59 5.88 -2.99 0.0321 123 66.20 45.95 -0.73 0.2072 175 52.04 13.04 0.22 0.3035 175 52.04 13.04 0.22 0.3035 1280 36.54 10.06 3.73 0.0213 1280 36.54 10.06 3.73 0.0213 1280 36.54 10.06 3.73 0.0213 1280		367	95.58	5.00	21.38	0.0007
380 25.00 30.00 -2.12 0.0579 424 62.99 4.00 -2.48 0.0445 551 63.02 5.46 3.37 0.0257 566 61.36 4.09 3.93 0.0194 421 14.61 10.75 -0.71 0.2117 458 62.70 4.31 -5.68 0.0096 624 17.78 3.29 -13.83 0.0017 673 27.59 5.88 -2.99 0.0321 103 57.55 2.6.96 -1.70 0.0817 123 66.20 45.95 -0.73 0.2072 133 59.77 11.48 -0.03 0.3181 406 23.65 3.75 -6.16 0.0082 cox2 138 35.45 9.17 -3.79 0.0208 cox3 257 54.59 6.94 -1.10 0.1437 matR 1807 11.74 3.47 -7.43 0.0057	ccb206	379	6.64	2.13	-8.86	0.0040
424 62.99 4.00 -2.48 0.0445 551 63.02 5.46 3.37 0.0257 566 61.36 4.09 3.93 0.0194 184 35.04 9.17 -2.31 0.0503 421 14.61 10.75 -0.71 0.2117 cb256 458 62.70 4.31 -5.68 0.0096 624 17.78 3.29 -13.83 0.0017 673 27.59 5.88 -2.99 0.0321 103 57.55 26.96 -1.70 0.0817 123 66.20 45.95 -0.73 0.2072 175 52.04 13.04 0.22 0.3035 333 59.77 11.48 -0.03 0.3181 406 23.65 3.75 -6.16 0.0082 cox2 138 35.45 9.17 -3.79 0.0208 cox3 257 54.59 6.94 -1.10 0.1437		380	25.00	30.00	-2.12	0.0579
551 63.02 5.46 3.37 0.0257 566 61.36 4.09 3.93 0.0194 421 14.61 10.75 -0.71 0.2117 421 14.61 10.75 -0.71 0.2117 62266 624 17.78 3.29 -13.83 0.0017 673 27.59 5.88 -2.99 0.0321 673 27.59 5.88 -2.99 0.0321 103 57.55 26.96 -1.70 0.0817 123 66.20 45.95 -0.73 0.2072 175 52.04 13.04 0.22 0.3035 333 59.77 11.48 -0.03 0.3181 406 23.65 3.75 -6.16 0.0082 1280 36.54 10.06 3.73 0.0213 cox3 257 54.59 6.94 -1.10 0.1437 matR 1807 11.74 3.47 -7.43 0.0057		424	62.99	4.00	-2.48	0.0445
566 61.36 4.09 3.93 0.0194 421 14.61 9.17 -2.31 0.0503 421 14.61 10.75 -0.71 0.2117 458 62.70 4.31 -5.68 0.0096 624 17.78 3.29 -13.83 0.0017 673 27.59 5.88 -2.99 0.0321 7673 27.55 26.96 -1.70 0.0817 123 66.20 45.95 -0.73 0.2072 333 59.77 11.48 -0.03 0.3181 406 23.65 3.75 -6.16 0.0082 1280 36.54 10.06 3.73 0.0213 cox2 138 35.45 9.17 -3.79 0.0208 cox3 257 54.59 6.94 -1.10 0.1437 matR 1807 11.74 3.47 -7.43 0.0057 nad1 500 37.08 0.21 -85.15		551	63.02	5.46	3.37	0.0257
184 35.04 9.17 -2.31 0.0503 421 14.61 10.75 -0.71 0.2117 458 62.70 4.31 -5.68 0.0096 624 17.78 3.29 -13.83 0.0017 673 27.59 5.88 -2.99 0.0321 103 57.55 26.96 -1.70 0.0817 123 66.20 45.95 -0.73 0.2072 175 52.04 13.04 0.22 0.3035 333 59.77 11.48 -0.03 0.3181 406 23.65 3.75 -6.16 0.0082 1280 36.54 10.06 3.73 0.0218 cox3 257 54.59 6.94 -1.10 0.1437 matR 1807 11.74 3.47 -7.43 0.0057 nad1 500 37.08 0.21 -85.15 4.38926E-05 nad2 995 45.90 26.49 -0.22 </td <td></td> <td>566</td> <td>61.36</td> <td>4.09</td> <td>3.93</td> <td>0.0194</td>		566	61.36	4.09	3.93	0.0194
$ \begin{array}{c} cb256 \\ \hline \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		184	35.04	9.17	-2.31	0.0503
$\begin{array}{c ccb256} ccb256 & \frac{458}{624} & \frac{62.70}{17.78} & \frac{4.31}{3.29} & \frac{-5.68}{13.83} & \frac{0.0096}{0.0017} \\ \hline 673 & 27.59 & 5.88 & -2.99 & 0.0321 \\ \hline 103 & 57.55 & 26.96 & -1.70 & 0.0817 \\ \hline 123 & 66.20 & 45.95 & -0.73 & 0.2072 \\ \hline 175 & 52.04 & 13.04 & 0.22 & 0.3035 \\ \hline 333 & 59.77 & 11.48 & -0.03 & 0.3181 \\ \hline 406 & 23.65 & 3.75 & -6.16 & 0.0082 \\ \hline 1280 & 36.54 & 10.06 & 3.73 & 0.0213 \\ \hline cox2 & 138 & 35.45 & 9.17 & -3.79 & 0.0208 \\ \hline cox3 & 257 & 54.59 & 6.94 & -1.10 & 0.1437 \\ \hline matR & 1807 & 11.74 & 3.47 & -7.43 & 0.0057 \\ \hline nad1 & 500 & 37.08 & 0.21 & -85.15 & 4.389261-05 \\ \hline nad2 & 995 & 45.90 & 26.49 & -0.22 & 0.3038 \\ \hline nad4 & 836 & 48.37 & 22.81 & -0.72 & 0.2094 \\ \hline nad5 & 1895 & 100.00 & 0.00 & - & - \\ \hline nad6 & \frac{446}{463} & 34.66 & 7.68 & -2.82 & 0.0355 \\ \hline nad7 & 795 & 21.16 & 2.14 & -5.84 & 0.0091 \\ \hline 1137 & 62.93 & 4.88 & 3.75 & 0.0212 \\ \hline 97 & 32.90 & 17.20 & 0.24 & 0.3011 \\ \hline 144 & 79.85 & 0.77 & 18.09 & 0.0010 \\ \hline 361 & 92.84 & 0.88 & 36.51 & 0.0002 \\ \hline 377 & 56.79 & 3.84 & 2.50 & 0.0439 \\ \hline 387 & 3.33 & 1.98 & -4.76 & 0.0135 \\ \hline 406 & 84.38 & 0.48 & 12.81 & 0.0019 \\ \hline 407 & 93.55 & 1.34 & 14.29 & 0.0016 \\ \hline 409 & 71.42 & 1.15 & 26.35 & 0.00057 \\ \hline \end{array}$		421	14.61	10.75	-0.71	0.2117
624 17.78 3.29 -13.83 0.0017 673 27.59 5.88 -2.99 0.0321 103 57.55 26.96 -1.70 0.0817 123 66.20 45.95 -0.73 0.2072 175 52.04 13.04 0.22 0.3035 333 59.77 11.48 -0.03 0.3181 406 23.65 3.75 -6.16 0.0082 1280 36.54 10.06 3.73 0.0213 cox3 257 54.59 6.94 -1.10 0.1437 matR 1807 11.74 3.47 -7.43 0.0057 nad1 500 37.08 0.21 -85.15 4.38926E-05 nad2 995 45.90 26.49 -0.22 0.3038 nad4 836 48.37 22.81 -0.72 0.2094 nad5 1895 100.00 0.00 - - nad4 836	ccb256	458	62.70	4.31	-5.68	0.0096
$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		624	17.78	3.29	-13.83	0.0017
$ \begin{array}{c} \mbox{cb452} \\ \mbox{cb452} \\ \mbox{cb452} \\ \begin{tabular}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		673	27.59	5.88	-2.99	0.0321
$ \begin{array}{c} 123 & 66.20 & 45.95 & -0.73 & 0.2072 \\ \hline 175 & 52.04 & 13.04 & 0.22 & 0.3035 \\ \hline 333 & 59.77 & 11.48 & -0.03 & 0.3181 \\ \hline 406 & 23.65 & 3.75 & -6.16 & 0.0082 \\ \hline 1280 & 36.54 & 10.06 & 3.73 & 0.0213 \\ \hline cox2 & 138 & 35.45 & 9.17 & -3.79 & 0.0208 \\ \hline cox3 & 257 & 54.59 & 6.94 & -1.10 & 0.1437 \\ \hline matR & 1807 & 11.74 & 3.47 & -7.43 & 0.0057 \\ \hline nad1 & 500 & 37.08 & 0.21 & -85.15 & 4.38926E-05 \\ \hline nad2 & 995 & 45.90 & 26.49 & -0.22 & 0.3038 \\ \hline nad4 & 836 & 48.37 & 22.81 & -0.72 & 0.2094 \\ \hline nad5 & 1895 & 100.00 & 0.00 & - & - \\ \hline nad6 & \frac{446 & 95.19 & 6.80 & 1.08 & 0.1472 \\ \hline 463 & 34.66 & 7.68 & -2.82 & 0.0355 \\ \hline nad7 & 795 & 21.16 & 2.14 & -5.84 & 0.0091 \\ \hline 1137 & 62.93 & 4.88 & 3.75 & 0.0212 \\ \hline 97 & 32.90 & 17.20 & 0.24 & 0.3011 \\ \hline 144 & 79.85 & 0.77 & 18.09 & 0.0010 \\ \hline 361 & 92.84 & 0.88 & 36.51 & 0.0002 \\ \hline 377 & 56.79 & 3.84 & 2.50 & 0.0439 \\ \hline 387 & 3.33 & 1.98 & -4.76 & 0.0135 \\ \hline 406 & 84.38 & 0.48 & 12.81 & 0.0019 \\ \hline 407 & 93.55 & 1.34 & 14.29 & 0.0016 \\ \hline 409 & 71.42 & 1.15 & 26.35 & 0.0005 \\ \hline \end{array}$		103	57.55	26.96	-1.70	0.0817
$ \begin{array}{c} ccb452 \\ \hline \begin{array}{c} 175 \\ 333 \\ \hline \begin{array}{c} 52.04 \\ 333 \\ \hline \begin{array}{c} 59.77 \\ 11.48 \\ 0.03 \\ 1280 \\ 23.65 \\ 1280 \\ 36.54 \\ 10.06 \\ 3.73 \\ 0.0082 \\ 1280 \\ 36.54 \\ 10.06 \\ 3.73 \\ 0.0213 \\ 0.0082 \\ \hline \begin{array}{c} 0.0082 \\ 3.73 \\ 0.00213 \\ 0.0082 \\ 0.0082 \\ \hline \begin{array}{c} 0.0082 \\ 3.73 \\ 0.00213 \\ 0.0082 \\ \hline \begin{array}{c} 0.0082 \\ 3.73 \\ 0.00213 \\ 0.0082 \\ \hline \begin{array}{c} 0.0082 \\ 3.73 \\ 0.00213 \\ 0.0082 \\ \hline \begin{array}{c} 0.0082 \\ 3.73 \\ 0.00213 \\ \hline \begin{array}{c} 0.0082 \\ 0.0082 \\ \hline \begin{array}{c} 0.0082 \\ 3.73 \\ 0.00213 \\ \hline \begin{array}{c} 0.0082 \\ 0.0082 \\ \hline \begin{array}{c} 0.0082 \\ 3.73 \\ 0.00213 \\ \hline \begin{array}{c} 0.0082 \\ 0.0082 \\ \hline \begin{array}{c} 0.0082 \\ 0.008 \\ \hline \begin{array}{c} 0.0082 \\ 0.008 \\ \hline \begin{array}{c} 0.0082 \\ 0.008 \\ \hline \begin{array}{c} 0.008 \\ 