

**Untersuchungen zur transkriptionellen Kontrolle
der Genexpression während der Blattseneszenz der
Gerste (*Hordeum vulgare* L.)**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel



vorgelegt von
Christian Scharrenberg

Kiel

2001

Referent: Frau Prof. Dr. Karin Krupinska

Koreferent: Herr Prof. Dr. Klaus Humbeck (Universität Halle)

Tag der mündlichen Prüfung: 07.02.2002

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 13.02.2002

Der Dekan

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Einführung in die pflanzliche Seneszenz	1
1.2	Seneszenzspezifische Genexpression	4
1.3	Ebenen der Genexpression	6
1.3.1	Transkription	7
1.3.2	Stabilität von Transkripten	9
1.4	„Run-on“-Analysen mit isolierten Kernen als Methode zur Untersuchung der Transkription	10
1.5	Zielsetzung	11
2.	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	Chemikalien und Enzyme	13
2.2	Pflanzenmaterial	13
2.2.1	Anzucht von Gerstenpflanzen in der Klimakammer	13
2.2.2	Gerstenpflanzen aus dem Freiland	14
2.3	Messung physiologischer Parameter	14
2.3.1	SPAD-Messungen zur Bestimmung des relativen Chlorophyllgehalts	14
2.3.2	Bestimmung der chlorophyllspezifischen Fluoreszenz (F_v / F_m)	14
2.4	Gensonden	15
2.5	Allgemeine Methoden	17
2.5.1	Anzucht von Bakterien und Plasmidisolierung	17
2.5.2	Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen	17
2.5.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	17
2.5.4	Sequenzierung klonierter DNA-Fragmente	18
2.5.5	Extraktion von Nukleinsäuren aus Pflanzenmaterial	18
2.5.5.1	Isolierung von Gesamt-RNA nach CHIRGWIN <i>et al.</i> (1979)	18
2.5.5.2	Isolierung von Gesamt-RNA mit dem TRIzol™-Reagenz	18
2.5.5.3	Isolierung von DNA aus Pflanzenmaterial	19

2.5.5.4	Fällung von Makromolekülen	19
2.5.5.5	Markierung von DNA-Sonden	20
2.5.5.6	Extraktion von Proteinen aus isolierten Kernen	20
2.5.6	Herstellung von DNA-„Dot Blot“-Membranen	21
2.5.7	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren und Proteinen	21
2.5.7.1	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	21
2.5.7.2	Immobilisierung von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen	22
2.5.7.3	Nachweis von immobilisierten Nukleinsäuren auf Nylonmembranen	22
2.5.7.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen	22
2.5.7.5	Färbung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen	22
2.5.7.6	Trocknen von Proteingelen	23
2.5.7.7	Elektrotransfer von Proteinen auf Membranen („Western-Blot“)	23
2.5.8	Hybridisierung	23
2.5.8.1	Hybridisierung von DNA-Membranen	23
2.5.8.2	Hybridisierung von RNA-Membranen	24
2.5.8.3	Hybridisierung von DNA-„Dot Blot“-Membranen	24
2.5.8.4	Detektion von Hybridisierungssignalen	25
2.5.8.5	Densitometrische Auswertung von Hybridisierungssignalen	25
2.5.8.6	Durchführung einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA)	26
2.5.8.7	Entfernen von hybridisierten Sonden von Membranen	26
2.5.8.8	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen durch „ECL“	26
2.6	Nichtradioaktives Durchmustern von Genbibliotheken	27
2.6.1	Titerbestimmung von Phagenbibliotheken	27
2.6.2	Plattierung der Bakterien und Infektion mit Bakteriophagen	27
2.6.3	Transfer der Phagen-Plaques auf Nylonmembranen	27
2.6.4	Hybridisierung der Plattenabzüge	28
2.6.5	Identifizierung und Isolierung von spezifischen Phagen-Plaques	28
2.6.6	„ <i>In vivo</i> “-Exzision mit dem „ExAssist“ Helferphagen	28
2.6.7	λ -DNA-Präparation aus Plattenlysaten	29
2.6.8	λ -DNA-Präparation aus Flüssiglysaten	30
2.6.9	Charakterisierung der HvSF27-spezifischen Sequenzen	31
2.7	Isolierung transkriptionsaktiver Kerne aus Blattmaterial	31
2.7.1	Kernisolierung nach COX & GOLDBERG (1988)	31

2.7.1.1	Percolldichtegradient	32
2.7.1.2	Isolierung der Kerne	33
2.7.1.3	Bestimmung der Kernaussbeute	35
2.7.2	Kernisolierung nach KANAZAWA <i>et al.</i> (2000)	35
2.7.2.1	Isolierung der Kerne	35
2.7.2.2	Bestimmung der Kernaussbeute	36
2.8	„Run-on“-Transkriptionsexperimente mit isolierten Kernen	37
2.8.1	„Run-on“-Transkription nach KRAUSE <i>et al.</i> (1998)	37
2.8.2	„Run-on“-Transkription nach KANAZAWA <i>et al.</i> (2000)	38
2.8.3	Bestimmung der Einbaueffizienz	39
2.8.4	Versuche zur Charakterisierung der Transkriptionsaktivität isolierter Kerne	39
2.8.5	Einfluß von Hemmstoffen auf die Transkription	40
2.8.6	„Run-on“-Transkription mit nichtradioaktiv markierten Nukleotiden	40
2.8.6.1	Synthese von 4-thio-Uridintriphosphat	43
2.8.6.2	Bestimmung der Einbaueffizienz	43
2.9	cDNA-Synthese	44
3.	ERGEBNISSE	46
3.1	Seneszenzassoziierte cDNA-Klone aus der Gerste	46
3.1.1	HvSD-cDNA-Klone	46
3.1.2	Neue Ergebnisse zu den HvSD-cDNA-Klonen	47
3.1.3	HvSF-cDNA-Klone	50
3.1.4	Weitere Untersuchungen zu den HvSF-cDNA-Klonen	51
3.1.4.1	HvSF2	53
3.1.4.2	HvSF6	55
3.1.4.3	HvSF42	56
3.1.4.4	HvSF27	58
3.1.4.5	Sequenzhomologien der HvSF27-cDNA	59
3.1.4.6	5' - 3' - Orientierung der HvSF27-cDNA	59
3.1.4.7	Durchmustern einer „λ-ZAP“- Phagenbibliothek	61
3.1.4.8	Durchmustern einer genomischen „Lambda FIX II“-Bibliothek	64

