

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung kernkodierter RNA-Polymerasen vom Phagentyp aus *Arabidopsis thaliana*

Um bei Pflanzen die für Mitochondrien zuständige RNA-Polymerase zu identifizieren, wurden die homologen kernkodierten Phagentyp-ähnlichen RNA-Polymerase-Sequenzen aus *Homo sapiens* (Tiranti *et al.* 1997) und *Saccharomyces cerevisiae* (Kelly *et al.* 1986) mit Hilfe der BLAST-Suchfunktion nach entsprechenden EST-Sequenzen (expressed sequence tag) der *Arabidopsis*-Datenbank durchsucht. Dabei konnten zwei überlappende ESTs (D24565 und D23514) identifiziert werden. Diese Teil-Sequenzen dienten als Basis zur Primerableitung, welche zur Amplifizierung eingesetzt wurden. Je nach verwendetem Template (genomisch bzw. cDNA), und abhängig vom Primerpaar, wurden die in Abbildung 1 dargestellten *Arabidopsis*-spezifischen Fragmente mit Hilfe der PCR gewonnen.

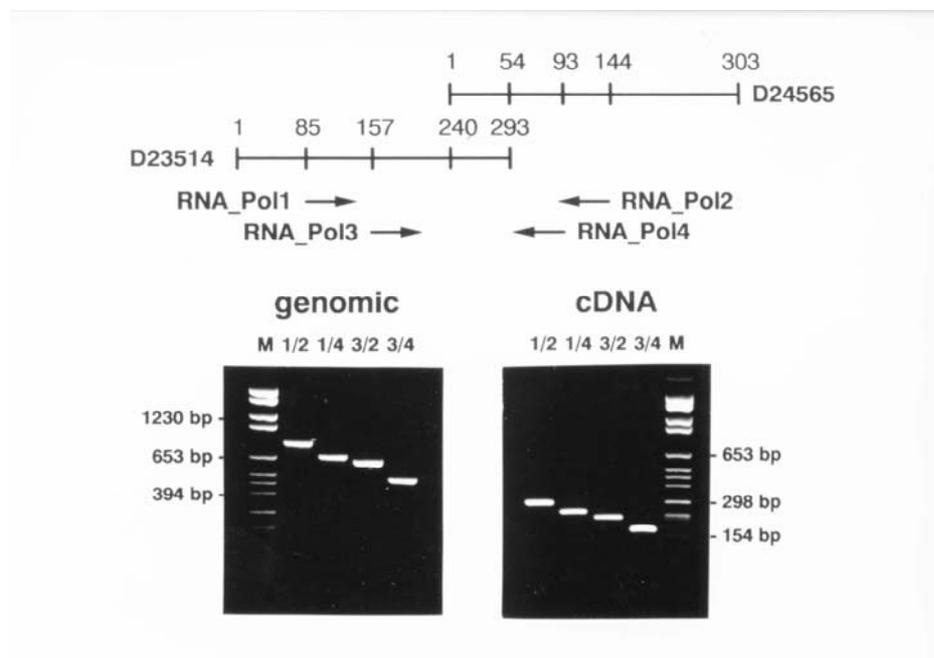


Abb. 1: Identifizierung von Phagentyp-ähnlichen RNA-Polymerasen in *Arabidopsis thaliana*.

Im oberen Teil der Abbildung sind die überlappenden ESTs schematisch dargestellt, die Homologien zu RNA-Polymerasen zeigen. Die zur Amplifizierung benutzten Primerpaare sind darunter gezeigt. Im unteren Teil der Abbildung sind die PCR-Produkte in Abhängigkeit des eingesetzten Templates mit den unterschiedlichen Primerkombinationen dokumentiert.

Um die vollständige genomische Sequenz zu erhalten, wurde das PCR-Fragment (Primer RNA_Pol1 und RNA_Pol2) als Probe zur Hybridisierung gegen eine genomische *Arabidopsis*-BAC Bibliothek (Mozo *et al.* 1998) eingesetzt. Abbildung 2 zeigt die identifizierten BACs, die jeweils mit *Bam*HI bzw. *Pst*I verdaut wurden und nach Hybridisierung die RNA-Polymerase-umfassenden Fragmente aufweisen. Die identifizierten Fragmente wurden subkloniert und anschließend sequenziert.

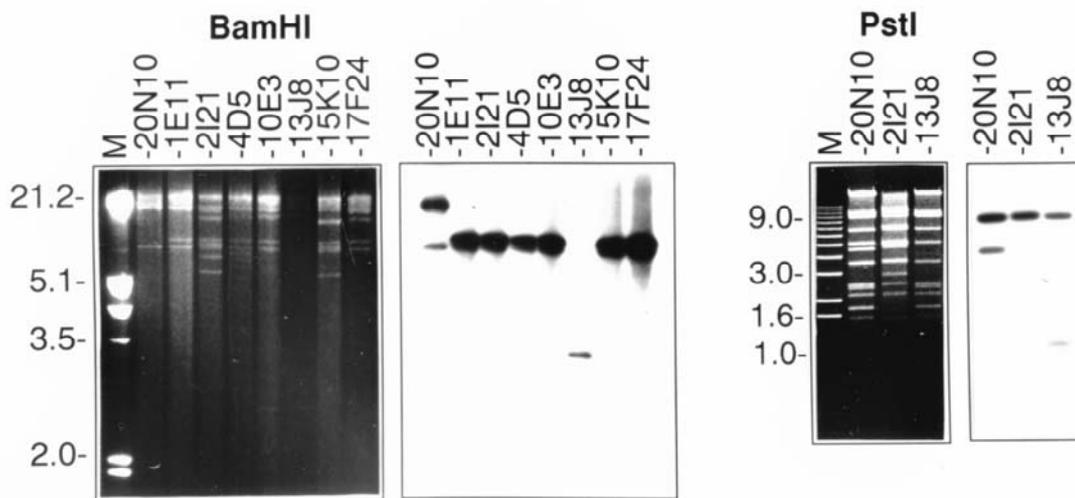


Abb. 2: Identifizierung der Lage der RNA-Polymerasen auf den BAC-Klonen.

Im linken Teil der Abbildung sind die mit *Bam*HI verdauten und gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Proben der BACs zu sehen. Rechts daneben die Darstellung des Southern Blots nach der Hybridisierung der verdauten BAC-DNAs mit dem PCR-Fragment. Auf der rechten Seite der Abbildung sind wiederum gelelektrophoretisch aufgetrennte BAC-DNA-Klone gezeigt, diesmal mit *Pst*I verdaut (links). Rechts daneben der zugehörige Southern Blot nach der Hybridisierung der verdauten BAC-DNA mit dem PCR-Fragment (1/2; siehe Abb. 1)

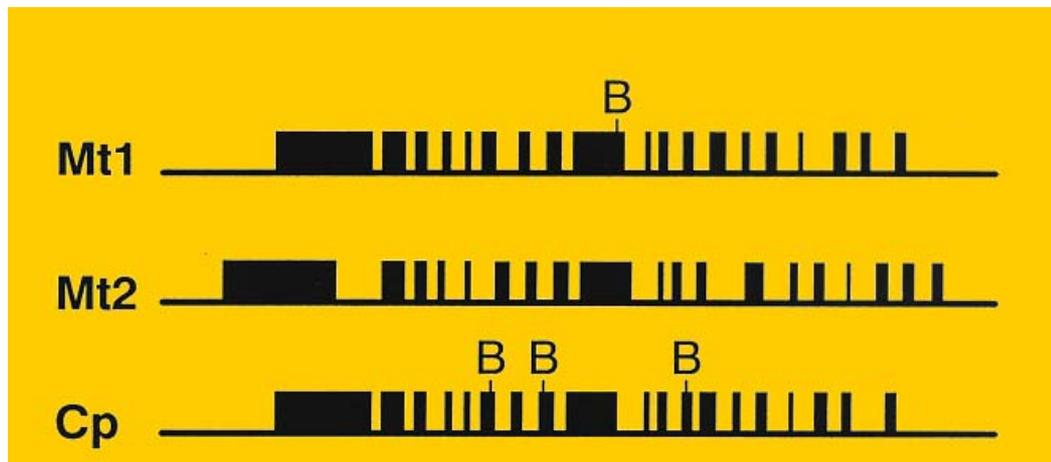
Bei geringerer Stringenz der Waschgänge nach der Hybridisierung in die BAC-Bibliothek konnten zwei zusätzliche BAC-Cluster identifiziert werden, die auf weitere sehr ähnliche RNA-Polymerase-Sequenzen (nicht gezeigt) hinwiesen und möglicherweise zusätzliche Genkopien darstellen.

Insgesamt konnten damit drei kernkodierte RNA-Polymerasen vom Phagen-Typ für *Arabidopsis thaliana* kloniert werden. Angaben zu den Sequenzdaten und Bezeichnungen der Gene sind in Tab. 3 wiedergegeben.

Tab. 3: Bezeichnungen der RNA-Polymerasen und Gen-Datenbank-Nummern

Bezeichnung der RNA-Polymerase	Gen-Datenbank-Nummer	Sequenz-Autoren
RNA-Polymerase 1 (Pol.1, Mt1, RpoT;1)	Y09432/At1g68990	W.Schuster 1996
RNA-Polymerase 2 (Pol.2, Mt2, RpoT;2)	AJ001037/At5g15700	H. Sanchez und W.Schuster 1997
RNA-Polymerase 3 (Pol.3, Cp, RpoT;3)	Y08722/At2g24120	Hedtke <i>et al.</i> 1996/ W.Schuster 1997

Die drei Gene der RNA-Polymerasen zeigen identische Genstruktur, wobei sie sich in 19 Exons und 18 Introns aufgliedern (siehe Abb. 3). Dabei sind die Exongrößen der Exons 1 und 2 am unterschiedlichsten, die Differenzen betragen hier zwischen 20bp und 80bp. Die Größen der Exons 3-6 sind bis auf wenige Basenpaare fast gleich. Von Exon 7 bis Exon 18 sind die Größen der Exons vollkommen identisch. Exon 19 ist für RNA-Polymerase 1 und 2 fast gleich groß (107bp und 110bp), während es für die RNA-Polymerase 3 fünf Mal so groß ist. Die Größen der Introns weichen in stärkerem Maße voneinander ab, bei ihnen liegt die Größen-Differenz zwischen 4% und 87%. Abb. 3 stellt die Genstruktur der drei RNA-Polymerasen schematisch dar.

**Abb. 3: Gen-Struktur der drei RNA-Polymerasen vom Phagentyp in *Arabidopsis thaliana*.**

Schematische Darstellung der Exon-Intron-Abfolge der einzelnen Gene. Mt1 bezeichnet RNA-Polymerase 1, Mt2 RNA-Polymerase 2 und Cp RNA-Polymerase 3. Die Buchstaben B, in schwarz, kennzeichnen in den Sequenzen vorhandene BamHI-Schnittstellen. Die Exons sind durch schwarze Balken dargestellt, die Introns werden durch die Zwischenräume verdeutlicht.

Die Sequenzhomologien betragen in den Aminosäuresequenzen 55% zwischen RNA-Polymerase 1 (Mt1) und RNA-Polymerase 3 (Cp). Die Homologie nimmt vom N-terminalen zum C-terminalen Ende in der Aminosäuresequenz stark zu. Die Sequenz von RNA-Polymerase 2 stimmt am N-terminalen Ende stärker mit RNA-Polymerase 3 überein, während sie im weiteren Verlauf der RNA-Polymerase 1 ähnlicher ist. In der Sequenz von RNA-

Die genomischen Sequenzen des translatierenden Bereichs (ATG bis Stoppcodon) der drei in *Arabidopsis thaliana* bekannten kernkodierte RNA-Polymerasen vom Phagentyp sind 5254bp, 5827bp und 5643bp lang. Die Länge der cDNA-Sequenzen des translatierten Bereichs beträgt für Pol.1 2909bp, für Pol.2 3017bp und für Pol.3 3400bp.

Bei der Untersuchung der phylogenetischen Zusammenhänge dieser drei RNA-Polymerasen wurde festgestellt, dass sich zwei RNA-Polymerasen (RNA-Polymerase 1 (Mt1) und RNA-Polymerase 2 (Mt2)) stärker gleichen. Verglichen mit RNA-Polymerase 3 (Cp) zeigt sich eine weniger starke Homologie. Die drei RNA-Polymerasen von *Arabidopsis thaliana* bilden eine Gruppe, die zusammen mit den RNA-Polymerasen von Pilzen (*Saccharomyces* und *Neurospora*) in die Gruppe der Organellen-RNA-Polymerasen einzuteilen sind. Sie sind von den eigentlichen Phagen-RNA-Polymerasen phylogenetisch etwas weiter entfernt. Abbildung 5 gibt die Verwandtschafts-Analyse (Bootstrap-Analyse mit Hilfe von Puzzle; Strimmer und von Haeseler 1996) verschiedener RNA-Polymerasen wieder.

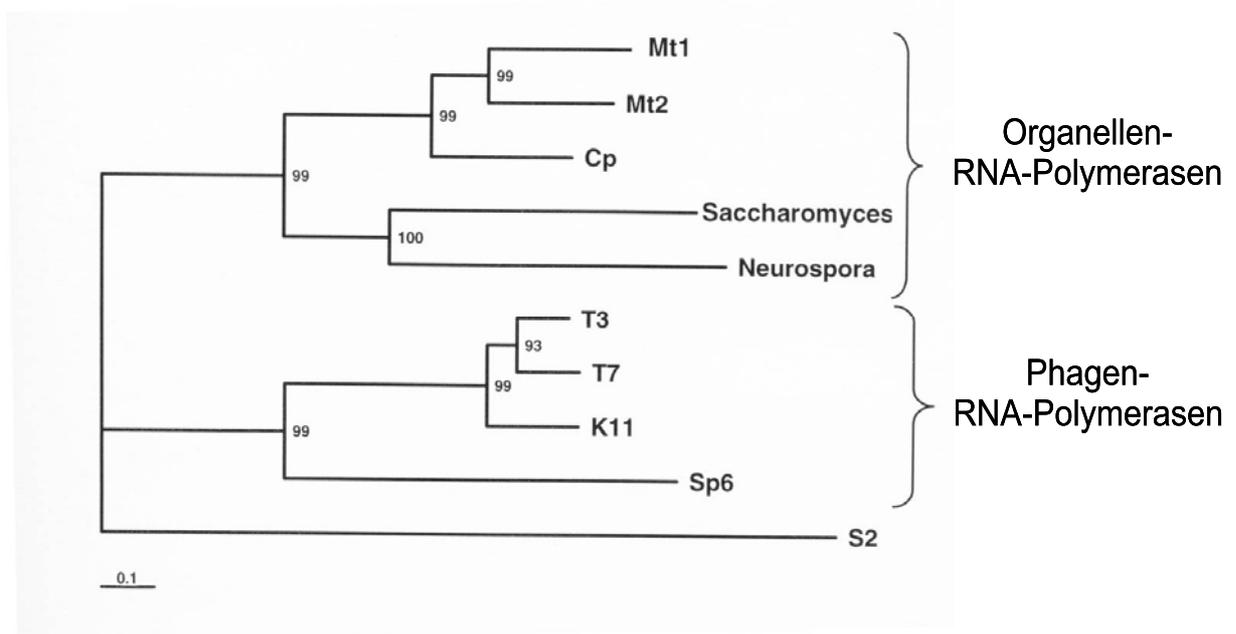


Abb. 5: Phylogenetische Analyse der kernkodierte Gene der RNA-Polymerasen in *Arabidopsis thaliana* mit RNA-Polymerase-Genen anderer Organismen.

Ergebnis der phylogenetischen Analyse mit Hilfe des „maximum likelihood“ Algorithmus. Als Ausgangsdaten wurden die DNA-Sequenzen der RNA-Polymerasen mit Hilfe des Programmes PILEUP (Genetics Computer Group, 1994) aneinander ausgerichtet und als Eingabe für das SEQBOOT Programm benutzt. Die so erhaltenen 100 Datensätze wurden genutzt, um 100 potentielle phylogenetische Bäume zu errechnen. Die Verzweigungslängen repräsentieren die relative Entfernung der einzelnen Gruppen voneinander. Der Balken unten links gibt 1/10 der maximalen evolutiven Entfernung wieder. Mt1, Mt2 und Cp stehen für die Gene der RNA-Polymerasen 1-3 von *Arabidopsis thaliana*, T3 (McGraw *et al.* 1985), T7 (Moffat *et al.* 1984), K11 und SP6 (Kotani *et al.* 1987) für die Gene von Bakteriophagen, und S2 für die orf-Sequenz auf dem linearen Plasmid in *Zea mays* (Oeser 1988).

3.2 Lokalisierung der Phagentyp-ähnlichen RNA-Polymerasen in der Zelle

Die Tatsache, dass in *Arabidopsis thaliana* insgesamt drei RNA-Polymerasen vom Phagentyp gefunden werden konnten, wirft die Frage auf, wozu diese Enzyme benötigt werden. Denkbar wäre es, dass sie unterschiedliche Funktionen übernehmen oder unterschiedlichen Wirkorten zugeordnet werden können. Sequenzdaten der RNA-Polymerasen in *Arabidopsis thaliana* ermöglichten eine weitergehende Untersuchung dieser Enzyme. So konnte z. B. mit Hilfe des Programms PSORT eine Vorhersage über die mögliche Lokalisierung der drei RNA-Polymerasen innerhalb der Zelle getroffen werden.

Wie in Abb. 4 dargestellt, unterscheiden sich die drei RNA-Polymerasen am N-terminalen Ende stärker voneinander als am C-terminalen Ende. Da die drei untersuchten Gene kernkodiert sind, verfügen sie über sogenannte Präsequenzen bzw. Transitsequenzen, die dafür sorgen, dass der Transport der Genprodukte in die entsprechenden Kompartimente erfolgt. Diese Prä- und Transitsequenzen befinden sich am N-terminalen Ende des Proteins. Die Tatsache, dass sich die drei RNA-Polymerasen in diesen Sequenzabschnitten unterscheiden, weist auf eine unterschiedliche Lokalisierung der RNA-Polymerasen innerhalb der Zellkompartimente hin. Mit Hilfe der oben genannten Programme wurde für RNA-Polymerase 1 eine Lokalisierung in den Mitochondrien und für die RNA-Polymerase 3 eine Lokalisierung in den Chloroplasten vorhergesagt. Die Lokalisierungsvorhersage für RNA-Polymerase 2 war nicht eindeutig. Die Aminosäuresequenz mit der Initiation am 1. ATG-Codon (1011 Aminosäurereste) ergab eine potentielle Lokalisierung des Proteins im Chloroplasten und im Kern. Die Sequenz, die am 2. ATG beginnt (972 Aminosäuren) führt zu einer Lokalisierung des Proteins im Mitochondrium. Die RNA-Polymerasen erhielten aufgrund der vorhergesagten Lokalisierungen die abgekürzten Bezeichnungen Mt1 und Mt2 (für RNA-Polymerase 1 und 2) sowie Cp (für RNA-Polymerase 3; siehe Tab. 3).

Anhand von Import-Versuchen *in organello*, sowie mittels GFP-Nachweis von Fusionsproteinen *in vivo* sollten diese Vorhersagen überprüft werden.

3.2.1 *In Organello*-Import von *in vitro*-translatierten RNA-Polymerase-Proteinen

Ob ein Import der RNA-Polymerasen in die Organellen tatsächlich stattfindet, sollte anhand von *in vitro*-translatierten Exon 1-RNA-Polymerase-Sequenzen untersucht werden. Für jede der drei RNA-Polymerasen wurde anhand der erstellten Sequenzen Primerpaare ausgesucht. Dabei bestand der Primer am 5'-Ende aus der T7-Promotorsequenz und einer 8bp, 13bp bzw.

einer 15bp langen upstream Sequenz vor dem eigentlichen Startcodon (ATG) und den ersten Basentriplets der kodierenden Sequenz. Der gegenläufige Primer bestand jeweils aus einer Sequenz im Intron 1 kurz hinter dem Ende des Exons 1. Mit Hilfe des TNT®T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) wurde die Transkription bzw. Translation des gewünschten Proteins mittels T7 RNA-Polymerase anhand des PCR-Produktes durchgeführt. Die Markierung des *in vitro*-translatierten Proteins erfolgte mit [³⁵S]-Methionin.

3.2.1.1 Import in Mitochondrien

Das *in vitro*-translatierte Protein wurde anschließend mit isolierten Mitochondrien inkubiert. Die Hälfte der Ansätze wurde als Kontrolle mit Valinomycin behandelt, da dadurch der Import verhindert wird.

Alle Ansätze wurden jeweils in drei Teile untergliedert. Der erste Ansatz wurde ohne weiteren Zusatz zum Import eingesetzt, der zweite wurde mit Proteinase K-Zusatz behandelt, welcher zum Verdau der ungeschützten Proteine führt. Der dritte Ansatz wurde sowohl mit Proteinase K als auch mit Triton X-100 behandelt, um diesen Abbau zu bestätigen.

Bei der Inkubation von isolierten Mitochondrien mit dem *in vitro*-translatierten Proteinteil (Exon 1) von RNA-Polymerase 1 konnte sowohl das Präprotein, als auch das prozessierte Protein nachgewiesen werden. Nach erfolgreichem Proteinase K-Verdau blieb in diesem Fall nur noch das geschützte Protein übrig, während nach dem Zusatz von Triton X-100, auch die geschützte Form des Proteins nicht mehr nachzuweisen war. Bei der Hemmung durch Valinomycin fand keinerlei Import in die Mitochondrien statt. Die Ergebnisse für das *in vitro*-translatierte RNA-Polymerase 2-Produkt decken sich vollständig mit denen von RNA-Polymerase 1. Es konnte also auch hier ein Import in die Mitochondrien nachgewiesen werden. Das *in vitro*-translatierte RNA-Polymerase 3-Produkt, wird auch ohne Zusatz von Valinomycin nicht in die Mitochondrien importiert, wird somit auch bei beiden Versuchsansätzen durch den Proteinase K-Verdau abgebaut.

Abbildung 6 zeigt die Ergebnisse für die einzelnen RNA-Polymerasen mit den unterschiedlichen Import-Ansätzen und bei Zugabe der unterschiedlichen Reagenzien.

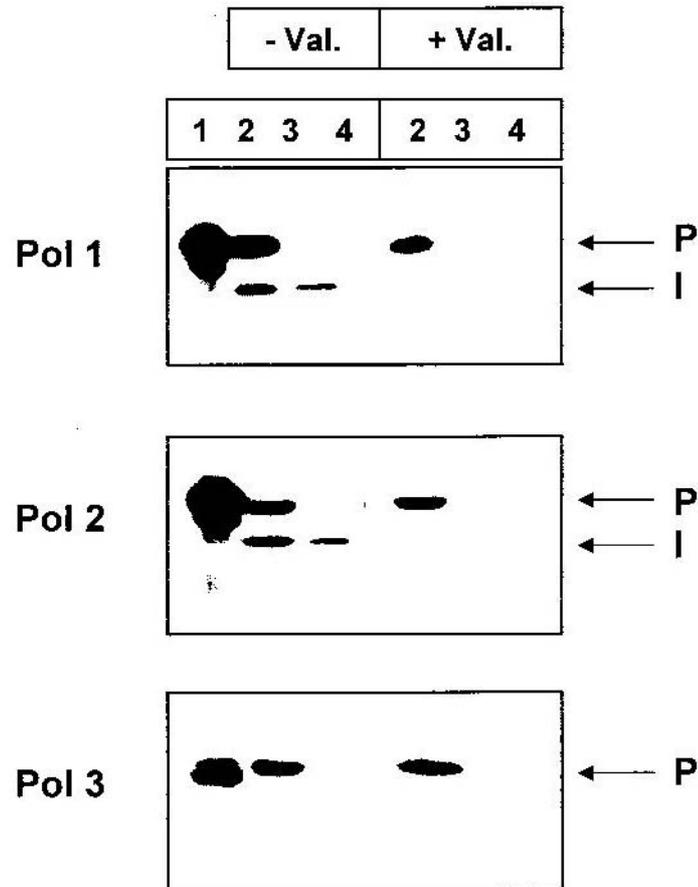


Abb. 6: In organello-Import in Mitochondrien.

Die mit [³⁵S]-markierten *in vitro*-translatierten Proteine (RNA-Polymerase 1, 2 und 3) wurden mit isolierten Mitochondrien inkubiert. Auf der linken Seite der Abbildung sind die Versuchsansätze ohne Zusatz von Valinomycin gezeigt (- Val.). Das eingesetzte Protein wurde jeweils in Spur 1 aufgetragen (nicht importiertes, größeres Präprotein). Der *in vitro*-translatierte Proteinteil (Exon 1) von RNA-Polymerase 1 und RNA-Polymerase 2 wurde, wie zu sehen ist, bei Inkubation mit Mitochondrien und ohne Zusatz von Valinomycin in diese importiert (Spur 2). Nach Proteinase K-Verdau kann nur noch das in die Mitochondrien importierte Protein nachgewiesen werden (es wird in den Mitochondrien vor dem Verdau durch die Proteinase K geschützt; Spur 3). Bei Zugabe von Triton X-100, welches die Mitochondrien zerstört, wird auch das zuvor durch die Mitochondrien geschützte importierte Protein durch die Proteinase K verdaut (Spur 4). Bei den Ansätzen mit Valinomycin-Zusatz kann nur das eingesetzte Protein nachgewiesen werden, es findet kein Import statt. Die Ergebnisse für das *in vitro*-translatierte RNA-Polymerase 2-Produkt decken sich vollständig mit denen von RNA-Polymerase 1. Das *in vitro*-translatierte RNA-Polymerase 3-Produkt, wird auch ohne Zusatz von Valinomycin nicht in die Mitochondrien importiert, wird somit auch bei beiden Versuchsansätzen durch den Proteinase K-Verdau abgebaut. P-Präprotein (nicht importiert); I-importiertes Protein (Schutz vor Proteinase K).

3.2.1.2 Import in Chloroplasten

Auch mit isolierten Chloroplasten wurde ein Importversuch der *in vitro*-translatierten RNA-Polymerase-Proteine durchgeführt. Dabei wurden jeweils zwei Ansätze unterschiedlich behandelt, einer mit Proteinase K-Verdau und einer ohne Proteinase K-Verdau.

Es zeigte sich dabei, dass das Präprotein von RNA-Polymerase 1 lediglich ohne Proteinase K-Verdau nachgewiesen werden konnte. Nach Proteinase K-Verdau ist kein importiertes Protein mit einer Größe von 22,2 kDa nachweisbar. Bei RNA-Polymerase 2 als auch bei RNA-Polymerase 3 konnte im Gegensatz dazu ein Proteinase K-geschütztes Protein nachgewiesen

werden. Somit ist festzuhalten, dass RNA-Polymerase 1 nicht in die Chloroplasten importiert wird, während die Transitsequenzen von RNA-Polymerase 2 als auch RNA-Polymerase 3 offensichtlich für einen Transport in die Chloroplasten sorgen. Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse des Importversuchs in Chloroplasten für die drei verschiedenen RNA-Polymerase-Proteine mit und ohne Proteinase K-Verdau.