0.005 \\ \hline \begin{array}{c} 0.008 \\ 0.005 \\ \hline \begin{array}{c} 0.008 \\ 0.005 \\ \hline \begin{array}{c} 0.008 \\ 0.008 \\ \hline \begin{array}{c} 0.008 \\ 0.000 \\ \hline \begin{array}{c} 0.008 \\ 0.009 \\ \hline \begin{array}{c} 0.008 \\ 0.009 \\ \hline \begin{array}{c} 0.008 \\ 0.001 \\ \hline \begin{array}{c} 0.008 \\ 0.0002 \\ \hline \begin{array}{c} 0.008 \\ 0.000 \\ \hline \begin{array}{c} 0.008 \\ 0.0002 \\ \hline \begin{array}{c} 0.008 \\ 0.0002 \\ \hline \begin{array}{c} 0.008 \\ 0.000 \\ \hline \end{array} \end{array} \end{array} \end{array} \right} \end{array} \right)$		123	66.20	45.95	-0.73	0.2072
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	ccb452	1/5	52.04	13.04	0.22	0.3035
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		333	59.77 22.6F	2.75	-0.03	0.0092
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		1200	25.05	3.75	-0.10	0.0062
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	cox2	1200	25 45	0.17	2 70	0.0213
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	cox2	257	53.45	6.94	-3.79	0.0200
$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	matB	1807	11 74	3 47	-7.43	0.0057
$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	nad1	500	37.08	0.21	-85.15	4 38926E-05
$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	nad2	995	45.90	26.49	-0.22	0 3038
$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	nad4	836	48.37	22.81	-0.72	0.2094
$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	nad5	1895	100.00	0.00	-	-
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		446	95.19	6.80	1.08	0.1472
$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	nad6	463	34.66	7.68	-2.82	0.0355
$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	17	795	21.16	2.14	-5.84	0.0091
$ \text{orfX} \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	nau/	1137	62.93	4.88	3.75	0.0212
144 79.85 0.77 18.09 0.0010 361 92.84 0.88 36.51 0.0002 377 56.79 3.84 2.50 0.0439 387 3.33 1.98 -4.76 0.0135 406 84.38 0.48 12.81 0.0019 407 93.55 1.34 14.29 0.0016 409 71.42 1.15 26.35 0.005		97	32.90	17.20	0.24	0.3011
361 92.84 0.88 36.51 0.0002 377 56.79 3.84 2.50 0.0439 387 3.33 1.98 -4.76 0.0135 406 84.38 0.48 12.81 0.0019 407 93.55 1.34 14.29 0.0016 409 71.42 1.15 26.35 0.005		144	79.85	0.77	18.09	0.0010
377 56.79 3.84 2.50 0.0439 387 3.33 1.98 -4.76 0.0135 406 84.38 0.48 12.81 0.0019 407 93.55 1.34 14.29 0.0016 409 71.42 1.15 26.35 0.005		361	92.84	0.88	36.51	0.0002
387 3.33 1.98 -4.76 0.0135 406 84.38 0.48 12.81 0.0019 407 93.55 1.34 14.29 0.0016 409 71.42 1.15 26.35 0.0005		377	56.79	3.84	2.50	0.0439
orfX 406 84.38 0.48 12.81 0.0019 407 93.55 1.34 14.29 0.0016 409 71.42 1.15 26.35 0.0005		387	3.33	1.98	-4.76	0.0135
407 93.55 1.34 14.29 0.0016 409 71.42 1.15 26.35 0.0005	orfX	406	84.38	0.48	12.81	0.0019
<u>409</u> 71.42 <u>1.15</u> <u>26.35</u> <u>0.0005</u>	UIIX	407	93.55	1.34	14.29	0.0016
		409	71.42	1.15	26.35	0.0005
<u>412</u> 88.93 0.75 16.84 0.0011		412	88.93	0.75	16.84	0.0011
<u>440</u> <u>13.64</u> <u>4.85</u> <u>-10.59</u> <u>0.0028</u>		440	13.64	4.85	-10.59	0.0028
4/4 14.51 0.55 -14.06 0.0016		474	14.51	0.55	-14.06	0.0016
bbb 2.34 0./1 -35.36 0.0003 mlf (4) 12.50 0.01 (02.00) (007111) 0.01	15	666		0./1	-35.30	0.0003
Ipi5 04 12.50 0.01 685.82 6.80/11E-0/ 602 01.67 10.72 1.54 0.0044	rpis	602	<u>12.58</u>	0.01	003.02	0.00/11E-0/
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	rnc?	003 1470	91.0/	10.72	1.54	0.0944
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	1055	152/	41 07	7 /0	-1.60	0.0017
rps4 524 69.80 4.43 -3.26 0.0274	rps4	524	69.80	4.43	-3.26	0.0274