3.2	Isolierung transkriptionsaktiver Kerne	66
3.2.1	Kernisolierung nach COX & GOLDBERG (1988)	66
3.2.2	Charakterisierung der isolierten Kerne	69
3.2.3	Charakterisierung der Transkriptionsaktivität in isolierten Kernen	70
3.2.4	Verwendung von modifizierten Nukleotiden zur Markierung neu synthetisierter RNA	72
3.2.5	Optimierung der „Run-on“-Transkriptionsbedingungen	75
3.2.6	Aufreinigung der Transkripte	77
3.3	Densitometrie und Auswertung	78
3.3.1	Detektionsbereich des "BioImager"	79
3.3.2	Korrelation zwischen der Signalstärke des "BioImagers" und der Plasmidkonzentration auf der DNA-"Dot Blot"-Membran	80
3.3.3	Korrelation zwischen der Signalstärke des "BioImagers" und der Sondenkonzentration in der Hybridisierungslösung	81
3.3.4	Optimierung der densitometrischen Auswertung von Hybridisierungssignalen am "BioImager"	82
3.3.5	Einfaktorielle ANOVA-Varianzanalyse	87
3.4	Dunkelinduzierte Seneszenz von Primärblättern	88
3.4.1	Charakterisierung der untersuchten Primärblätter mit physiologischen Parametern	88
3.4.2	Transkriptionsaktivität in Kernen aus Primärblättern	89
3.4.3	Hybridisierungsexperimente zur Untersuchung der Transkription und des relativen Transkriptgehalts ausgewählter Gene während der dunkelinduzierten Seneszenz	90
3.4.3.1	Varianzanalyse mit den Daten der „Run-on“-Transkriptionsanalyse während der dunkelinduzierten Seneszenz	92
3.4.3.2	Relative Transkription, relativer Transkriptgehalt und relative Transkriptstabilität der Gene mit signifikant veränderter Transkription während der dunkelinduzierten Seneszenz	95
3.4.3.3	Relative Transkription, relativer Transkriptgehalt und relative Transkriptstabilität der HvSF-Gene während der dunkelinduzierten Seneszenz	98

3.4.3.4	Relative Transkription, relativer Transkriptgehalt und relative Transkriptstabilität der HvSD-Gene während der dunkelinduzierten Seneszenz	100
3.4.3.5	Relative Transkription, relativer Transkriptgehalt und relative Transkriptstabilität ausgewählter Photosynthesegene während der dunkelinduzierten Seneszenz	102
3.4.3.6	Relative Transkription, relativer Transkriptgehalt und relative Transkriptstabilität der AiGs während der dunkelinduzierten Seneszenz	103
3.5	Seneszenz von Fahnenblättern der Gerste unter Freilandbedingungen	107
3.5.1	Physiologische Parameter der untersuchten Fahnenblätter	107
3.5.2	Transkriptionsaktivität der Kerne aus Fahnenblättern	108
3.5.3	Hybridisierungsexperimente zur Untersuchung der Transkription und des Transkriptgehalts während der Seneszenz des Fahnenblattes unter Freilandbedingungen	110
3.5.3.1	Relative Transkription und relativer Transkriptgehalt der HvSF-Gene während der Seneszenz von Fahnenblättern der Gerste unter Freilandbedingungen	112
3.5.3.2	Relative Transkription und relativer Transkriptgehalt der HvSD-Gene während der Seneszenz von Fahnenblättern der Gerste unter Freilandbedingungen	114
3.5.3.3	Relative Transkription und relativer Transkriptgehalt ausgewählter Photosynthesegene während der Seneszenz von Fahnenblättern der Gerste unter Freilandbedingungen	115
3.5.3.4	Relative Transkription und relativer Transkriptgehalt der AiG während der Seneszenz von Fahnenblättern der Gerste unter Freilandbedingungen	116
3.5.4	Vergleichende Betrachtung der Genexpression während der dunkelinduzierten Seneszenz in Primärblättern und der Seneszenz von Fahnenblättern unter Freilandbedingungen	120
4.	DISKUSSION	125
4.1	„Run-on“-Transkription	126

4.1.1	Nichtradioaktive Markierung von „Run-on-Transkripten	127
4.2	Hybridisierung mit „Run-on“-Transkripten und einer komplexen cDNA-Sonde	129
4.2.1	Die Qualität von Hybridisierungssignalen	130
4.2.2	Korrelation zwischen der Signalstärke und der Sondenkonzentration	130
4.2.3	Normalisierung verschiedener Hybridisierungsexperimente	132
4.2.4	Berechnung der Signalintensität	133
4.3	Veränderungen in der Transkription und im Transkriptgehalt von ausgewählten Genen während der Blattseneszenz	133
4.3.1	Gene mit signifikant veränderter Transkription während der dunkelinduzierten Seneszenz	134
4.3.2	Beschreibung der Sequenzen der cDNAs HvSF2, HvSF27 und HvSF42	139
4.3.3	Vergleich der Ergebnisse der „Run-on“-Transkription mit den Ergebnissen der MMA-Analyse und der „Northern-Blot“-Analyse	143
4.3.4	Eignung der Dunkelinkubation als Modellsystem für die Untersuchung der Blattseneszenz	145
4.4	Ausblick	147
5.	ZUSAMMENFASSUNG	149
6.	LITERATURVERZEICHNIS	152

ANHANG

Abkürzungsverzeichnis

$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	Ammoniumdicarbonat
^{32}P	Phosphorisotop mit der Massenzahl 32
AiG	andere interessante Gene
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphat Toluidiniumsalz
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
cpm	Zerfälle pro Minute („counts per minute“)
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
DAPI	4,6-diamino-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrrocarbonat
dGTP	Desoxyguanidin-5'-triphosphat
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DR	„defense-related“
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
ECL	verstärkte Chemilumineszenz („enhanced chemiluminescence“)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>g</i>	Zentrifugalbeschleunigung
GTP	Guanidin-5'-triphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
kBp	Kilobasenpaare (1000 Basenpaare)
kD	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
LSU	große Untereinheit der Rubisco

MCS	multiple Klonierungsstelle („multiple cloning site“)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MMA	„multiplex messenger assay“
mRNA	Boten-RNA
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitroblautetrazoliumsals
nt	Nukleotide
NTP	Nukleosidtriphosphate
pbsc	Plasmid BluescriptII
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pfu	„plaque-forming units“
PG	Photosyntheseogen
PR	„pathogenesis-related“
PSII	Photosystem II
PSL	Einheit für die Signalintensität („photo-stimulated luminescence“)
RNAP	DNA-abhängige RNA-Polymerase
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
SAG	seneszenzassoziiertes Gen („senescence associated gene“)
SAM	S-Adenosylmethionin
SAMDC	S-Adenosylmethionin-Decarboxylase
SAR	systemisch erworbene Resistenz („systemic acquired resistance“)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sUTP	4-Thiouridin-5'-triphosphat
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
u	Enzymeinheit („unit“)
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridin-5'-triphosphat

v/v	Volumen/Volumen
Vol	Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

Anmerkung:

Englische Termini, für die es keine gebräuchlichen deutschen Ausdrücke gibt und die teilweise auch Eingang in die deutschsprachige Fachliteratur gefunden haben, wurden als solche beibehalten und mit Anführungsstrichen versehen.