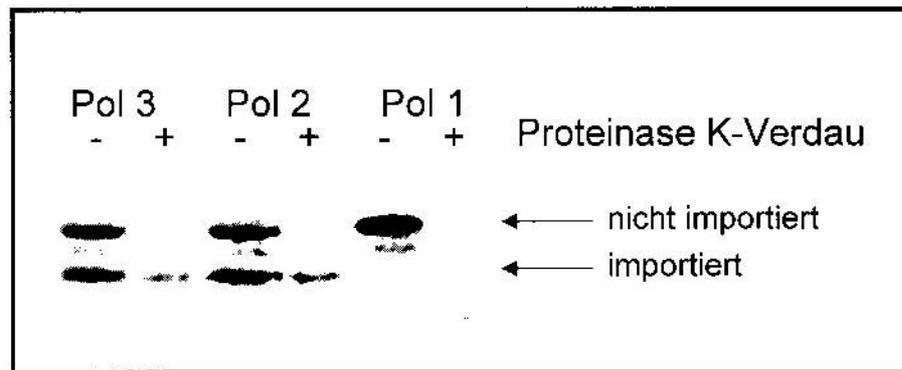


Abb. 7: Import in Chloroplasten.

Die mit [³⁵S]-markierten *in vitro*-translatierten RNA-Polymerasen-Proteine wurden mit Chloroplasten inkubiert. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse der Inkubation der Chloroplasten mit den *in vitro*-translatierten Proteinen vor (-) und nach (+) dem erfolgten Proteinase K-Verdau. Für RNA-Polymerase 3 und 2 kann in beiden Fällen jeweils ein prozessiertes Protein (importiert) nachgewiesen werden. Es wird durch die Chloroplasten vor dem Verdau durch Proteinase K geschützt. Das nicht geschützte Präprotein wird abgebaut (nicht importiert). Für RNA-Polymerase 1 kann nur das Präprotein ohne Proteinase K-Verdau dokumentiert werden, da das Protein offensichtlich nicht in die Chloroplasten importiert und somit durch Proteinase K abgebaut wird.

3.2.2 Lokalisierung der unterschiedlichen RNA-Polymerasen *in vivo* mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen

Um nach den erfolgreichen Import-Versuchen die Lokalisierung der einzelnen RNA-Polymerasen *in vivo* nachzuweisen, wurden GFP-Fusionen (in pBin-mGFP5; Haseloff *et al.* 1997) mit dem jeweiligen N-terminalen Teil der RNA-Polymerase-Sequenz eingesetzt. Für RNA-Polymerase 1 (Mt1) wurde die Sequenz der ersten 97 Aminosäuren, für RNA-Polymerase 2 (Mt2) die Sequenz für die ersten 102 Aminosäuren (bzw. 142 Aminosäuren) und für RNA-Polymerase 3 die Sequenz für die ersten 101 Aminosäuren eingesetzt.

Diese Fusionssequenzen standen unter der Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors. Die Vektoren wurden anschließend mittels *Agrobakterien*-vermitteltem Gentransfer in C24 Wildtyp-Pflanzen transformiert. Nach erfolgter Transformation, anschließender Ernte der Samen und Selektion der erfolgreich transformierten Pflanzen, wurden aus dem Material dieser Pflanzen Protoplasten isoliert. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden diese auf die Lokalisierung (den Transport) der Fusionsproteine hin untersucht.

In den Pflanzen, die mit dem Konstrukt RNA-Polymerase 1::GFP transformiert worden waren, wurde eine Lokalisierung in den Mitochondrien nachgewiesen. Wie in Abbildung 8 zu erkennen ist, konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie die GFP-Färbung eindeutig in den Mitochondrien nachgewiesen werden. Die als große gelbe Punkte sichtbaren Chloroplasten würden eine weitere GFP-Färbung vermuten lassen. In der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie war jedoch eindeutig nur die Autofluoreszenz der Chloroplasten zu erkennen, woraus man schließen kann, dass es sich bei der GFP-Färbung um aufgelagerte Mitochondrien handeln muss.

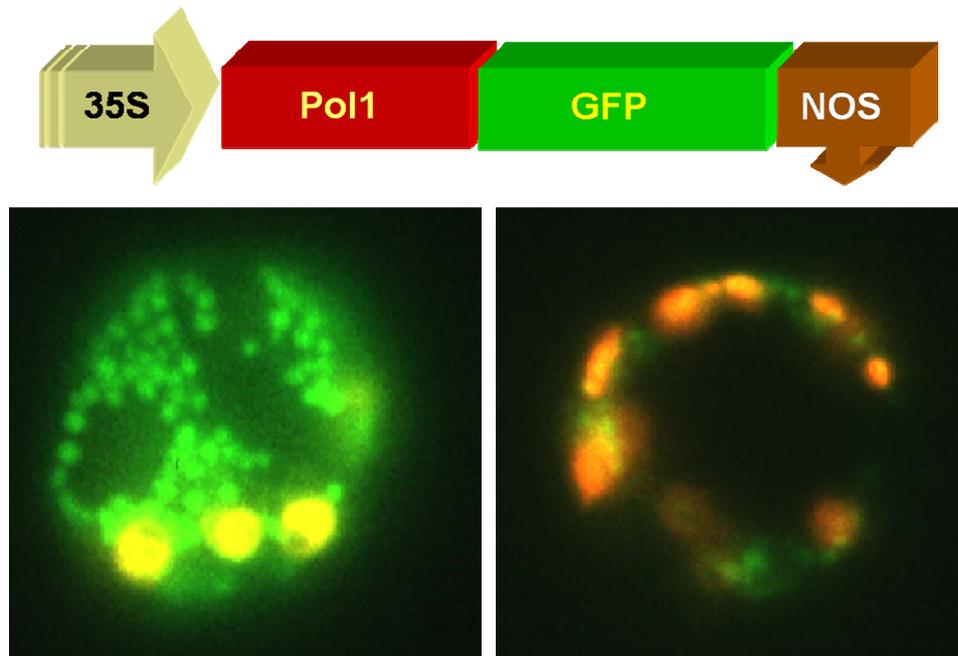


Abb. 8: Lokalisierung der RNA-Polymerase 1 in Mitochondrien.

Im oberen Teil der Abbildung ist ein Ausschnitt aus dem Klonierungsvektor zur Herstellung des RNA-Polymerase 1::GFP-Fusionsproteins dargestellt. Die Sequenz für die N-terminalen 97 Aminosäuren der RNA-Polymerase 1 (Mt1) wurde in die *Bam*HI-*Eco*RI-Schnittstelle vor das GFP und hinter den 35S-Promotor gesetzt. Im unteren Teil der Abbildung sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von *Arabidopsis thaliana*-Protoplasten mit RNA-Polymerase 1 (Mt1)::GFP-Fusionsprotein zu sehen. Links ist ein Protoplast mit GFP-markierten Mitochondrien zu erkennen. Rechts ist ein Protoplast zu sehen, in dem die Grünfärbung der Mitochondrien durch die Autofluoreszenz der daneben liegenden Chloroplasten stark überstrahlt wird.

Bei Pflanzenmaterial mit dem Fusionsprodukt von GFP und RNA-Polymerase 2 konnte eine Lokalisierung sowohl in den Chloroplasten als auch in den Mitochondrien festgestellt werden. Abbildung 9 zeigt die entsprechenden mikroskopischen Bilder (konfokale Fluoreszenzmikroskopie, blau unterlegt). Mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie war es möglich, mittels Einsatz unterschiedlicher Filter zuerst die Autofluoreszenz der Chloroplasten, die reine GFP-Färbung und eine Überlagerung beider Färbungen zu dokumentieren. Somit ist deutlich zu erkennen, dass neben der GFP-Färbung in den Chloroplasten auch in den Mitochondrien eine GFP-Färbung vorlag.

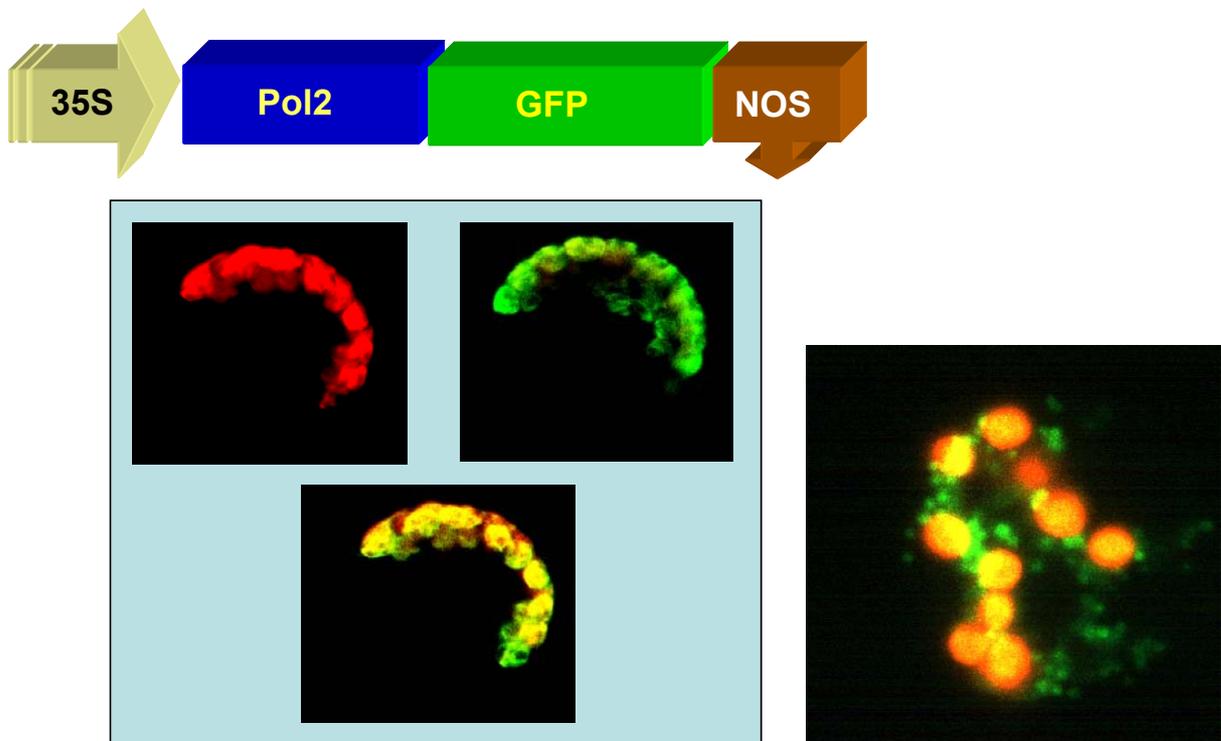


Abb. 9: Lokalisierung der RNA-Polymerase 2 in unterschiedlichen Organellen.

Im oberen Bereich der Abbildung ist der Ausschnitt aus dem Klonierungsvektor zur Herstellung des RNA-Polymerase 2::GFP-Fusionsproteins dargestellt. Die Sequenz für die N-terminalen 102 bzw. 142 Aminosäuren der RNA-Polymerase 2 (Mt2) wurde in die *Bam*HI-*Eco*RI-Schnittstelle vor das GFP und hinter den 35S-Promotor gesetzt. Unten links (blau unterlegt) sind die konfokalen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von *Arabidopsis thaliana*-Protooplasten mit RNA-Polymerase 2 (Mt2)::GFP-Fusionsprotein dargestellt, links die Autofluoreszenz der Chloroplasten (rot), rechts die GFP-Färbung und darunter die Überlagerung beider Färbungen. Es ist deutlich zu erkennen, dass außer der GFP-Färbung der Chloroplasten (durch Überlagerung gelb) eine weitergehende Grünfärbung vorhanden ist, die auf die Lokalisierung in den Mitochondrien zurückzuführen ist. Unten rechts ist die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines *Arabidopsis thaliana*-Protooplasten mit importiertem RNA-Polymerase 2 (Mt2)::GFP-Fusionsprotein zu sehen. Deutlich kann man die Überlagerung der Chloroplasten-Autofluoreszenz und der GFP-Färbung (gelb), sowie die Grünfärbung durch GFP der Mitochondrien erkennen.

Bei Pflanzen, die das Fusionsprotein RNA-Polymerase 3::GFP exprimierten, zeigte es sich, dass sie deformierte und asymmetrisch geformte Blätter aufwiesen. Weiterhin trat eine ungleichmäßige und nur teilweise Grünfärbung der Blätter auf. Abb. 10 zeigt ein Beispiel dieses speziellen Phänotyps. Die Untersuchung des grün gefärbten Gewebes ergab eindeutig eine ausschließliche Lokalisierung des Fusionsproteins in den Chloroplasten. Eine Untersuchung des entfärbten, weißlichen Gewebes mittels Fluoreszenzmikroskopie erbrachte einen Hinweis auf die Störung in diesem Gewebe. Hier konnte das Fusionsprotein mittels GFP nicht nur in den Chloroplasten, sondern erstaunlicherweise auch im Nukleus nachgewiesen werden. Dabei kann es sich vermutlich um eine Form von „mistargeting“ handeln.

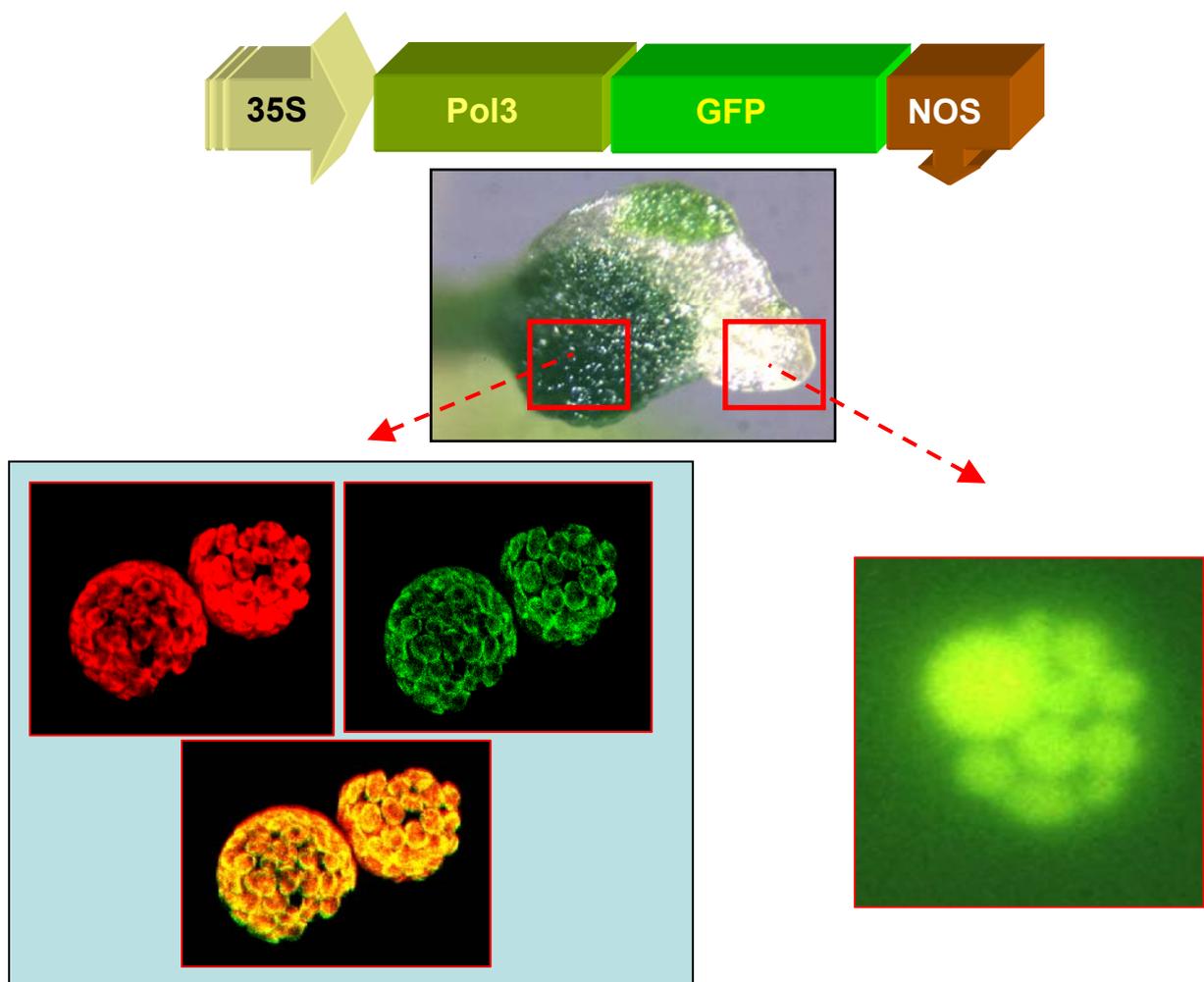


Abb. 10: Lokalisierung der RNA-Polymerase 3 in Plastiden.

Im oberen Teil der Abbildung kann man den Ausschnitt aus dem Klonierungsvektor zur Herstellung des RNA-Polymerase 3::GFP-Fusionsproteins erkennen. Die Sequenz für die N-terminalen 101 Aminosäuren der RNA-Polymerase 3 (Cp) wurde in die *Bam*HI-*Eco*RI-Schnittstelle vor das GFP und hinter den 35S-Promotor gesetzt. In der Mitte der Abbildung ist der ungewöhnliche Phänotyp der mit RNA-Polymerase 3::GFP transformierten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen gezeigt, charakteristisch das deformierte Blatt mit ungleichmäßiger Grünfärbung. Unten links (blau unterlegt) sind die konfokalen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von *Arabidopsis thaliana*-Protoplasten mit RNA-Polymerase 3 (Cp)::GFP-Fusionsprotein aus grünem Blattgewebe gezeigt. Unten rechts ist die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *Arabidopsis thaliana*-Protoplasten mit RNA-Polymerase 3 (Cp)::GFP-Fusionsprotein aus weißem Blattgewebe dargestellt.

Die Lokalisierungsversuche mit Hilfe der RNA-Polymerase::GFP-Fusionsproteine *in vivo* zeigten übereinstimmend mit den Import-Versuchen des *in vitro*-translatierten Teilproteins eine Lokalisierung von RNA-Polymerase 1 (Mt1) in den Mitochondrien, von RNA-Polymerase 2 (Mt2) erstaunlicherweise sowohl in den Mitochondrien und als auch in den Plastiden und von RNA-Polymerase 3 (Cp) einzig in den Plastiden.

3.3 Klonierung von *Antisense*- und *Sense*-Konstrukten

Die Tatsache, dass in *Arabidopsis thaliana* insgesamt drei kernkodierte, Phagentyp-RNA-Polymerasen existieren, die in unterschiedlichen Organellen lokalisiert sind, wirft eine Reihe von Fragen auf. Zum einen ist ungeklärt, inwieweit die Ähnlichkeit der drei RNA-Polymerasen zu einer Überschneidung der Funktionen führt. Denkbar wäre, dass alle drei RNA-Polymerasen dieselben Fähigkeiten besitzen und somit ein Austausch der Enzyme möglich ist, oder dass zu bestimmten Entwicklungsstadien mehr Organellentranskription notwendig ist. Andererseits lässt die Existenz dreier so ähnlicher RNA-Polymerasen, die jedoch in den unterschiedlichen Organellen lokalisiert sind, auf eine Spezialisierung dieser Enzyme in den Kompartimenten schließen. Mit Hilfe einer gezielten „Down“-Regulation der einzelnen RNA-Polymerasen sollte es daher möglich sein, diese Frage zu beantworten. Aufgrund der essentiellen Funktion der RNA-Polymerasen ist ein phänotypischer Effekt deregulierter Pflanzen zu erwarten. Ein vollständiger Ausfall (evtl. durch knock-out-Mutanten) auch nur einer RNA-Polymerase wäre für die entsprechenden Pflanzen sicherlich schwer zu kompensieren, so dass in der vorliegenden Untersuchung die *Antisense-Sense*-Methode gewählt wurde, um diese Beeinflussung vorzunehmen. Stockhaus *et al.* (1990) konnten zeigen, dass eine Expression von „*Antisense*“-Genen meist zu einer „Down“-Regulation des natürlichen Gens in der transformierten Pflanze führt. Dabei ist es möglich, sowohl vollständige genomische Gensequenzen, Teilsequenzen oder cDNA-Sequenzen, sowohl in *Antisense*- als auch in *Sense*-Orientierung in die Pflanzen einzubringen. Bisher gibt es keine übereinstimmende Meinung, welcher Genabschnitt oder welche Gengröße einen optimalen *Antisense*-Effekt auslöst (Bourque 1995). In allen Fällen erhält man eine Population transformierter Pflanzen, die die gesamte Bandbreite an Expressionsmöglichkeiten zeigt. Eine andere Möglichkeit, eine Reduktion von Genprodukten zu erreichen, ist die sogenannte RNAi-Methode (= RNAinterference), bei der eingeführte doppelsträngige RNA-Moleküle zu einem Abbau der Transkription und damit zu einer Verringerung der erzeugten

Genprodukte führen (Hannon 2002, Zamore 2001, Klink und Wolniak 2000, Tijsterman *et al.* 2001). Da zu Beginn dieser Arbeit diese Methode noch unbekannt war, konnte sie nicht eingesetzt werden.

Aus der Gen-Lokalisierung der RNA-Polymerasen ergibt sich eine weitere Frage. Da sich die RNA-Polymerase-Gene im Kern befinden, der Wirkungsort der Enzyme jedoch in den Chloroplasten und Mitochondrien liegt, wird in der pflanzlichen Zelle ein zuverlässiger Regulationsmechanismus benötigt, der die Steuerung der RNA-Polymerasenfunktion in den Organellen gewährleistet. Denkbar wären zu diesem Zweck Prozesse, wie das RNA-Editing, das sowohl in Chloroplasten als auch den Mitochondrien vorkommt und in unterschiedlich starkem Maß die Transkriptionsergebnisse posttranskriptional beeinflusst. Mit Hilfe von kernkodierten RNA-Editingfaktoren, aber auch anderer spezifischer Transkriptions- und Modulationsfaktoren, wäre eine Regulation der Organellentranskription durch den Kern denkbar. Um den Zusammenhang zwischen den kernkodierten RNA-Polymerasen und möglicher Regulationsprozesse zu untersuchen, wurde das RNA-Editing in Mitochondrien und Chloroplasten der *Antisense-Sense*-Pflanzenlinien näher betrachtet.

3.3.1 Auswahl der Genabschnitte zur *Antisense-/Sense*-Klonierung

Anhand der Sequenzen der drei RNA-Polymerasen konnten mittels PCR sowohl genomische als auch cDNA-Fragmente amplifiziert werden. Aufgrund ihrer Größe zwischen 5200bp und 5800bp wurden die genomischen Sequenzen für die Herstellung der *Antisense*-Konstrukte in zwei überlappende Genabschnitte unterteilt.

Die einzelnen Genabschnitte wurden wie in Abb. 13 gezeigt in die Vektoren pBinOligo bzw. des pBCM20 kloniert, die in Abbildung 11 schematisch dargestellt sind. Beim Vektor pBCM20 wurde lediglich die Resistenz für prokaryotische Organismen des pBinOligo (Kanamycin) gegen die Chloramphenicolresistenz ausgetauscht, um eine Klonierung in die Binärvektoren zu erleichtern. In beiden Fällen wurde der 35S-Promotor verwendet, um eine stabile Expression zu gewährleisten. Um eine einfache und richtungsorientierte Klonierung zu gewährleisten, wurde die Polylinkersequenz um acht Restriktionsstellen erweitert, die nur selten schneiden. Dabei handelte es sich um die in Abb. 11 gezeigten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme, *KpnI* (*Asp718*), *SmaI*, *AscI*, *XhoI*, *SpeI*, *PacI*, *XbaI* und *Sall*.

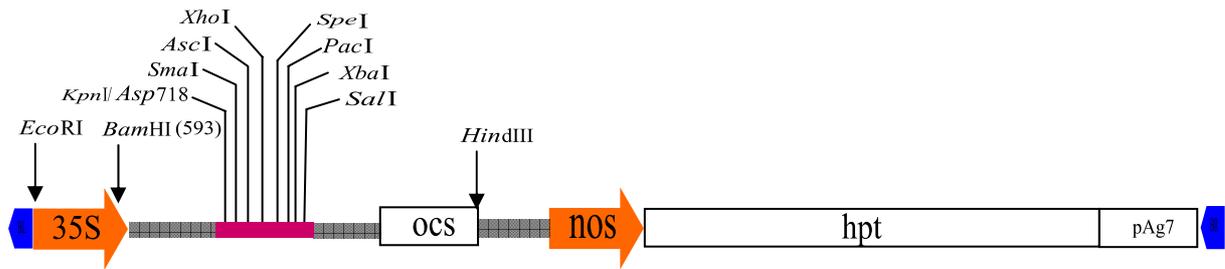


Abb. 11: Schematische Darstellung der T-DNA-Region in pBinOligo und pBCM20.

Die Expressionskassette mit dem Polylinker-Bereich (rot gekennzeichnet) zur Klonierung der *Antisense*- und *Sense*-Sequenzabschnitte befindet sich im Bereich eines *EcoRI/HindIII*-Fragments. (BL = left border; 35S = 35S-Promotor des Cauliflower Mosaic Virus; ocs = Terminationssequenz der Octopin-Synthetase; nos = Nopalinsynthetase-Promotor; hpt = Hygromycin B-Phosphotransferase-Gensequenz; pAg7 = Polyadenylierungssequenz des Gens 7; BR=right border).

In Ermangelung geeigneter Schnittstellen und um eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Gene zu bekommen, wurde die PCR-Herstellung benutzt, wodurch geeignete Restriktions-Schnittstellen eingebaut wurden.

Da eine Amplifizierung der gesamten genomischen Sequenzen der drei RNA-Polymerasen nicht möglich war, wurde die Sequenz von RNA-Polymerase 1 in Teilen von Exon 1 bis Exon 7 und von Exon 7 bis Exon 19 amplifiziert. Die Sequenz von RNA-Polymerase 2 wurde in zwei Bereiche (Exon 1 bis Exon 8 und von Exon 7 bis Exon 19) geteilt, der Sequenzbereich von RNA-Polymerase 3 wurde ebenfalls in zwei Teile, von Exon 1 bis Exon 9 und von Exon 8 bis Exon 19, getrennt.

Die cDNA-Konstrukte konnten in ihrer vollständigen Größe amplifiziert werden, so dass für die RNA-Polymerase 1 ein Fragment von 2909bp Länge, für RNA-Polymerase 2 ein Fragment mit 3017bp Länge und für RNA-Polymerase 3 ein 3400bp großes Fragment hergestellt werden konnte.

