

4 Diskussion

Die Bedeutung der drei Phagentyp-ähnlichen kernkodierten RNA-Polymerasen (RpoT;1, RpoT;2 und RpoT;3) für die Biogenese der Plastiden und Mitochondrien in *Arabidopsis thaliana* besser zu verstehen, war das Ziel dieser Arbeit. Dabei lag ein Schwerpunkt auch auf der funktionellen Lokalisierung der drei RNA-Polymerasen in den Organellen.

Die Ermittlung der vollständigen DNA-Sequenzen der drei RNA-Polymerase-Gene sollte u. a. für eine Verwendung in den *Antisense*-Versuchen erfolgen. Die gezielte Reduktion der verschiedenen RNA-Polymerasen sollte es ermöglichen, Auswirkungen auf die Pflanzenentwicklung zu erkennen. Besonders interessant war in diesem Zusammenhang die Untersuchung, ob sich RNA-Polymerasen aufgrund ihrer Ähnlichkeit ergänzen oder ersetzen können. Dazu wurden *Antisense*-Ansätze und knock-out Mutanten herangezogen, um die funktionelle Zuordnung der einzelnen RNA-Polymerasen zu ermöglichen.

4.1 Struktur Phagentyp-ähnlicher RNA-Polymerasen in *Arabidopsis thaliana*

In *Arabidopsis thaliana* konnten drei BAC-Cluster identifiziert werden, die für Phagentyp-ähnliche RNA-Polymerasen kodieren. Diese Sequenzen können auf unterschiedlichen Chromosomen im Genom lokalisiert werden. Während das Gen für RNA-Polymerase 1 (RpoT;1) auf Chromosom 1 liegt, befindet sich das RNA-Polymerase 2-Gen (RpoT;2) auf Chromosom 5 und das für RNA-Polymerase 3 (RpoT;3) auf Chromosom 2. Die Untersuchung der Genstruktur dieser drei RNA-Polymerasen ergab einen identischen Exon-Intron-Aufbau der Gene. Alle drei Gene besitzen 19 Exons, wobei die Exon/Intron-Grenzen konserviert sind. Die jeweiligen Exon-Größen waren nahezu gleich, ebenso die Größen der Introns. So unterscheidet sich Exon 19 in der Größe bei RNA-Polymerase 1 und 2 nur in wenigen Basenpaaren, während RNA-Polymerase 3 ein sehr viel größeres Exon 19 besitzt. Insgesamt zeigen RNA-Polymerase 1 und 2 stärkere Ähnlichkeiten, was die Genstruktur betrifft, als sie jeweils mit RNA-Polymerase 3 teilen. Diese Tatsache weist daraufhin, dass die RNA-Polymerasen 1 und 2 näher miteinander verwandt sind, als mit RNA-Polymerase 3. Da die Exons der drei RNA-Polymerase-Gene fast gleich groß sind, die Introns jedoch zum Teil sehr unterschiedliche Größen besitzen, weichen die Proteingrößen nur in sehr geringem Maße voneinander ab (zwischen 2-4%).

Die Untersuchung von Kerngenomen der Angiospermen durch Richter *et al.* (2002) hat ergeben, dass bei diesen eine kleine Familie von *RpoT*-Genen (RpoT = RNA-Polymerase vom Phagentyp) kodiert ist, die bei den dikotyledonen Arten, die bisher untersucht worden sind (*Arabidopsis*, *Nicotiana* ssp.), aus insgesamt drei Mitgliedern bestehen und aus zwei Genen in den monokotyledonen Pflanzen, wie *Zea mays* und *Triticum aestivum* (Hedtke *et al.* 1997, 2002, Chang *et al.* 1999, Ikeda und Gray 1999, Börner *et al.* 1999). Bei den Monokotyledonen könnte der Mangel an einer weiteren RNA-Polymerase durch alternatives Splicing ausgeglichen werden.

Die Analyse der Sequenzen und die bemerkenswerte Konservierung der Exon-Intron-Struktur verdeutlicht, dass die vielfältigen Gene das Ergebnis von Genduplikationen sind und Paraloge darstellen.

4.2 Lokalisierung der Genprodukte von *rpoT;1*, *rpoT;2* und *rpoT;3*

In vorliegender Arbeit konnte die Lokalisierung der einzelnen RNA-Polymerasen in den einzelnen Organellen nachgewiesen werden. Bei der genaueren Untersuchung der Sequenzbereiche wurde zuerst auffällig, dass die N-terminalen Bereiche der drei RNA-Polymerasen größere Unterschiede aufwiesen, als die C-terminalen Bereiche, in denen die konservierten, funktionellen Domänen und katalytisch notwendigen Aminosäurereste erwartet werden (Masters *et al.* 1987, Oeser 1988, Sousa *et al.* 1993). Mit Hilfe des Vorhersageprogramms PSORT, das Proteine auf mögliche Zielorte untersucht, stellte sich heraus, dass die N-terminalen Sequenzbereiche für unterschiedliche Transitpeptide kodieren. Laut dieser Vorhersagen kodieren die Sequenzbereiche im N-terminalen Bereich der RNA-Polymerase 1 für ein Transitpeptid, das zur Lokalisierung des Enzyms in Mitochondrien führt. Für RNA-Polymerase 3 dagegen wird als Zielort der Chloroplast vorgeschlagen. Für RNA-Polymerase 2 werden je nach Initiationsstelle unterschiedliche Zielorte vorgeschlagen, somit ist eine Lokalisierung des Proteins im Mitochondrium ebenso möglich wie auch eine Lokalisierung im Chloroplasten. Diese Vorhersagen konnten durch *in organello*-Importversuche in Mitochondrien und Plastiden bestätigt werden. Um eine Bestätigung auch auf *in vivo*-Ebene zu erhalten, wurden GFP-Fusionsproteine konstruiert und transformiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass RpoT;1 in die Mitochondrien und RpoT;3 vor allem in die Plastiden, teilweise auch in den Kern, importiert wird. RpoT;2 konnte sowohl in Plastiden als auch in Mitochondrien nachgewiesen werden.

Somit scheint es so, als ob RNA-Polymerase 2 (RpoT;2), während der Evolution ein zweiteiliges Transitpeptid erhielt, welches mit den vorderen 39 Aminosäuren für eine Lokalisierung der RNA-Polymerase in den Chloroplasten sorgt und mit dem restlichen C-terminalen Teil die Lokalisierung in den Mitochondrien bewirkt. Diese Untersuchungsergebnisse decken sich mit den Erkenntnissen von Hedtke *et al.* (2000).

Damit gehört die RNA-Polymerase 2 zu den wenigen pflanzlichen Proteinen, die in zwei unterschiedliche Organellen bzw. Zellkompartimente importiert werden (Small *et al.* 1998).