Alle Gennamen wurden entsprechend den Konventionen kursiv und mit kleinen Buchstaben, Proteinamen mit großen Buchstaben geschrieben.

1. Einleitung

1.1 Einführung in die Seneszenz der Pflanzen

Die Seneszenz ist die letzte Phase in der Entwicklung einer Pflanze oder von Pflanzenorganen, die dem Tod vorausgeht. Im Pflanzenreich wird zwischen der polykarpischen und der monokarpischen Seneszenz unterschieden (LEOPOLD 1961). Die polykarpische Seneszenz der überdauernden Stauden, Sträucher und Bäume ist allgemein von der herbstlichen Laubfärbung bekannt. Die monokarpische Seneszenz der annualen Pflanzen kann beispielsweise beim Reifen von Getreidefeldern beobachtet werden. Die grundlegenden Prozesse sind die gleichen, doch unterscheiden sich diese beide Seneszenztypen in einem entscheidenden Faktor. Während die polykarpische Seneszenz dem Absterben von Teilen der Pflanze vorausgeht, führt die monokarpische Seneszenz zum Tod der gesamten Pflanze mit Ausnahme der Samen, für deren Entwicklung sie entscheidend ist. Die Seneszenz ist wie das Wachstum oder die Reife ein geordneter und wichtiger Schritt in der Entwicklung.

Die Seneszenz betrifft neben anderen Organen der Pflanze vor allem das Blatt, das bei der polykarpischen Seneszenz als buntes Herbstlaub zu Boden fällt und bei der monokarpischen Seneszenz als gelbbraunes Blatt („Stroh“) an der ebenfalls absterbenden Pflanze verbleibt. Diesen mit dem Auge gut sichtbaren Veränderungen der Blätter liegen eine Vielzahl von Veränderungen im seneszierenden Organ auf physiologischer, biochemischer und molekularer Ebene zugrunde. Es werden Zellinhaltsstoffe remobilisiert und aus dem Blatt transportiert, die bei mehrjährigen Pflanzen in überdauernden Organen gespeichert und bei annualen Pflanzen zum Aufbau der Samen als Verbreitungseinheit genutzt werden. Die Remobilisierung in seneszierenden Blättern liefert bei Gräsern den größten Teil der Nährstoffe für die Kornfüllung (FELLER & KLEIST 1986).

Während der Seneszenz ist für das bloße Auge nur der Abbau des Chlorophylls durch Abnahme der Grünfärbung sichtbar. Der Abbau des Chlorophylls und die Auflösung der Chloroplasten (NOODÉN *et al.* 1997) dient als Schutz des seneszierenden Gewebes vor photooxidativer Schädigung durch das Chlorophyll, das durch den Abbau der Chlorophyllbindeproteine freigesetzt wird (MATILE & HÖRTENSTEINER 1999). Die Rückgewinnung von wichtigen Verbindungen wie Stickstoff und Magnesium spielt in bezug auf den Abbau des Chlorophylls nur eine untergeordnete Rolle. In einer Pflanzenzelle sind 80% des Stickstoffs in den Chloroplasten enthalten und dort zur Hälfte in der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase

(Rubisco) und zu einem Drittel in den Lichtsammel- und Antennenkomplexen gebunden (MAKINO & OSMOND 1991). Die Menge des Stickstoffs, der beispielsweise bei einer vollständigen Remobilisierung des 240 kD-Photosystem II-Kernkomplexes, der 36 Chlorophyll a-Moleküle enthält, frei wird, ist im Verhältnis zur der großen Menge an Stickstoff, der bei dem Abbau der Rubisco frei wird, gering. Dabei ist noch zu bedenken, daß der im Chlorophyll enthaltene Stickstoff nur 6% der Stickstoffmenge aus dem 240 kD-Photosystem II-Kernkomplex ausmacht (MATILE & HÖRTENSTEINER 1999). Ein Abbau des Chlorophylls ist also nicht für die Rückgewinnung von Stickstoff wichtig, sondern hauptsächlich für die Entgiftung des photodynamisch wirksamen Chlorophylls. Die Abbauprodukte werden in der Vakuole eingelagert, wo sie für eine weitere Remobilisierung nicht mehr zur Verfügung stehen. Durch den Abbau des Chlorophylls werden die Apoproteine der Pigment-Protein-Komplexe zugänglich, die neben der Rubisco einen Großteil der remobilisierten Stoffe aus dem Chloroplasten liefern.

Der Schutz des seneszierenden Blattes gegen Photooxidation deutet darauf hin, daß es sich bei der Seneszenz nicht um einen passiven und ungeordneten Prozeß handelt. Die Seneszenz ist ein regulierter Prozeß, der nach einem festgelegten Programm abläuft (NOODÉN *et al.* 1997) und die Expression spezifischer Gene erfordert. Der Ablauf dieses Programms ist von äußeren Faktoren abhängig und in seiner Geschwindigkeit modulierbar, kann aber nicht völlig unterdrückt oder verhindert werden. Neben dem durch die Blattfärbung augenscheinlichem Chlorophyllabbau werden auf zellulärer Ebene weitere typische Seneszenzmerkmale sichtbar. Dazu gehören der Abbau der Proteine und der Nukleinsäuren einerseits sowie eine seneszenzspezifische Transkription und die damit verbundene *de novo*-Synthese von bestimmten Proteinen andererseits.

Durch eine Inhibierung der Proteinbiosynthese, die zu einer Verzögerung der Seneszenz führt, konnte gezeigt werden, daß für das Fortschreiten der Seneszenz eine Neusynthese von Proteinen notwendig ist (MARTIN & THIMANN 1972). Der seneszenzassoziierten Transkription und Proteinsynthese steht eine Abnahme des Proteingehalts gegenüber, die anfänglich vor allem auf den Abbau der Proteine des Photosyntheseapparates zurückzuführen ist (BATE *et al.* 1991, HENSEL *et al.* 1993, HUMBECK *et al.* 1994, HUMBECK *et al.* 1996, ZA VALETA-MANCERA *et al.* 1999). Die Abnahme des Proteingehalts wird stets auch von einer Abnahme des Gehalts von Nukleinsäuren begleitet (LOHMAN *et al.* 1994) und betrifft vor allem ribosomale RNAs, Transkripte für Photosyntheseproteine und andere Proteine des anabolen Stoffwechsels (HENSEL *et al.* 1993, CRAFTS-BRANDNER *et al.* 1996, HUMBECK & KRUPINSKA 1996).