Abbildung 12 stellt in einer Übersicht die für die Pflanzentransformation hergestellten Vektoren dar. Die daran anschließende Abbildung 13 zeigt schematisch die eingesetzten Genabschnitte der drei RNA-Polymerasen. Dabei sind die Exon/Intronabschnitte maßstabsgetreu wiedergegeben. Der Unterschied der Exon- und Introngrößen in den verschiedenen Genen wird dadurch gut deutlich.

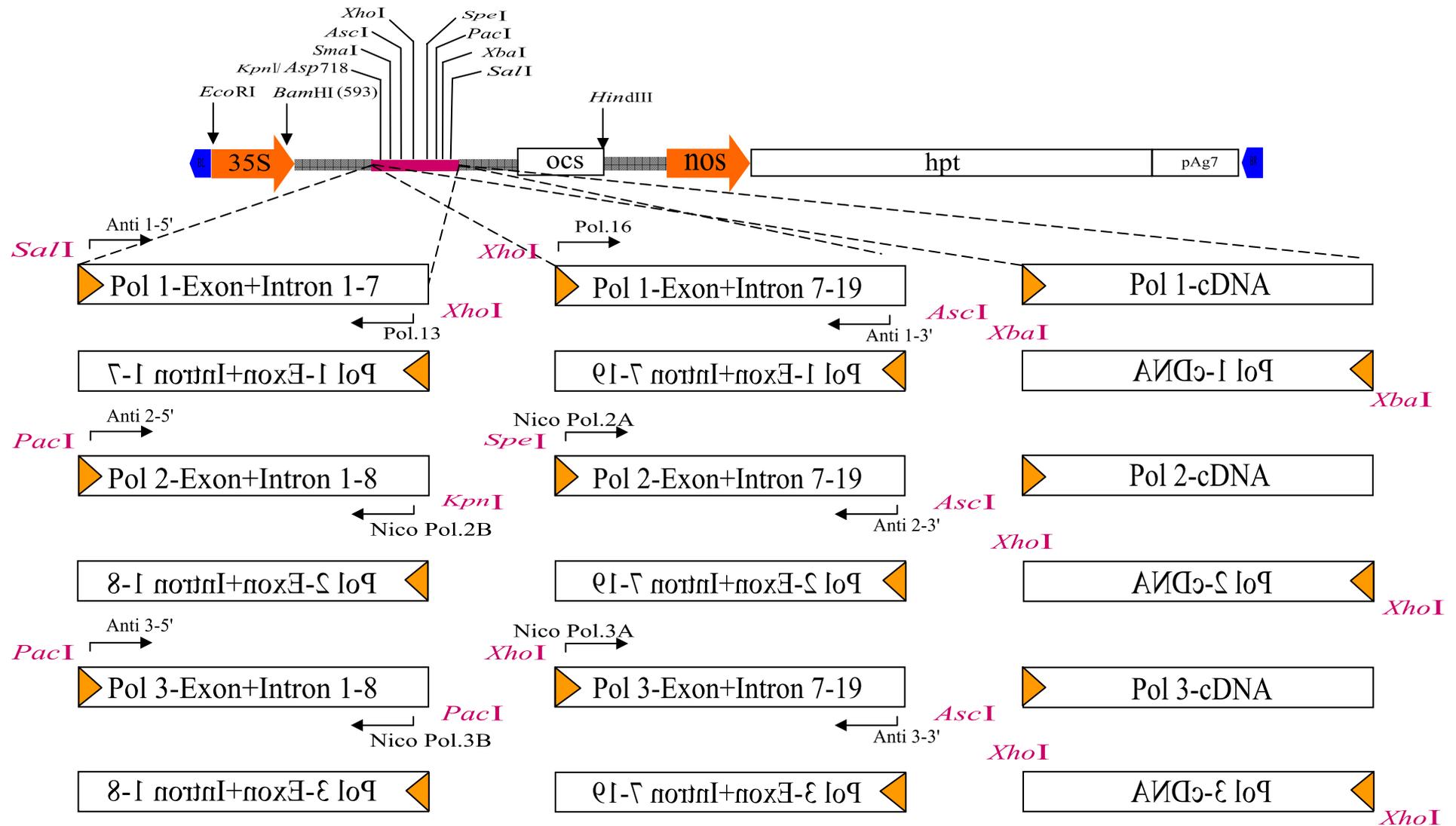


Abb. 12: Schema der Klonierung in die Vektoren pBinOligo bzw. pBCM20.

Oben: Schematisch dargestellter Ausschnitt der Vektoren pBinOligo und pBCM20 (siehe Abb. 11). Gezeigt ist die T-DNA mit Polylinkersite. Darunter sind die unterschiedlichen in *Antisense*- und *Sense*-Orientierung klonierten Sequenzbereiche dargestellt. Orange unterlegt sind die 5'-Enden der genomischen Fragmente und cDNA-Sequenzen, um die Änderung der Orientierung zu verdeutlichen. Rot gekennzeichnet sind die zur Klonierung in die binären Vektoren eingesetzten Restriktionsschnittstellen. Die Primer, die zur Amplifizierung der Sequenzen eingesetzt wurden, sind mit Pfeilen und Beschriftung gekennzeichnet.

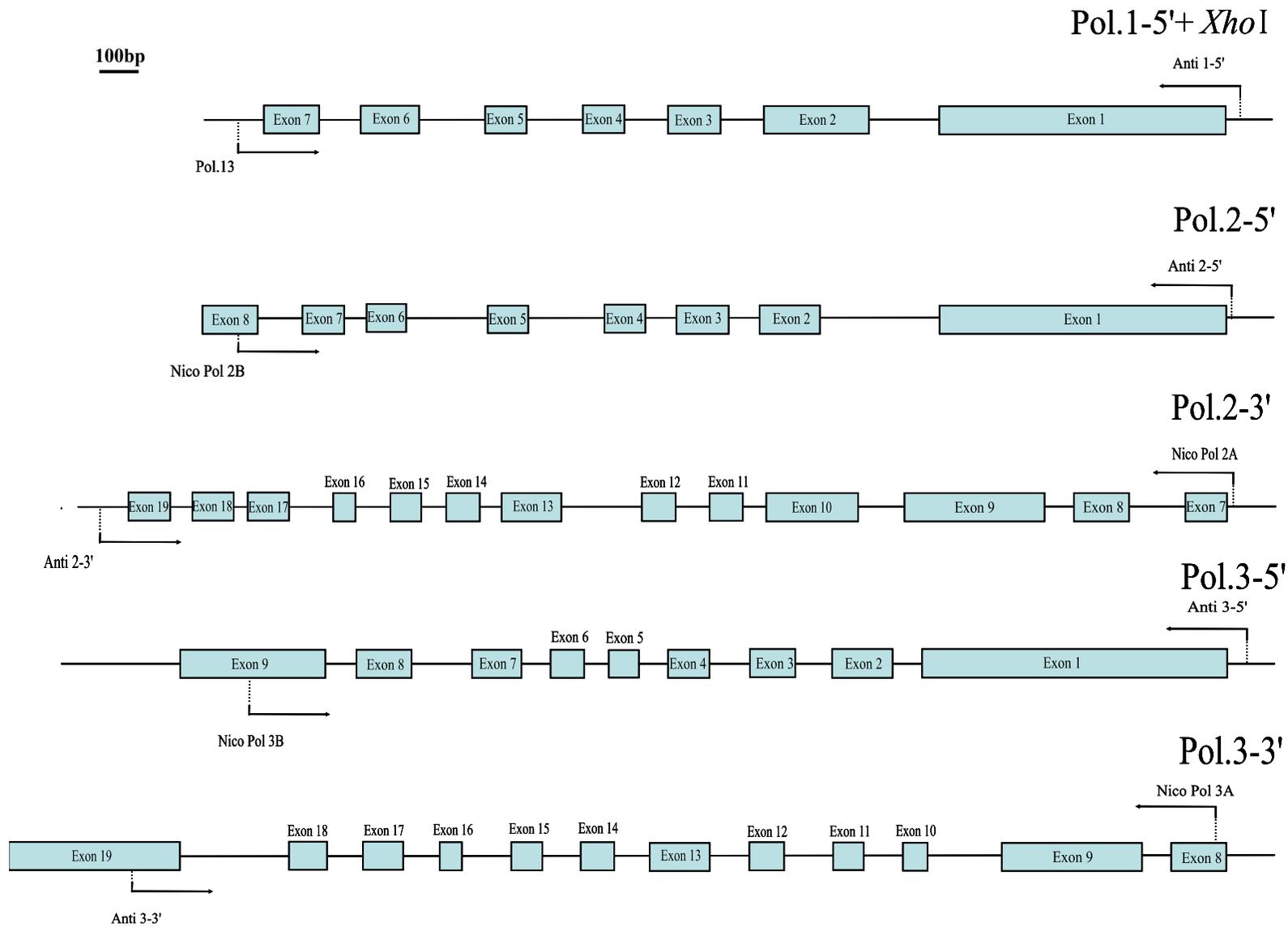


Abb. 13: Schema des Exon/Intronaufbaus der eingesetzten genomischen *Antisense*-Konstrukte von RNA-Polymerase 1,2 und 3.

Die Primer, die zur Amplifizierung der Sequenzbereiche eingesetzt wurden, sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Exons sind als hellblaue Blöcke dargestellt, die dazwischenliegenden Linien symbolisieren die Introns. Der Balken in der linken oberen Ecke gibt den Maßstab für die Exon/Intron-Größen an.

3.3.2 Klonierung in pBinOligo und pBCM20

Nach der Amplifizierung mittels PCR wurden die Fragmente in den pCR2.1-Vektor kloniert und in *Escherichia coli* (Stamm XL1-blue) vermehrt und selektiert. Anschließend erfolgte die gerichtete Umklonierung in einen der beiden binären Vektoren in gewünschter Orientierung (*Antisense*- bzw. *Sense*-Orientierung).

Es konnten fünf genomische Sequenzteile in *Antisense*-Orientierung in den Vektor pBinOligo eingebracht werden. Die drei cDNA-Sequenzen wurden in den Vektor pBCM20 sowohl in *Antisense*-als auch in *Sense*-Orientierung kloniert.

Die hergestellten Plasmide (siehe Material und Methoden, Kap. 2.2.2.1) wurden mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung auf ihre korrekte Sequenz und die Orientierung des eingefügten Fragments hin überprüft.

Für die RNA-Polymerase 1 konnte ein Plasmid mit einem *Antisense*-Konstrukt des vorderen Teils der genomischen Sequenz und jeweils ein Plasmid mit einem *Antisense*- und einem *Sense*-Konstrukt der cDNA-Sequenz hergestellt werden. Für die RNA-Polymerasen 2 und 3 wurden jeweils Plasmide mit dem vorderen und dem hinteren Teil der genomischen Sequenz und jeweils ein Plasmid mit den gesamten cDNA-Sequenzen in *Antisense*- und *Sense*-Orientierung erzeugt.

3.3.3 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* und Pflanzen

Die zur Pflanzentransformation eingesetzten Plasmide wurden in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert, wobei insgesamt vier verschiedene Agrobakterienstämme eingesetzt wurden (AGL1, EHA 105, LBA4404 und GV2260). Die beiden Stämme EHA 105 und AGL1 konnten dabei immer erfolgreich transformiert werden, LBA4404 und GV2260 konnten nicht in jedem Fall erfolgreich transformiert werden. Die Plasmide mit den genomischen *Antisense*-Konstrukten wurden somit in EHA105, die Plasmide mit den cDNA-Konstrukten in AGL1 eingebracht und zur Pflanzentransformation benutzt.

Pro Transformationsversuch wurden 10-15 Pflanzen eingesetzt. Tabelle 4 gibt Aufschluss über die transformierten Plasmide, die verwendeten Agrobakterienstämme und die nach der Transformation erhaltenen Pflanzenlinien. Die Benennung der weiteren Linien folgt den Angaben aus Tabelle 4.

Tab. 4: Übersicht der zur Transformation eingesetzten Plasmide und Agrobakterienstämme

Bezeichnung des Plasmids	Ausgangs-plasmid	Enthaltenes RNA-Polymerasegen/-fragment und dessen Orientierung	Eingesetzter Agrobakterienstamm	Bezeichnung der T ₀ -Pflanzenlinien	
pBinOligo 1-5'+ <i>Xho</i> I	pBinOligo	genomische Sequenz	vorderer Teil Pol.1 Antisense	EHA 105	1-5'
pBinOligo 2-5'	pBinOligo		vorderer Teil Pol.2 Antisense	EHA 105	2-5'
pBinOligo 2-3'	pBinOligo		hinterer Teil Pol.2 Antisense	EHA 105	2-3'
pBinOligo 3-5'	pBinOligo		vorderer Teil Pol.3 Antisense	EHA 105	3-5'
pBinOligo 3-3'	pBinOligo		hinterer Teil Pol.3 Antisense	EHA 105	3-3'
pBR20anti 1	pBCM20	cDNA-Sequenz	Pol.1 Antisense	AGL1	#135
pBR20sense 1	pBCM20		Pol.1 Sense	AGL1	#136
pBR20anti 2	pBCM20		Pol.2 Antisense	AGL1	#137
pBR20sense 2	pBCM20		Pol.2 Sense	AGL1	#138
pBR20sense 3	pBCM20		Pol.3 Sense	AGL1	#139
pBR20anti 3	pBCM20		Pol.3 Antisense	AGL1	#140

Die *in planta*-Transformation mit Hilfe dieser Agrobakterienstämme wurde an Wildtyp-Pflanzen des Ökotyps C24 nach einer abgewandelten Methode nach Bechtold *et al.* (1993) und Bent *et al.* (1994) durchgeführt (siehe dazu Kap. 2.2.5 Material und Methoden). Es entstanden so Pflanzenlinien in der T₀ (Transformationsgeneration), deren Samen auf Selektionsmedium (Hygromycin) ausplattiert wurden.

3.3.4 Selektion von Samen der T₀ und nachfolgender Generationen

Die Samen der T₀ wurden auf Selektionsmedium ausplattiert. Insgesamt konnten 164 unabhängige Pflanzenlinien durch Anzucht auf Selektionsmedium identifiziert werden. Im Durchschnitt wurden pro T₀-Linie 15 transgene unabhängige Nachkommenschaftslinien erzeugt, dabei lag die Spanne von 4 bis zu 37 unabhängigen Pflanzenlinien.

Auffällig bei der Ausplattierung war bei den Linien 1-5'-1-x, 2-5'-1-x, 2-5'-3-x, 2-5'-6-x, 2-5'-7-x, sowie 2-5'-9-x eine insgesamt verzögerte und in einigen Fällen vollständig unterbundene Keimung, so dass die Keimungsrate der transformierten Samen dieser Linien im Vergleich zum Wildtyp lediglich zwischen 20% und 60% lag. Im Durchschnitt ergab sich bei diesen Linien eine Keimungsrate von 57% im Vergleich zum Wildtyp (100%). Auch bei Linie 3-3'-1-x zeigte sich eine deutliche Verringerung der Keimungsrate im Vergleich zum Wildtyp, dagegen konnte bei der Linie 3-5' kaum eine vom Wildtyp abweichende Keimungsrate festgestellt werden. Die Keimung war jedoch auch hier etwas verzögert. Die Linien, die mit den cDNA-Konstrukten in *Sense*- und *Antisense*-Orientierung transformiert worden waren, zeigten eine weitgehend normale Keimungsrate und Keimungsgeschwindigkeit im Vergleich zum Wildtyp.

In Abbildung 14 ist exemplarisch der Vergleich der Keimungsrate zwischen Wildtyp-Pflanzen und Pflanzen der Linien 1-5'-1-x, 2-5'-3-x, 2-5'-6-x und 3-3'-1-9 gezeigt. Ein Diagramm gibt die Werte für den prozentualen Anteil der gekeimten Samen nach 2, 4, 5, 7, 9 und 13 Tagen vom Wildtyp im Vergleich zu den transgenen Pflanzenlinien wieder. Das zweite Diagramm in Abbildung 14 (rechts) stellt die Entwicklung des Wurzelwachstums anhand der Wurzellänge in Abhängigkeit vom Alter der Pflanzen dar.

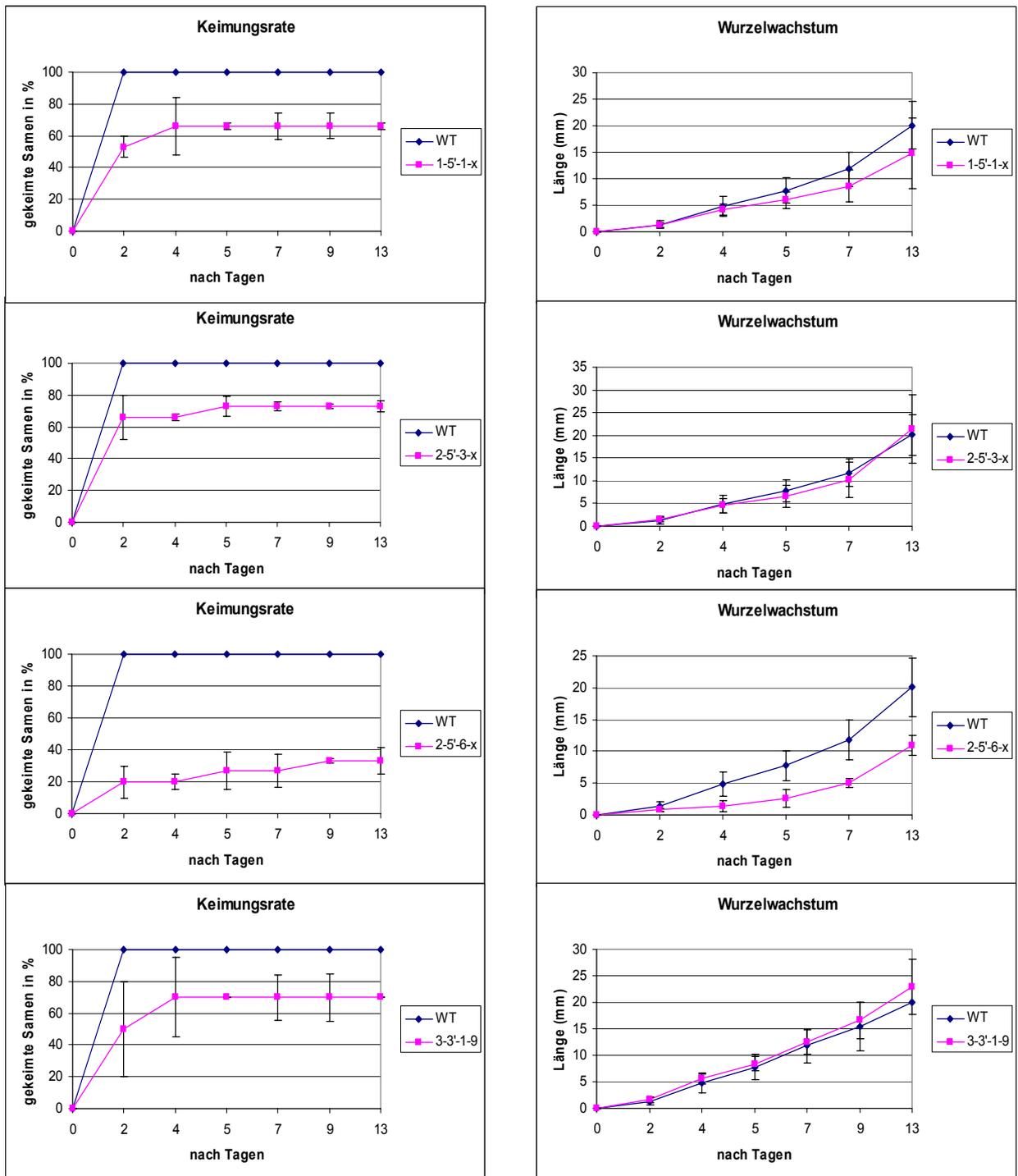


Abb. 14: Keimungsrate und Wurzelwachstum transgener *Arabidopsis*-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp. Links: Keimungsrate von *Arabidopsis*-Wildtyp-Samen und *Arabidopsis*-Samen der Pflanzenlinien 1-5'-1-x, 2-5'-3-x, 2-5'-6-x und 3-3'-1-x nach 2, 4, 5, 7, 9 und 13 Tagen *in vitro* auf 1AM. Rechts: Wurzelentwicklung anhand des Wachstums im Vergleich, Wildtyp und Pflanzenlinien 1-5'-1-x, 2-5'-3-x, 2-5'-6-x und 3-3'-1-x nach 2, 4, 5, 7 und 13 Tagen auf 1AM. Die Fehlerbalken geben die Werte der Standardabweichung wieder.

Die Pflanzenlinien, die nach erfolgter Selektion für weitere Untersuchungen eingesetzt wurden sind in Tabelle 5 gelistet.

Tab. 5: T₀-Generation und ihre unabhängigen Nachkommenschaftslinien

Bezeichnung der T ₀ -Pflanzenlinie	Zur Transformation eingesetztes Plasmid	Anzahl an unabhängigen Nachkommenschaftslinien in der T ₁
1-5'	pBinOligo 1-5'+ <i>Xho</i> I	4
2-5'	pBinOligo 2-5'	27
2-3'	pBinOligo 2-3'	18
3-5'	pBinOligo 3-5'	4
3-3'	pBinOligo 3-3'	21
#135	pBCM20 Pol.1antisense	6
#136	pBCM20 Pol.1sense	8
#137	pBCM20 Pol.2antisense	18
#138	pBCM20 Pol.2sense	4
#139	pBCM20 Pol.3sense	17
#140	pBCM20 Pol.3antisense	37

Bereits in der T₁-Generation zeigten sich nach dem Ausplattieren während der *in vitro*-Selektion unterschiedliche phänotypische Effekte bei einzelnen Pflanzenlinien. Dabei traten asymmetrisch verformte Keimblätter, niedriger Wuchs, deformierte Sprossstruktur, Reduktion und Deformation von Wurzeln sowie Verfärbungen und Deformationen von Blättern auf. In den Abbildungen 15-17 sind einige Linien mit diesen Effekten exemplarisch gezeigt.

Pol.1-5'

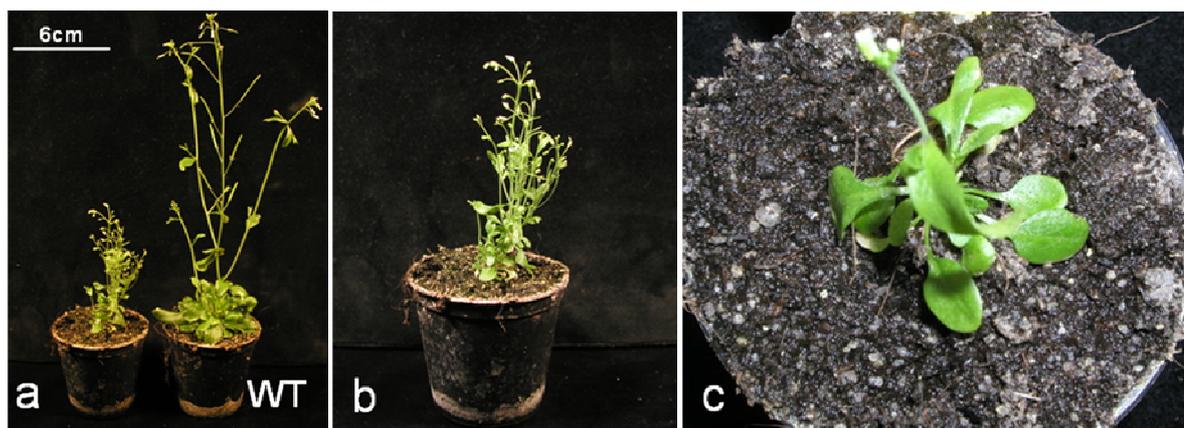


Abb. 15: Phänotyp transgener Pflanzen der Linie 1-5'-1-x.

a) Eine Pflanze der Linie 1-5'-1-x (links), die das charakteristisch stark verzögerte Sprosswachstum, fehlende Rosettenblätter und chaotische Organisation von Spross und Blütenstand zeigt, im Vergleich zu einer Wildtyp-Pflanze (rechts, gekennzeichnet mit WT). Die Pflanzen sind jeweils 8 Wochen alt. Sie wurden *in vitro* selektiert bzw. angezogen und danach ins Gewächshaus transferiert. b) Die vergrößerte Detailaufnahme zeigt die transgene 1-5'-1-x-Pflanze aus Abbildung a), hier wird die fehlende Rosettenbildung sowie die gestauchte Organisation des Sprosses besonders deutlich. c) Diese Abbildung zeigt ein weiteres Charakteristikum der Linie 1-5'-1-x, die chaotische Organisation der Blattrosette wird erkennbar an den verdrehten Blattstielen, und der unregelmäßigen Abfolge der Blätter.

Pol.3-5'



Abb. 16: Phänotyp der transgenen Pflanzen der Linie 3-5'.

a) Diese Abbildung zeigt eine *in vitro* auf IAM angezogene Pflanze im Alter von 5 Tagen mit stark Anthocyan-verfärbten Keimblättern, was auf eine Beeinträchtigung der frühesten Pflanzenentwicklung schließen lässt. b) Diese Abbildung stellt die Deformationen von Blättern der Blattrosette einer *in vitro* angezogenen Pflanze der Linie 3-5' dar. Auch bei diesem Effekt handelt es sich um eine charakteristische Veränderung in dieser Linie. c) In dieser Abbildung ist die Veränderung in der Rosettenstruktur und -organisation einer *in vitro* angezogenen Pflanze der Linie 3-5', sowie die Aufhellung einiger Rosettenblätter, gezeigt. Die aufgehellten Blätter färben sich in den meisten Fällen im Laufe der Entwicklung nach.

Diese pleiotropen Effekte traten breit gestreut in zahlreichen transformierten Linien für alle RNA-Polymerasen, sowohl bei der Anzucht *in vitro* als auch im Gewächshaus auf Erde in unterschiedlich starker Ausprägung auf.