Auch in dem Moos *Physcomitrella patens* kodieren zwei *rpoT*-Gene für Phagentyp-ähnliche RNA-Polymerasen mit „dual-targeting“ (zweifachem Ziel) in Mitochondrien und Chloroplasten (Richter *et al.* 2002). Richter *et al.* (2002) fanden jedoch einen bemerkenswerten Unterschied zwischen den Eigenschaften der Transitpeptide, die für das „dual-targeting“ in *Arabidopsis thaliana* und *Physcomitrella patens* verantwortlich sind. Während die Struktur des äußersten N-Terminus sehr ähnlich ist, z. B. ein in-frame AUG codon getrennt vom ersten AUG durch 50-100 Nukleotide, sind die „dual-targeting“-Eigenschaften der *Arabidopsis thaliana*-Präsequenz scheinbar durch die zweideutige Natur des full-length Transitpeptids verursacht (da die Mutation des in-frame AUGs das „dual-targeting“ nicht verhindert; Hedtke *et al.* 2000). Im Unterschied dazu, verursacht die Mutation des zweiten Methionins in der *Physcomitrella patens*-Sequenz einen Verlust der mitochondrialen targeting-Funktion. Damit scheint das „dual-targeting“ in diesem Fall eine Konsequenz des doppelten Translations-Starts zu sein. Kobayashi *et al.* (2001) vermuten, dass die alternative Translation von einer der zwei Initiationscodons am 5'-Ende der RpoT;2 die Lokalisierung differentiell regulieren kann.

Die Konservierung dieser „dual targeted“ RNA-Polymerasen von Moosen bis hin zu höheren Pflanzen zeigt, dass diese Enzyme in den Mitochondrien und den Chloroplasten eine unentbehrliche Rolle spielen. Die Stammbaum-Topologie von Richter *et al.* (2002) lässt weiterhin vermuten, dass die Genduplikation, die zu den „dual-targeting“ RNA-Polymerasen in Angiospermen geführt hat, nur nach der Separation der dikotyledonen von den monokotyledonen Pflanzen stattfand.

4.3 Einfluss von *Antisense*- und *Sense*-Konstrukten auf den Phänotyp

Nach erfolgter Transformation von Wildtyp-*Arabidopsis* vom Ökotyp C24 mit den verschiedenen *Antisense*- und *Sense*-Konstrukten konnten insgesamt 164 unabhängige

Pflanzenlinien auf Hygromycin-haltigem Medium selektiert werden. Für jedes Konstrukt wurden mindestens 4 Linien erstellt. Es wurden zwischen 4 und 37 Linien selektiert.

Schon bei der nachfolgenden Generation (T_1) fielen während der Selektion diverse unterschiedliche phänotypische Effekte in verschiedenen Linien auf. Die Bandbreite reichte von niedrigem Wuchs, deformierter Sprossstruktur, asymmetrisch verformten Keimblättern, Reduktion und Deformation von Wurzeln bis zu Verfärbungen bzw. Entfärbungen (Bleichungen) und Deformationen von Blättern.

Besonders stark betroffen waren Linien, die mit dem 5'-Ende der genomischen Sequenz von RNA-Polymerase 2 in *Antisense*-Orientierung transformiert worden waren. 21 unabhängige Linien mit dem Konstrukt 2-5' zeigten durchgängig defiziente Spross- und Wurzelentwicklung, unorganisierte Sprossstruktur, sowie degenerierte Blüten und keine Samensätze. Besonders auffällig waren die zum Teil fast vollständig reduzierten bzw. stark deformierten Wurzeln, sowie der gestauchte Spross. Baba *et al.* (2004) beschreiben einen ähnlichen Phänotyp bei einer knock-out Mutante von *Arabidopsis*, die eine T-DNA-Insertion im 18. Intron vom *rpoT;2*-Gen besitzt. Diese Pflanzen zeigen ebenfalls ein geringeres Wurzelwachstum, sowie eine veränderte Blattform und eine verzögerte Grünfärbung der Blätter bei 6-Tage etiolierten Keimlingen, die ins Licht transferiert wurden. Zusätzlich war die Blühzeit um 4-7 Tage verzögert. Baba *et al.* (2004) stellten bei diesen Mutanten jedoch fest, dass sie die Entwicklungsverzögerung nach vier Wochen nach und nach aufgeholt haben und das Erscheinungsbild dem Wildtyp immer ähnlicher wurde.

Im Gegensatz dazu erholten sich die in vorliegender Arbeit erzeugten *Antisense*-Pflanzen der Linie 2-5' Nr.1-22 nicht und bildeten auch keine Samen. Ganz offensichtlich war der Defekt in diesen Pflanzen zu stark.

Die Tatsache, dass die mit Teilen der *RpoT;2* und dort vor allem mit dem vorderen Teil dieser RNA-Polymerase, transformierten Pflanzenlinien besonders ausgeprägte Effekte zeigen, ist im Hinblick auf die Lokalisierung dieses Enzyms durchaus nachvollziehbar. Vermutlich hat die Beeinträchtigung dieser RNA-Polymerase, die sowohl in Mitochondrien als auch in Chloroplasten lokalisiert ist, eine umso stärkere Auswirkung auf den Status der Pflanze. Diese Tatsache lässt auf eine wichtige Doppelfunktion in beiden Organellen schließen. Baba *et al.* (2004) gehen jedoch aufgrund des frühen aber reversiblen Phänotyps ihrer *RpoT;2*-Mutanten davon aus, dass *RpoT;2* eine essentielle Rolle in der frühen Pflanzenentwicklung spielt, die anderen beiden kernkodierten RNA-Polymerasen (*RpoT;1* und *RpoT;3*) jedoch zu einem Ausgleich in der späteren Pflanzenentwicklung in der Lage sind und damit das Überleben der Pflanzen sichern.

Bei der *Antisense*-Linie für RpoT;1 (1-5'-1-x) zeigte sich vor allem ein Phänotyp mit kleinerem verzögertem Wuchs und runden, kleinen Blättern. Linien mit RpoT;3 *Antisense*-Konstrukten zeigten vor allem asymmetrisch geformte Keimblätter und ausgebleichene Rosettenblätter. Im Gegensatz zu Linie 2-5' Nr. 1-22 bildeten diese Linien Samen und ermöglichten somit eine Anzucht von Nachkommen.

4.3.1 Keimungsraten und Wurzelwachstum

Bei der Selektion der transformierten Linien war die im Vergleich zum Wildtyp stark reduzierte Keimungsrate und die insgesamt verzögerte Keimung und Entwicklung der transgenen Nachkommen ganz besonders auffällig. Vor allem in 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 erreichte die Keimungsrate gerade 20-60%, im Vergleich zu 100% im Wildtyp. Die Linien, die mit Teilen der genomischen Sequenz von RNA-Polymerase 3 transformiert worden waren, zeigten ebenso wie die Linien, die mit den cDNA-Konstrukten in *Sense*- und *Antisense*-Orientierung transformiert worden waren, eine normale Keimungsrate, waren aber in der Wachstums-Geschwindigkeit auch verzögert. Es liegt die Vermutung nahe, dass diese Effekte auf einer unterschiedlichen Funktionsverteilung der verschiedenen RNA-Polymerasen während der Pflanzenentwicklung zurückzuführen ist, so wie Hajdukiewicz *et al.* (1997) es für die beiden RNA-Polymerasen NEP (nucleus encoded plastid polymerase) und PEP (plastid encoded plastid polymerase) für Chloroplasten in Tabak beschrieben haben. Da es sich bei der Keimung um einen sehr energieaufwendigen Prozess handelt, ist eine Beeinträchtigung in der Keimungsrate und Keimungsgeschwindigkeit in den Linien mit *Antisense*-Konstrukten von RNA-Polymerase 1 und 2, welche in den Mitochondrien bzw. in den Mitochondrien und Chloroplasten wirken, einleuchtend. Eine Störung der mitochondrialen Transkription aufgrund eines Effektes auf die entsprechenden RNA-Polymerasen könnte durchaus zu einem Problem in der Energieversorgung während der Keimung, und damit zu einer Verzögerung oder sogar zu einem kompletten Ausfall derselben führen. Baba *et al.* (2004) beschreiben allerdings für RpoT;2-Mutanten, die 6-Tage im Dunkeln und anschließend ins Licht überführt worden waren, trotz Transkriptreduktion von RpoT;2 keine wesentliche Veränderung der mitochondrialen Transkriptmengen im Vergleich zum Wildtyp (mit Ausnahme von *atp1*). Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass in diesen RpoT;2-Mutanten eine Kompensation der fehlenden RpoT;2 durch RpoT;1 möglich ist. Offenkundig existiert in den vorliegenden *Antisense*-Linien für RpoT;1 und RpoT;2 ein zusätzlicher Effekt, der dazu führt, dass keine

Kompensation dieser beiden RNA-Polymerasen möglich ist und damit bereits die Keimungsfähigkeit der Samen nachhaltig beeinträchtigt wird.