Ein Schwerpunkt der gegenwärtigen Seneszenzforschung ist die Identifizierung sogenannter seneszenzassoziierter Gene (SAG, LOHMAN *et al.* 1994), deren Transkripte während der Seneszenz verstärkt akkumulieren. Von einer Charakterisierung dieser Gene erwartet man ein besseres Verständnis des gesamten Seneszenzprozesses und seiner Regulation. Eine Übersicht über die bisher in verschiedenen Pflanzenspezies identifizierten SAGs findet sich bei SMART (1994), BUCHANAN-WOLLASTON (1997) und GAN & AMASINO (1997). Zu den Genprodukten der charakterisierten SAGs gehören vor allem katabolische Proteine, wie z.B. Proteinasen (HENSEL *et al.* 1993, SMART *et al.* 1995, DRAKE *et al.* 1996, NAKASHIMA *et al.* 1997, LEE *et al.* 2001, PAGE *et al.* 2001), Ribonukleasen (TAYLOR *et al.* 1993, BARIOLA *et al.* 1994, LERS *et al.* 1998, PÉREZ-AMADOR *et al.* 2000), Lipasen (HONG *et al.* 2000), Galaktosidasen (CHROST & KRUPINSKA 2000) und Glukosidasen (FUJIKI *et al.* 2001, YOSHIDA *et al.* 2001). Außerdem wurden einige Proteine aus der Glukoneogenese identifiziert (GRAHAM *et al.* 1992, SMART *et al.* 1995) sowie auch Proteine mit Funktionen bei der Streßtoleranz (JOHN *et al.* 1997, WEAVER *et al.* 1998, CORPAS *et al.* 1999, PAGE *et al.* 2001) und speziell der Pathogenabwehr der Pflanzen (BECKER & APEL 1993, SMART *et al.* 1995, HANFREY *et al.* 1996, JOHN *et al.* 1997, BUTT *et al.* 1998, QUIRINO *et al.* 1999, PONTIER *et al.* 1999, PAGE *et al.* 2001, YOSHIDA *et al.* 2001, OBREGÓN *et al.* 2001). Spezifische Proteine, die für die Modifikation und Markierung anderer Proteine verantwortlich sind, z.B. Proteine des katabolischen Stoffwechselweges über die ubiquitinabhängige Proteolyse (GENSCHIK *et al.* 1994, GARBARINO *et al.* 1995, WOO *et al.* 2001) sowie ein Transkriptionsfaktor der WRKY-Familie (HINDERHOFER & ZENTGRAF 2001) konnten ebenso als seneszenzspezifisch klassifiziert werden. Das große Spektrum von während der Seneszenz transkribierten Genen deutet auf eine Verknüpfung vieler Regulations- und Stoffwechselwege hin, die letztendlich den Seneszenzprozeß ausmachen (BLEECKER & PATTERSON 1997, BUCHANAN-WOLLASTON 1997, GAN & AMASINO 1997, NAM 1997, QUIRINO *et al.* 2000).

In der Arbeitsgruppe von Frau Professor Krupinska wurden aus der Gerste eine Reihe von Genen isoliert, die einen erhöhten Transkriptgehalt während der Seneszenz besitzen. Dazu gehören unter anderem Gene, die für einen Proteinaseinhibitor (KLEBER-JANKE & KRUPINSKA 1997, VAN DER KOOIJ *et al.*) und eine 4-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase kodieren (KLEBER-JANKE & KRUPINSKA 1997, FALK *et al.* 2002) sowie eine Anzahl weiterer Gene, bei denen das kodierte Protein unbekannt ist.

1.2 Seneszenzspezifische Genexpression

Untersuchungen zur Expression verschiedener SAGs ergaben, daß diese unterschiedliche Expressionsmuster besitzen. Auf der Grundlage der zeitlichen Expressionsmuster im Verlauf der Pflanzenentwicklung wurden die SAGs in verschiedene Klassen eingeteilt (SMART 1994, BUCHANAN-WOLLASTON 1997). Diese Klassen berücksichtigen allerdings allein den Zeitraum der spezifischen Genexpression während der normalen und ungestörten Blattentwicklung. Viele Untersuchungen zeigten jedoch, daß verschiedene externe und interne Faktoren die Expression der SAGs beeinflussen und damit die Seneszenz auslösen oder verzögern können (WEAVER *et al.* 1998). Zu diesen Faktoren gehören Phytohormone, die Seneszenzprozesse auszulösen oder zu beschleunigen vermögen (ZACARIAS & REID 1990), z.B. Ethylen (GRBÍC & BLEECKER 1995, JOHN *et al.* 1995), Methyljasmonat (BELTRANO *et al.* 1998, CHEN & KAO 1998) und Salicylsäure (MORRIS *et al.* 2000). Demgegenüber kann Cytokinin (GAN & AMASINO 1995, JORDI *et al.* 2000, MENGLIANG 2001) die Seneszenz verzögern. Als weitere Beispiele für Faktoren, die einen Einfluß auf die Seneszenz haben, seien noch die Stickoxidradikale NO^\bullet (LESHEM *et al.* 1998), UV-B-Strahlung (JOHN *et al.* 2001) und Ozon (MILLER *et al.* 1999) genannt.

Zusätzlich zu diesen Faktoren können Abschneiden und eine Dunkelinkubation von abgeschnittenen sowie von an der Pflanze belassenen Blättern die Expression von SAGs fördern (AZUMI & WATANABE 1991, BECKER & APEL 1993, KLEBER-JANKE & KRUPINSKA 1997, ZAVALETA-MANCERA *et al.* 1999, WEAVER & AMASINO 2001). Dunkelinkubation oder die Verwendung abgeschnittener Blätter stellen Modellsysteme für die Induktion von Seneszenzprozessen dar (PARK *et al.* 1998, WEAVER *et al.* 1998, HAJOUJ *et al.* 2000). Es gibt jedoch Hinweise darauf, daß sich die künstlich erzeugte Seneszenz von der natürlichen erheblich unterscheidet (BECKER & APEL 1993, OH *et al.* 1996, WEAVER & AMASINO 2001).

Schon länger wird angeregt, die Seneszenz als eine Form des programmierten Zelltod (PCD) zu betrachten (GAN & AMASINO 1997, DANGL *et al.* 2000), da die Pflanze selbst ihren eigenen Tod oder den Tod einzelner Organe durch ein genetisch definiertes Programm der Selbstzerstörung herbeiführt. Dabei ist die Regulation dieses Zelltods multifaktoriell reguliert und zusammen mit einer differentiellen Steuerung der Expression der SAGs eng mit weiteren physiologischen und biochemischen Regelkreisläufen zu einem umfangreichen Signaltransduktionsnetz verknüpft.

QUIRINO *et al.* (2000) berichteten in diesem Zusammenhang von einer deutlichen Überlappung der Pathogenabwehr der Pflanzen mit dem Seneszenzprogramm. Als Grundlage dieser Überlappung kommen nach Meinung der Autoren Faktoren in Frage, die beiden Prozessen gemein sind und jeweils den anderen auslösen können. In Frage kommen Stressfaktoren oder physiologische Veränderungen, wie z.B. eine Erhöhung der Ethylensynthese oder auch eine Abnahme der Photosynthese.