Tabelle 16. Signifikanzanalyse der abweichenden Editingeffizienz zwischen MORF1 und MORF3 und der mit dem Konstrukt 35S:: M1M3N2C2 transformierten Linie *morf1-1*.

Transkript	Locus	Mittelwert Editingeffizienz \overline{X} (morf1-1 : 35S::M1M3N2C2)	Standardabweichung σ ²	p-Wert morf1-1: MORF1 morf1-1: M1M3N2C2	p-Wert morf1-1: MORF3 morf1-1: M1M3N2C2
atp4	138	82.36	4.64	0.0309	0.0004
atp9	167	93.04	11.17	0.3797	0.8789
ccb203	176	95.25	3.03	0.8800	0.0003
ccb203	208	56.44	13.50	0.3767	0.0044
ccb206	80	86.70	4.22	0.7627	-
ccb206	380	85.15	18.54	0.2814	0.3248
ccb206	424	83.57	12.95	0.3361	0.0766
ccb206	551	96.08	3.71	0.3020	0.0005
ccb206	566	83.27	9.38	0.6816	0.0348
ccb256	184	99.15	0.52	0.2435	0.0500
ccb256	421	99.43	0.99	0.5590	0.0302
ccb256	458	90.95	7.85	0.4304	0.0249
ccb256	673	86.13	8.05	0.9903	0.0010
cox3	257	94.18	3.56	0.2649	7.78E-06
matR	1807	89.81	5.05	0.5739	9.24E-06
nad1	500	100.00	0.00	0.5000	0.0446
nad2	995	100.00	0.00	-	0.0018
nad6	446	99.12	1.42	0.3968	0.0092
nad6	463	33.59	53.56	0.1776	0.9481
nad7	795	54.94	11.31	0.2390	0.0747
nad7	1137	36.92	52.21	0.3371	0.8011
orfX	97	84.36	0.00	0.6869	0.0063
orfX	377	63.40	12.68	0.6016	0.4498
orfX	409	86.79	12.81	0.2313	0.8647
orfX	412	75.15	32.05	0.3298	0.4512
orfX	440	88.50	8.05	0.2473	0.0016
orfX	474	60.85	9.78	0.0298	0.0134
orfX	666	44.66	12.67	0.8017	0.0336
rpl5	64	52.18	8.43	0.0627	0.1811
rps3	603	91.97	3.18	0.1558	0.0472
rps3	1470	81.28	12.87	0.1673	0.0003
rps3	1534	65.43	9.50	0.9358	0.0883
rps4	524	92.08	6.95	0.1926	0.1160