Pol.3-3'

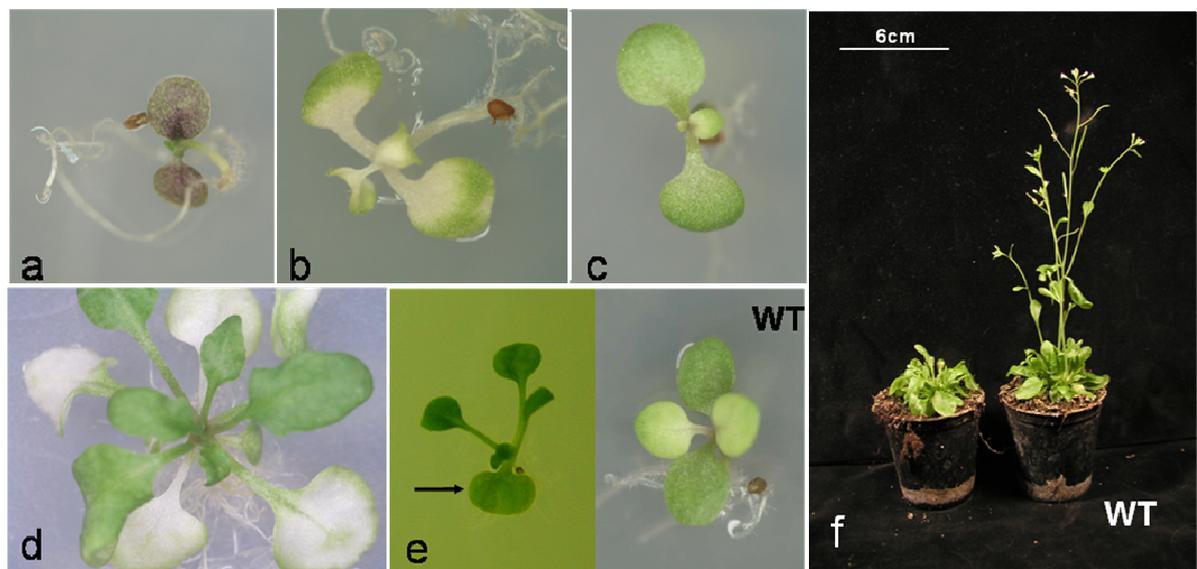


Abb. 17: Phänotyp transgener Pflanzen der Linie 3-3'.

a) Gezeigt sind ebenfalls stark Anthocyan-verfärbte Keimblätter der Linie 3-3' bei der Anzucht *in vitro*. b) Darstellung der charakteristischen Entfärbungen des Blattgewebes sowohl in Keimblättern als auch in Primärblättern der Linie 3-3' bei Anzucht *in vitro*. c) Asymmetrisch verformte Primärblätter bei einer transgenen Pflanze der Linie 3-3', die *in vitro* angezogen wurde. d) Veränderte Rosettenstruktur und charakteristisch entfärbte Blätter der Blattrosette bei einer *in vitro* angezogenen Pflanze der Linie 3-3', deutlich zu erkennen, die nachgegrünt inneren Rosettenblätter. e) Asymmetrie bei den Keimblättern dieser Linie, der Pfeil kennzeichnet das größere der beiden Keimblätter; rechts daneben eine Wildtyp-Pflanze im Vergleich. f) Hier ist zu erkennen, der deutlich verzögerte Sprosswuchs und Bildung der Blütenstände der Linie 3-3' (links) im Vergleich zum Wildtyp (rechts) nach Anzucht im Gewächshaus. Beide Pflanzen befinden sich im Alter von 8 Wochen.

Besonders stark waren diese phänotypischen Ausprägungen bei der Linie 2-5', welche mit dem Plasmid pBinOligo 2-5' transformiert worden war. 21 unabhängige Pflanzen der T₁-Generation dieser Linie zeigten kleinen Wuchs, eine deformierte Sprossstruktur und keine oder nur sehr wenige Wurzeln, bzw. rhizomartig verdickte Wurzelgebilde.

Abbildung 18 a) zeigt eine dieser transgenen Pflanzen ohne Wurzeln. In Abbildung 18 b) sind mehrere transgene Pflanzen *in vitro* gezeigt, die eine deformierte Sprossstruktur und degenerierte Blütenstände, sowie fehlende Wurzeln im Vergleich zum Wildtyp (c) aufwiesen.

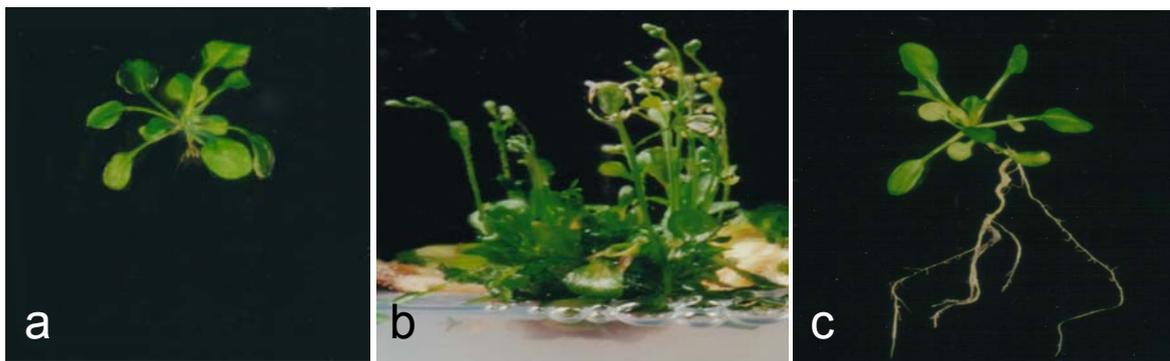


Abb. 18: Phänotyp bei Pflanzen der Linie 2-5' *in vitro*.

a) Die hier gezeigte Pflanze ist eine der 21 unabhängigen transformierten Pflanzen der Linie 2-5', die lediglich *in vitro* kultiviert werden konnten, da ihnen die Wurzeln z. T. vollständig fehlten bzw. rhizomartig verdickt vorlagen. Aufgrund der fehlenden Samenbildung war es nicht möglich von diesen Pflanzen Nachkommen zu erzeugen. b) Zwei unabhängige Pflanzen der Linie 2-5' *in vitro* auf *Arabidopsis*-Medium mit charakteristisch kleinem Wuchs, deformiertem Spross und fehlenden bzw. rhizomartig verdickten Wurzeln. c) Wildtyp-Pflanze zum Vergleich im gleichen Alter (3 Wochen) *in vitro*.

Da auch die Blüten stark betroffen waren, sich keine Schoten bildeten oder diese keine Samen enthielten, war somit eine Weiterführung dieser 21 Linien nicht möglich. Es konnte aber Blattmaterial genommen werden, das eine Untersuchung dieser Pflanzenlinien im Hinblick auf die Transkriptmenge der RNA-Polymerasen mit Hilfe von RT-PCR ermöglichte (siehe Kap. 3.4).

Insgesamt fünf weitere unabhängige Pflanzenlinien mit dem 2-5'-*Antisense*-Konstrukt konnten gewonnen werden, welche ebenfalls zum Teil sehr starke phänotypische Effekte zeigten.

Einen besonders auffälligen Effekt zeigt die Linie 2-5'-3-x, eine Nachkommenschaftslinie von 2-5'-3. Bei Blättern dieser Linie kommt es nur zu einer teilweisen Ausbildung der Plastiden. Weiterhin zeigten die Pflanzen dieser Linie eine verzögerte Entwicklung, Probleme bei der Strukturierung des Sprossaufbaus, sowie oftmals stark verringerte Entwicklung der Blattrosette. Die Blätter dieser Pflanzen färbten sich erst nach längerer Zeit (8 Wochen) grün (siehe Abb. 19 d). Abbildung 19 zeigt exemplarisch einige *in vitro* angezogene Pflanzen der Linie 2-5'-3-x.

Pol.2-5'-3-x



Abb. 19: Pflanzen der Linie 2-5'-3-x auf 1AM *in vitro*.

a) Die Keimblätter einer Pflanze der Linie 2-5'-3-x zeigen lediglich eine Grünfärbung entlang des Leitgewebes. Im Verlauf der weiteren Pflanzenentwicklung färben sich die Blätter *in vitro* etwas nach, werden jedoch nicht vollständig gefärbt wie der Wildtyp. b) Detailansicht des Keimblatts aus Abbildung a). c) Hier ist die starke Entfärbung auch der Primärblätter einer Pflanze dieser Linie, im frühen Anlagestadium dieser Blätter gezeigt. Der Entfärbungseffekt beschränkt sich nicht nur auf die Keimblätter, sondern ist auch in allen anderen Geweben zu finden (siehe auch Abbildung 20-22). d) Phänotyp einer Pflanze vier Wochen nach der Keimung.

Nach der Überführung der Pflanzen auf Erde zeigten sie eine hellgrüne Blattfärbung im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abbildung 20). Bei dieser Linie lässt sich bei der Anzucht auf Erde eine deutliche Verzögerung in der Pflanzenentwicklung im Vergleich zum Wildtyp, ein Defekt in der Rosettenstruktur und eine Verringerung des Blütenwuchses sowie der Samenansätze beobachten. Die phänotypische Ausbildung dieser Effekte ist bei der Anzucht auf Erde stärker als unter *in vitro*-Bedingungen (siehe auch Abbildung 21). Abbildung 20 zeigt die unterschiedlichen morphologischen Defekte der Linie 2-5'-3-x im Vergleich zum Wildtyp bei der Anzucht im Gewächshaus.

Pol.2-5'-3-x

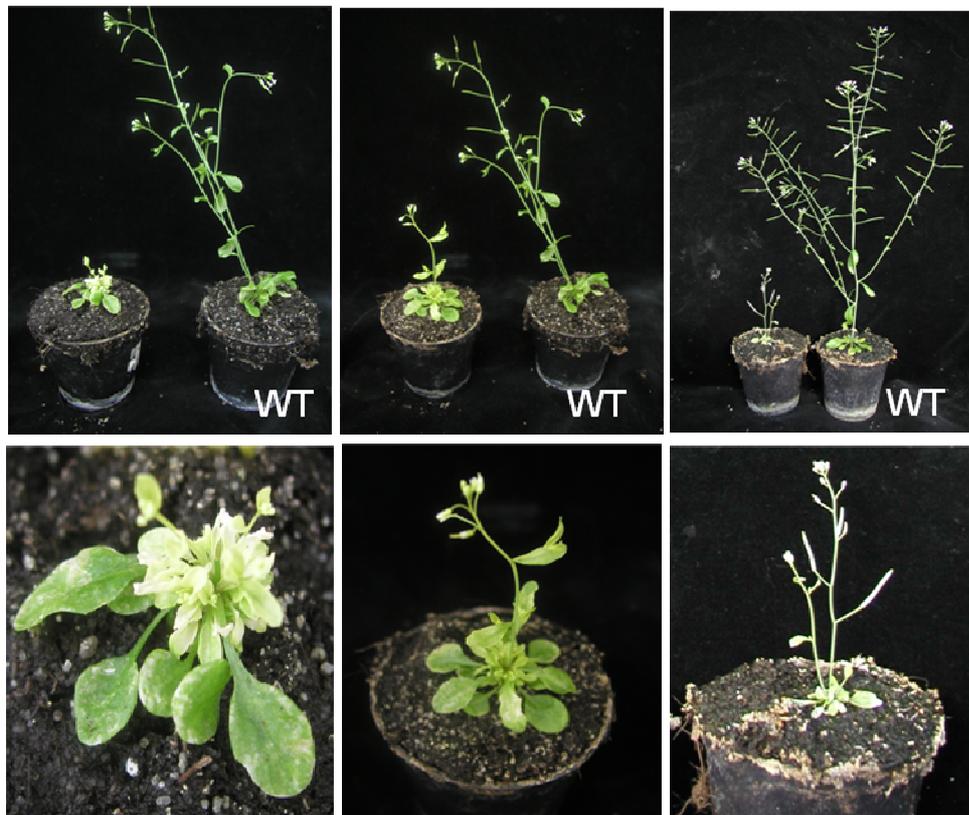


Abb. 20: Phänotypen der Linie 2-5'-3-x nach der Anzucht im Gewächshaus.

Im oberen Bereich der Abbildung ist jeweils der Vergleich einer transgenen Pflanze (links) mit einer gleich alten Wildtyp-Pflanze (rechts, gekennzeichnet mit WT) zu erkennen. In den unteren Abbildungen jeweils die vergrößerte Detailansicht der transgenen Pflanze aus der oberen Abbildung.

Links: Eine Pflanze mit verzögertem und verringertem Wuchs, deformierter Rosette mit Defekt in der Strukturorganisation, charakteristisch panaschierte Färbung der Blätter, und stark ausgebleichten inneren Rosettenblättern. Mitte: Pflanze mit verzögertem und verringertem Wuchs, gestauchtem Blütenstand, und wenig Blütenansätzen. Rechts: Phänotyp einer weiteren Pflanze mit ebenfalls verringertem und verzögertem Wuchs, verfrühtem Schotenansatz und nahezu fehlenden Rosettenblättern, sowie bleicher Färbung.

Vor allem im frühen Entwicklungsstadium waren die Blätter dieser Pflanzenlinie auffällig gefleckt und im Gegensatz zum Wildtyp war die gesamte Pflanze auch deutlich kleiner.

Abbildung 21 zeigt den typischen Phänotyp der Linie 2-5'-3-x im Vergleich zum Wildtyp unter *in vitro*-Bedingungen sowohl auf Selektionsmedium als auch auf *Arabidopsis*-Medium ohne Antibiotikum, sowie unter Anzuchtbedingungen auf Erde im Gewächshaus.

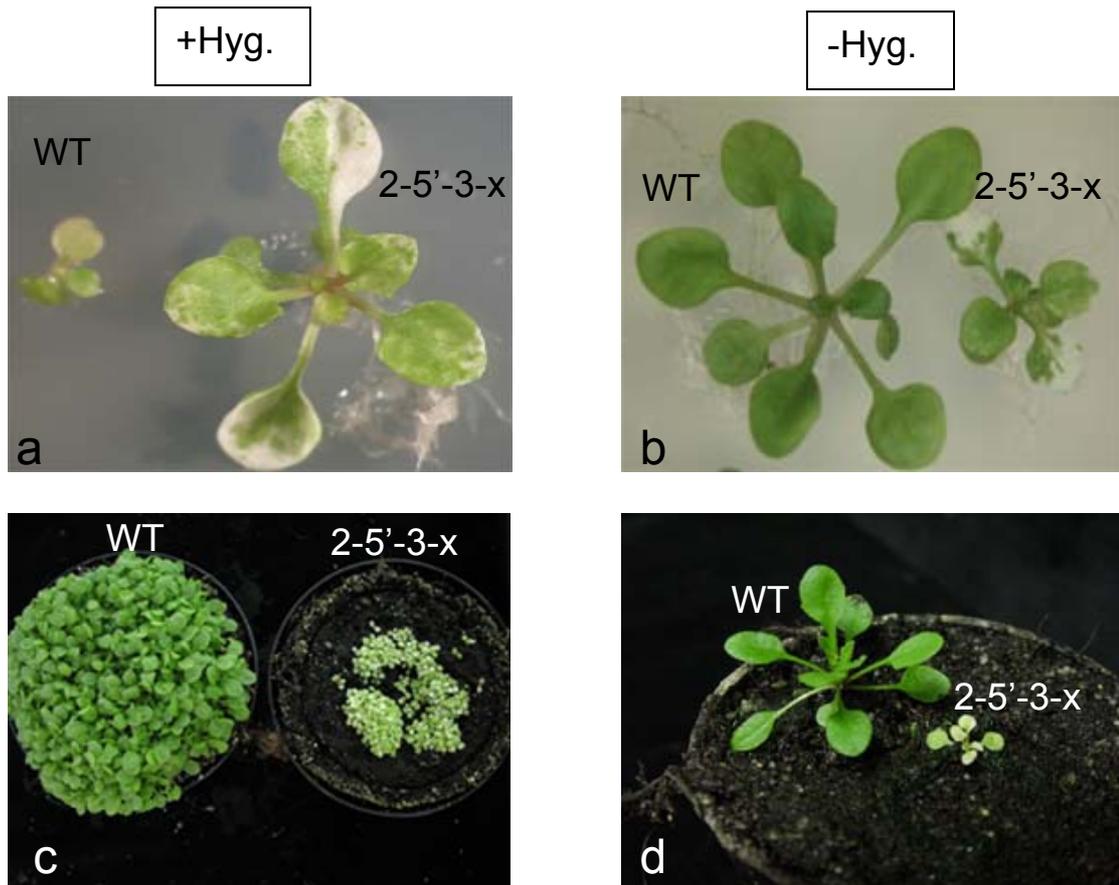


Abb. 21: Vergleich des Phänotyps der Linie 2-5'-3-x mit dem Wildtyp unter verschiedenen Anzuchtbedingungen.

Im oberen Teil sind Pflanzen unter *in vitro*-Anzuchtbedingungen gezeigt, darunter nach Anzucht im Gewächshaus auf Erde. Die Wildtyp-Pflanze(n) ist/sind jeweils links, die transgene Pflanze(n) ist/sind jeweils rechts dargestellt.

a) In dieser Abbildung wird der Vergleich zwischen Wildtyp (links) und Linie 2-5'-3-x *in vitro* auf 1AM mit Hygromycin deutlich. Die Wildtyp-Pflanze zeigt deutliche Wuchsprobleme auf dem Antibiotikum-haltigen Medium, während die transgene Pflanze der Linie 2-5'-3-x gut wachsen kann. b) Genau entgegengesetzt verhält es sich bei der Anzucht auf 1AM ohne Selektion (ohne Hygromycin). Der Wildtyp (links) wächst im Vergleich zur Pflanze der Linie 2-5'-3-x (rechts) deutlich besser und schneller. c) Bei der Anzucht der Pflanzen auf Erde im Gewächshaus zeigt sich der Effekt der Entwicklungsverzögerung sowie der Entfärbung fast noch stärker als *in vitro*. Die Wildtyp-Pflanzen (links) zeigen im Vergleich zu Linie 2-5'-3-x-16-7 (rechts) auf Erde vor dem Pikieren im Alter von 17 Tagen ein deutlich besseres Wachstum und eine normale Färbung im Vergleich zur transgenen Linie 2-5'-3-x. d) In dieser Abbildung ist der Größenvergleich einer Wildtyp-Pflanze (links) zu einer Pflanze der Linie 2-5'-3-x-16-7 (rechts) auf Erde im Alter von 21 Tagen zu sehen.

Die Blütenknospen dieser Linie sind auffällig gestreift gefärbt (siehe Abbildung 22 b), die Blütenstände sehr viel heller als beim Wildtyp. Die Blüte selbst erscheint deformiert und degeneriert (Abbildung 23) und Samen werden nur wenige gebildet.



Abb. 22: Vergleich des Blütenphänotyps der transgenen Linie 2-5'-3-x mit dem Wildtyp.

a) Diese Abbildung zeigt einen Blütenstand mit geschlossenen Knospen einer Wildtyppflanze. b) Zum Vergleich die Knospe einer Pflanze der Linie 2-5'-3-x-36 im gleichen Alter. Ganz deutlich zu erkennen ist die auffällige weiß-grüne Streifung. c) In dieser Abbildung ist der Blütenstand mit den deformierten Knospen einer Pflanze der Linie 2-5'-3-x-36 dargestellt. Die Blüten und auch die sich entwickelnden Samen (falls Samenbildung stattfindet) bleiben auch weiterhin deutlich heller gefärbt als die des Wildtyps.

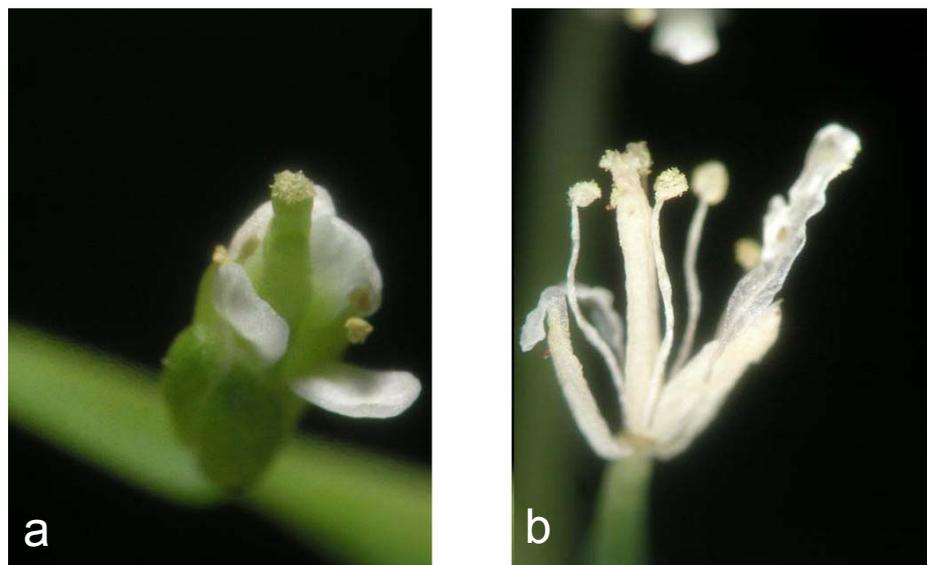


Abb. 23: Blütenmorphologie der Linie 2-5'-3-x.

a) Gezeigt ist die sich öffnende Blüte einer Wildtyp-Pflanze mit „normal“-entwickelten Blütenorganen. b) Blüte einer Nachkommenschaftslinie von 2-5'-3-x.

Dieser phänotypische Effekt, der verringerte Wuchs und die Bleichung, war bei der Anzucht auf Erde noch sehr viel deutlicher und blieb dort auch durchgehend erhalten. Die Pflanzen grüntem nur geringfügig nach und nur wenige kamen bis zur Samenbildung. Oftmals wurden Schoten gebildet, die jedoch keine Samen enthielten, oder deren Samen nicht keimungsfähig waren.

Auch andere Pflanzen der Linien mit den *Antisense*-Konstrukten von RNA-Polymerase 2 zeigten deutliche phänotypische Effekte, die von verringertem und verzögertem Wuchs, defekter Rosettenorganisation, bis hin zur Sprossstauchung und Anthocyan-Verfärbungen reichten. Sie zeigten somit das gesamte Spektrum an phänotypischen Effekten, welches auch in den anderen Linien zu finden war. Erstaunlicherweise traten in diesen Linien (exemplarisch gezeigt in Abbildung 24) auch Effekte auf, die zum Beispiel zur Bildung von drei Keimblättern, sowie zur Vergrößerung der Pflanze führte.

Pol.2-5'

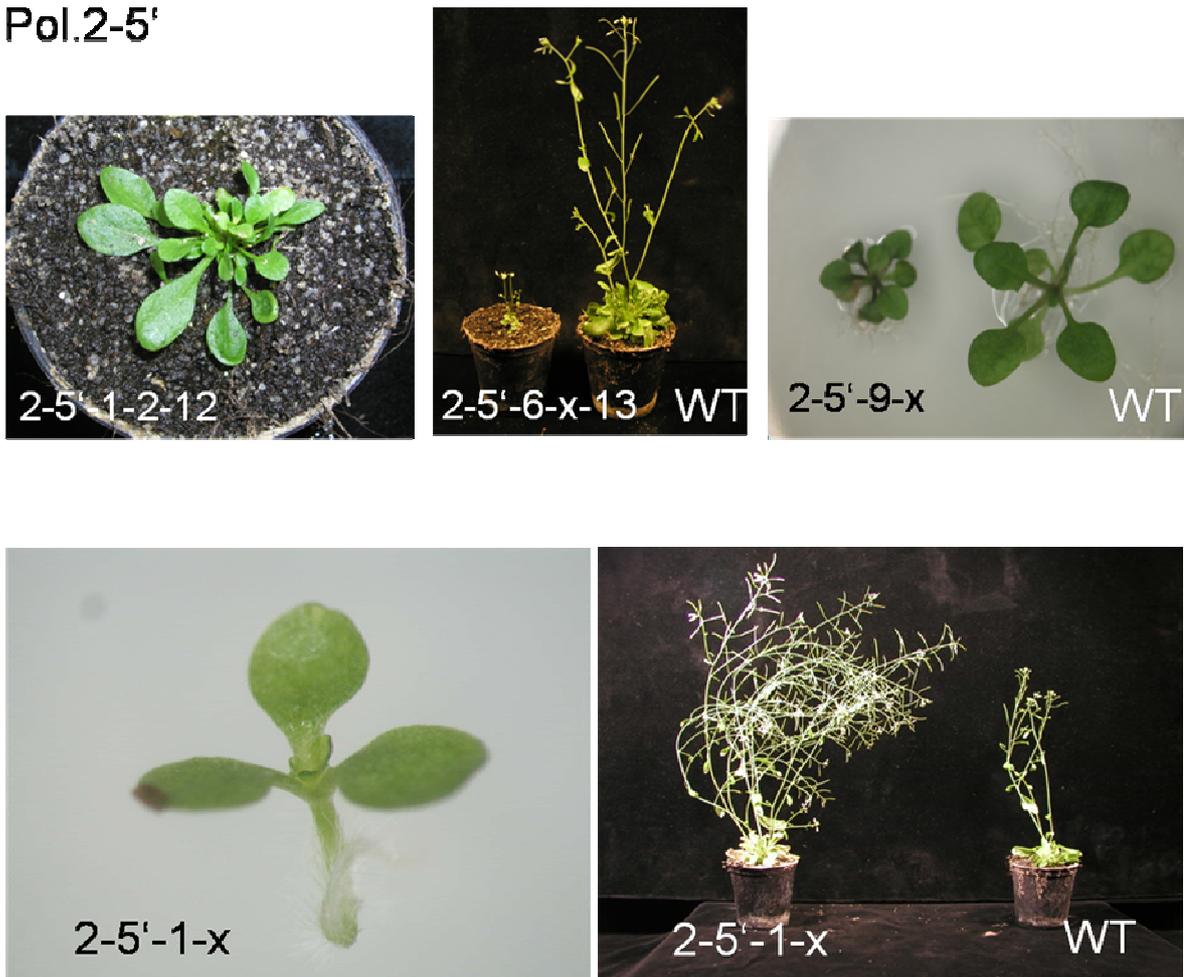


Abb. 24: Phänotyp von *Antisense*-Linien der RNA-Polymerase 2.

Oben: Exemplarisch gezeigte Phänotypen einiger unterschiedlicher transgener *Arabidopsis*-Linien. Links: Defekte in der Rosettenorganisation einer Pflanze der Linie 1-5'. Mitte: Deutlicher Größenunterschied als Folge verzögerter Entwicklung der Pflanze, sowie fehlende Rosettenblätter und verringerte Blütenansätze bei einer Pflanze der Linie 2-5'-6-x. Rechts: Verzögerte Entwicklung und gestauchte Rosettenblätter bei einer Pflanze der Linie 2-5'-9-x im Vergleich zum Wildtyp. Unten: Pflanze der Linie 2-5'-1-x mit der Bildung von drei Keimblättern, links: *in vitro*, rechts: nach der Überführung der Pflanze ins Gewächshaus im Vergleich zum Wildtyp.

Dieser, in der Literatur als sogenannter „superman“-Effekt beschriebene, Phänotyp könnte auf eine veränderte Energieversorgung zurückzuführen sein. Bedenkt man in diesem Zusammenhang die Ergebnisse der Lokalisierung der einzelnen RNA-Polymerasen und dabei die „dual-targeting“-Eigenschaft der RNA-Polymerase 2, so könnte diese Erscheinung eventuell eine Folge der Überexpression der RNA-Polymerasen sein, wie er häufiger beobachtet werden kann.

3.3.5 Untersuchung der transgenen Linien auf Integration der T-DNA

Die Integration der T-DNA bei den selektierten Pflanzenlinien wurde mit Hilfe der PCR-Methode überprüft. Die extrahierte genomische Pflanzen-DNA wurde als Template in Standard-PCR-Ansätzen eingesetzt. Durch die Verwendung des Primerpaares HPT 6/HPT 7, konnte ein 882bp großes Fragment innerhalb des HPT-Gens amplifiziert werden, sofern die T-DNA integriert war. Die Lage der Primer innerhalb der HPT-Sequenz ist in Abbildung 25 schematisch dargestellt.