Bei einer absinkenden Photosyntheseleistung verwandelt sich das Blatt ab einem gewissen Schwellenwert von einem „Source“- in ein „Sink“-Organ und tritt damit in Konkurrenz zu anderen „Sink“-Organen, wie z.B. dem sich entwickelnden Samen. Um diese Konkurrenzsituation zu verhindern und die Samen mit Nährstoffen zu versorgen, wird in diesen Blättern die Seneszenz eingeleitet. Nach Einschätzung von AMASINO bleiben Blätter einer Pflanze nur so lange erhalten, wie sie zum Überleben der Pflanze beitragen können (GUARENTE *et al.* 1998).

Anders als in Säugetieren scheint die Länge der Telomere keinen direkten Einfluß auf die Seneszenz in Pflanzen zu haben. Sowohl die Differenzierung als auch die Seneszenz sind in Rosettenblättern von *Arabidopsis* unabhängig von der Telomerlänge (ZENTGRAF *et al.* 2000). Anstelle einer Verkürzung der Telomere konnte bei *Arabidopsis* zu Beginn der Blattseneszenz eine Komplexbildung zweier Proteine mit der telomerischen DNA beobachtet werden. ZENTGRAF *et al.* (2000) nehmen an, daß diese Komplexbildung im Zusammenhang mit einer Störung der Telomerfunktion oder der Etablierung einer neuen Telomerfunktion steht, die für die Auslösung der Seneszenz von Bedeutung sein könnte.

In der Gerste konnte während der Entwicklung eine Verkürzung der Telomere nachgewiesen werden, in Kalluskulturen nahm die Länge der Telomere jedoch mit dem Alter der Kultur zu (KILIAN *et al.* 1995). Die relative Verkürzung der Telomerlänge in Gerste ist entwicklungsabhängig und beträgt im Schnitt 50 Bp pro Zellteilung, während in Tomaten und bei *Arabidopsis* eine konstante Telomerlänge während der Entwicklung nachgewiesen wurde. Da die Seneszenz nicht bei allen Pflanzen mit einer Verkürzung der Telomerlänge verbunden ist, hat bei den Pflanzen vermutlich eher die Telomerstruktur als die Telomerlänge einen Einfluß auf die Seneszenz (ZENTGRAF *et al.* 2000).

1.3 Ebenen der Genexpression

Die Untersuchung der Genexpression während der Seneszenz erfolgt beinahe ausschließlich auf Ebene der mRNA-Zusammensetzung. Durch die Bestimmung des Gehalts an spezifischen Transkripten vor und nach der Seneszenz wird auf Veränderungen in der Transkription der betreffenden Gene geschlossen. Auch der Begriff SAG wurde über die Untersuchung von mRNA-Gehalten als Name für Gene mit gesteigertem Transkriptgehalt während der Seneszenz definiert (LOHMAN *et al.* 1994). Die Expression eines Genes wird allerdings auf mehreren Ebenen reguliert: der Transkription, der posttranskriptionellen Modifikation der mRNA, der Translation und posttranslationellen Modifikation des Proteins. Aus der Untersuchung der Genexpression über den Transkriptgehalt ergeben sich daher zwei grundlegende Probleme:

Erstens kann über den Transkriptgehalt, der durch posttranskriptionelle Prozessierung und eine Stabilisierung oder einen Abbau der Transkripte verändert werden kann, nicht auf die Transkription geschlossen werden. So wurde gezeigt, daß der mRNA-Gehalt von Haferblättern nach Dunkelinkubation unterschiedlicher Dauer Veränderungen unterliegt (MALIK 1987), indem vermutlich schwach konzentrierte mRNAs angereichert werden, während die Transkription einer großen Anzahl von Genen abgeschaltet wird. Bei einer Abnahme des Gehalts an ribosomaler RNA während der Seneszenz können die Anteile eines spezifischen Transkripts in der Gesamt-RNA ansteigen, auch wenn keine Neusynthese vorliegt (LOHMAN *et al.* 1994). Von großer Bedeutung ist in diesem Falle die Bezugsgröße für die RNA in einer „Northern-Blot“-Analyse. Bei einer Untersuchung auf der Grundlage gleicher RNA-Mengen können auch solche Gene als SAG klassifiziert werden, deren Transkriptgehalt pro Zelle während der Seneszenz nicht zunimmt. Bei einer vergleichenden Analyse gleicher RNA-Mengen kann es sogar ohne Transkription des Genes und trotz abnehmendem Transkriptgehalt zu einer Zunahme der relativen Transkriptmenge und damit zu einer Klassifizierung des zugehörigen Genes als SAG kommen (CRAFTS-BRANDNER *et al.* 1996). Dies ist der Fall, wenn während der Seneszenz die Abnahme im Gehalt der betreffenden mRNA im Vergleich zur ribosomalen RNA und auch zu anderen mRNAs verlangsamt erfolgt.

Zweitens ist es nicht möglich, aus der Betrachtung des Transkriptgehalts auf die Expression eines Proteins zu schließen, da über die cDNA keine Aussagen über die Translation und die posttranslationelle Prozessierung des Proteins gemacht werden können. Eine Untersuchung an *Arabidopsis* zeigte, daß der Anteil des ERD1-Proteins, eines ClpC-ähnlichen Proteins, pro

Gramm Frischgewicht der Blätter während der Seneszenz abnimmt, der Gehalt der mRNA jedoch ansteigt (WEAVER *et al.* 2001). Aus der cDNA können also keine Rückschlüsse auf die Translation und die posttranslationalen Prozesse gezogen werden, so daß im Fall des ERD1 unklar bleibt, ob während der Seneszenz keine Translation stattfindet oder das Protein posttranslational destabilisiert wird.

Trotz der beschriebenen Problematik, die mit einer RNA-Analyse unter Verwendung von gleichen Mengen an Gesamt-RNA aus verschiedenen alten Blättern verbunden ist, wurden alle bisher beschriebenen Gene als SAGs definiert, weil ihr Anteil an der Gesamt-RNA während der Seneszenz zunimmt. Dabei wurden mit einer Vielzahl von verschiedenen Techniken, die alle auf dem Vergleich gleicher Mengen an Gesamt-RNA beruhen, bevorzugt zwei RNA-Populationen, eine aus seneszierendem und eine aus nicht-seneszierendem Pflanzenmaterial, direkt oder nach der Synthese von cDNA-Banken miteinander verglichen. Der Vergleich erfolgte durch das differentielle (u.a. LOHMAN *et al.* 1994, PARK *et al.* 1998, JOHN *et al.* 1997, DELORME *et al.* 2000) und subtraktive Durchmusterung von cDNA-Banken (BUCHANAN-WOLLASTON & AINSWORTH 1997, LEE *et al.* 2001, QUIRINO *et al.* 1999) sowie durch die „Differential Display Reverse Transcription PCR“ (DDRT-PCR, KLEBER-JANKE & KRUPINSKA 1997, PANAVALAS *et al.* 1999, HAJOUJ *et al.* 2000, FUJIKI *et al.* 2001, YOSHIDA *et al.* 2001). Neuere Methoden sind die cDNA-AFLP (BINYAMIN *et al.* 2001) und die SSH („suppression subtractive hybridization“, HINDERHOFER & ZENTGRAF 2001).