Dass die Linien, die mit den Konstrukten für die RNA-Polymerase 3 transformiert wurden, nur einen Verzögerungseffekt zeigen, wenn auch die Transkriptmengen der RNA-Polymerasen 1 und/oder 2 zusätzlich reduziert sind (siehe Erläuterungen zur semiquantitativen RT-PCR, Linie 3-3'-1-9), bestätigt die Vermutung, dass beide RNA-Polymerasen RpoT;1 und RpoT;2 für die Keimung von entscheidender Bedeutung sind.

Möglich wäre es, dass eine Transkriptreduktion von RpoT;2 mittels *Antisense*, nicht nur einen Effekt auf die mitochondriale Transkription und damit auf die Energieproduktion ausübt, sondern auch eine Beeinträchtigung der plastidären Transkription zur Folge hat. Die Kommunikation zwischen Chloroplasten und Mitochondrien, sowie zwischen dem Kern und den beiden Organellen ist von Hedtke *et al.* (1999) und Leon *et al.* (1998) bereits beschrieben worden. Aufgrund der Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Organellen ist es durchaus denkbar, dass die komplexen Vorgänge wie Keimung oder Chloroplastendifferenzierung durch die Reduktion eines zentralen Enzyms stark beeinträchtigt sind und der ordnungsgemäße Ablauf der Prozesse nicht mehr gewährleistet ist. Eine verzögerte Chloroplastenentwicklung wiederum kann die Transkription im Kern beeinflussen. Surpin *et al.* (2002) konnten z. B. eine Organellen-Kern-Kommunikation beobachten, die zeigte, dass der Entwicklungsstatus des Chloroplasten die Expression von kernkodierten Plastidengen kontrollierte.

Das Wurzelwachstum der 21 unabhängigen Linien 2-5' Nr.1-22 konnte aufgrund der starken Reduktion und Deformation der Wurzeln quantitativ nicht erfasst werden. Die qualitative Untersuchung der Wurzeln ergab für alle Linien eine mehr oder weniger starke Reduktion der Wurzeln und z. T. erhebliche Deformationen. Baba *et al.* (2004) charakterisieren ihre RpoT;2-Mutanten unter anderem durch einen wurzeldefizienten Phänotyp, und führen diese Wurzelreduktion auf eine gewebespezifische Transkriptreduktion nicht nur von RpoT;2 sondern auch von RpoT;1 um 40% zurück.

Bei den anderen transgenen Linien ist das Wurzelwachstum in fast allen Fällen nahezu vergleichbar mit dem des Wildtyps. Hier kommt auf jeden Fall die Tatsache zum Tragen, dass die keimungsunfähigen Samen, in die Wurzellängenmessung nicht mit eingehen, da sie überhaupt keine Wurzeln bilden. Diejenigen Samen, die zur Keimung befähigt sind, deren Pflanzen zeigen dann auch ein im Wesentlichen normales Wurzelwachstum. Es ist lediglich bei den Pflanzenlinien, die eine sehr stark verminderte Keimungsrate zeigen (z. B. 2-5'-6-x)

auch eine Verzögerung des Wurzelwachstums zu verzeichnen. Die Wurzellänge nähert sich mit zunehmendem Alter der Keimlinge der Länge der Wildtyppflanzen an. Die Effekte in den transgenen Pflanzen scheinen zum Teil so massiv zu sein, dass ein Überleben der Pflanzen, bzw. überhaupt eine Keimung der Samen nicht möglich ist. Diese Tatsache steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Baba *et al.* (2004), die aufgrund ihrer Untersuchungen eine sehr wichtige Rolle in der frühen Pflanzenentwicklung für RpoT;2 vermuten, jedoch der Auffassung sind, dass diese nicht zum Überleben der Pflanzen notwendig ist.

4.3.2 Pleiotrope Effekte im Phänotyp

Die Pleiotropie der Effekte, die in den transformierten Pflanzenlinien auftreten, ist aufgrund der universellen Bedeutung der drei RNA-Polymerasen für die Organellentranskription nachvollziehbar. Vorausgesetzt, dass die verschiedenen RNA-Polymerasen für die Transkription unterschiedlicher Genklassen zuständig sind und sich gegenseitig nicht ersetzen können.

Der besonders auffällige Phänotyp von Linie 2-5'-3-x, mit den panaschierten und damit nur zum Teil grün gefärbten Blättern und insgesamt stark betroffenem Phänotyp, scheint ganz offensichtlich bei der Chloroplasten-Entwicklung gestört zu werden.

Leon *et al.* (1998) entwickeln eine Hypothese, nach der die Chlorophyllproduktion das Potential hat, die Organellenentwicklung zu beeinflussen, so wie es bei Mutanten mit veränderten Chlorophyllraten (für Chlorophyll a und b) (Falbel und Staehelin 1994) und „oli“-Mutanten von *Antirrhinum* (Hudson *et al.* 1993) beschrieben wurde.

Chlorophyll scheint entweder für die Translation oder die Stabilität von kernkodierten Apoproteinen des „light-harvesting“ Komplexes und der Bildung von Grana-defizienten Thylakoidmembranen notwendig zu sein (Harrison *et al.* 1993, Król *et al.* 1995). Genzerstörungen oder -Unterbrechungen an anderen Stellen der Chlorophyll-Biosynthese zeigt Veränderungen in der Plastidenentwicklung sogar im Dunkeln, wo eine photo-oxidative Schädigung ausgeschlossen werden kann, was wiederum auf eine direkte Beteiligung des Chlorophylls schließen lässt (Falbel *et al.* 1996, Harrison *et al.* 1993, Runge *et al.* 1995, Somerville 1986). Die direkte Beteiligung der Pigment-Biosynthese an der Chloroplastenentwicklung konnte aufgrund von Pleiotropie nur schwer nachgewiesen werden. Es wurden jedoch einige Mutanten mit veränderter Chlorophyll-Akkumulation beschrieben (Somerville 1986).

Eine Parallele zu diesen Untersuchungen könnte man im vorliegenden Fall ziehen, wenn man davon ausgeht, dass bestimmte RNA-Polymerasen in die Transkription von Chlorophyll-

relevanten Genen und damit auch in die Chlorophyll-Produktion involviert sind. Es bleibt zu beweisen, um welche Gene es sich unter diesen Umständen handelt und in welchem Umfang die unterschiedlichen RNA-Polymerasen an der Transkription beteiligt sind.