Tabelle 17. Signifikanzanalyse der abweichenden Editingeffizienz zwischen MORF1 und MORF3 und der mit dem Konstrukt 35S:: M1M3N3C3 transformierten Linie *morf1-1.*

Transkript	Locus	Mittelwert Editingeffizienz \overline{X} (morf1-1 : 35S::M1M3N3C3)	Standardabweichung σ ²	p-Wert morf1-1: MORF1 morf1-1: M1M3N3C3	p-Wert morf1-1: MORF3 morf1-1: M1M3N3C3
atp4	138	89.71	8.30	0.8120	0.0002
atp9	167	94.22	7.04	0.3767	0.6675
ccb203	176	84.41	12.83	0.2111	0.0069
ccb203	208	38.28	19.66	0.4319	0.0470
ccb206	80	84.33	1.87	0.5203	-
ccb206	380	90.97	8.06	0.4672	0.3010
ccb206	424	77.93	6.83	0.0622	0.1389
ccb206	551	97.58	3.32	0.5306	0.0003
ccb206	566	90.00	6.47	0.3860	0.0102
ccb256	184	98.58	2.46	0.2709	0.0419
ccb256	421	98.74	2.18	0.7815	0.0231
ccb256	458	94.19	9.03	0.8043	0.0211
ccb256	673	84.10	4.14	0.7694	0.0033
cox3	257	94.72	4.41	0.4465	2.54E-05
matR	1807	92.78	6.53	0.4517	4.31E-05
nad1	500	100.00	0.00	0.5000	0.0446
nad2	995	100.00	0.00	-	0.0018
nad4	836	91.87	2.36	0.0127	0.0410
nad6	446	99.54	0.81	0.4226	0.0253
nad6	463	34.01	55.31	0.1882	0.9469
nad7	795	51.79	1.38	0.0003	0.0073
nad7	1137	80.91	16.84	0.1887	0.0669
orfX	97	99.96	0.05	0.0487	0.0403
orfX	377	91.24	7.82	0.1849	0.1788
orfX	409	96.57	3.56	0.2160	0.0753
orfX	412	95.46	1.66	0.0625	0.4244
orfX	440	98.89	1.28	0.2128	0.0123
orfX	474	80.90	10.70	0.2354	0.0051
orfX	666	41.46	30.11	0.9504	0.0988
rpl5	64	46.61	5.66	0.0654	0.4554
rps3	603	74.64	10.61	0.0515	0.0547
rps3	1470	82.34	1.08	0.0424	0.0019
rps3	1534	51.71	0.82	0.0356	0.0144
rps4	524	95.41	7.77	0.4270	0.2297

Tabelle 18. Signifikanzanalys der abweichenden Editingeffizienz zwischen MORF1 und MORF3 und der mit dem Konstrukt 35S:: M1M3N4C4 transformierten Linie *morf1-1*.