1.3.1 Transkription

Bei der Transkription wird die genetische Information in RNA-Moleküle umgeschrieben. Ausgehend von einer DNA-Matrize wird die Bildung der RNA durch die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen katalysiert, die nicht wie DNA-Polymerasen auf ein freies 3'-OH-Ende angewiesen sind. Im Zellkern finden sich drei verschiedene RNA-Polymerasen (RNAP), die unterschiedliche Gene transkribieren. Die RNAP I transkribiert die Gene für große ribosomale RNAs wie die 28S-, die 18S- und die 5,8S-rRNA. Die mRNAs und einige snRNAs („small nuclear“ RNAs) werden von der RNAP II, tRNAs, die 5S-rRNA, einige snRNAs und die scRNAs („small cytoplasmic“ RNAs) von der RNAP III synthetisiert. Die RNAP I ist für ca. 50-70%, die RNAP II für ca. 20-40% und die RNAP für ca. 10% der Gesamtaktivität der RNA-Polymerasen eines Zellkerns verantwortlich (OGBOURNE & ANTALIS 1998). Die Akti-

vität der Polymerasen kann mit spezifischen Hemmstoffen blockiert werden. So kann in Pro- und Eukaryoten durch Interkalierung des Antibiotikums Actinomycin D in die Helix die DNA als Matrize unbrauchbar gemacht werden. Eine weitere Möglichkeit ist eine Hemmung auf Substratniveau durch ATP-Analoga wie z.B. Cordycepin. Der vielseitigste Angriffspunkt für eine Hemmung der Transkription sind die RNA-Polymerasen selbst. So binden in Prokaryoten Rifamycin, ein Antibiotikum aus *Streptomyces mediterranei* und sein synthetisches Analogon Rifampicin an die β -Untereinheit der RNA-Polymerase und verhindern eine Initiation der RNA-Synthese, haben aber keine Wirkung auf die eukaryotische Transkription. Das Rifampicin hat keinen Einfluß auf die Verlängerung der RNA-Ketten, die jedoch durch Streptolydigin aus *Streptomyces lydicus* gehemmt werden kann. Dieser Hemmstoff verhindert in Prokaryoten die Elongation, jedoch nicht die Initiation der RNA-Synthese. In Eukaryoten wird das α -Amanitin, ein Wirkstoff des Giftes des Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides*, als Hemmstoff genutzt. Es besitzt keine Wirkung auf die prokaryotische RNA-Polymerase und hemmt spezifisch die RNA-Polymerase II und in hohen Konzentrationen auch die RNA-Polymerase III.

Die DNA liegt im Zellkern mit Histonen komplexiert als Chromatin vor. Ionische Wechselwirkungen der anionischen DNA mit den basischen Histonen bewirken dabei eine enge Bindung. Einer Transkription geht zuerst eine Aktivierung der Chromatinstruktur voraus, die einer Lockerung der Chromatinstruktur gleichkommt, durch die der Promotorbereich eines Gens für den Transkriptionsapparat zugänglich wird. Eine solche Aktivierung geschieht z.B. durch die Acetylierung der Histonproteine oder einer Herabsetzung des Methylierungsgrades der DNA, während durch eine Deacetylierung der Histonproteine oder durch DNA-Methylierungen Gene stillgelegt werden können (OGBOURNE & ANTALIS 1998, KREBS *et al.* 1999). Durch die Aktivierung des Chromatins wird nur die Voraussetzung für die Transkription geschaffen, durch die es zur Bindung des Transkriptionsapparates an die freigelegten regulierenden Sequenzen auf der DNA, den Promotoren, kommt. Von *cis*-aktiven Sequenzen und deren Kombination gesteuert erfolgt nun die Transkription. Zu diesen Sequenzen gehören die TATA-Box für die Positionierung der RNAP II und weitere Elemente, die für die Induzierbarkeit der spezifischen Transkription durch endogene oder exogene Faktoren verantwortlich sind.

1.3.2 Stabilität von Transkripten

Neben der Transkription wird die Genexpression auch über die Stabilität der Transkripte reguliert. In einer Eukaryotenzelle wird die Transkriptstabilität auf drei Ebenen kontrolliert (GUTTIÉRREZ *et al.* 1999). Dazu gehört ein RNA-Abbaumechanismus, der für den Abbau instabiler sowie der meisten stabilen Transkripte zuständig ist. Die Halbwertszeit von Transkripten in eukaryotischen Zellen reicht von weniger als einer Stunde bis zu mehreren Tagen (TAYLOR & GREEN 1995). Dabei zeigte sich, daß Gene, die nur über einen sehr kurzen Zeitraum transkribiert werden, oft sehr instabile Transkripte besitzen, und das zugehörige Genprodukt nur kurze Zeit synthetisiert werden kann. In diesen Genen fanden sich spezielle *cis*-aktive Sequenzelemente, die eine schnelle Degradierung der Transkripte herbeiführten. In *Arabidopsis* konnten mRNAs identifiziert werden, die sogenannte mRNA-Instabilitätssequenzen tragen, die auch als „downstream element“ (DSE) bezeichnet werden (GUTTIÉRREZ *et al.* 1999, JOHNSON *et al.* 2000). Transkripte mit dieser Sequenz besitzen eine Halbwertszeit von nur 10-50 min.

Eine weitere Kontrollebene stellen sequenzspezifische Faktoren dar, die die Stabilität der Transkripte beeinflussen. Neben solchen sequenzspezifischen Elementen finden sich bei allen mRNAs der Eukaryoten zwei posttranskriptionelle Modifikationen mit einem großen Einfluß auf die Transkriptstabilität. Bevor die Transkripte aus dem Kern in das Cytoplasma transportiert werden, erfolgt erstens die Anheftung einer 7-Methylguanosin-Kappe an das 5'-Ende des Transkripts („Capping“), die Voraussetzung für die Bindung der Ribosomen an das Transkript ist, und zweitens die Vervollständigung des 3'-Endes durch Addition eines Polyadenosinmonophosphatschwanzes (CRAMER *et al.* 2001). Versuche zeigten, daß die Transkriptstabilität durch die Kappe am 5'-Ende um das Zwei- bis Vierfache und durch den Poly-A-Schwanz am 3'-Ende um das Zwei- bis Dreifache erhöht wird (GALLIE 1991).