Da jedoch bekannt ist, dass beide Organellen sowohl Mitochondrien als auch Chloroplasten in ständiger Kommunikation mit dem Kern und untereinander stehen, erscheint es einleuchtend, dass eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Transkription auch einen Effekt im Chloroplasten hervorruft und umgekehrt.

Im vorliegenden Fall sind jedoch nicht alle Chloroplasten davon betroffen, da die Blätter nur zum Teil farblos sind. Eine genauere Untersuchung der Chloroplastenmorphologie dieser Mutanten würde sicherlich einen Hinweis darauf geben, ob zumindest die vorhandenen Chloroplasten ordnungsgemäß entwickelt sind.

4.4 Zusammenhang von T-DNA-Integration bzw. -Kopienanzahl und phänotypischen Auswirkungen

Der Nachweis der T-DNA-Integration in den Transformationslinien wurde mit Hilfe der PCR-Methode durchgeführt. Es konnte für insgesamt 39 unabhängige Pflanzenlinien eine T-DNA-Integration mittels HPT-PCR nachgewiesen werden. Für fast alle verwendeten Konstrukte konnten HPT-positive Linien detektiert werden, mit Ausnahme der Linie #137, für die bei keiner der getesteten 18 Nachkommenschaftslinien der T₁ eine Amplifizierung des HPT-Fragments in der PCR möglich war.

Zur Überprüfung der Kopienanzahl der integrierten T-DNA bei den transgenen Pflanzenlinien wurde die Southern Blot-Methode mit anschließender nicht-radioaktiver Hybridisierung mit Sonden für den 35S-Promotor und das Hygromycin-Phosphotransferase-Gen eingesetzt. Die Kenntnis über die Kopienanzahl machte eine eventuelle Korrelation zwischen dieser und den unterschiedlich stark ausgeprägten phänotypischen Effekten der einzelnen Pflanzenlinien möglich. Die Linien mit den subjektiv stärksten phänotypischen Effekten wurden einer Untersuchung auf ihre Kopienanzahl der integrierten T-DNA hin unterzogen. Dabei wurden bei 8 der 9 untersuchten Pflanzenlinien mehr als eine Kopie der T-DNA gefunden.

Bourque (1995) berichtet, dass eine Erhöhung der Kopienzahl sowohl einen negativen als auch einen positiven Effekt in Hinblick auf den Grad der *Antisense*-Hemmung verursachen kann. So muss die Einführung mehr als eines komplementären *Antisense*-Gens nicht notwendigerweise zu einer Expressionserhöhung des *Antisense*-Gens und damit zu einer Verringerung des Zieltranskripts führen. Linie 2-5'-6-x, die eine starke Beeinträchtigung der

Keimungsfähigkeit und sogar des Wurzelwachstums zeigt, enthält vier Kopien der T-DNA zeigt jedoch keine Verringerung der Transkriptmenge für *RpoT*;2 (Daten nicht gezeigt). Auch die Linien 1-5'-1-x und 3-3'-1-x enthielten mindestens vier Kopien der T-DNA und zeigten ebenfalls deutliche Phänotypen. Im Unterschied zu Linie 2-5'-6-x konnte hier auch ein Effekt auf die Transkriptionsrate der unterschiedlichen RNA-Polymerasen nachgewiesen werden (siehe 4.7). In der Literatur gehen viele Vermutungen in die Richtung, dass es sich bei der *Antisense*-Hemmung um einen posttranskriptionalen Effekt handelt, da weder bei der Transkriptionsrate des *Antisense*-Gens noch beim Ziel-Gen eine Verringerung zu verzeichnen ist.

Matzke und Matzke (1993) weisen daraufhin, dass die durchgängige und stabile *Antisense*-Expression in Pflanzen vor allem mit Konstrukten erreicht wird, die keine sich wiederholenden Elemente und stattdessen nur einzelne Kopien des Transgens enthielten. In der phänotypisch auffälligsten Pflanzenlinie 2-5'-3-x, die gescheckte Blätter besitzt, niedrigen und unorganisierten Sprosswuchs, sowie deformierte Blätter und degenerierte Blütenstände zeigt, wurde eine single-copy-Integration der T-DNA nachgewiesen. Auch die Nachkommen dieser Linie zeigen weiterhin stabil den charakteristischen Phänotyp, auch wenn die Transkriptmengen der RNA-Polymerasen in diesen Fällen eher erhöht sind.

In prokaryotischen und tierischen Systemen wird allgemein akzeptiert, dass *Antisense*-RNA, die die 5'-Region des entsprechenden Gens betrifft, am besten geeignet ist, die Genexpression effektiv zu unterdrücken. Für die Situation in Pflanzen gibt es bisher keine Einigung darüber, welche Regionen oder Längen von Gen-Fragmenten als optimale *Antisense*-Sequenzen dienen. Aufgrund dessen wurden in vorliegender Arbeit auch unterschiedlichste Konstrukte eingesetzt. Es kamen jeweils ungefähr gleich lange Sequenzen der genomischen Sequenz des 5'- und des 3'-Endes zum Einsatz, sowie alle vollständigen cDNA-Sequenzen in *Antisense*- und *Sense*-Orientierung. Starke phänotypische Auswirkungen konnten sowohl bei Pflanzenlinien mit 5'- als auch bei 3'-Konstrukten der genomischen Sequenzen beobachtet werden. Die transgenen Pflanzenlinien mit cDNA-Konstrukten zeigten insgesamt einen schwächer ausgeprägten Phänotyp. Die Effizienz hinsichtlich des *Antisense*-Effektes der cDNA-Konstrukte scheint gegenüber den genomischen Sequenzen geringer zu sein.

4.5 Bedeutung der Lage der single-copy T-DNA Insertion der transgenen Pflanzenlinie 2-5'-3-x

Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei der Linie 2-5'-3-x um eine transgene Linie mit single-copy-Integration der T-DNA handelt, wurde die Lage der T-DNA mit Hilfe der inversen PCR-Methode (IPCR) schnell festgestellt. Es stellte sich dabei heraus, dass die T-DNA-Insertion in einem Gen (At5g27330) erfolgte, welches für ein Glutaminsäure-reiches Protein von bisher unbekannter Funktion kodiert. Dieses Gen befindet sich auf Chromosom 5, auf welchem auch die Sequenz für die kernkodierte RNA-Polymerase 2 (RpoT;2) lokalisiert ist.

Weitere Analysen führten zu der Feststellung, dass das Protein Ähnlichkeiten mit bekannten Myosin-ATPasen anderer Organismen besitzt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass sich diese Ähnlichkeiten aufgrund des so hohen Glutaminsäure-Gehaltes dieses Proteins ergeben und funktionell keine weiteren Zusammenhänge bestehen. Solange eine genaue Charakterisierung dieses Proteins noch nicht erfolgt ist, bleibt dieser Punkt weiter ungeklärt.

Mit Hilfe der PCR konnte festgestellt werden, dass die 2-5'-3-x-Linie für die T-DNA-Insertion homozygot ist. Diese Tatsache könnte eine mögliche Ursache für den ungewöhnlichen und starken Phänotyp der 2-5'-3-x-Linie sein.