Insgesamt konnten 38 für das HPT-Gen positive Pflanzenlinien detektiert werden, davon waren 26 aus der T₀-Linie 2-5', zwei Linien der T₀-Linie 3-3', #138, #139, und jeweils eine der Linien 1-5', 2-3', 3-5', #135, #136, und #140. Für die Linie #137 konnte keine HPT-positive Linie gefunden werden, obwohl sie ursprünglich auf Selektionsmedium angezogen worden war.

Abbildung 25 zeigt beispielhaft die gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte einiger HPT-PCR-Untersuchungen an unterschiedlichen selektierten Pflanzenlinien.

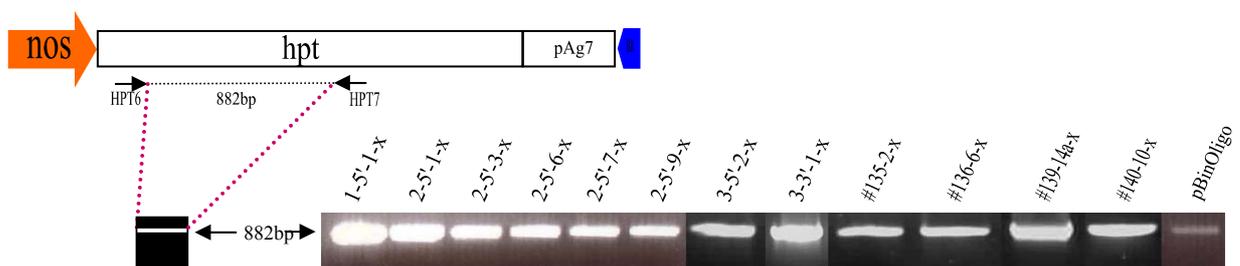


Abb. 25: Nachweis des Markergens mittels PCR in den transformierten Pflanzenlinien.

Links: Lage der HPT-Primer zum Nachweis des HPT-Gens mittels PCR an den selektierten Pflanzenlinien, sowie der Größe des entstehenden Fragmentes nach gelelektrophoretischer Auftrennung; Rechts: Gelelektrophoretisch aufgetrennte PCR-Produkte von DNA-Proben unterschiedlicher Pflanzenlinien, ganz rechts außen zum Vergleich das PCR-Produkt beim Einsatz von pBinOligo-DNA als PCR-Template mit dem HPT-Primerpaar.

In Tab. 6 sind die Ergebnisse des HPT-Gen-Nachweises für die selektierten weitergeführten Pflanzenlinien zusammengefasst.

Tab. 6: Pflanzenlinien mit dem Nachweis des HPT-Gens mittels PCR (Primerpaar HPT6/HPT7)

Bezeichnung der T ₀ -Pflanzenlinie	zur Transformation eingesetztes Plasmid	Bezeichnung der HPT-positiven weitergeführten Pflanzenlinien
1-5'	pBinOligo 1-5'+ <i>Xho</i> I	1-5'-1-x
2-5'	pBinOligo 2-5'	2-5'-1-x 2-5'-3-x 2-5'-6-x 2-5'-7-x 2-5'-9-x
2-3'	pBinOligo 2-3'	2-3'-16-x
3-5'	pBinOligo 3-5'	3-5'-2-x
3-3'	pBinOligo 3-3'	3-3'-1-x 3-3'-18
#135	pBCM20 Pol.1antisense	#135-2-x
#136	pBCM20 Pol.1sense	#136-6-x
#137	pBCM20 Pol.2antisense	n.d.
#138	pBCM20 Pol.2sense	#138-2-x #138-3
#139	pBCM20 Pol.3sense	#139-2 #139-14a-x
#140	pBCM20 Pol.3antisense	#140-10-x

3.3.6 Kopienanzahl der T-DNA in transgenen Linien

Die anschließende Southern Blot-Untersuchung diente der Ermittlung der Kopienanzahl der integrierten T-DNA. Die mit der Restriktionsendonuklease *Bam*HI bzw. *Eco*RI verdaute Pflanzen-DNA der zu untersuchenden Transgenen wurde mit einem 617bp großen Dig-markierten *Eco*RI/*Bam*HI-Fragment aus dem 35S-Promotor hybridisiert. Die T-DNA der Vektoren pBinOligo1-5'+*Xho*I, 2-5' und 2-3' enthält jeweils nur eine *Bam*HI Schnittstelle im hinteren Teil des 35S-Promotor (in den jeweiligen RNA-Polymerasegenabschnitten der *Antisense*-Konstrukte liegen keine zusätzlichen *Bam*HI-Schnittstellen mehr). Die genomische Pflanzen-DNA dieser Linien wurde für die Southern Blots daher mit *Bam*HI verdaut. In der T-DNA der Vektoren pBinOligo3-5', 3-3' und pBCM20 Pol.1antisense liegt eine *Hind*III-Schnittstelle, daher wurde die genomische Pflanzen-DNA dieser Linien mit *Hind*III verdaut. Durch die singuläre Schnittstelle in der T-DNA ergibt sich mit der 35S-Sonde eine Hybridisierung mit Übergangssequenzen (über die linke Border) zwischen der T-DNA und der Pflanzen-DNA, wobei sich die Größe der hybridisierenden Fragmente nach der jeweils

nächsten im Pflanzengenom liegenden *Bam*HI bzw. *Hind*III-Schnittstelle richtet (Bildung von „junction-fragments“). Da die Integration zufällig erfolgte, stellt jedes Fragment auf dem Southern Blot in der Regel einen Integrationsort der T-DNA dar.

Insgesamt wurden 9 verschiedene Pflanzenlinien, die in der HPT-PCR positiv waren, mittels Southern Blot auf die Kopienanzahl der integrierten T-DNA hin untersucht, um beurteilen zu können, ob eine Korrelation zwischen Phänotyp und Kopienanzahl der integrierten T-DNA besteht. In den Linien 1-5'-1-x und 3-3'-1-x konnten mindestens vier Kopien gefunden werden. Diese Linien besitzen einen deutlichen Phänotyp, wobei bei Linie 1-5'-1-x vor allem die Keimungsrate und die Sprossorganisation sowie das Wachstum der Pflanzen allgemein betroffen ist. Linie 3-3'-1-x zeigt ebenfalls Beeinträchtigungen in der Keimungsrate, zeichnet sich vor allem aber auch durch eine Bleichung und Deformation der Blätter sowie die Bildung asymmetrischer Keimblätter aus (siehe 3.3.4). In Linie 2-5'-6-x konnten vier Kopien der T-DNA nachgewiesen werden, in Linie 2-5'-7-x mindestens 3 Kopien. Bei beiden Linien konnte eine Beeinträchtigung der Keimungsrate, wie auch ein pleiotroper Phänotyp gefunden werden, der vor allem mit Wuchsverringerung und Desorganisation des Sprosses auffiel. Linie 2-5'-1-x enthielt drei Kopien der T-DNA und zeigte neben einer Reduktion der Keimungsrate und des Sprosswachses, erstaunlicherweise auch einen Phänotyp, der sich durch die Bildung von drei Keimblättern und in der weiteren Entwicklung durch besonders starken Wuchs auszeichnete (siehe Abb. 24). Möglicherweise handelt es sich dabei um eine Auswirkung durch die mehreren Kopien der T-DNA und ihrer Position im Genom. Bei den Linien 3-5'-2-x und #135-2-x konnten jeweils zwei Kopien der T-DNA identifiziert werden, Linie 2-5'-9-x enthält mindestens eine Kopie. Linie 3-5'-2-x zeigte lediglich eine Keimungsverzögerung, aber keine Keimungsverringerung. Die cDNA-Linie #135-2-x glich in Bezug auf Keimungsrate- und Geschwindigkeit, sowie beim Wurzelwachstum dem Wildtyp. Linie 3-5'-2-x zeigte vor allem Anthocyan-verfärbte und deformierte Blätter, sowie Abweichungen in der Sprossmorphologie. Die cDNA-Linien besitzen generell einen dem Wildtyp ähnlichen Phänotyp.

Die Linie 2-5'-3-x ist eindeutig eine single-copy Linie, da sie nur ein Hybridisierungssignal im Southern Blot zeigt. Diese Linie zeigt einen sehr auffälligen panaschierten Phänotyp.

Abbildung 26 stellt exemplarisch einen mit der 35S-Sonde hybridisierten Southern Blot dar.

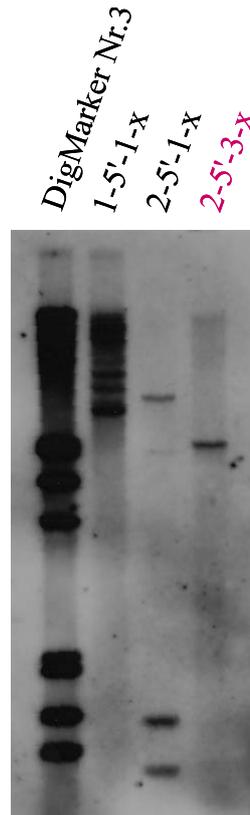


Abb. 26: Nachweis der 35S-Promotorsequenz mittels Southern Blot.

Die Abbildung zeigt einen Southern Blot, der mit einer Dig-markierten 617bp großen 35S-Sonde hybridisiert wurde. Die genomische Pflanzen-DNA wurde jeweils mit *Bam*HI geschnitten. Es wurden jeweils zwischen 3 bzw. 5µg genomische Pflanzen-DNA verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine positiv geladene Boehringer Nylonmembran mittels alkalischem Vakuumblotting transferiert. Spur 1: 3µl Dig-markierter Marker No. 3; Spur 2: 3µg genomische Pflanzen-DNA 1-5'-1-x; Spur 3: 3µg genomische Pflanzen-DNA 2-5'-1-x; Spur 4: 3µg genomische Pflanzen-DNA 2-5'-3-x. Als Negativ-Kontrolle wurde C24-Wildtyp-DNA eingesetzt, als Positivkontrolle wurde liniarisiertes Plasmid in single-copy-Verdünnung aufgetragen. Die Konzentration der Dig-markierten Sonde in der Hybridisierungslösung betrug 40ng/ml. Die Detektion der Hybridisierungssignale erfolgte über Chemilumineszenz und die Expositionszeit der Röntgenfilme betrug zwischen 4 und 36h.

Als zusätzliche Kontrolle wurde mit einer Dig-markierten HPT-Sonde rehybridisiert. Bei der HPT-Sonde handelte es sich um ein 1.000bp großes *Bam*HI Fragment aus dem HPT-Gen welches mit Dig markiert worden war. Stripping und Rehybridisierung des Blots erfolgten nach den genauen Angaben des Herstellers und den für *Arabidopsis thaliana* ausgetesteten optimalen Hybridisierungs-Bedingungen (siehe Material und Methoden).

Bei der Rehybridisierung zeigte sich, dass die Anzahl der Kopien auch bei der Hybridisierung mit der HPT-Sonde mit den Ergebnissen der 35S-Sonde identisch waren.

Abbildung 27 zeigt den Vergleich eines mit der 35S-Sonde hybridisierten Southern Blots und seine Rehybridisierung mit der HPT-Sonde.

Die genomische DNA der Linie 3-5'-2-x und die der Linie #135-2-x zeigen jeweils zwei Hybridisierungssignale. Die genomische DNA der Linie 3-3'-1-x ergab nach der Hybridisierung mit der HPT-Sonde vier deutliche Signale.

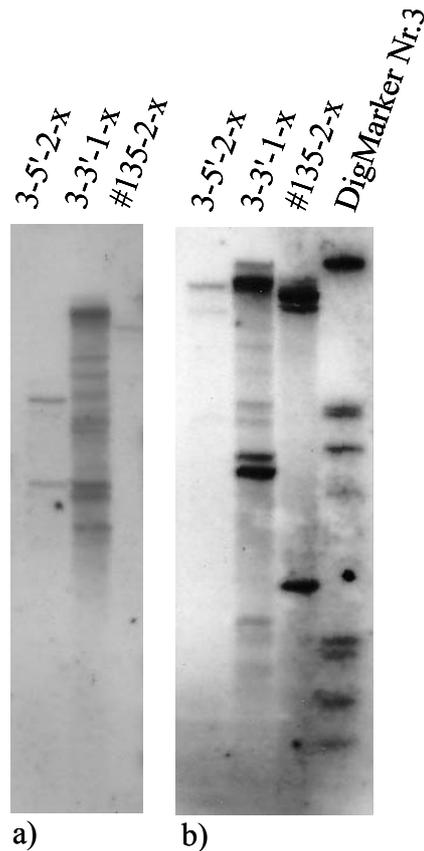


Abb. 27: Vergleich zweier Southern Blots zum Nachweise der T-DNA mittels unterschiedlicher DNA-Sonden.

a) Nachweis der 35S-Promotorsequenz mittels Southern Blot; hybridisiert mit einer Dig-markierten 617bp großen 35S-Sonde. Die genomische Pflanzen-DNA wurde jeweils mit *Hind*III geschnitten. Spur 1: 3µg genomische Pflanzen-DNA der Linie 3-5'-2-x; Spur 2: 3µg genomische Pflanzen-DNA der Linie 3-3'-1-x; Spur 3: 3µg genomische Pflanzen-DNA der Linie #135-2-x. b) Nachweis der HPT-Gen-Sequenz mittels Southern Blot; Rehybridisierung des Blots aus a) mit einer Dig-markierten 1.000 bp großen HPT-Sonde. Spur 1: 3µg genomische Pflanzen-DNA der Linie 3-5'-2-x; Spur 2: 3µg genomische Pflanzen-DNA der Linie 3-3'-1-x; Spur 3: 3µg genomische Pflanzen-DNA der Linie #135-2-x; Spur 4: Dig-markierter Marker Nr.3.

Die Daten für die Kopienanzahl der T-DNA in den untersuchten Pflanzenlinien sind in Tabelle 7 zusammengefasst wiedergegeben.

Tab. 7: Kopienanzahl der integrierten T-DNA der mittels Southern Blot untersuchten Pflanzenlinien

Pflanzenlinie	Kopienanzahl
1-5'-1-x	>4
2-5'-1-x	3
2-5'-3-x	1
2-5'-6-x	4
2-5'-7-x	>3
2-5'-9-x	>1
3-5'-2-x	2
3-3'-1-x	>4
#135-2-x	2

Aufgrund der Tatsache, dass in Linie 2-5'-3-x nur eine single copy der T-DNA integriert wurde und zusätzlich dazu ein sehr auffälliger Phänotyp vorlag, wurde in den folgenden Untersuchungen ein Schwerpunkt auf diese Linie gelegt.

3.4 Semiquantitative RT-PCR zur Untersuchung der Transkriptmengen

Zur Quantifizierung der Transkriptmengen der verschiedenen RNA-Polymerasen in den unterschiedlichen *Antisense*-Linien wurde eine semiquantitative RT-PCR eingesetzt. Die Notwendigkeit der Quantifizierung erforderte den Einsatz eines internen Standards, der eine Abschätzung der vorhandenen Transkriptmenge in den unterschiedlichen Proben ermöglichte. Als interner Standard wurde ein Actin-Gen aus *Arabidopsis thaliana* ausgewählt (Isono *et al.* 1997). Das Actin 2-Gen enthält an der von den Primern flankierten Stelle ein Intron und ist in nahezu allen Geweben von *Arabidopsis thaliana* konstitutiv exprimiert (An *et al.*, 1996). Das Primerpaar für den internen Actin-Standard wurde in einer multiplex PCR zusammen mit den spezifischen RNA-Polymerase-Primern eingesetzt. Die spezifischen RNA-Polymerase-Primer wurden so ausgewählt, dass sie innerhalb der Exons 2-5 der entsprechenden RNA-Polymerasen lagen. Durch die Lage der Primer in den Exons konnte eine Detektion von unerwünschten Verunreinigungen durch genomische DNA gewährleistet werden. Tabelle 8 zeigt eine Zusammenstellung der eingesetzten Primerpaare mit der Größenangabe der, je nach eingesetztem Template, zu erwartenden Fragmente.

Tab. 8: Daten zur semiquantitativen RT-PCR

Art des DNA- Templates	Größe des entstehenden Amplikons (bp)	Name des nachzuweisenden Transkripts	Bezeichnung der Primer
Genomische DNA	563	Actin 2	Act2A/Act2B
cDNA	477	Interner Standard	
Genomische DNA	648	RNA-Polymerase 1	Nico Pol1A/Nico Pol1B
cDNA	299		
Genomische DNA	684	RNA-Polymerase 2	Nico Pol2D/Nico Pol2E
cDNA	236		
Genomische DNA	705	RNA-Polymerase 3	Nico Pol3C/Nico Pol3D
cDNA	382		

Aus Pflanzengewebe der zu untersuchenden Pflanzen wurde zuerst Gesamt-RNA extrahiert, dann die mRNA aufgereinigt und anschließend eine Erst-Strang-cDNA-Synthese durchgeführt. Die gewonnene cDNA wurde als Template für die folgende multiplex PCR-Reaktion eingesetzt.

Es wurden insgesamt 34 HPT-positive Linien mit Hilfe der quantitativen RT-PCR auf die Transkriptmenge der drei kernkodierten RNA-Polymerasen untersucht. Dabei bildeten die Linien mit dem pBinOligo 2-5' Plasmid einen besonderen Schwerpunkt, da die RNA-Polymerase 2 sowohl in Chloroplasten als auch in Mitochondrien importiert wird.

Die RT-PCR wurde jeweils mit dem Actinprimerpaar und einem spezifischen RNA-Polymerasen-Primerpaar durchgeführt. Je 1 µl des 20 µl umfassenden Erst-Strang-cDNA-Syntheseansatzes wurde als Template in der PCR eingesetzt. Die Amplifizierung lief im Bereich von 30 Zyklen noch exponentiell ab, so dass in der Standardreaktion insgesamt 30 PCR-Zyklen durchlaufen wurden. Die Annealingtemperaturen wurden den spezifischen RNA-Polymerase-Primern entsprechend ausgewählt, da die Actin-Primer innerhalb einer weiten Temperaturspanne (von 43-63°C) optimale Anlagerung zeigten. Die entsprechenden PCR-Bedingungsangaben finden sich unter 2.2.7.10. Es konnte in keinem Fall eine Verunreinigung durch genomische DNA festgestellt werden.

Die 21 unabhängigen 2-5'-Linien mit Wurzel- und Sprossreduktion zeigten für jede RNA-Polymerase eine Verringerung der Transkriptmenge um mehr als 80% im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abb. 28). Die festgestellte Transkriptmenge korrelierte mit der Stärke des beobachteten Phänotyps.

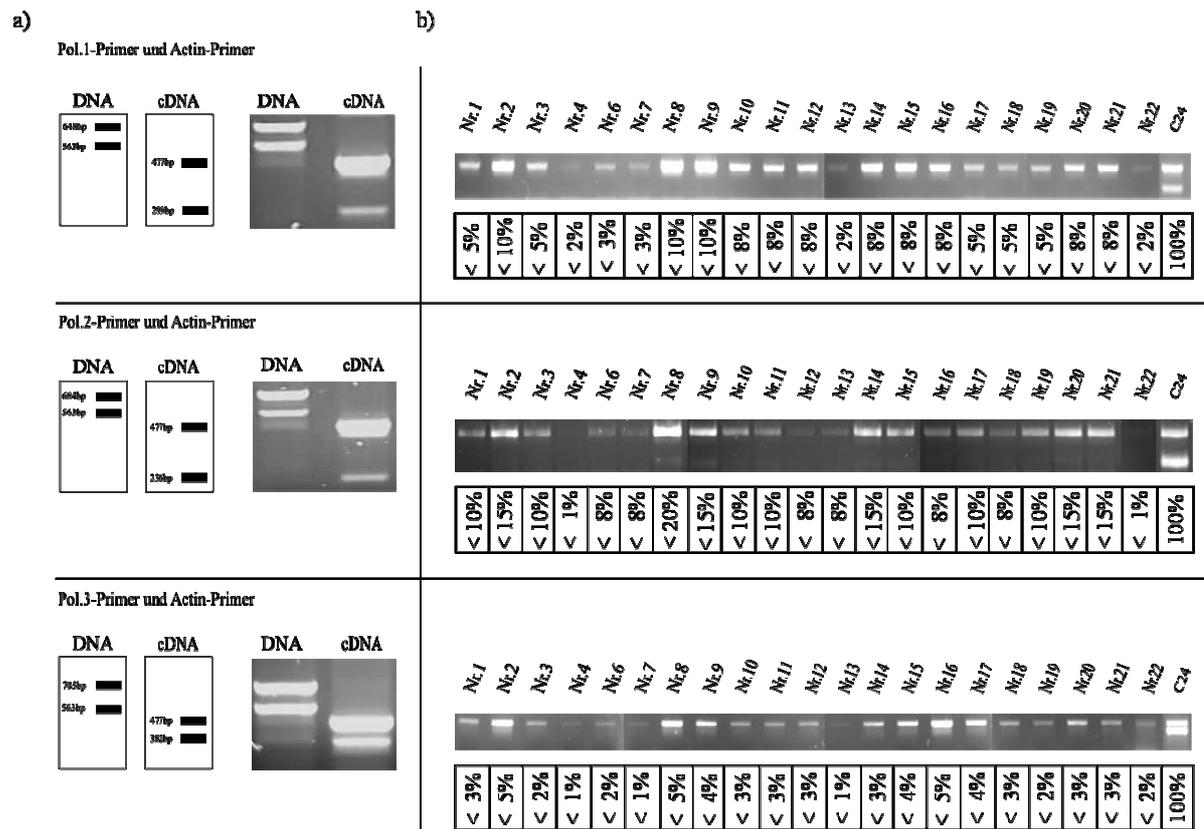


Abb. 28: Multiplex-RT-PCR zur Bestimmung der verschiedenen RNA-Polymerase-Transkripte in der Linie 2-5'.

a) Schematisch: PCR-Produkte der semiquantitativen RT-PCR bei unterschiedlichen Matrizen mit spezifischen Polymerasen-Primerpaaren und Actinprimern (oben) Pol.1- und Actin-Primer, (Mitte) Pol.2- und Actin-Primer, (unten) Pol.3- und Actin-Primer in Abhängigkeit der eingesetzten Templates (DNA bzw. cDNA); b) Gelelektrophoretisch aufgetrennte Produkte der semiquantitativen RT-PCR mit cDNA-Proben der Linie 2-5' Nr. 1-22 und den Primerpaaren für Pol.1 und Actin (oben), Pol.2 und Actin (Mitte), Pol.3 und Actin (unten). Die im Vergleich zum Wildtyp festgestellten RNA-Polymerase-Transkriptmengen sind jeweils linienbezogen angegeben. Die prozentualen Werte der Transkriptmengen für die RNA-Polymerasen ergeben sich nach einem Abgleich des internen Actin-Standards zwischen transgener Linie und dem Wildtyp.

Die fünf anderen *Antisense*-Linien, die ebenfalls mit dem Plasmid pBinOligo2-5' transformiert worden waren, zeigten dagegen eine Reduktion der Transkriptmenge von RNA-Polymerase 1 und 3, jedoch keine für die RNA-Polymerase 2. Als Beispiel sind hierfür die Ergebnisse der RT-PCR-Untersuchung für die Nachkommenschaftslinie 2-5'-3-x-14 in Abbildung 29 gezeigt.

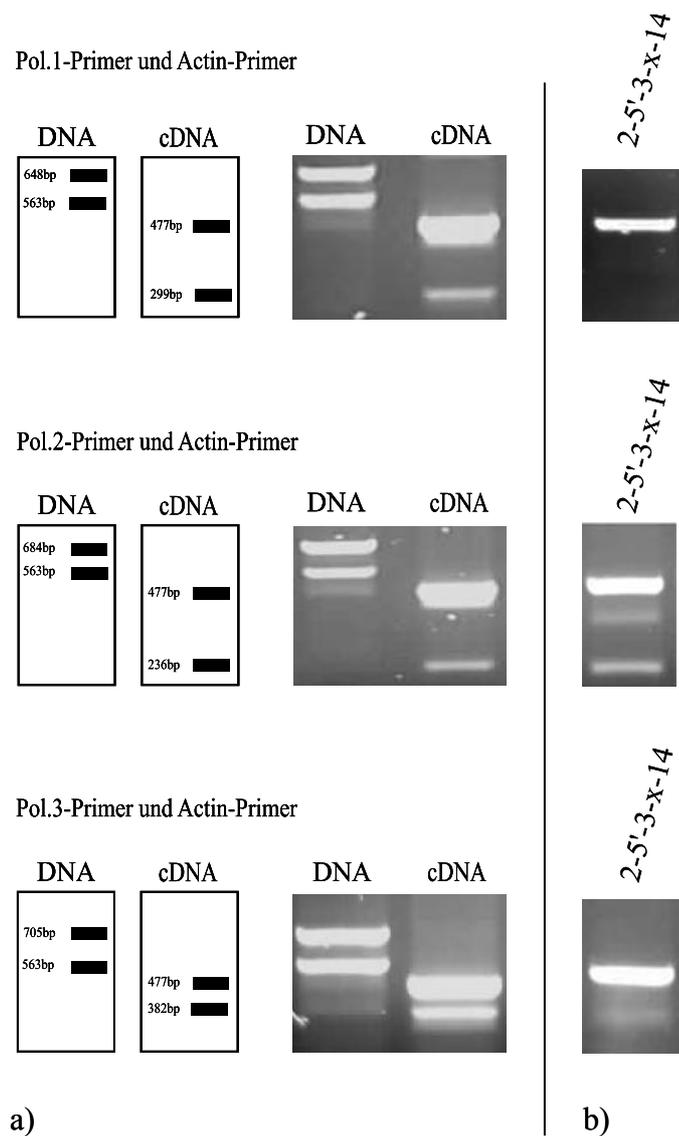


Abb. 29: Bestimmung der Transkriptmenge in der Linie 2-5'-3-x-14 für RNA-Polymerase 1-3.

a) Schematisch: Angaben zu den PCR-Produkten der semiquantitativen RT-PCR bei unterschiedlichen Matrizen mit spezifischen Polymerasen-Primerpaaren und Actinprimern (oben) Pol.1- und Actin-Primer, (Mitte) Pol.2- und Actin-Primer, (unten) Pol.3- und Actin-Primer in Abhängigkeit der eingesetzten Templates (DNA bzw. cDNA); b) Gelelektrophoretisch aufgetrennte Produkte der semiquantitativen RT-PCR mit cDNA-Proben der Linie 2-5'-3-x-14 und den Primerpaaren für Pol.1 und Actin (oben), Pol.2 und Actin (Mitte), Pol.3 und Actin (unten).