Die dritte Kontrollebene schließlich sind exogene oder endogene Faktoren, die einen Einfluß auf die Stabilität der Transkripte besitzen. Zu den exogenen Stimuli, die einen großen Einfluß auf die Stabilität von Transkripten besitzen, gehören unter anderem Licht (PETRACEK *et al.* 1998) und biotischer Streß (ZHANG *et al.* 1993). Für alle diese Faktoren konnte gezeigt werden, daß sie die Stabilität spezifischer Transkripte und auch deren Translation positiv oder negativ zu beeinflussen vermögen. Weitere Beispiele für Faktoren mit Einfluß auf die Transkriptstabilität sind abiotischer Streß durch Hitze, Kälte oder Salinität, sowie Hormone.

Von einzelnen Genen abgesehen, gibt es bisher noch keine umfassenden Untersuchungen mit genauen Angaben über Veränderungen der Transkriptstabilität während der Seneszenz. Die Faktoren, die eine Destabilisierung oder Stabilisierung von Transkripten während der Seneszenz bewirken, sind nicht bekannt. Daher kann eine Untersuchung der molekularen Grundlagen der Seneszenz, die allein die Transkriptgehalte berücksichtigt, nur zu unzureichenden Erkenntnissen führen.

1.4 „Run-on“-Analysen mit isolierten Kernen als Methode zur Untersuchung der Transkription

Um direkt die Transkription der kernkodierten Gene einer Zelle in Blättern verschiedenen Alters vergleichen zu können, bietet sich die Methode der Kern-„Run-on“-Analyse an. Durch Hybridisierung von radioaktiv markierten Transkripten kann eine große Anzahl von Genen gleichzeitig auf Änderungen in ihrer Transkriptionsrate hin untersucht werden. Dazu werden Zellkerne aus Pflanzengewebe isoliert und mit einem radioaktiven Nukleotid inkubiert. Während der Inkubation wird die Transkription bereits initiiert Transkripte fortgesetzt („Run-on“), und die verlängerten Transkripte werden durch den Einbau des radioaktiven Nukleotids markiert (WEBER *et al.* 1977). Über eine Hybridisierung dieser Transkripte mit einer Membran, auf die eine beliebig große Auswahl an zu untersuchenden genspezifischen DNA-Fragmenten aufgetragen worden sind, kann die relative Stärke der Transkription der einzelnen Gene bestimmt werden. Diese Methode ist unabhängig vom Transkriptgehalt in der Zelle und erlaubt Aussagen über die Transkriptionsrate zum Zeitpunkt der Blatternte bzw. der Kernextraktion.

Mit „Run-on“-Analysen wurde unter anderem erfolgreich die Veränderung der Genexpression während des Tagesverlaufs (TAYLOR 1989, WINTERS 1996), durch Sauerstoffmangel (FENNOY & BAILEY-SERRES 1995, FENNOY *et al.* 1998), nach Inkubation mit Hormonen (MANSFIELD & RAIKHEL 1990, LU *et al.* 1990, YI *et al.* 1999) oder bei Streß (DEROCHER & BOHNERT 1993, WINICOV & KRISHNAN 1996) untersucht. Mit dieser Methode kann neben der Transkription im Zellkern mit leicht modifizierten Protokollen auch die Transkription der Chloroplasten (DENG *et al.* 1987, MULLET & KLEIN 1987, KRUPINSKA & APEL 1989, KLEIN & MULLET 1990, KRUPINSKA 1992, KRAUSE *et al.* 1998, KRAUSE *et al.* 2000) und der Mitochondrien (GIEGÉ *et al.* 2000) untersucht werden.

Die „Run-on“-Transkription liefert qualitativ andere Ergebnisse als die klassische „Northern-Blot“-Analyse, da die Transkription von Genen direkt bestimmt wird.

Durch Hybridisierung der akkumulierten RNA, die durch „reverse“ Transkription radioaktiv markiert werden kann, mit entsprechenden DNA-„Dot Blot“-Membranen kann der Anteil von spezifischen mRNAs an der Gesamt-RNA bestimmt werden. Üblicherweise werden gleiche Mengen an Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben für die cDNA-Synthese eingesetzt, obwohl dabei das Problem der Anreicherung von Transkripten auftreten kann. Allerdings können die Ergebnisse dann mit anderen Untersuchungen dieser Art verglichen werden. Bei der Verwendung unterschiedlicher Mengen an RNA, die aus gleichen Mengen von Blattmaterial extrahiert wurden, sind Aussagen zur Veränderung der Menge akkumulierter mRNAs pro Zelle möglich (LOHMAN *et al.* 1994).

Die Signale, die durch Hybridisierung mit den „Run-on“-Transkripten einerseits und der cDNA andererseits erhalten werden, lassen sich densitometrisch auswerten. Die Transkriptstabilität der untersuchten Gene läßt sich nach GIEGÉ *et al.* (2000) durch die Bildung des Quotienten aus Transkriptgehalt und Transkription ableiten. Ein Vergleich der Hybridisierungsmuster von „Run-on“-Transkripten aus Kernen und cDNA-Populationen von jungen und seneszierenden Blättern erlaubt eine genaue Quantifizierung der Änderung der Transkription und des Transkriptgehalts während der Seneszenz. Durch die vergleichende Analyse der Transkription einerseits und der Menge an akkumulierter RNA andererseits kann ein Einblick in die Regulation der Genexpression auf Ebene der Transkription und der posttranskriptionellen Stabilisierung oder Destabilisierung von Transkripten erhalten werden.

1.5 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen zunächst die nicht publizierten HvSF-Klone der Gerste charakterisiert werden. Durch die Suche nach homologen Sequenzen in den Datenbanken soll versucht werden, die durch die HvSF-Klone kodierten Proteine zu ermitteln. In diese Suche werden auch auf die schon publizierten HvSD-Klone einbezogen, um den dadurch repräsentierten Genen mit unbekannter Funktion mit Datenbanksequenzen neueren Datums möglicherweise ein Protein zuweisen zu können.

Weiterhin sollen die bisher aus Fahnen- und Primärblättern der Gerste isolierten HvSF- und HvSD-Klone auf die Änderungen ihrer Transkription und ihres Transkriptgehalts während der

dunkelinduzierten Seneszenz von Primärblättern und der Fahnenblattseneszenz unter Freilandbedingungen untersucht werden. Dabei kommt die Technik der „Run-on“-Transkription zur Untersuchung der jeweiligen Transkriptionsrate und in einem zweiten Schritt die Verwendung radioaktiv markierter cDNA zur Ermittlung der Mengen an jeweils akkumulierter mRNA zum Einsatz.

Unbedingte Voraussetzung für die Durchführung von „Run-on“-Transkriptionsexperimenten ist die Isolierung transkriptionsaktiver Kerne aus Primär- und Fahnenblättern der Gerste. Daher sind eine geeignete Methode für die Isolierung von Kernen aus Gerstenblättern und die Bedingungen zur Analyse der Transkriptionsaktivität in den isolierten Zellkernen zu optimieren.