Denkbar wäre jedoch auch, dass die Lage der T-DNA-Insertion im Glutaminsäure-reichen Protein eine phänotypische Auswirkung hat. Da die genaue Funktion dieses Proteins noch ungeklärt ist, lediglich eine Ähnlichkeit zu den Myosin-ATPasen festgestellt werden konnte, bleibt das ein Punkt, der noch der Klärung bedarf.

4.6 Eigenschaften einer T-DNA-Insertionslinie für das Glutaminsäure-reiche Protein (E-rich protein)

Für das Glutaminsäure-reiche Protein wurde eine T-DNA-Insertionslinie bestellt. Sie sollte einen Vergleich der phänotypischen Effekte mit der in vorliegender Arbeit hergestellten 2-5'-3-x homozygoten Linie ermöglichen. Die T-DNA-Linie Salk_070979 (Δ E-rich), enthält die T-DNA-Insertion 146bp vor dem Startcodon des Glutaminsäure-reichen Protein-Gens. Bei der Ermittlung der Aufspaltung dieser Linie für die T-DNA-Insertion, stellte sich bei 9 von 10 Pflanzen eine Heterozygotie und bei nur einer Pflanze eine Homozygotie bezüglich der T-DNA heraus. Alle Pflanzen wiesen bei der Anzucht im Gewächshaus unter Standardbedingungen keinen auffälligen, d. h. vom Wildtyp abweichenden, Phänotyp auf.

Geht man von dem ungewöhnlich starken und auffälligen Phänotyp der Linie 2-5'-3-x aus, so könnte man vermuten, dass dieser Phänotyp offensichtlich mit der Insertion im Glutaminsäure-reichen Protein-Gen At5g27330 nichts zu tun hat. Da aber die T-DNA-Insertion bei Linie Salk_070979 nicht an derselben Stelle in diesem Gen liegt, sondern sogar vor dem eigentlichen Gen, ist eine phänotypische Auswirkung der T-DNA-Insertionsposition im Falle der Linie 2-5'-3-x nicht vollkommen auszuschließen. Um diesen Punkt ausreichend zu klären, wurde ein Komplementationsversuch mit dem intakten At5g27330-Gen in Linie 2-5'-3-x vorgenommen, allerdings liegen die Daten dazu noch nicht vor.

4.7 Korrelation zwischen RNA-Polymerase-Transkription und phänotypischer Auswirkung

Die Untersuchung der verschiedenen transgenen Pflanzenlinien mittels semiquantitativer RT-PCR diente der genauen Bestimmung der Transkriptmengen der drei kernkodierte RNA-Polymerasen, um die Stärke des jeweiligen *Antisense*- bzw. *Sense*-Effekts auf die RNA-Polymerase-Transkription zu bestimmen. Da die Transkriptionsrate der kernkodierte RNA-Polymerasen vom Phagentyp sehr niedrig ist, war eine Durchführung von Northern Blot-Untersuchungen in diesem Fall nicht zweckmäßig und die semiquantitative RT-PCR die Methode der Wahl.

Die 21 unabhängigen Linien (Nr.1-22) der T₀-Linie 2-5', die extreme phänotypische Merkmale, wie fehlende oder deformierte Wurzeln, degenerierten und unorganisierten Sprosswuchs, sowie verkümmerte Blütenstände und defiziente Samenproduktion zeigten, wiesen in der semiquantitativen RT-PCR erstaunlicherweise eine Transkriptreduktion aller drei RNA-Polymerasen auf. Dabei konnte eine dem Phänotyp entsprechende Stärke der Transkript-Reduktion von stark reduziert bis hin zu nahezu vollständiger Reduktion beobachtet werden. Erstaunlich ist, dass mit Hilfe des *Antisense*-Konstrukts für eine RNA-Polymerase, insgesamt die Transkription aller drei RNA-Polymerasen beeinträchtigt werden kann. Das legt die Vermutung nahe, dass zwischen der Transkription der RNA-Polymerase 2 und der Transkription der anderen beiden RNA-Polymerasen 1 und 3, ein direkter Zusammenhang besteht. Baba *et al.* (2004) konnten in knock-out Mutanten für RpoT;2 ebenfalls eine Transkriptreduktion von RpoT;2 allerdings auch eine zu 40% reduzierte Transkription von RpoT;1 im Vergleich zum Wildtyp feststellen. In ihrem Fall handelte es

sich jedoch nur um eine gewebespezifisch in den Wurzeln auftretende Reduktion. Sie führen auch die Wurzelverkürzung ihrer RpoT;2-Mutanten darauf zurück.

Es wäre jedoch auch denkbar, dass RNA-Polymerase 2, welche ja sowohl in Chloroplasten als auch in Mitochondrien importiert wird, wiederum für die Transkription wichtiger Stabilitätsfaktoren für mRNA zuständig sein könnte, oder eine indirekte Verbindung in Form einer Feedback-Regulation zwischen Organellengenomen und dem Kern besteht. Dass es einen regulativen Zusammenhang zwischen Kern- und Organellengenomen geben muss, ist bereits in unterschiedlichen Zusammenhängen der Organellenentwicklung beschrieben worden (Hedtke *et al.* 1999, Leon *et al.* 1998, Surpin *et al.* 2002). Da es sich sowohl bei der Chloroplastenentwicklung als auch bei der Mitochondrienentwicklung um sehr komplexe Vorgänge handelt, bei denen beide Organellen auf viele Proteine angewiesen sind, deren Sequenzinformation im Kerngenom lokalisiert ist, ist eine Kommunikation mit dem Kern eine unabdingbare Notwendigkeit. So wie auch eine Regulation und Kommunikation zwischen den beiden Organellen aufgrund ihrer essentiellen Funktionen für die pflanzliche Zelle sehr wichtig ist.

Bei den fünf anderen Linien, die ebenfalls mit dem Plasmid pBinOligo2-5' transformiert worden waren, zeigte sich dagegen eine Reduktion der Transkriptmenge von RNA-Polymerase 1 und 3, jedoch keine für die RNA-Polymerase 2. Aufgrund der Tatsache, dass diese Linien mit dem *Antisense*-Konstrukt der RNA-Polymerase 2 transformiert wurden, wäre allerdings eher eine Reduktion der RNA-Polymerase 2 zu erwarten gewesen. Da die *Antisense*-Methode jedoch in ihrem Mechanismus immer noch nicht eindeutig erklärt ist, kann nicht mit Sicherheit festgestellt werden, ob die Erhöhung der Transkriptmenge nicht in direktem Zusammenhang mit den eingesetzten *Antisense*-Konstrukten steht.

Wahrscheinlicher jedoch ist, dass aufgrund der Lage der Primer in Exon 2 und Exon 5, die zur semiquantitativen RT-PCR eingesetzt wurden, genau der Bereich, der auch für die Herstellung der *Antisense*-Konstrukte verwendet wurde, detektiert wird. Dadurch lässt eine Erhöhung der Transkriptmenge der RNA-Polymerase, bei diesen Linien, welche die vorderen Teile der genomischen RNA-Polymerase-Sequenz als *Antisense*-Konstrukt enthielten, nicht eindeutig auf eine Überexpression schließen. Eine Reduktion der Transkriptmenge ist dagegen eindeutig auch als solche zu bewerten, da mit Hilfe der Actin-Kontrolle eine erfolgreiche Erst-Strang-cDNA-Synthese und die Durchführung der PCR kontrolliert werden kann, ebenso wie eine Kontamination mit DNA.