Bei den beiden Pflanzenlinien mit den *Antisense*-Konstrukten für RNA-Polymerase 3, 3-5'-2-x und 3-3'-1-x ergaben sich gegensätzliche Ergebnismuster. Während die RT-PCR-Produkte für Linie 3-5'-2-x eine Erhöhung in der Transkriptmenge für alle drei RNA-Polymerasen zeigte, entsprach die Transkriptmenge bei der Linie 3-3'-1-x nur für die RNA-Polymerase 3 dem Wildtyp. Die Transkriptmenge für die RNA-Polymerase 1 und 2 war hingegen deutlich (bis auf 60% bzw. auf 25%) reduziert (Abbildung 30).

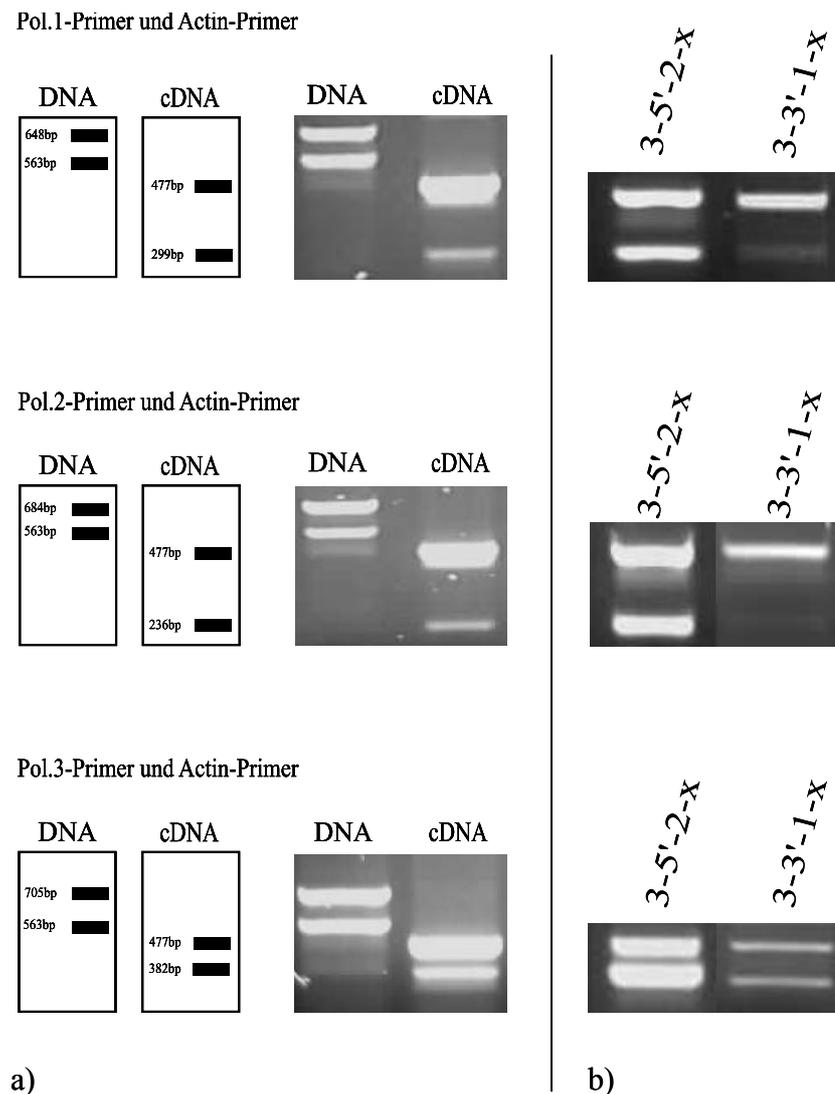


Abb. 30: Bestimmung der RNA-Polymerase-Transkriptmengen in den Linien 3-5'-2-x und 3-3'-1-x.

a) Schematisch: Erwartete PCR-Produkte der semiquantitativen RT-PCR mit (oben) Pol.1- und Actin-Primern, (Mitte) Pol.2- und Actin-Primern und (unten) Pol.3- und Actin-Primern. und Bilder der gelelektrophoretischen Auftrennung der Produkte der semiquantitativen RT-PCR mit DNA- und cDNA-Proben des Wildtyps mit (oben) Pol.1- und Actin-Primern, (Mitte) Pol.2- und Actin-Primern und (unten) Pol.3- und Actin-Primern; b) Gelelektrophoretisch aufgetrennte Produkte der semiquantitativen RT-PCR mit cDNA der Proben 3-5'-2-x und 3-3'-1-x.

Beim Einsatz der cDNA von Linie 1-5'-1-x konnte wiederum eine eindeutige Reduktion der Transkriptmenge für RNA-Polymerase 2 verzeichnet werden, während die Transkriptmengen für RNA-Polymerase 1 und 3 im Vergleich zum Wildtyp unverändert waren. In Abbildung 31 ist die gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR-Produkte dargestellt.

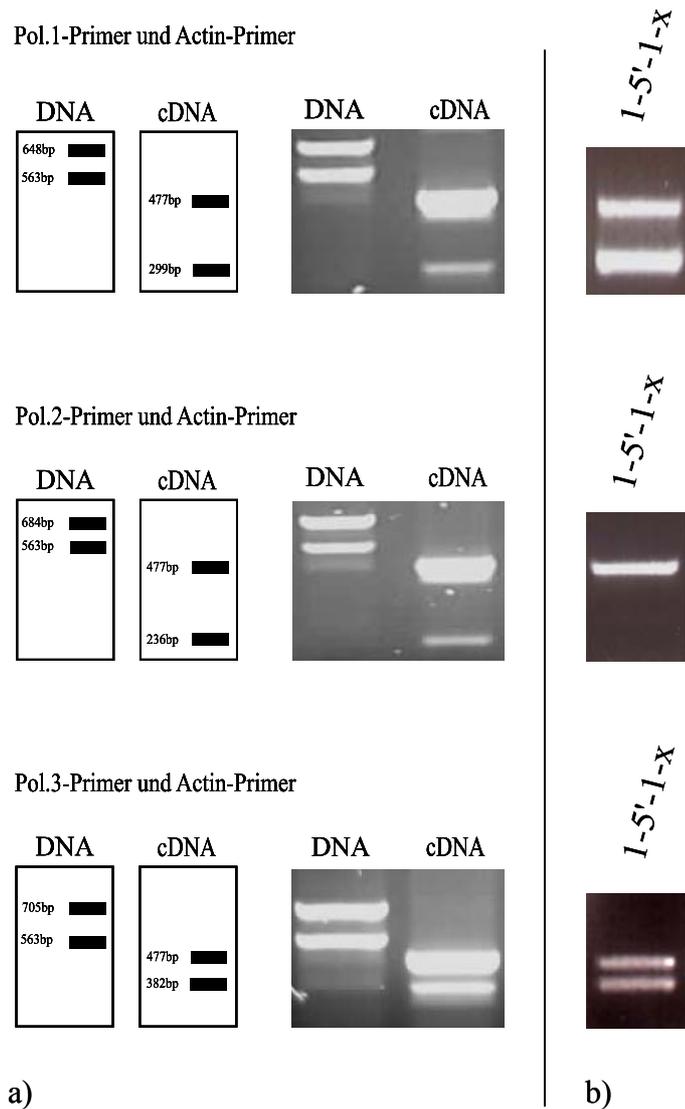


Abb. 31: Bestimmung der Transkriptmengen für die RNA-Polymerasen 1-3 in der Linie 1-5'-1-x.

a) Schematisch: Angaben zu den PCR-Produkten der semiquantitativen RT-PCR mit (oben) Pol.1- und Actin-Primern, (Mitte) Pol.2- und Actin-Primern und (unten) Pol.3- und Actin-Primern. und Bilder der gelelektrophoretischen Auftrennung der Produkte der semiquantitativen RT-PCR mit DNA- und cDNA-Proben des Wildtyps mit (oben) Pol.1- und Actin-Primern, (Mitte) Pol.2- und Actin-Primern und (unten) Pol.3- und Actin-Primern; b) Gelelektrophoretisch aufgetrennte Produkte der semiquantitativen RT-PCR mit cDNA der Probe von 1-5'-1-x.

Bei der Untersuchung der cDNA-Linien, bei denen sowohl *Antisense*-als auch *Sense*-Linien erzeugt worden waren, zeigte sich für die untersuchten Linien #135-2-x, #136-6-x, #139-14a-x und #140-10-x eine Überexpression für alle drei RNA-Polymerasen. Abbildung 32 stellt die gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte der Linien #135-2-x und #140-10-x dar.

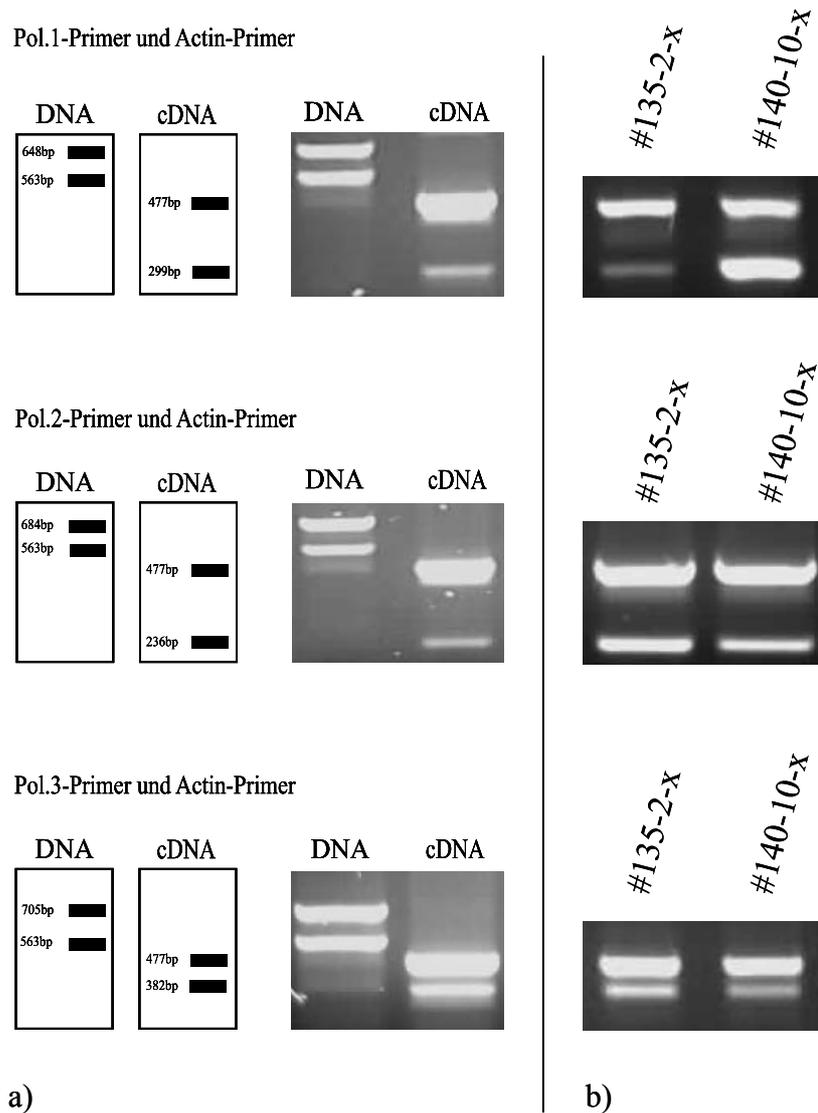


Abb. 32: Bestimmung der RNA-Polymerase-Transkriptmenge in den Linien #135-2-x und #140-10-x.

a) Schematisch: Erwartete PCR-Produkte der semiquantitativen RT-PCR mit (oben) Pol.1- und Actin-Primern, (Mitte) Pol.2- und Actin-Primern und (unten) Pol.3- und Actin-Primern. und Bilder der gelelektrophoretischen Auftrennung der Produkte der semiquantitativen RT-PCR mit DNA- und cDNA-Proben des Wildtyps mit (oben) Pol.1- und Actin-Primern, (Mitte) Pol.2- und Actin-Primern und (unten) Pol.3- und Actin-Primern; b) Gelelektrophoretisch aufgetrennte Produkte der semiquantitativen RT-PCR mit cDNA der Proben von #135-2-x und #140-10-x.

Die Ergebnisse für die Untersuchung der Transkriptmengen der einzelnen RNA-Polymerasen und die unterschiedlichen Linien werden in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tab. 9: Zusammenfassung der Daten für die RNA-Polymerasen-Expression in den *Antisense*- und *Sense*-Pflanzen

Pflanzenlinienbezeichnung	Ergebnis der RT-PCR-Untersuchung für folgende RNA-Polymerasen		
	Pol.1	Pol.2	Pol.3
1-5'-1-x	∅	-	∅
2-5' Nr.1-22	-	-	-
2-5'-1-x	-	∅	-
2-5'-3-x	-	∅	-
2-5'-6-x	-	∅	-
2-5'-7-x	-	∅	-
2-5'-9-x	-	∅	-
3-5'-2-x	+	+	+
3-3'-1-x	-	-	∅
#135-2-x	+	+	+
#136-6-x	+	+	+
#139-14a-1	+	+	+
#140-10-2	+	+	+

+ Transkriptmenge erhöht (bis zu 300%)

- Transkriptmenge reduziert (bis zu 100%)

∅ Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp unverändert

3.5 Phänotypen und RNA-Editing

Die mitunter sehr starken phänotypischen Effekte der transformierten Linien ließen auf eine besondere Relevanz der drei RNA-Polymerasen schließen. Die Tatsache, dass die RNA-Polymerase das zentrale Enzym der Transkription darstellt, ließ eine Beteiligung an weiteren Prozessen der Transkriptproduktion und -veränderung vermuten. Ein wesentlicher Bestandteil der Transkriptprozessierung in den Organellen ist das RNA-Editing. Es findet sowohl in Chloroplasten als auch in Mitochondrien statt und führt zur quantitativen und qualitativen Modulation der Transkripte. Die Tatsache, dass eine der drei RNA-Polymerasen (RNA-Polymerase 2) sowohl in Chloroplasten als auch in Mitochondrien importiert wird, ließ die Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen RNA-Polymerase-Reduktion und RNA-Editing vielversprechend erscheinen. Der Einfluss jeder einzelnen RNA-Polymerase auf Erfolg des RNA-Editings sollte mit Hilfe der selektiven Reduktion der RNA-Polymerasen durch die *Antisense*-Methode ermittelt werden.

3.5.1 Untersuchung des plastidären und des mitochondrialen RNA-Editings

Karcher und Bock (1998) konnten in Tabak-Chloroplasten einen hemmenden Effekt von Hitzeschock- sowie Antibiotikabehandlung (prokaryotische Translationshemmung) auf das plastidäre RNA-Editing nachweisen. Dabei waren jedoch offenbar nur Stellen-spezifische Faktoren betroffen, da es keinen allgemeinen sondern nur einen auf bestimmte Editing-Stellen beschränkten Ausfall des Editings zu beobachten gab.

Die Pflanzen der transgenen *Antisense*-Linien mit dem Konstrukt des vorderen Teils von RNA-Polymerase 2 (Bezeichnung 2-5' Nr.1-22), die einen offensichtlichen und starken Phänotyp sowie eine deutliche Transkriptreduktion aller drei RNA-Polymerasen aufwiesen, wurden herangezogen, um eine Untersuchung des RNA-Editings durchzuführen.

Dabei wurde das in Chloroplasten und Mitochondrien am häufigsten auftretende C-zu-U-Editing, bei dem ein Cytidinrest durch einen Uridinrest mit Hilfe eines bisher unbekanntes Mechanismus ersetzt wird, untersucht.

Pflanzengewebe der zu untersuchenden Pflanzenlinien wurde mit Hilfe von Gesamt-RNA-Extraktion, mRNA-Aufreinigung und Erst-Strang-cDNA-Synthese zur anschließenden Untersuchung des RNA-Editings an definierten plastidären und mitochondrialen RNA-Editing-Stellen eingesetzt. Diese Untersuchung erfolgte nach der Erst-Strang-cDNA-Synthese mittels spezifischer Amplifizierung von cDNA-Abschnitten bestimmter Gene und anschließender Sequenzierung der gewonnenen cDNA-Amplifikate. An den Stellen, an denen in der genomischen Sequenz ein Cytidin eingebaut ist, wird bei erfolgreichem RNA-Editing in der mRNA ein Austausch vorgenommen und anstelle dessen ein Uridin eingesetzt. Dieser Uridinrest sorgt bei der Herstellung von cDNA dafür, dass ein komplementäres T (also ein Thyminrest) erscheint, anstelle des genomisch kodierten Cytidins. Im Vergleich mit den Sequenzierungsergebnissen für die Wildtyp-cDNA konnte so festgestellt werden, ob die Editingreaktion in den transgenen Pflanzen im jeweils untersuchten Gen korrekt und vollständig abgelaufen ist.

Von den insgesamt 12 plastidären Editing-Stellen in *Arabidopsis thaliana* wurden hier 8 Editing-Stellen untersucht. Tabelle 10 gibt einen Überblick über die untersuchten plastidären RNA-Editing-Stellen, die editierten Cytidine und die Position der editierten Codons.

Tab. 10: RNA-Editing in Plastiden. Untersuchte RNA-Editing sites in spezifischen plastidären Genen in Pflanzen transgener *Arabidopsis thaliana*-Linien

Name des untersuchten Gens	Bezeichnung des untersuchten Gens	Position des/der untersuchten Codons	editierte Codons	eingesetztes Primerpaar	Größe des PCR-Produkts (bp)	
plastidäre RNA-Editing sites	ATPase Untereinheit I	<i>atpF</i>	31	cCa	atpF1/atpF2	406
	NADH Dehydrogenase Untereinheit 2	<i>ndhB</i>	156	cCa	ndhB_1/ndhB-2	420/1120
	NADH Dehydrogenase Untereinheit 2	<i>ndhB</i>	196	Cau	ndhB_1/ndhB-2	420/1120
	NADH Dehydrogenase Untereinheit 2	<i>ndhB</i>	371	cCa	ndhB-8/ndhB-9	273
	NADH Dehydrogenase Untereinheit ND5	<i>ndhF</i>	97	uCa	ndhF-1/ndhF-2	332
	Photosystem II Cytochrom b559	<i>psbE</i>	72	Ccu	psbE-1/psbE-2	249
	plastidäre RNA Polymerase Untereinheit Beta	<i>rpoB</i>	113	uCu	rpoB-1/rpoB-2	366
	plastidäre RNA-Polymerase Untereinheit Beta	<i>rpoB</i>	184	uCa	rpoB-1/rpoB-2	366
	30S Chloroplasten ribosomales Protein S14	<i>rps14</i>	50	cCa	rps14-1/rps14-2	297

C = zu U editiertes C

Die Primerpaare wurden so gewählt, dass durch die PCR DNA-Produkte in der Größe zwischen 250bp und 420bp amplifiziert werden konnte. Mit Ausnahme des *ndhB*-Gens waren alle weiteren untersuchten plastidären Gene intronfrei. Bei der Amplifizierung des *ndhB*-Genabschnitts mit dem Primerpaar ndhB-1/ndhB-2 entstanden zwei Produkte, ein „gesplittedes“ Produkt ohne Intron (420bp) und ein „ungesplittedes“ mit Intron (1120bp).

Die Untersuchung des plastidären Editings der Linie 2-5' Nr.16 für die 8 Editing-Stellen der 6 verschiedenen Gene ergab insgesamt eine Reduktion des RNA-Editings für 6 Editing-Stellen, lediglich das RNA-Editing in den Genen *atpF* und *ndhB* (Position 156) zeigte dieselbe Intensität wie der Wildtyp. Die übrigen 6 Editing-Stellen der Gene *ndhB* (Position 371), *ndhF*, *psbE*, *rpoB* (Position 113 und 184) und *rps14* waren im Vergleich zum Wildtyp zwischen 20% und 75% weniger stark editiert. Im Falle der zweiten Editing-Stelle im *rpoB*-Gen (Position 184) kam es zu einem vollständigen Ausfall des RNA-Editings. In Tabelle 11 sind die Ergebnisse für die einzelnen Editing-Stellen aufgeführt.

Tab. 11: Plastidäres RNA-Editing in Pflanzen der Linie 2-5'. Editierungsstärke einzelner plastidärer RNA-Editing-Stellen in cDNA-Amplifikaten transgener *Arabidopsis thaliana*-Pflanzenlinien im Vergleich zu cDNA-Amplifikaten vom Wildtyp in Prozent

C→T (Editierung)				
Sequenzierungsergebnis für folgende Pflanzenlinien				
Gen	Codon	Sequenz	2-5' Nr.16	cDNA WT
<i>atpF</i>	31	cCa	100%T	100%T
<i>ndhB</i>	156	cCa	100%T	100%T
<i>ndhB</i>	371	cCa	30%T	>60%T
<i>ndhF</i>	97	uCa	<10%T	40% T
<i>psbE</i>	72	Ccu	80%T	100%T
<i>rpoB</i>	113	uCu	50%T	90% T
<i>rpoB</i>	184	uCa	0%T	66% T
<i>rps14</i>	50	cCa	10%T	-

Abbildung 33 zeigt den Vergleich der Editingstelle 184 des *rpoB*-Gens sowohl im Wildtyp als auch in einer untersuchten transgenen Pflanzenlinie mit der Bezeichnung 2-5' Nr.16.

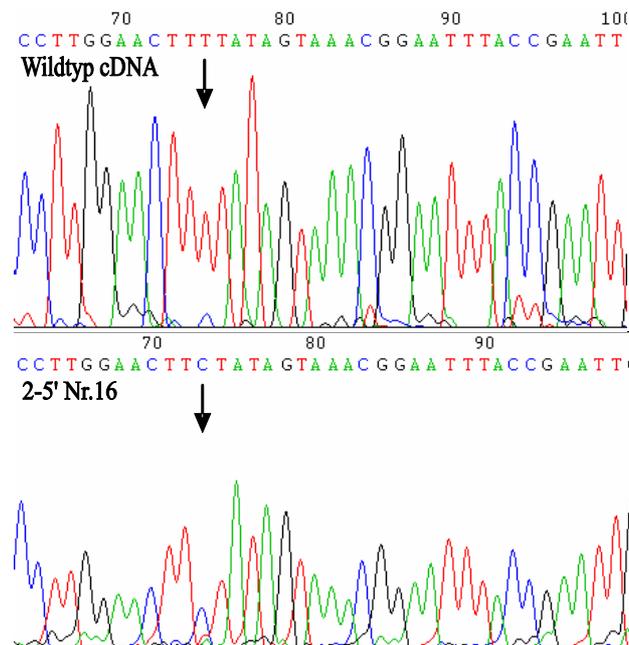


Abb. 33: Nachweis des Cytidin zu Uridin RNA-Editings der Editingstelle 184 des *rpoB*-Gens des Wildtyps (oben) im Vergleich mit der Linie 2-5' Nr.16 (unten). Die Editingstelle ist mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden in den weiteren Pflanzenlinien, die in der RT-PCR zumindest bei einer RNA-Polymerase eine Transkriptreduktion gezeigt hatten, die Editing-Stellen der Gentranskripte von *ndhB* und *rpoB* untersucht.

Hierbei stellte sich heraus, dass die vier Editing-Stellen dieser zwei Gene in diesen Pflanzenlinien entsprechend dem Wildtyp editiert waren. Die in Linie 2-5'-Nr.16 ausgefallene Editing-Stelle Nr.2 des *rpoB*-Gens war bei allen vier Linien 1-5'-1-x, 2-5'-3-x-16-7 (Nachkommenschaftslinie der Linie 2-5'-3-x), 3-3'-1-x und #135-2-x vollständig editiert.

RNA-Editing an mitochondrialen Transkripten findet in höheren Pflanzen sehr viel häufiger statt als an plastidären Transkripten. Aufgrund dessen mussten für die Untersuchung des mitochondrialen RNA-Editings einige Gene ausgewählt werden.

Es wurde schließlich das RNA-Editing an Transkripten von insgesamt drei verschiedenen Genen untersucht, für das *nad1*-Gen, welches für die NADH-Dehydrogenase-Untereinheit 1 kodiert, für das *cob*-Gen, welches für Apocytochrom B kodiert, und für das *cox3*-Gen, das für die Cytochrom Oxidase Untereinheit 3 kodiert. Zur Amplifizierung der gewünschten cDNA-Bereiche wurden die Primerpaare *cob*vorn/*cob*hinten, *cox3*vorn/*cox3*hinten und *nd1*-B/C/*nd1*_D/E eingesetzt. Dabei werden folgende Produktgrößen erwartet, *cob*-575bp, *cox3*-591bp und *nad1*-270bp.

Für die Linie 2-5' Nr.8 und Nr.16 zeigte es sich, dass im Gegensatz zum plastidären RNA-Editing, beim mitochondrialen RNA-Editing des *nad1*-Gens eine ordnungsgemäße Editierung der vorhandenen Editing-Stellen stattgefunden hat. Es fanden sich vier weitere Editing-Stellen, die jedoch nur zu 30-50% editiert waren und für eine Übereditierung dieses Transkripts sprechen. Die beiden anderen untersuchten Transkripte der Gene *cob* und *cox3* waren durchgängig geringer editiert als die Transkripte des Wildtyps, wobei im Transkript des *cob*-Gens drei der vier untersuchten Editing-Stellen ausgefallen waren und die vierte Stelle nur zu 10% editiert war. Im Transkript des *cox3*-Gens wurden vier der fünf untersuchten Editing-Stellen zu 50-60% editiert, während die fünfte Editingstelle uneditiert blieb.

Die Untersuchungsergebnisse der untersuchten 2-5'-Linien im Hinblick auf das mitochondriale RNA-Editing sind in Abb. 34 schematisch dargestellt.

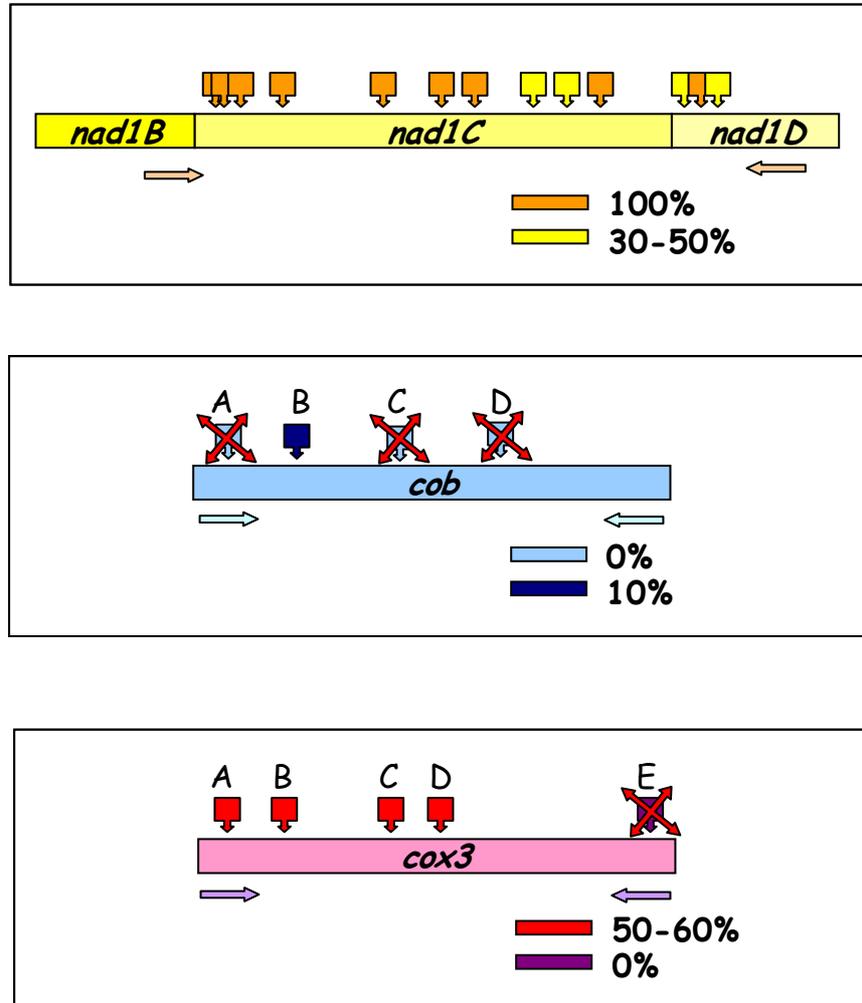


Abb. 34: RNA-Editing mitochondrialer Gene in 2-5'-Pflanzen.