Transkript	Locus	Mittelwert Editingeffizienz X(morf1-1 : 35S::M1M3N4C4)	Standardabweichung σ ²	p-Wert morf1-1: MORF1 morf1-1: M1M3N4C4	p-Wert morf1-1: MORF3 morf1-1: M1M3N4C4
atp4	138	89.16	8.21	0.7198	0.0002
atp9	167	98.79	0.68	0.9888	0.0681
ccb203	176	90.08	4.73	0.2489	0.0001
ccb203	208	40.10	6.54	0.1217	0.0105
ccb206	80	95.19	4.95	0.3909	-
ccb206	380	95.99	2.61	0.3922	0.2857
ccb206	424	91.81	9.41	0.8222	0.0094
ccb206	551	93.64	8.72	0.3050	0.0018
ccb206	566	91.64	2.84	0.0621	0.0008
ccb256	184	97.13	2.95	0.3801	0.0388
ccb256	421	99.74	0.45	0.4777	0.0319
ccb256	458	91.10	1.78	0.2618	0.0040
ccb256	673	85.63	2.85	0.9492	0.0090
cox3	257	94.32	1.26	0.1015	7.60E-05
matR	1807	80.90	15.22	0.8752	0.0026
nad1	500	100.00	0.00	0.5000	0.0446
nad2	995	98.88	1.94	0.4226	0.0331
nad4	836	71.25	0.82	0.0067	0.3631
nad6	446	99.69	0.54	0.4226	0.0354
nad6	463	32.44	54.89	0.0897	0.9120
nad7	795	39.14	13.79	0.0128	0.1160
nad7	1137	88.75	13.15	0.1858	0.0130
orfX	97	77.98	8.04	0.5034	0.0066
orfX	377	72.75	30.59	0.9203	0.9916
orfX	409	93.93	7.13	0.2247	0.1588
orfX	412	90.69	10.40	0.2179	0.7892
orfX	440	95.42	4.84	0.8722	0.0003
orfX	474	69.12	15.76	0.0666	0.0052
orfX	666	41.38	23.57	0.9321	0.0285
rpl5	64	54.18	9.26	0.1008	0.3004
rps3	603	87.07	13.95	0.3124	0.2616
rps3	1470	91.21	7.00	0.6924	2.40E-05
rps3	1534	45.56	10.12	0.0201	0.6343
rps4	524	95.98	6.27	0.3059	0.0370

Tabelle 19.Signifikanzanalyse der abweichenden Editingeffizienz zwischen MORF1 und MORF3 und der mit dem Konstrukt 35S:: M3M1N1C1 transformierten Linie *morf1-1*.

Transkript	Locus	Mittelwert Editingeffizienz X(morf1-1 : 35S::M3M1N1C1)	Standardabweichung σ ²	p-Wert morf1-1: MORF1 morf1-1: M3M1N1C1	p-Wert morf1-1: MORF3 morf1-1: M3M1N1C1
atp4	138	30.74	9.73	0.0079	0.3821
atp9	167	83.59	20.55	0.2354	0.3854
ccb203	176	55.08	9.97	0.0100	0.2240
ccb203	208	6.84	4.43	0.0008	0.3708
ccb206	80	48.06	0.00	0.0192	-
ccb206	380	60.10	28.62	0.0804	0.6312
ccb206	424	56.52	12.58	0.0102	0.6542
ccb206	551	57.84	6.59	0.0084	0.4812
ccb206	566	55.00	8.11	0.0179	0.9247
ccb256	184	28.12	4.81	0.0005	0.9644
ccb256	421	6.52	5.71	1.89E-06	0.9935
ccb256	458	73.17	11.65	0.0227	0.3095
ccb256	673	27.20	17.35	0.0027	0.1780
cox3	257	41.24	9.74	0.0089	0.2150
matR	1807	23.90	3.26	0.0035	0.0215
nad1	500	50.67	10.45	0.0104	0.1087
nad2	995	85.64	10.86	0.1490	0.9947
nad4	836	48.49	17.58	0.0809	0.7535
nad6	446	92.99	5.64	0.0890	0.0486
nad6	463	31.31	34.31	0.0304	0.7909
nad7	795	16.33	10.91	0.0094	0.8744
nad7	1137	49.81	11.23	0.0030	0.9109
orfX	97	26.65	8.95	0.0013	0.7292
orfX	377	52.60	17.28	0.2510	0.1642
orfX	409	86.29	11.19	0.1015	0.8367
orfX	412	94.54	3.05	0.0666	0.5473
orfX	440	33.77	19.74	0.0071	0.4679
orfX	474	17.97	1.44	5.16E-07	0.5443
orfX	666	26.15	13.93	0.1451	0.0285
rpl5	64	12.92	1.42	0.0084	0.3409
rps3	603	95.13	7.99	0.5834	0.3511
rps3	1470	22.51	23.39	0.0077	0.4261
rps3	1534	48.00	11.46	0.0449	0.9712
rps4	524	89.48	1.49	0.0597	0.3356

Tabelle 20. Signifikanzanalyse der abweichenden Editingeffizienz zwischen MORF1 und MORF3 und der mit dem Konstrukt 35S:: M3M1N2C2 transformierten Linie *morf1-1*.