Die übrigen *Antisense*-Linien, die ebenfalls Teile der genomischen RNA-Polymerase-Sequenzen in *Antisense*-Orientierung enthielten, zeigten sehr unterschiedliche Ergebnisse bei der Untersuchung der RNA-Polymerase-Transkriptmengen. Während die Linien 1-5'-1-x (transformiert mit dem *Antisense*-Konstrukt des 5'-Endes des genomischen Teils der RNA-Polymerase 1) und 3-3'-1-x (transformiert mit dem *Antisense*-Konstrukt des 3'-Endes des genomischen Teils der RNA-Polymerase 3) jeweils eine Reduktion der Transkriptmenge für RNA-Polymerase 2 aufweisen, und Linie 3-3'-1-x zusätzlich eine Reduktion von RNA-Polymerase 1 zeigt, ist bei Linie 3-5'-2-x (transformiert mit dem *Antisense*-Konstrukt des 5'-Endes des genomischen Teils der RNA-Polymerase 3) für alle drei RNA-Polymerasen eine Überexpression zu verzeichnen.

Ebenso zeigt sich bei allen Pflanzenlinien mit cDNA-Konstrukten (gleich welcher Orientierung, *Antisense* wie *Sense*) eine Erhöhung der Transkriptmengen für alle drei RNA-Polymerasen.

4.8 Untersuchung des RNA-Editings in transgenen Linien

RNA-Editing tritt in pflanzlichen Organellen post-transkriptional auf und verändert einzelne Nukleotide durch Cytidin-zu-Uridin-Konversionen, bzw. Uridin-zu-Cytidin-Konversionen an hoch spezifischen Stellen der mRNA. Pflanzliches RNA-Editing wird vor allem als Reparatur-Mechanismus auf der Transkript-Ebene angesehen, der zur Wiederherstellung konservierter Aminosäure-Reste führt. Diese Wiederherstellung von konservierten Aminosäuren durch RNA-Editing in Plastiden lässt vermuten, dass genaues RNA-Editing für die korrekte Proteinfunktion in den Plastiden wichtig ist. RNA-Editing in Chloroplasten kann kodierende Eigenschaften interner Triplets in plastidären mRNAs verändern (Maier *et al.* 1992) und es kann an der Erstellung von plastidären reading frames durch Einführung von Start- oder Terminations-Codons mitwirken (Hoch *et al.* 1991, Kudla *et al.* 1992, Wakasugi *et al.* 1996). In Mitochondrien von *Arabidopsis* zum Beispiel, führt das RNA-Editing auch zur Erhöhung des Anteils an hydrophoben Aminosäure-Resten und damit insgesamt zur Erhöhung der hydrophoben Eigenschaften der mitochondrialen Proteine (Giegé und Brennicke 1999). Covello und Gray (1993) haben mit Hilfe von Evolutionsmodellen versucht, eine Erklärung für den Ursprung des pflanzlichen Organellen-RNA-Editings ohne ausschlaggebenden selektiven Vorteil zu finden.

Karcher und Bock (2002) beschreiben erstmalig einen Fall, bei dem RNA-Editing in Pflanzen die Genexpression qualitativ zu regulieren scheint, was letztlich in einer Produktion von zwei unterschiedlichen Proteinen, von ein und demselben Gen in Abhängigkeit vom Entwicklungsstand der Pflanze bzw. der Plastiden resultiert.

Die Funktion von RNA-Editing in pflanzlichen Organellen als qualitative genregulative Kraft, durch Herstellung zweier verschiedener Proteine von ein und demselben Gen, könnte der initialisierende Selektionsvorteil gewesen sein, der zu einer Etablierung und Ausbreitung des RNA-Editings in Mitochondrien und Chloroplasten geführt hat (Covello und Gray 1993).

Karcher und Bock (1998) konnten in Tabak zeigen, dass das RNA-Editing an einer spezifischen Stelle im *ndhB*-Transkript abhängig von der Plastidenfunktion ist und blockiert wird, wenn keine aktive plastidäre Proteinsynthese stattfindet. Diese Blockierung erfolgte sowohl bei Hitzeschockbehandlung als auch nach Behandlung der Versuchspflanzen mit einem prokaryotischen Translationshemmer. Die Hitzeschock-behandelten Pflanzen zeigten einen bleichen, hellgrünen Phänotyp, was auf einen negativen Effekt auf die Synthese oder die Zusammensetzung des photosynthetischen Proteinkomplexes hinwies.

Aufgrund dieser Voraussetzungen, und der Tatsache, dass die vorliegenden *Antisense*-Pflanzen zumindest in einigen Fällen einen bleich-grünen (bzw. gescheckt-grünen) Phänotyp aufwiesen und die Transkriptmenge, zumindest von einer (in einigen Fällen von allen drei) RNA-Polymerase(n) reduziert war, machte eine Untersuchung des RNA-Editings in diesen Pflanzen interessant.

4.8.1 Untersuchung des plastidären RNA-Editings

Von den 8 untersuchten RNA-Editingstellen in Chloroplasten, die das Konstrukt 2-5' (5'-Ende von RNA-Polymerase 2 in *Antisense*-Orientierung) enthielten und eine Transkriptreduktion aller drei RNA-Polymerasen zeigten, wurden fast alle Editingstellen (mit Ausnahme von *atpF* und *ndhB* site 156) geringer editiert als im Wildtyp. Eine Editingstelle im Transkript des Gens *rpoB* an Position 184 wurde dagegen nicht editiert, eine Editingstelle im *ndhB*-Transkript nur zu 30% (im Gegensatz zu mehr als 60% beim Wildtyp). Eine fehlende Editierung an Position 184 im *rpoB*-Transkript führt dazu, dass kein Austausch von Serin durch Leucin stattfindet. Damit wird an dieser Editingstelle eine Veränderung zu einem hydrophoben Aminosäurerest hin, wie er in *Arabidopsis* vor allem in Mitochondrien auftritt (Giegé und Brennicke 1999), verhindert.

Der Ausfall eines entsprechenden Editingfaktors könnte die Editingreaktion an dieser einen spezifischen Editingstelle verursacht haben. Plastidäre RNA-Editingstellen sind bekannt

dafür, dass sie spezifisch durch *trans*-acting Faktoren (Chaudhuri *et al.* 1995, Bock und Koop 1997) erkannt werden, welche wahrscheinlich im Kerngenom kodiert sind. Die Tatsache, dass RNA-Editingstellen in Chloroplasten sehr viel seltener sind, als in Mitochondrien, verleiht jeder einzelnen davon eine größere Bedeutung. Der Ausfall einer einzigen RNA-Editingstelle in einem plastidären Transkript kann bereits zu einem ausgeprägten Phänotyp führen (Karcher und Bock 1998).

Es wäre denkbar, dass eine unvollständige Chloroplastendifferenzierung bzw. -entwicklung mittels Kommunikation mit dem Kerngenom, wie sie z. B. für Redox-Regulation bei Plastiden-Kern-Kommunikation (Escoubas *et al.* 1995, Maxwell *et al.* 1995, Karpinski *et al.* 1997) beschrieben ist, eine Auswirkung auf die Produktion bestimmter Editing- oder Spezifitätsfaktoren haben kann.