Oben: Transkript des *nad1*-Gens. Mitte: Transkript des *cob*-Gens. Unten: Transkript des *cox3*-Gens. Bunt markierte Pfeile geben die Position der eingesetzten Primer an. Die Exons des *nad1*-Gens sind mit *nad1B*, *nad1C* und *nad1D* bezeichnet.

Um den Einfluss der RNA-Polymerasen auf das RNA-Editing-„Verhalten“ in den Mitochondrien und Chloroplasten nicht nur unter Reduktion der Transkriptmenge bei den RNA-Polymerasen, sondern auch bei Überexpression derselben bewerten zu können, wurden Nachkommen der 2-5'-3-x untersucht. Diese Pflanzen der Nachkommenschaftslinien zeigen einen Phänotyp, bei welchem die Blätter nur zum Teil grün gefärbt sind (Abbildung 19-23 zeigen einige Beispiele für diesen Phänotyp). Diese Pflanzen wiesen eine erhöhte Transkriptmenge der drei RNA-Polymerasen auf.

Von diesen Pflanzenlinien wurden Transkripte der plastidären und mitochondrialen Gene *ndhB*, *rpoB* und *cox3* untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass in allen Transkripten der drei untersuchten Gene nahezu vollständiges und korrektes RNA-Editing stattgefunden hatte. Eine Übereditierung, verursacht zum Beispiel durch einen Überschuss an Editing-Faktoren oder durch Instabilität der Transkripte, konnte in diesen Fällen nicht festgestellt werden.

3.6 Untersuchung von RNA-Polymerasen-Insertionslinien

Mit Hilfe von knock-out-Linien der Firma SIGnAL (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, Torrey Mesa Research Institut, San Diego, USA) sollte eine Übereinstimmung der phänotypischen Effekte im Vergleich zu den *Antisense*- und *Sense*-Linien, abhängig von der Lage der T-DNA-Insertion, festgestellt werden. Für jede der drei RNA-Polymerasen, für die bereits die *Antisense*-Pflanzenlinien existierten, wurden T-DNA Insertionslinien herangezogen.

Folgende Linien wurden zur Analyse eingesetzt: Salk_005875 RNA-Polymerase 1 (Δ -RpoT;1), Salk_132842 RNA-Polymerase 2 (Δ -RpoT;2) und Salk_093884 RNA-Polymerase 3 (Δ -RpoT;3). Die T-DNA-Insertion von Δ -RpoT;1 befindet sich im vorderen Bereich des Exons 1, 233bp hinter dem Initiationscodon (ATG) in 3'-Richtung orientiert. In der Linie Δ -RpoT;2 ist die T-DNA im Intron 3 lokalisiert, 58bp von der Exon-Introngrenze entfernt und in 3'-Richtung orientiert. Die T-DNA in der Insertionslinie Δ -RpoT;3 liegt ebenfalls im 3. Intron. Sie ist 53bp von der Exon-Introngrenze entfernt und in 5'-Orientierung positioniert.

Die Lage der T-DNA-Insertionen in den einzelnen RNA-Polymerase-Genen ist in Abb. 35 schematisch dargestellt. Von den Insertionslinien wurden Samen ausgelegt und auf Erde im Gewächshaus unter Standard-*Arabidopsis*-Bedingungen kultiviert, um die Aufspaltung für die T-DNA-Insertion zu untersuchen.

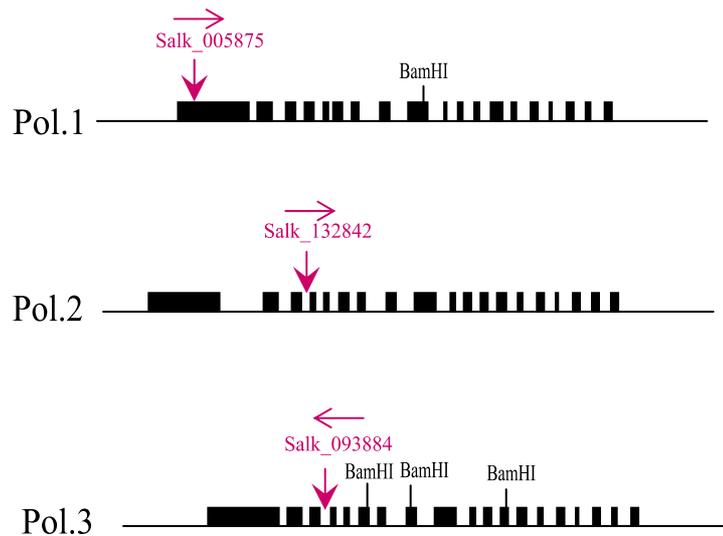


Abb. 35: Lage der T-DNA in den Insertionslinien für die einzelnen RNA-Polymerase-Gene.

Schwarz gefüllte Bereiche bezeichnen die Exons, weiße Lücken stellen die Introns dar. Der rote Pfeil über der Nummernbezeichnung gibt die Orientierung der T-DNA in den Insertionslinien ausgehend von der left border an.

3.6.1 Untersuchung der Aufspaltung der Insertionslinien

Zur Untersuchung der Aufspaltung der T-DNA-Linien für die T-DNA-Insertion wurden PCR-Reaktionen durchgeführt. Dabei wurde ein Primerpaar eingesetzt, bei dem ein Primer in der T-DNA lag (Binv4-left border primer) und ein Primer, der im RNA-Polymerase-Gen vor bzw. hinter der T-DNA-Insertion lag (siehe oben). Zur Amplifizierung der Wildtyp-DNA kam jeweils ein Primerpaar zum Einsatz, bei dem ein Primer vor und ein Primer hinter der entsprechenden Insertionsstelle positioniert war. Eine Amplifizierung beider erwarteter PCR-Produkte war nur bei DNA-Proben heterozygoter Pflanzenlinien möglich. Tabelle 12 gibt einen Überblick über die eingesetzten Primerpaare mit den erwarteten PCR-Produkt-Größen in Abhängigkeit vom eingesetzten Template.

Tab. 12: Primerkombinationen zur Untersuchung der Aufspaltung der Insertionslinien

Bezeichnung der T-DNA-Insertionslinie	Bezeichnung des Gens mit Insertion	Bezeichnung der Primer	Detektierte DNA	Größe des PCR-Produkts
Salk_005875 (Δ -RpoT;1)	RNA-Polymerase 1	Binv4/Pol 1tag	T-DNA	274bp
Salk_132842 (Δ -RpoT;2)	RNA-Polymerase 2	Binv4/ Nico Pol2E	T-DNA	381bp
Salk_093884 (Δ -RpoT;3)	RNA-Polymerase 3	Nico Pol3C/ Binv4	T-DNA	428bp
Salk_005875 (Δ -RpoT;1)	RNA-Polymerase 1	Pol1-T7/Pol1tag	Wildtyp	522bp
Salk_132842 (Δ -RpoT;2)	RNA-Polymerase 2	Nico Pol2D/Nico Pol2E	Wildtyp	688bp
Salk_093884 (Δ -RpoT;3)	RNA-Polymerase 3	Nico Pol3C/Nico Pol3D	Wildtyp	711bp

Es stellte sich heraus, dass bei den Insertionslinien vor allem heterozygote zum Teil jedoch auch homozygote Pflanzenlinien vorhanden waren. Für die RNA-Polymerase 1-Insertionslinie (Δ -RpoT;1) wurden unter mehr als 200 Samen nur heterozygote Linien und keine homozygote Linie identifiziert. Für die Insertionslinie der RNA-Polymerase 2 wurden sowohl heterozygote als auch homozygote Linien bezüglich der Insertion gefunden. Die Insertionslinie der RNA-Polymerase 3 zeigte ebenfalls heterozygote und homozygote Linien. Die Abbildungen 36-38 zeigen die PCR-Ergebnisse exemplarisch.

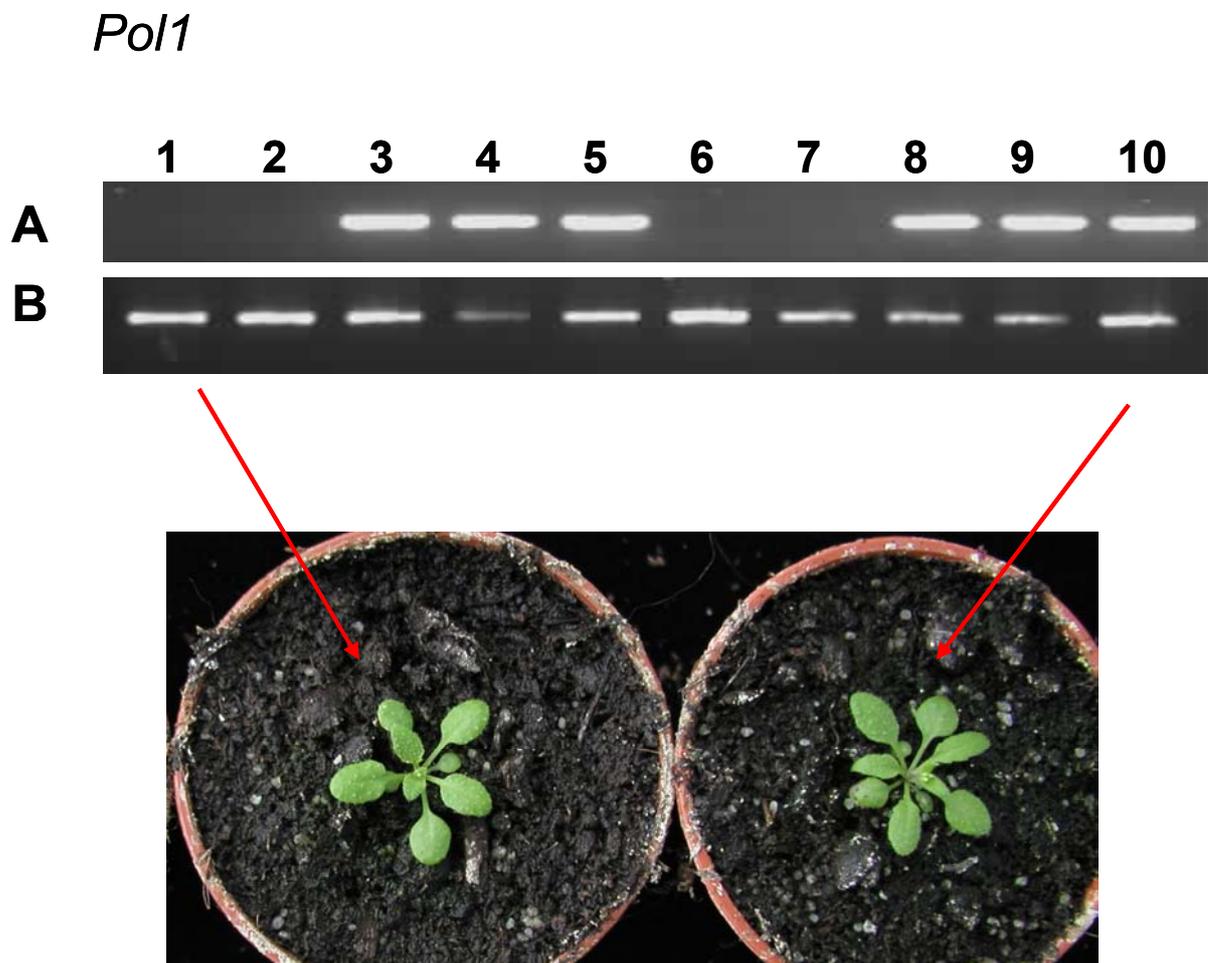


Abb. 36: Aufspaltung der Insertionslinie Δ -RpoT;1 Exemplar 1-10.

Oben: Dargestellt sind jeweils die gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte, in der oberen Zeile (A) mit dem Primerpaar zum Nachweis der T-DNA-Insertion (Bin4/Pol 1tag), in der unteren Zeile (B) mit dem Primerpaar zum Nachweis der Wildtyp-DNA (Pol1-T7/Pol1tag). Unten: Phänotypen der Pflanzen, links ist der Wildtyp dargestellt, rechts die eine für die Insertion heterozygote Pflanze der Linie Δ -RpoT;1. Die knock-out Mutante hat den gleichen Phänotyp wie der Wildtyp. Der Durchmesser der Töpfe beträgt 6cm.

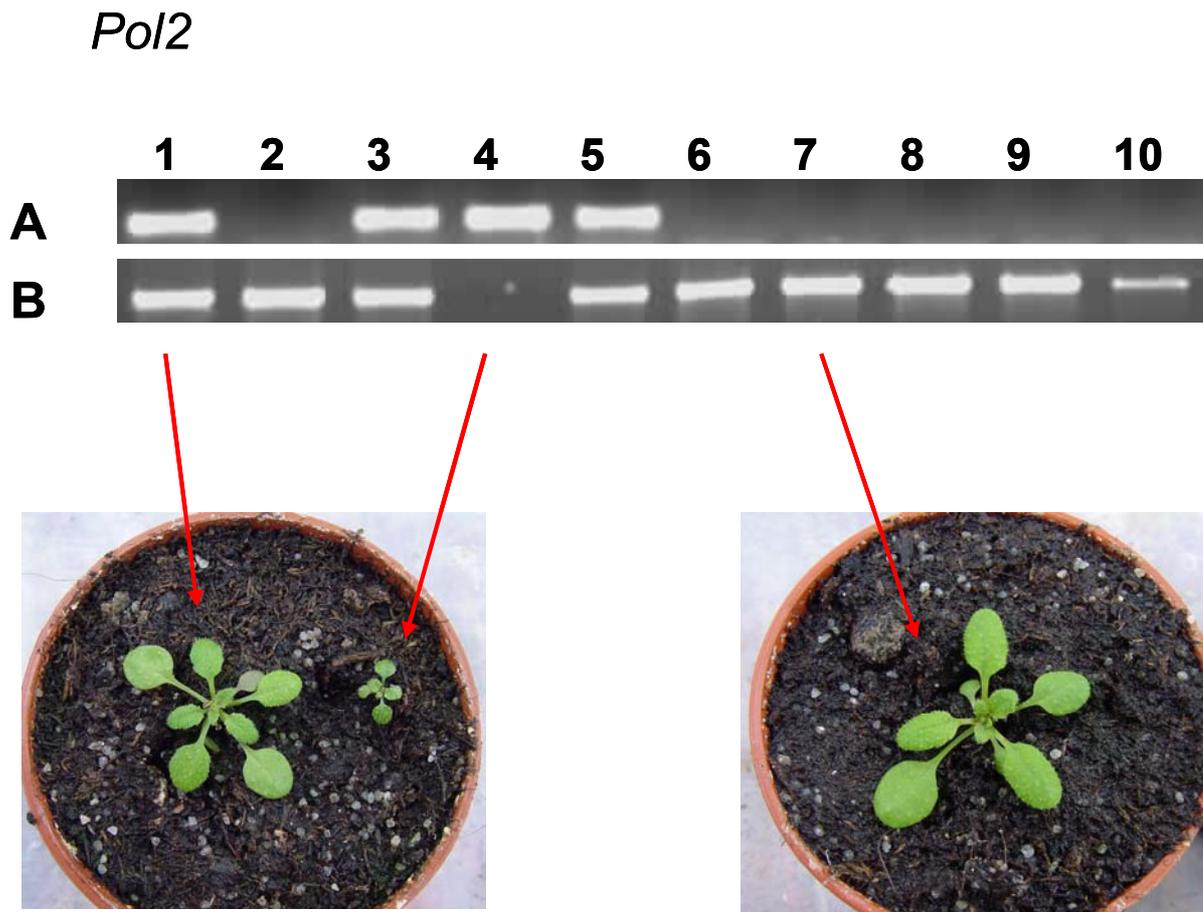


Abb. 37: Aufspaltung der Insertionslinie Δ -RpoT;2 Exemplar 1-10.

Oben: Dargestellt sind jeweils die gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte, in der oberen Zeile (A) mit dem Primerpaar zum Nachweis der T-DNA-Insertion (BinV4/ Nico Pol2E), in der unteren Zeile (B) mit dem Primerpaar zum Nachweis der Wildtyp-DNA (Nico Pol2D/Nico Pol2E). Unten: Darstellung der pflanzlichen Phänotypen. Links sind zwei Pflanzen der Insertionslinie Δ -RpoT;2 gezeigt, wobei sich die heterozygote Pflanze links im Topf, die homozygote rechts davon befindet. Die homozygote Pflanze zeigt einen deutlich verzögerten und verringerten Wuchs, während die heterozygote Pflanze dem Wildtyp (rechts dargestellt) gleicht. Allerdings ist auch bei dieser Pflanze eine etwas geringere Größe festzustellen. Der Topfdurchmesser beträgt 6cm.

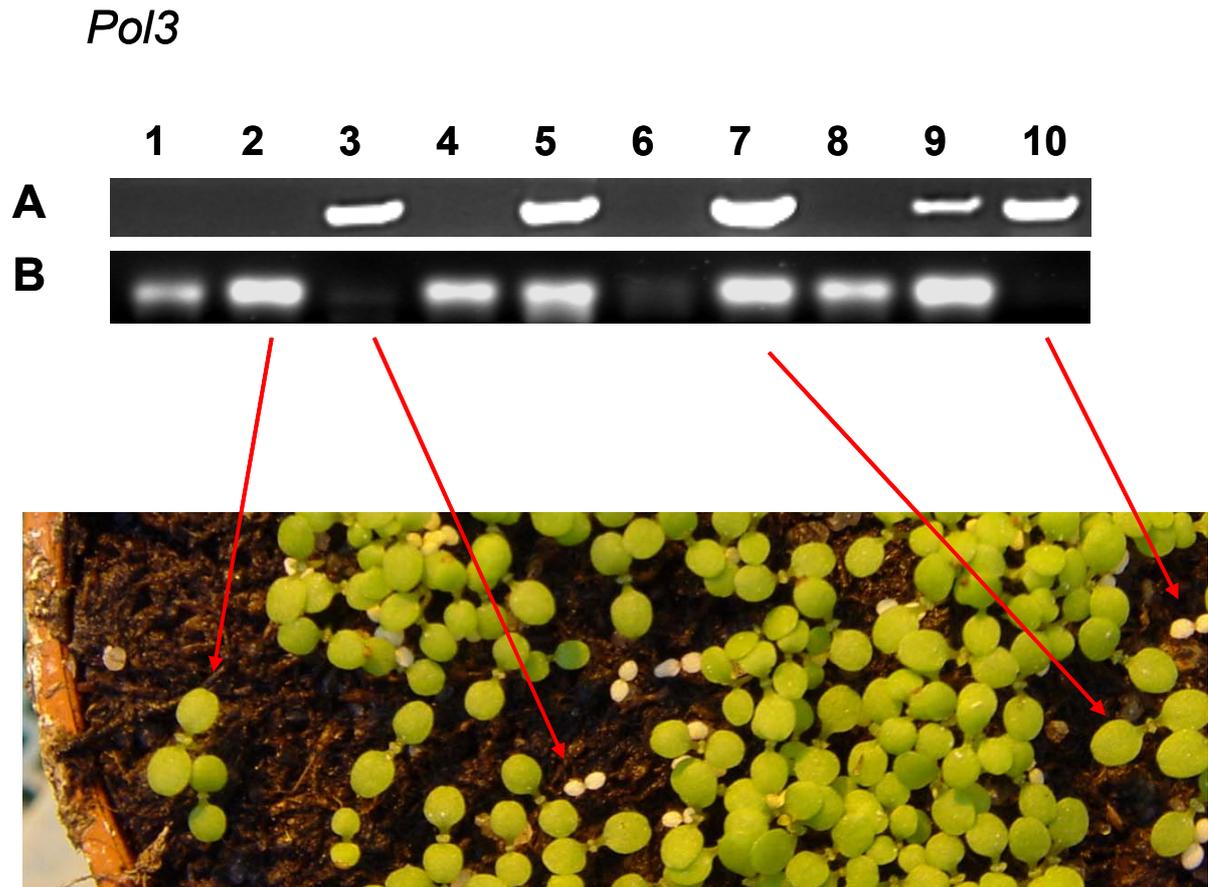


Abb. 38: Aufspaltung der Insertionslinie Δ -RpoT;3 Exemplar 1-10.

Oben: Dargestellt sind jeweils die gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte, in der oberen Zeile (A) mit dem Primerpaar zum Nachweis der T-DNA-Insertion (Nico Pol3C/ Binv4), in der unteren Zeile (B) mit dem Primerpaar zum Nachweis der Wildtyp-DNA (Nico Pol3C/Nico Pol3D). Unten: Durch Pfeile gekennzeichnet sind die unterschiedlichen Pflanzen der Insertionslinie Δ -RpoT;3, sowie ein Wildtyp. Die für die Insertion homozygoten Pflanzen zeigen eine deutliche Wachstumsverzögerung und einen kleinen Wuchs. Besonders auffällig ist auch der bleiche Phänotyp dieser Pflanzen. Dagegen zeigen die für die Insertion heterozygoten Pflanzen einen Phänotyp, der dem Wildtyp gleicht.

Bei den heterozygoten RNA-Polymerase-Insertionslinien konnte bei der Entwicklung der Pflanzen während der Gewächshausanzucht kein auffälliger, vom Wildtyp abweichender, Phänotyp festgestellt werden. Die homozygoten Pflanzen zeigten aber deutlich einen stark verringerten Wuchs und im Fall der Insertionslinie für RNA-Polymerase 3 eine deutliche Entfärbung der Blätter. Die Keimlinge konnten jedoch *in vitro* auf Saccharose-haltigem Medium innerhalb von zwei Wochen eine leichte Nachgrünung des Blattgewebes erreichen. Nur nach dieser Gewebekulturphase war ein Ausbringen der Pflanzen auf Erde möglich.

Die Untersuchung heranreifender Schoten der RNA-Polymerasen-Insertions-Linien zeigte, dass bereits dort ein deutlicher Effekt auftrat (Abb. 39). Bei Linie Δ -RpoT;1 zeigten 27% der Samen einer Schote einen letalen Effekt (verkümmerter Samenansatz), bei der Linie Δ -RpoT;2 zeigten 16% einen Effekt bei der Samenreifung (kleine Samen, die aber

keimungsfähig sind). Bei der Linie Δ -RpoT;3 zeigten bis zu 76% der untersuchten Samen Abweichungen von der Samenentwicklung des Wildtyps.

Abb. 39 zeigt exemplarisch geöffnete unreife Schoten der unterschiedlichen Insertionslinien für die RNA-Polymerasen 1-3.

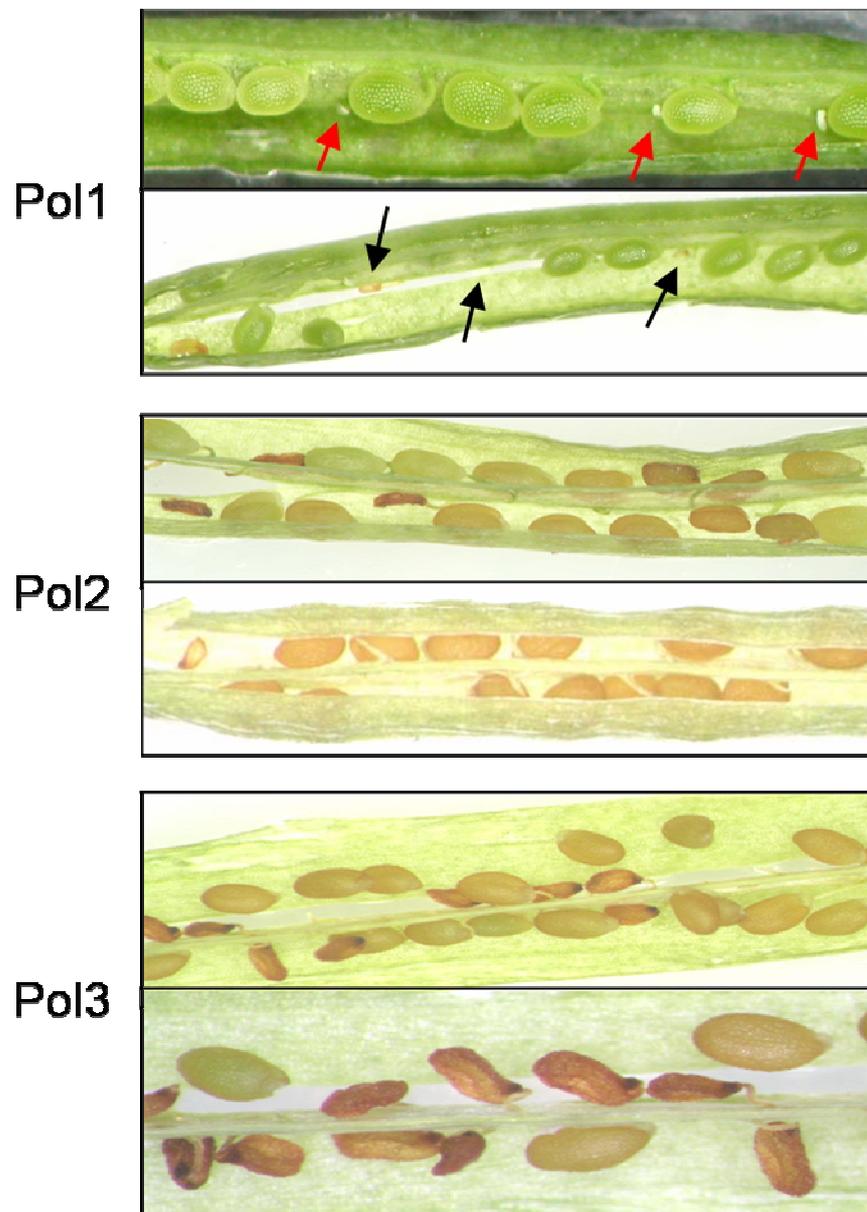


Abb. 39: Schoten von Pflanzen der T-DNA-Insertionslinien.