Transkript	Locus	Mittelwert Editingeffizienz \overline{X} (morf1-1 : 35S::M3M1N2C2)	Standardabweichung σ ²	p-Wert morf1-1: MORF1 morf1-1: M3M1N2C2	p-Wert morf1-1: MORF3 morf1-1: M3M1N2C2
atp4	138	20.03	11.32	0.0010	0.5194
atp9	167	79.04	11.35	0.0387	0.1016
ccb203	176	51.18	21.74	0.0246	0.6231
ccb203	208	4.92	1.53	0.0049	0.3773
ccb206	80	35.61	0.00	0.0114	-
ccb206	380	77.86	7.81	0.0258	0.4106
ccb206	424	47.00	4.56	0.0032	0.6952
ccb206	551	47.71	6.22	0.0048	0.1924
ccb206	566	45.94	2.72	0.0002	0.0176
ccb256	184	37.18	6.07	0.0006	0.3458
ccb256	421	5.62	6.15	0.0001	0.8872
ccb256	458	62.76	19.66	0.0483	0.8695
ccb256	673	18.83	16.00	0.0064	0.5339
cox3	257	42.34	7.00	0.0041	0.1333
matR	1807	14.14	7.86	0.0379	0.8466
nad1	500	30.30	3.87	0.0003	0.6331
nad2	995	61.62	32.90	0.1808	0.3325
nad4	836	21.33	12.79	0.0216	0.5142
nad6	446	94.36	7.08	0.3017	0.1230
nad6	463	24.41	21.64	0.0249	0.4479
nad7	795	18.54	14.46	0.0196	0.9597
nad7	1137	50.79	2.67	0.0010	0.7855
orfX	97	22.21	10.49	0.0021	0.8369
orfX	377	54.27	17.20	0.3199	0.2354
orfX	409	71.69	0.00	3.09E-05	0.0691
orfX	412	75.68	0.00	0.0002	0.0972
orfX	440	32.72	0.00	0.0007	0.2062
orfX	474	25.78	0.00	0.0002	0.2678
orfX	666	12.16	9.91	0.0193	0.3840
rpl5	64	9.00	3.14	0.0027	0.2868
rps3	603	94.37	5.93	0.4563	0.2694
rps3	1470	8.91	3.73	1.58E-05	0.8640
rps3	1534	58.11	5.33	0.1362	0.0848
rps4	524	91.17	7.83	0.1950	0.2826

Tabelle 21. Signifikanzanalyse der abweichenden Editingeffizienz zwischen MORF1 und MORF3 und der mit dem Konstrukt 35S:: M3M1N3C3 transformierten Linie *morf1-1.*

Transkript	Locus	Mittelwert Editingeffizienz X(morf1-1 : 35S::M3M1N3C3)	Standardabweichung σ ²	p-Wert morf1-1: MORF1 morf1-1: M3M1N3C3	p-Wert morf1-1: MORF3 morf1-1: M3M1N3C3
atp4	138	23.35	0.00	0.0001	0.7369
atp9	167	80.39	0.00	0.0017	0.0262
ccb203	176	50.19	0.00	0.0035	0.2024
ccb203	208	7.18	0.00	0.0247	0.0397
ccb206	80	35.30	0.00	0.0113	-
ccb206	380	74.37	0.00	0.0029	0.4364
ccb206	424	46.83	0.00	7.47E-06	0.6844
ccb206	551	50.48	0.00	0.0016	0.2026
ccb206	566	46.81	0.00	0.0184	0.0414
ccb256	184	36.31	0.00	0.0052	0.4078
ccb256	421	8.32	0.00	0.0005	0.7755
ccb256	458	75.98	0.00	0.0233	0.2193
ccb256	673	30.89	0.00	0.0098	0.1117
cox3	257	17.57	4.07	0.0002	0.0008
matR	1807	15.99	0.66	0.0020	0.1085
nad1	500	23.53	3.67	0.0002	0.2443
nad2	995	66.26	5.11	0.0076	0.0117
nad4	836	47.24	0.03	0.0075	0.7816
nad6	446	85.43	0.00	-	0.4906
nad6	463	60.80	0.00	0.0452	0.1288
nad7	795	30.11	9.17	0.0106	0.2852
nad7	1137	50.00	0.00	0.0001	0.8694
orfX	97	34.66	27.59	0.0436	0.5771
orfX	377	69.27	6.94	0.9040	0.7405
orfX	409	85.02	10.24	0.1361	0.9756
orfX	412	89.06	7.81	0.1633	0.5721
orfX	440	57.35	17.65	0.0202	0.0818
orfX	474	7.40	3.26	3.40E-05	0.4970
orfX	666	2.87	0.13	0.0047	0.0167
rpl5	64	6.52	0.00	0.0221	0.2709
rps3	603	86.29	9.91	0.1732	0.1457
rps3	1470	8.77	0.00	0.0009	0.8767
rps3	1534	47.84	0.00	0.0244	0.1710
rps4	524	63.88	0.00	1.80E-05	0.6219