Die Untersuchung von anderen transgenen Pflanzenlinien, die jedoch nur eine Transkriptreduktion von einer der drei RNA-Polymerasen gezeigt hatten, wiesen jedoch korrektes RNA-Editing in allen untersuchten Fällen, vor allem im Fall des *rpoB*-Transkripts auf. Ganz offensichtlich scheint im vorliegenden Fall eine Beeinträchtigung des RNA-Editings nur bei einer Transkriptreduktion aller drei RNA-Polymerasen aufzutreten.

4.8.2 Untersuchung des mitochondrialen RNA-Editings

Bei der Analyse dreier verschiedener mitochondrialer Transkripte (*cox3*, *cob*, *nad1*) konnte für die Linien des Konstrukts 2-5' mit dem pleiotropen Phänotyp und der Transkriptreduktion für alle drei RNA-Polymerasen ein Effekt auch im Falle des mitochondrialen RNA-Editings festgestellt werden. Es zeigte sich zum einen eine korrekte Editierung beim *nad1*-Transkript, wobei neben den regulären Editingstellen zusätzliche unvollständig editierte RNA-Editingstellen auftraten. Diese wiesen auf eine Übereditierung des Transkriptes aus einem noch ungeklärten Grund hin. Denkbar wäre als Ursache ein Ungleichgewicht zwischen Editingfaktoren und Transkriptmenge, verursacht durch geringe Transkription.

In den anderen beiden untersuchten Transkripten (*cob* und *cox3*) konnte jedoch eine Verringerung der Editingaktivität festgestellt werden; während im *cob*-Transkript drei der vier untersuchten Editingstellen nicht editiert und die vierte nur zu 10% editiert wurden, fand im *cox3*-Transkript bei insgesamt vier der fünf untersuchten Editingstellen ein Editing zwischen 50-60% statt. Die fünfte untersuchte Editingstelle blieb vollständig uneditiert.

Die Untersuchung des RNA-Editings in Chloroplasten und Mitochondrien von transgenen Linien, die das 2-5'-Konstrukt in single-copy-Integration trugen, und einen „gescheckten“ Phänotyp (Linie 2-5'-3-x und Nachkommen) sowie eine Überexpression der drei RNA-

Polymerasen zeigten, erbrachte jedoch keine Auffälligkeiten. Es konnten weder vollständige Ausfälle, noch Übereditierungen oder Reduktionen in der Editingaktivität an den untersuchten Editingstellen der Transkripte festgestellt werden. Zumindest auf das RNA-Editing scheint dieser extreme Phänotyp keinen Einfluß zu haben.

Baba *et al.* (2004) stellten hingegen in ihren RpoT;2-Mutanten trotz Transkriptreduktion von RpoT;2 keine Beeinträchtigung der Transkription dieses Gens fest.

Fehlendes RNA-Editing an spezifischen Editingstellen, könnte die Folge von fehlenden Editing- oder Spezifitätsfaktoren sein, so wie es auch von Karcher und Bock (1998) für den Einfluß von plastidärer Translation auf eine Editingstelle im *ndhB*-Transkript von Tabak vermutet wird. Da heute noch immer nicht genau geklärt ist, wie der RNA-Editingprozess genau vor sich geht, und welche Editing- oder Spezifitätsfaktoren maßgeblich daran beteiligt sind, kann über die eigentliche Ursache des Editingausfalls nur spekuliert werden. Da jedoch im Fall dieser 21 Linien bei allen eine Transkriptreduktion aller kernkodierter RNA-Polymerasen vom Phagentyp auftrat, scheint eine Beeinträchtigung entsprechender Hilfsfaktoren naheliegend.

Im Fall der weiteren transgenen Linien, die nur für eine RNA-Polymerase eine Transkriptreduktion aufwiesen bzw. von Nachkommen, die zum Teil eine starke Überexpression der RNA-Polymerasentranskripte zeigten, konnte wie beim plastidären RNA-Editing keine Auswirkung auf die untersuchten Editingstellen festgestellt werden. Ausschlaggebend für eine Beeinflussung des RNA-Editingprozesses scheint auch hier wieder die Transkriptreduktion aller drei RNA-Polymerasen zu sein.

4.9 Charakterisierung von T-DNA-Insertionslinien für die kernkodierten RNA-Polymerasen

Die Analyse von T-DNA-Insertionslinien für die drei kernkodierten RNA-Polymerasen in *Arabidopsis thaliana* lieferten teilweise ähnliche phänotypische Auswirkungen, wie sie bereits für die *Antisense*-Pflanzen gezeigt werden konnte. Ebenso wie die T-DNA-Insertionslinie Salk_070979 für die Linie 2-5'-3-x, sollten sie einen Vergleich des Phänotyps mit den in der vorliegenden Arbeit erstellten *Antisense*-Linien für die einzelnen RNA-Polymerasen ermöglichen.

Dabei wurde für RNA-Polymerase 1 die Linie Salk_005875 (Δ -RpoT;1), für RNA-Polymerase 2 die Linie Salk_132842 (Δ -RpoT;2) und für RNA-Polymerase 3 die Linie

Salk_093884 (Δ -RpoT;3) untersucht. Die Linie Salk_005875 enthielt die T-DNA-Insertion im vorderen Teil von Exon 1, Linie Salk_132842 und Linie Salk_093884 wiesen die T-DNA-Insertion in Intron 3 auf. Die Untersuchung der Aufspaltung zeigte, dass für RNA-Polymerase 2 und 3 sowohl homo- als auch heterozygote Pflanzen vorhanden waren. Für RNA-Polymerase 1 konnten allerdings nur heterozygote Pflanzen angezogen werden.

Bei der Anzucht der Pflanzen im Gewächshaus unter Standardbedingungen zeigte sich bei heterozygoten Pflanzen kein phänotypischer Unterschied zu den Wildtyppflanzen. Ein auffälliges grün-weiß geschecktes Erscheinungsbild wie bei Linie 2-5'-3-x konnte in keinem Fall auch nur ansatzweise detektiert werden. Homozygote Pflanzen der knock-out Linie für RNA-Polymerase 2 sind jedoch kleiner und verzögert im Wachstum. Homozygote Pflanzen der knock-out Linie für RNA-Polymerase 3 waren nicht nur deutlich kleiner, sondern wiesen auch eine auffällige Bleichung der Keim- und Rosettenblätter auf. Bei der Anzucht auf Saccharose-haltigem Medium *in vitro* zeigten diese Pflanzen auch weiterhin eine Wuchsverzögerung, konnten aber nach zwei Wochen die fehlende Grünfärbung nachbilden. Dies legt die Vermutung nahe, dass im Fall von RNA-Polymerase 3, die anderen beiden RNA-Polymerasen nicht fähig sind, einen Ausfall dieses Enzyms zu kompensieren, zumindest nicht im frühen Stadium der Pflanzenentwicklung. Dieser phänotypische Effekt der knock-out-Linie für RNA-Polymerase 3 deckt sich mit den phänotypischen Auffälligkeiten der in dieser Arbeit erzeugten *Antisense*-Linien für RNA-Polymerase 3. Auch bei diesen Pflanzen ist eine deutliche Bleichung der Blätter zu erkennen, eine spätere Nachfärbung ist bei diesen Pflanzen nur in Teilbereichen der Blätter zu beobachten. Auch ist diese Nachfärbung nicht vollständig, so wie bei den knock-out-Mutanten. Die Untersuchung der Transkriptmengen in den *Antisense*-Linien für RNA-Polymerase 3 ergab jedoch eine zusätzliche Verringerung für RNA-Polymerase 1 und 2. Die fehlende bzw. unvollständige Nachfärbung dieser Pflanzen ließe sich somit durch eine ebenfalls fehlende Kompensationsmöglichkeit durch RNA-Polymerase 1 und 2 erklären.