Oben: Δ RpoT;1 (RNA-Polymerase 1). Mitte: Δ RpoT;2 (RNA-Polymerase 2). Unten: Δ RpoT;3 (RNA-Polymerase 3). Schoten kurz vor dem Abreifen (6 Wochen nach der Keimung).

Die große Menge an degenerierten Samen der Insertionslinie für Δ -RpoT;3 lässt darauf schließen, dass es sich bei einigen dieser Samen um die zumindest keimungsfähigen Samen handelt, aus denen die homozygoten Pflanzen hervorgehen. Diese Samen unterliegen im Gegensatz zu denen der Linie Δ -RpoT;1 keinem letalen Effekt.

3.6.2 Phänotyp der Insertionslinie Δ -RpoT;3

Die in Abb. 38 gezeigten homozygoten Pflanzen der Insertionslinie Δ -RpoT;3 konnten auf Erde nicht weiterkultiviert werden, sie starben ab. Lediglich bei Anzucht auf Saccharosehaltigem *Arabidopsis*-Medium *in vitro* war eine Kultur dieser Nachkommen möglich. Abb. 40 a) zeigt im Vergleich den Unterschied des Phänotyps zwischen einer Wildtyp-Pflanze und Δ -RpoT;3-Mutanten, die *in vitro* angezogen wurden. Nach einem Zeitraum von zwei Wochen grünten die Pflanzen mit dem Albinophänotyp langsam nach (Abb. 40 b). An den Primär- und Sekundärblättern zeigte sich zusätzlich zur Bleichung der Pflanzen eine charakteristische Blattverformung („Öhrchenbildung“), die bereits zuvor bei Pol.3::GFP-Mutanten beobachtet worden war (siehe dazu Abb. 40 c). Auch diese Blattverformung verschwindet z. T. jedoch mit zunehmendem Alter der Pflanze und der Phänotyp nähert sich dem des Wildtyps an.

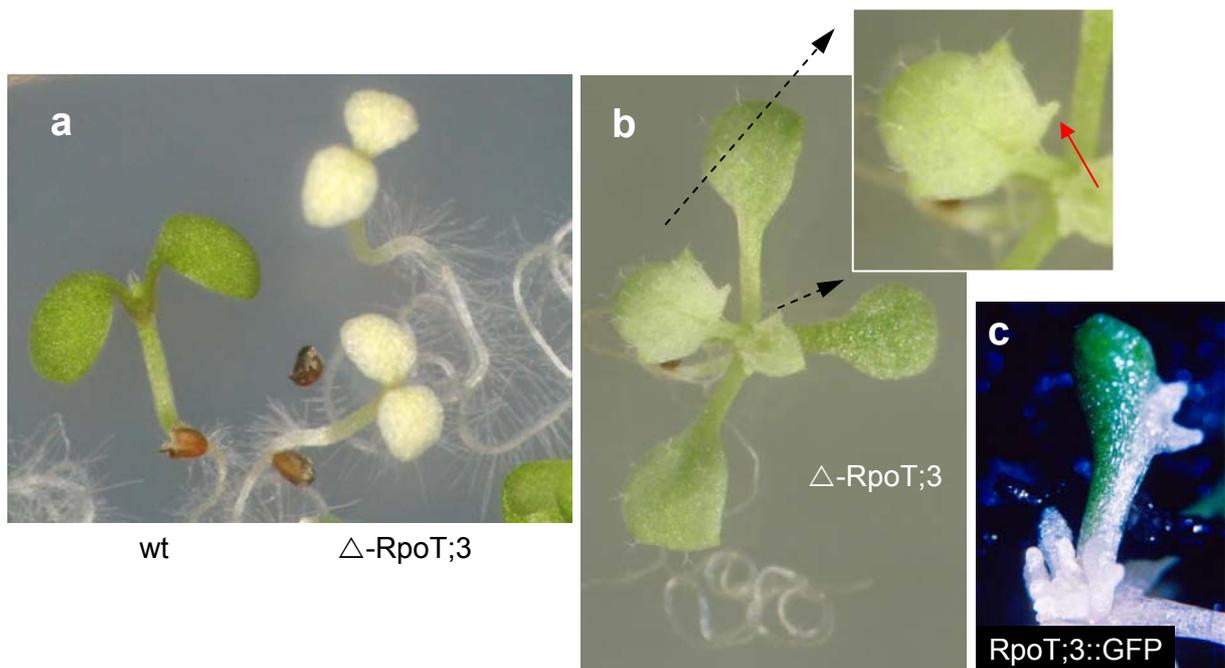


Abb. 40: Phänotyp der homozygoten Δ -RpoT;3-Mutanten (*in vitro*).

a) Phänotyp 10 Tage alter Δ -RpoT;3-Keimlinge im Vergleich zum Wildtyp. Die Pflanzen wurden *in vitro* auf *Arabidopsis*-Medium (1% Saccharose) angezogen. Der Unterschied in der Blattfärbung ist im Vergleich zum Wildtyp deutlich zu erkennen. b) Δ -RpoT;3-Mutante nach zweiwöchiger Kultur *in vitro* auf Saccharose-haltigem Medium. Die beginnende Nachfärbung des Blattgewebes ist bereits gut zu erkennen. Die charakteristische Blattverformung („Öhrchenbildung“) ist in der Detailansicht vergrößert dargestellt. Diese Deformation bildet sich im Laufe der Zeit weiter zurück, bis die Blätter eine dem Wildtyp vergleichbare Blattform erreicht haben. c) Diese typische „Öhrchenbildung“ konnte bei RpoT;3::GFP-Mutanten bereits beobachtet werden und ist hier exemplarisch dargestellt. Bei diesen Mutanten findet eine partielle Grünfärbung statt, die sich ebenso wie bei den Δ -RpoT;3-Mutanten mit zunehmendem Alter der Pflanze der Gestalt des Wildtyps annähert.

Aus den Δ -RpoT;3-Mutanten wurde mRNA isoliert und anschließend eine RT-PCR in Hinblick auf die Transkription der drei RNA-Polymerasen durchgeführt. Bei dieser Untersuchung konnte festgestellt werden, dass die Δ -RpoT;3-Mutanten eine „normale“ Transkription von RNA-Polymerase 1 und 2 zeigten, während die Transkription der RNA-Polymerase 3 vollständig ausgefallen war. Abbildung 41 zeigt den Phänotyp der entsprechenden Δ -RpoT;3-Mutanten und die Ergebnisse der RT-PCR für die Transkription der RNA-Polymerasen.

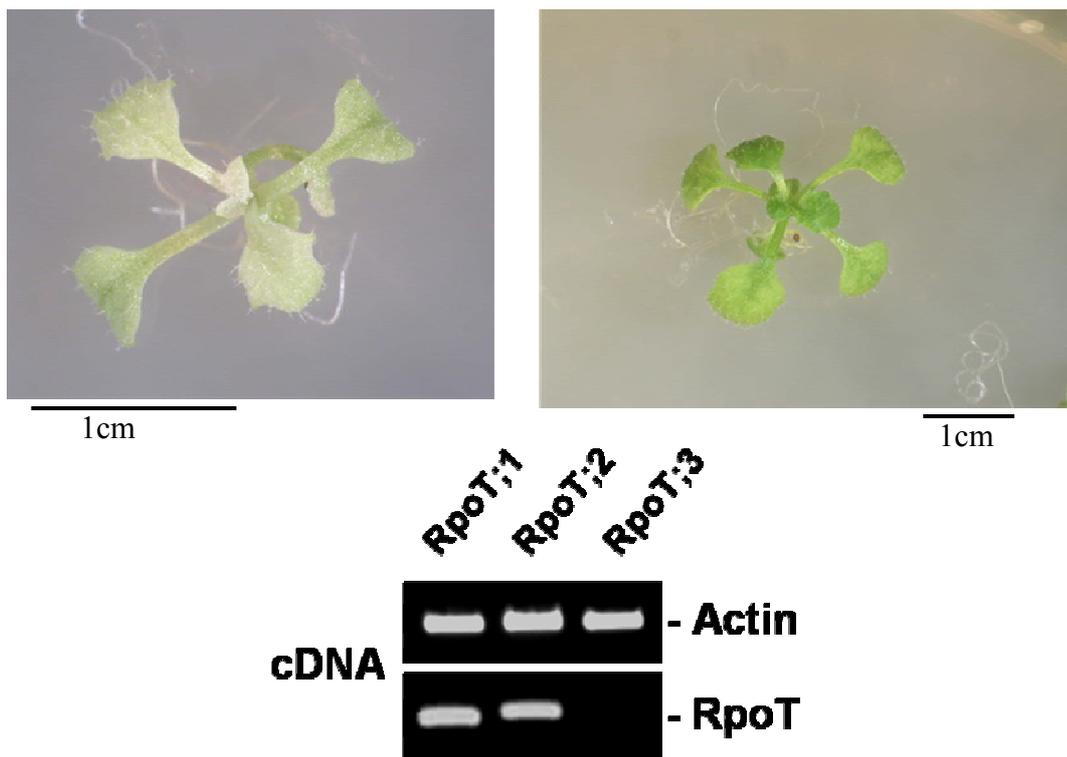


Abb. 41: Transkription der RNA-Polymerasen in Δ -RpoT;3-Mutanten.

Oben links: Dargestellt ist hier eine Δ -RpoT;3-Mutante im bleichen Zustand auf Saccharose-haltigem *Arabidopsis*-Medium *in vitro* im Alter von 14 Tagen. Oben rechts: Eine Δ -RpoT;3-Mutante zwei Wochen später, deutlich zu erkennen ist hier die bereits erfolgte Nachgrünung des zuvor stark gebleichten Phänotyps. Unten: Aus den Δ -RpoT;3-Mutanten wurde mRNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe der Actin/RNA-Polymerase-PCR die Transkription der einzelnen RNA-Polymerasen nachgewiesen. Als interner Standard fungiert hier wiederum das Actin 2-Gen (Isono *et al.* 1997).

3.7 Bestimmung der Lage der single-copy T-DNA Insertion der transgenen Pflanzenlinie 2-5'-3-x mittels *inverser* PCR (IPCR)

Aufgrund der Southern Blot-Untersuchung, bei der für die Linie 2-5'-3-x eine single-copy-Integration der T-DNA festgestellt werden konnte, sollte anschließend die genaue Lage der Insertion im Genom von *Arabidopsis thaliana* mittels *inverser* PCR (nach dem Protokoll von Ochman *et al.* 1990, Silver 1991) untersucht werden.

Als Restriktionsenzym für den Verdau der genomischen Pflanzen-DNA wurde *PvuII* eingesetzt. Nach der darauffolgenden Ligation wurde mit Hilfe der Primer Binv1/Binv2 (für die right border Sequenz) und Binv4/Binv5 (für die left border Sequenz) eine PCR durchgeführt. Nach der Überprüfung der PCR-Ergebnisse und der Extraktion der entsprechenden Banden aus dem Gel erfolgte eine Sequenzierung mit den Primern Binv2 (right border) und/oder Binv4 (left border) je nach zuvor genutzter PCR-Primerkombination. Für die Primerkombination der left border konnte ein entsprechendes PCR-Produkt hergestellt werden, während die PCR mit der Primerkombination Binv1/Binv2 erfolglos blieb. So konnte für die folgende Sequenzierung ein PCR-Produkt in der kodierenden Sequenz mit dem Primer Binv4 eingesetzt werden.

Das Sequenzierungsergebnis (ausgehend von der left border-Sequenz) wurde mit Hilfe eines Sequenzvergleichs in der Datenbank dem Gen mit der Bezeichnung At5g27330 zugeordnet. Dabei handelt es sich um das Gen eines sogenannten „glutamic acid rich protein“ (E-rich protein) ohne bisher eindeutige Funktionszuordnung. Dieses Gen ist 1887bp groß und frei von Introns. Der Sequenzabschnitt befindet sich ebenso wie das Gen der RNA-Polymerase 2 auf dem Chromosom 5 von *Arabidopsis thaliana*.

Anhand der Proteinsequenz konnten mit Hilfe von Sequenzvergleichen in den Datenbanken eine Ähnlichkeit mit Myosin ATPasen (Myosin heavy chain) anderer Organismen festgestellt werden. Abbildung 42 gibt schematisch die Lage der T-DNA-Insertion der Linie 2-5'-3-x im „glutamic-acid-rich protein“ wieder.

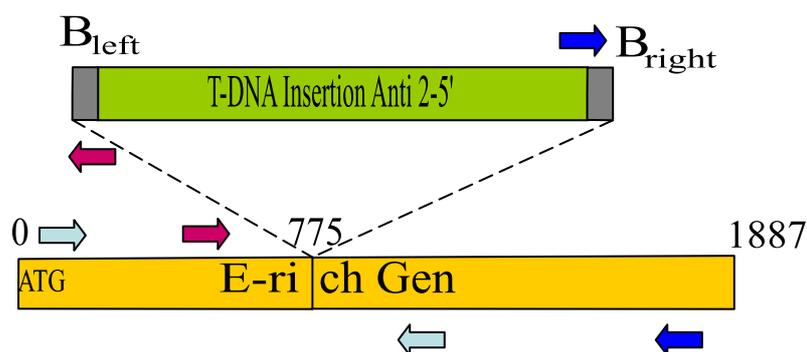


Abb. 42: Lage der insertierten T-DNA der Linie 2-5'-3-x innerhalb des Gens für das „Glutaminsäure-reiche“ Protein („E-rich“-Gen gelb gekennzeichnet).

Die bunten Pfeile kennzeichnen die zusammengehörigen Primerpaare, die sowohl zur Sequenzierung als auch zur Analyse der Aufspaltung eingesetzt wurden.

Um Informationen über die funktionelle Bedeutung des Gens für das Glutaminsäure-reiche Protein in *Arabidopsis thaliana* zu erhalten, wurde die Sequenz des Gens (At5g27330) mit der *Arabidopsis*-Datenbank verglichen (BLASTN und BLASTP). Dabei wurde ein zusätzliches Gen (At3g05130) identifiziert, welches 57% Identität auf Aminosäure-Ebene zum „E-rich“-Gen (At5g27330) aufweist. Eine Abbildung über den Vergleich der Aminosäuresequenzen beider Gene ist im Anhang zu finden.

3.7.1 Untersuchung der Aufspaltung der Linie 2-5'-3-x

Zur Untersuchung der Aufspaltung der T-DNA-Linie für die T-DNA-Insertion wurden PCR-Reaktionen durchgeführt. Dabei wurde ein Primer eingesetzt, der in der T-DNA lag (Bin4-left border primer) und ein Primer, im „E-rich“-Gen (siehe Abb. 42, rotes Primerpaar). Zur Detektion der Wildtyp-DNA-Sequenz wurde ein downstream gelegener Primer genutzt. Abbildung 43 zeigt die Ergebnisse der Aufspaltungs-Untersuchungen der Linie 2-5'-3-x. Es zeigte sich dabei, dass die untersuchte Linie 2-5'-3-x homozygot für die T-DNA-Insertion ist.

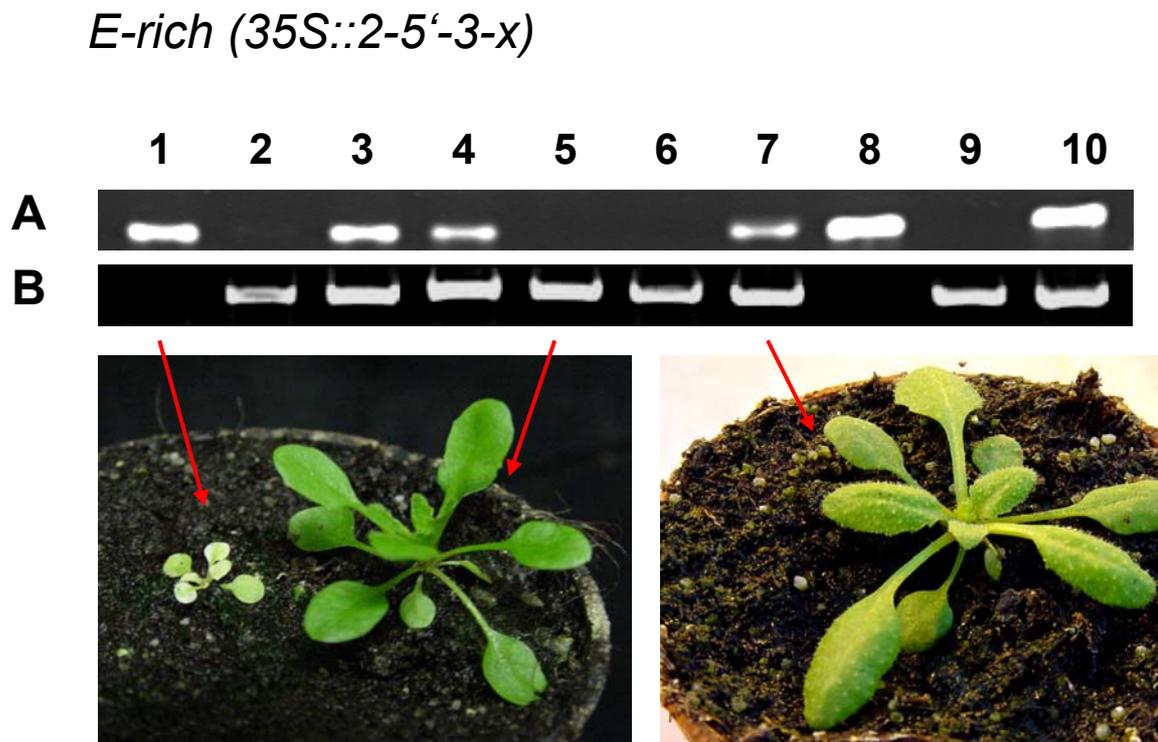


Abb. 43: Aufspaltung der Linie 2-5'-3-x.

Dargestellt sind jeweils die gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte. In der oberen Zeile (A) mit dem Primerpaar zum Nachweis der T-DNA-Insertion (E-rich 1/Binv4), in der unteren Zeile (B) mit dem Primerpaar zum Nachweis der Wildtyp-DNA (E-rich 5/E-rich 2).

Vorläufige Ergebnisse von Komplementationstudien mit der cDNA von RNA-Polymerase 2 (Vektoren und Agrobakterienstämme, siehe Tab. 4) lassen vermuten, dass der phänotypische Effekt nicht auf die Positionierung der T-DNA in dem E-rich Gen zurückzuführen ist, sondern ein *Antisense*-Effekt ist. Das ergibt sich aus der Tatsache, dass Pflanzen der Linie 2-5'-3-x sich mit zunehmendem Alter dem Wildtyp angleichen. Abbildung 44 zeigt die Entwicklung des Pflanzenphänotyps der Linie 2-5'-3-x.



Abb. 44: Komplementation der Linie 2-5'-3-x.

a) Pflanzen der Linie 2-5'-3-x 14 Tage nach der Transformation mit der cDNA von RNA-Polymerase 2. Hier ist noch der charakteristische panaschierte Phänotyp bei vielen Pflanzen zu erkennen. Auch die verringerte Wuchsgröße ist deutlich zu sehen. b) Die Grünfärbung der Blätter wird mit zunehmendem Alter (4 Wochen) immer stärker, auch die Größe der Pflanzen nimmt zu. c) Zustand der Pflanzen nach weiteren zwei Wochen. Es werden „normale“ Blütenstände gebildet, die Blätter sind dunkelgrün und die Pflanzen haben sich deutlich vergrößert. Die Gestalt nähert sich immer mehr der des Wildtyps an. Allerdings zeigen die Schoten einen Albinophänotyp.

3.8 Untersuchung einer Insertionslinie für das Glutaminsäure-reiche Protein (E-rich protein)

Für das „Glutaminsäure-reiche Protein“, in welchem die T-DNA-Integration der *Antisense*-Linie 2-5'-3-x erfolgt war, wurde eine Salk-Insertionslinie untersucht, die die T-DNA-Insertion an Position 146bp vor dem Startcodon des „Glutaminsäure-reichen Protein“-Gens besitzt.

Von dieser Linie wurden 100 Samen auf *Arabidopsis-Erde* ausgesät, angezogen und anschließend pikiert. Die Entwicklung der Pflanzen wurde bezüglich des Phänotyps kontinuierlich beobachtet und dokumentiert, um eine phänotypische Ähnlichkeit mit der *Antisense*-Linie 2-5'-3-x zu überprüfen. Es konnte jedoch kein vom Wildtyp abweichender Phänotyp festgestellt werden.

3.8.1 Untersuchung der Aufspaltung

Zur Untersuchung der Aufspaltung der Linie Salk_070979 für die T-DNA-Insertion wurden PCR-Reaktionen durchgeführt. Dabei wurde ein Primerpaar eingesetzt, bei dem ein Primer in der T-DNA lag (Binv4-left border primer) und ein Primer, der in dem Glutaminsäure-reichen Protein-Gen vor der T-DNA-Insertion lag (siehe Tabelle 13). Eine zweite PCR mit einem Primer, der hinter der right border lag und einem Primer der wiederum vor der T-DNA-Insertion positioniert war, machte eine Detektion der Wildtyp-DNA-Sequenz möglich. Die Amplifizierung beider erwarteter Sequenzen mit den unterschiedlichen Primerpaaren war nur bei DNA-Proben heterozygoter Pflanzenlinien möglich. Bei DNA-Proben von homozygoten Linien wurde lediglich die entsprechende Sequenz mit dem T-DNA-Primer und dem vor der Insertion liegenden Primer amplifiziert, während eine Amplifizierung der Sequenz mit dem Primer hinter der T-DNA (hinter der right border) und dem Primer vor der T-DNA-Insertion in Wildtyp-Größe nicht möglich war. Tabelle 13 zeigt die eingesetzten Primerpaare mit den zu erwartenden PCR-Produktgrößen in Abhängigkeit von der Aufspaltung für das T-DNA-Allel.

Tab. 13: Untersuchung der Aufspaltung

Bezeichnung der T-DNA-Insertionslinie	Bezeichnung des Gens mit Insertion	Bezeichnung der Primer	Detektierte DNA	Größe des PCR-Produkts
Salk_070979	Glutaminsäure-reiches Protein	E-rich 1/Binv4	T-DNA	165bp
Salk_070979	Glutaminsäure-reiches Protein	E-rich 5/E-rich 2	Wildtyp	1258bp

Linien mit deren DNA-Proben sich bei der PCR-Untersuchung mit beiden Primerpaaren die erwarteten Produkte amplifizieren lassen, sind somit heterozygot, während die DNA-Proben von homozygoten Linien nur mit dem T-DNA-Primerpaar eine Amplifizierung der DNA in erwarteter Größe zur Folge haben. Bei den Insertionslinien für das „Glutaminsäure-reiche Protein“ konnten insgesamt neun heterozygote und eine homozygote Pflanzenlinie festgestellt werden. Die Ergebnisse für die PCR-Reaktionen sind in Abb. 45 gezeigt.

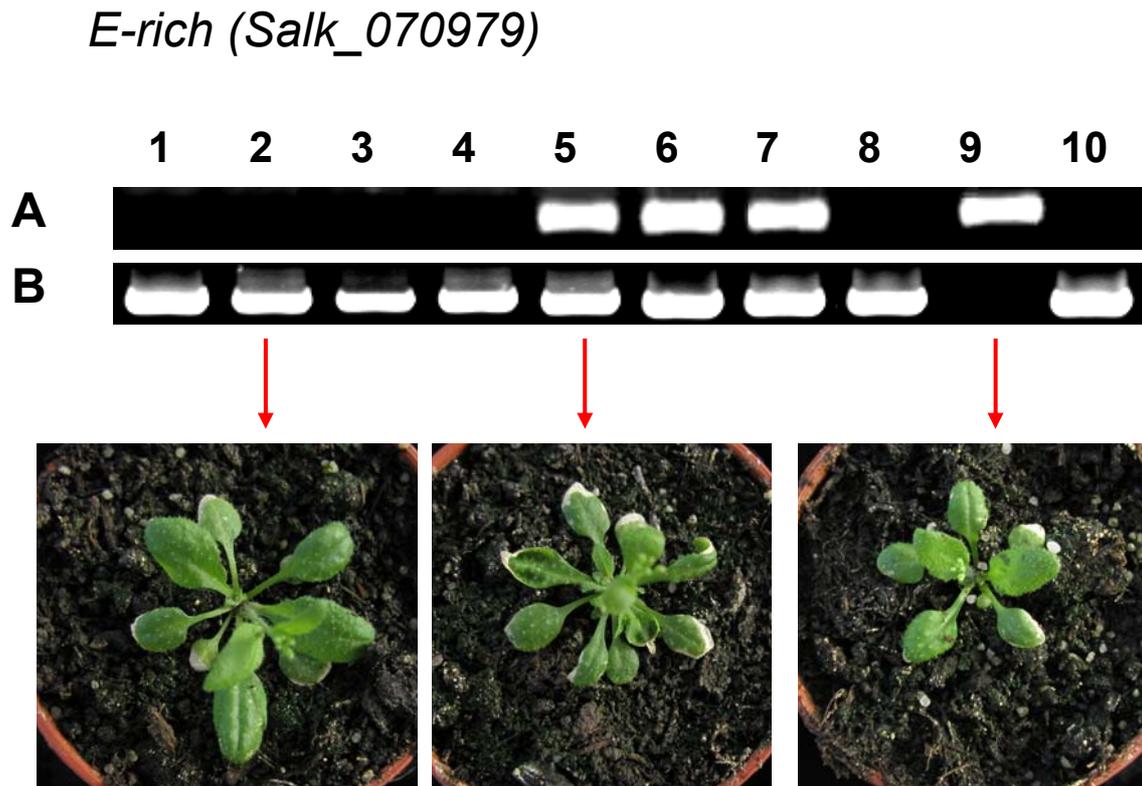


Abb. 45: Untersuchung der Aufspaltung der Linie Salk_070979.

Dargestellt sind jeweils die gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte, in der oberen Zeile (A) mit dem Primerpaar zum Nachweis der T-DNA-Insertion (E-rich 1/Binv4), in der unteren Zeile (B) mit dem Primerpaar zum Nachweis der Wildtyp-DNA (E-rich 5/E-rich 2).

Da die T-DNA-Insertion im Fall der Insertionslinie Salk_070979 jedoch vor dem eigentlichen Gen lag, kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Gen trotz Insertion ordnungsgemäß prozessiert wird. Um zu überprüfen, ob eine Transkription des Gens stattfindet, wurde mit der homozygoten T-DNA-Insertionslinie eine PCR-Untersuchung durchgeführt. Als Primer dienten dabei der Binv4-left border primer und ein Gen-interner Primer (E-rich 1), als Template wurde cDNA der entsprechenden Linie eingesetzt. Es kam in der homozygoten T-DNA-Insertionslinie Salk_070979 trotz allem zu einer korrekten Transkription des vorderen Teils des Gens für das Glutaminsäure-reiche Protein.