11 Publikationsliste

11.1 Publikationen

Glass F, Härtel B, Zehrmann A, Verbitskiy D, Takenaka M (2015). MEF13 requires MORF3 and MORF8 for RNA editing at eight targets in mitochondrial mRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant*; 8 (10), 1466-1477

Takenaka M, Verbitskiy D, Zehrmann A, Härtel B, Bayer-Császár E, **Glass F**, Brennicke A (2014). RNA editing in plant mitochondria - Connecting RNA target sequences and acting proteins. Mitochondrion; 19, 191-197

Zehrmann A, Härtel B, **Glass F**, Bayer-Császár E, Obata T, Meyer E, Takenaka M (2015). Selective Homo- and Heteromer Interactions between the Multiple Organellar RNA Editing Factor (MORF) Proteins in Arabidopsis thaliana. The Journal of Biological Chemistry, 290(10), 6445–6456

Brehme N, Bayer-Császár E, **Glass F**, Takenaka M (2015). The DYW Subgroup PPR Protein MEF35 Targets RNA Editing Sites in the Mitochondrial rpl16, nad4 and cob mRNAs in Arabidopsis thaliana. PLoS ONE; 10(10), e0140680

11.2 Kongressvorträge

Glass F (2014). Interaction of RNA Editing Factors -Locating the Binding Sites in MORF and PPR Proteins. "MiteCross" Summer School for PhD students: Strachourg 01 02 Juli 2014

"MitoCross" Summer School for PhD students; Strasbourg, 01. – 02. Juli 2014

Glass F (2015). PPR RNA editing factors and MORF proteins make up plant organellar editosomes.

8. RegioPlantScicence Meeting Stuttgart-Tübingen-Ulm; Ulm, 20. Februar 2015

11.3 Poster

- Glass F, Zehrmann A, Takenaka M, Brennicke A (2014). Deciphering the interaction interface of MORF proteins.
 XVI. Annual Meeting of the International Society of Endocytobiology German Section (ISE-G); Herzogenhorn, 21. 24. Juli 2014
- Takenaka M, Zehrmann A, Glass F, Brehme N, Bayer-Császá E, Stegherr H, Verbitskiy D, Graichen K, Brennicke A (2014). Refinement and Verification of the RNA Recognition Code for PPR RNA Editing Factors.
 XVI. Annual Meeting of the International Society of Endocytobiology German Section (ISE-G); Herzogenhorn, 21. 24. Juli 2014

- <u>Verbitskiy D</u>, Zehrmann A, Brehme N, **Glass F**, Takenaka M (2014). Strategy for the purification of RNA editing complexes from isolated mitochondria. XVI. Annual Meeting of the International Society of Endocytobiology German Section (ISE-G); Herzogenhorn, 21. 24. Juli 2014
- Marchetti MF, **Glass F**, Brennicke A, Pagnussat GC, Zabaleta EJ (2014). Mitochondrial PPR-containing proteins are essential in embryo development in Arabidopsis thaliana. Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB); Rosario (Argentinien), 11.- 14. November 2014
- Glass F, Härtel B, Zehrmann A, Verbitskiy D, Takenaka M (2015). MEF13 requires a protein complex of both MORF3 and MORF8 for RNA editing at all eight targets in mitochondrial mRNAs in *Arabidopsis thaliana*"
 28. Tagung Molekularbiologie der Pflanze; Darbringhausen, 24.-27. Februar 2015
- Glass F, Zehrmann A, Takenaka M, Brennicke A (2015). Analysis of the RNA editing protein interaction network.
 9th International Conference for Plant Mitochondrial Biology (ICPMB); Wroclaw, 18.-22. Mai 2015

12 Danksagung

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

13 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Arbeit selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, sowie wörtliche und inhaltlich übernommene Stelle als solche kenntlich gemacht habe.

Ulm, den

Franziska Glass

14 Curriculum vitae

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Teile der in dieser Dissertation präsentierten Daten wurden bereits in folgenden Fachartikeln veröffentlicht:

Zehrmann A, Härtel B, Glass F, Bayer-Császár E, Obata T, Meyer E, Brennicke A, Takenaka M. Selective Homo- and Heteromer Interactions between the Multiple Organellar RNA Editing Factor (MORF) Proteins in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*. 2015; 290, 6445-6456.

Glass F, Härtel B, Zehrmann A, Verbitskiy D, Takenaka M. MEF13 Requires MORF3 and MORF8 for RNA Editing at Eight Targets in Mitochondrial mRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant*. 2015; 8(10), 1466-1477