Bei der näheren Untersuchung von Schoten der knock-out-Pflanzen für RNA-Polymerase 1 stellte sich heraus, dass sie in hohem Maße geschädigte Samenanlagen enthielten, erkennbar an deutlichen Samenausfällen in den Schoten. Das Verhältnis von intakten zu degenerierten Samenanlagen lag bei 3:1. Es ist zu vermuten, dass es sich bei diesen Samenanlagen um die homozygoten handelt, was erklären würde, dass keine homozygoten Pflanzen dieser knock-out-Linie angezogen werden konnten. Der Ausfall von RNA-Polymerase 1 scheint somit eine Embryoletalität zur Folge zu haben. Yao *et al.* (2003) beschreiben für Insertionsmutanten, die T-DNA-Insertionen in einem Gen für einen Sigma-ähnlichen Faktor enthalten, einen

ähnlichen Phänotyp. Bei diesem kommt es bereits in den Schoten zu absterbenden Embryos bzw. zu unbefruchteten Samenanlagen, die in der Schote als Lücken zu erkennen sind. Die Tatsache, dass die Störung eines Transkriptions-Faktors, der in beide Organellen importiert wird, einen ähnlichen Phänotyp hervorruft, wie er bei knock-out-Mutanten für RpoT;1 auftritt, weist auf eine ähnliche Funktion bzw. auf einen ähnlichen Wirkungsbereich hin.

Die Schoten der anderen beiden knock-out-Linien zeigten deutliche Unterschiede im Aussehen der Samen, jedoch keine Lücken in der Schote (also keinen Ausfall von Samenanlagen). Die gebildeten Samen waren zum Teil in der heranreifenden Schote hell verfärbt, oder dunkel und von vertrocknetem Aussehen, wahrscheinlich handelt es sich dabei um die homozygoten Samen. Eine entsprechend niedrige Keimungsrate, wie sie auch für die *Antisense*-Linien (siehe 4.3.1) beschrieben wurde, ist die Folge und deckt sich mit den für diese Linien gefundenen Ergebnissen.

Die große Menge an ungewöhnlich gestalten Samen (bis zu 76%) in heterozygoten Pflanzen der Insertionslinie für RpoT;3 spricht für einen partiell dominanten Effekt in dieser Linie.

Bei der Untersuchung der nachfolgenden F₁-Generation zeigten Pflanzen der Linie Δ rpoT;3 bei der Anzucht im Gewächshaus einen eindeutigen Phänotyp. Die Blätter dieser Individuen waren vollständig entfärbt, die Pflanzen eindeutig kleiner und langsamer in der Entwicklung als die vergleichbaren Wildtyp-Pflanzen. Für diese Linie lässt sich somit eindeutig die Aussage treffen, dass RpoT;2 zumindest in diesem Fall den Ausfall von RpoT;3 offensichtlich nicht kompensieren kann und auch die PEP dazu nicht in der Lage ist. Diese Tatsache weist vorläufig darauf hin, dass alle drei RNA-Polymerasen vom Phagentyp definierte Aufgaben besitzen und nur bedingt fähig sind, Aufgaben der anderen RNA-Polymerasen mit zu übernehmen.

Bei der Anzucht dieser Pflanzen auf Saccharose-haltigem Medium *in vitro* wurde ebenfalls eine Bleichung der Blätter und eine Wuchsverzögerung, sowie eine Bildung von charakteristisch geformten Blatträndern („Öhrchenbildung“) beobachtet. Nach ungefähr zwei Wochen wurden diese Pflanzen jedoch nachträglich hellgrün und normal geformt, was für eine Kompensationsmöglichkeit dieser fehlenden RNA-Polymerase spricht. Transgene *Arabidopsis*-Pflanzen, die ein Fusionsprotein von RNA-Polymerase 3 mit GFP exprimieren (siehe 3.2.2 Abb. 10), zeigten ebenfalls einen Phänotyp mit nur teilweise ergrünten Blattbereichen und charakteristisch geformten Blättern, der sich im Verlauf der Entwicklung dem der Wildtyppflanze annäherte. Vermutlich fehlt diesem Fusionsprotein ein essentieller Sequenzbereich, der für die Interaktion mit einem für diese RNA-Polymerase spezifischen Transkriptionsfaktor benötigt wird.

Mit fortschreitender Entwicklung der Pflanzen scheint jedoch eine der anderen beiden RNA-Polymerasen diesen Verlust ausgleichen zu können, da sie nicht von diesem Transkriptionsfaktor abhängig sind, sondern eigene verwenden. Dies wiederum spricht für eine, wenn auch sehr begrenzte Möglichkeit der Kompensation in der späteren Entwicklung der Pflanzen. Eine weitere Kompensationsmöglichkeit wäre gegeben, wenn man davon ausgeht, dass von der PEP in den Chloroplasten immer, auch zu Beginn der Pflanzenentwicklung, eine sehr geringe Menge vorliegt. Diese könnte dann zumindest die Initiation der Transkription essentieller Gene im Chloroplasten gewährleisten, bis die entsprechende RpoT ihre Aufgabe erfüllen kann. Auch dieses Szenario wäre als Erklärung für die anfänglich fehlende und später nachgebildete Grünfärbung der homozygoten Insertions- bzw. *Antisense*-Linien denkbar. Da dieser Punkt noch nicht abschließend geklärt ist, bleibt abzuwarten, welches der möglichen Erklärungsmodelle sich als richtig erweisen wird.

Die weiterführende Untersuchung der transgenen Linien, vor allem der Linie 2-5'-3-x mit dem auffällig panaschierten Phänotyp, scheint vielversprechend. Eine Komplementation des Glutaminsäure-reichen Proteins könnte klären, ob der Phänotyp auf die Position der T-DNA-Insertion zurückzuführen ist. Die morphologische Untersuchung, der in ihrer Entwicklung gestörten Chloroplasten dieser Linie, könnte einen Hinweis auf mögliche Funktionsstörungen und deren Ursachen geben.

Eine Kreuzung verschiedener transgener Linien schien bereits während dieser Arbeit erfolgversprechend, konnte aber offensichtlich aufgrund der starken phänotypischen Effekte in den Blüten bisher nicht erfolgreich durchgeführt werden. Eine genauere Analyse, in Hinblick auf die fehlenden oder geschädigten Proteine, der transgenen Linien, vor allem derer, die nur eine Transkriptreduktion einer der drei RNA-Polymerasen zeigten, würde es ermöglichen, Aussagen über die betroffenen Genklassen und damit über die Zuständigkeit der einzelnen RNA-Polymerasen zu treffen. Eine weitergehende Untersuchung der knock-out-Mutanten für RNA-Polymerase 1-3 (RpoT;1, RpoT;2 und RpoT;3) in Bezug auf die Transkription der verschiedenen Gene könnte einen weiteren Hinweis auf die Aufgabenverteilung der einzelnen RNA-Polymerasen in den Organellen liefern.