Zunächst sind aus Blattmaterial von verschiedenen Stadien der Fahnenblattseneszenz der Gerste im Freiland und Primärblättern aus der Klimakammer vor und nach der Induzierung von Seneszenz durch Dunkelinkubation Kerne zu isolieren. Mit diesen Kernen sind „Run-on“-Transkriptionsexperimente durchzuführen, um die Transkription von Seneszenzgenen aus der Gerste im Vergleich zu Photosynthesegenen und anderen Genen zu untersuchen und zwischen verschiedenen Stadien der Entwicklung zu vergleichen. Darüber hinaus soll aus dem untersuchten Blattmaterial Gesamt-RNA isoliert, „revers“ transkribiert und durch den Einbau eines radioaktiv markierten Nukleotids markiert und für Hybridisierungsexperimente genutzt werden. Von diesen Untersuchungen sind Erkenntnisse über den Transkriptgehalt und seine Veränderung während der Seneszenz zu erwarten. Nach der Etablierung einer quantitativen Auswertung der Hybridisierungssignale mit Hilfe des „BioImagers“ und einer geeigneten Auswertesoftware sollen die Ergebnisse der unterschiedlichen Hybridisierungsansätze densitometrisch ausgewertet werden. Durch einen Vergleich der für verschiedene Stadien erhaltenen Werte sollen Änderungen in der Transkription, im Transkriptgehalt und auf der Grundlage dieser beiden Werte auch in der Transkriptstabilität aller SAGs und anderer Gene der Gerste berechnet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Laborchemikalien wurden von den Firmen Fisher Scientific (Düsseldorf), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma (München) bezogen und waren, soweit nicht anders angegeben, von reinster Qualität.

Die Radionukleotide α -³²P-CTP, α -³²P-UTP und α -³²P-dCTP wurden mit einer spezifischen Aktivität von jeweils 3000 Ci / mmol von der Firma NEN (Dreieich) bezogen.

2.2 Pflanzenmaterial

2.2.1 Anzucht von Gerstenpflanzen in der Klimakammer

Das Saatgut der Sommergerste *Hordeum vulgare* L. cv. Carina wurde von der Firma Ackermann Saatzeit (Irlbach) bezogen und 48 h bei 4°C und 24 h bei 20°C im Dunkeln auf feuchtem Filterpapier vorgekeimt. Keimlinge des gleichen Entwicklungsstadiums wurden anschließend auf einer Mischung von 1/3 Sand und 2/3 Einheitserde, der ein Langzeitdünger (4 g / l Plantacote 4M) beigemischt wurde, ausgelegt und mit 1 bis 2 cm des Substrats überschichtet. Die gut befeuchteten Keimlinge wurden in der Klimakammer im Licht (16 h / 21°C) / Dunkel (8 h / 21°C) – Rhythmus kultiviert.

Für eine Dunkelinkubation wurden die Pflanzen nach 9 Tagen bei unveränderten Kulturbedingungen 48 h ohne Licht kultiviert. Für eine Revertierung der dunkelinduzierten Seneszenz wurde der Licht- / Dunkelrhythmus für 48 h wieder aufgenommen (KLEBER-JANKE & KRUPINSKA 1997). Von den Versuchspflanzen wurden die Blattspreiten der Primärblätter in der Mitte der Dunkelphase unter Grünlichtbedingungen oberhalb der Blattscheide abgetrennt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.2.2 Gerstenpflanzen aus dem Freiland

Für Untersuchungen der Seneszenz von Fahnenblättern der Gerste unter Freilandbedingungen wurde Sommer- und Wintergerste verschiedener Sorten verwendet, die an unterschiedlichen Standorten angebaut wurden (Tabelle 2.2.2).

Tabelle 2.2.2: Liste der verwendeten Gerstensorten mit Angabe der Varietät und des Standorts des Versuchsfelds.

<i>Gerstentyp</i>	<i>Gerstenvarietät</i>	<i>Standort</i>
Sommergerste	Carina	Botanischer Garten CAU Kiel (2000)
Sommergerste	Carina	Norddeutsche Pflanzenzucht Hohenlieth (2000)
Wintergerste	Nikel	Norddeutsche Pflanzenzucht Hohenlieth (2001)

Die Blattspreiten der Fahnenblätter wurden oberhalb der Blattscheide abgetrennt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.3 Physiologische Parameter

2.3.1 SPAD-Messungen zur Bestimmung des relativen Chlorophyllgehalts

Mit einem Chlorophyllmeter der Firma Minolta (SPAD 502) wurde in der Mitte der Blattspreite ca. 2 cm unterhalb der Blattspitze der relative Chlorophyllgehalt ermittelt. Es wurde der Mittelwert aus zehn Einzelmessungen berechnet.

2.3.2 Bestimmung der chlorophyllspezifischen Fluoreszenz (F_v / F_m)

Die chlorophyllspezifische Fluoreszenz (F_v / F_m) wurde in Anlehnung an SCHREIBER *et al.* (1986) mit einem „Pulse Amplituden Modulations“ (PAM) Chlorophyll Fluorometer 101 der Firma Walz (Effeltrich) ca. 2 cm unterhalb der Blattspitze gemessen.

Bei Klimakammermaterial wurde das Blattmaterial im Anschluß an die Bestimmung des relativen Chlorophyllgehalts (2.3.1) gemessen. Bei Freilandmaterial wurde entweder das tragbare Chlorophyll Fluorometer MiniPAM (Walz, Effeltrich) vor Ort verwendet, nachdem die unter-

suchten Blätter mit speziellen Klammern für 15 min partiell abgedunkelt wurden, oder es wurden einige Pflanzen aus dem Freiland ins Labor überführt und dort nach Dunkelinkubation (30 min) mit dem Chlorophyll Fluorometer PAM 101 im Grünlicht gemessen. Es wurde jeweils der Mittelwert aus zehn Einzelmessungen berechnet.

2.4 Gensonden

Zur Herstellung von DNA-„Dot Blot“-Membranen (2.5.6) oder für die Hybridisierung von „Southern-“, oder „Northern-Blots“ (2.5.7.2) wurden verschiedene Gensonden verwendet. Die eingesetzten Gensonden sind mit ihrer Größe, ggf. dem kodierten Protein, den verwendeten Vektor und unter Angabe des bei der Klonierung verwendeten Enzyms in Tabelle 2.4 aufgeführt.

Tabelle 2.4: Liste der verwendeten Gensonden einschließlich Größe, kodierten Proteinen, Vektoren, Restriktionsschnittstellen und Referenzen.

<i>lfd. Nr.</i>	<i>Name</i>	<i>Protein</i>	<i>Insert [Bp]</i>	<i>Vektor</i>	<i>Klonierungsstelle</i>	<i>Restriktionsenzym</i>	<i>Referenz</i>
Klone aus der seneszenzspezifischen cDNA-Bank „D“ (QUAST 1995)							
1	HvSF2	Glukosyltransferase	800	pUC18	<i>Sma</i> I	<i>Eco</i> R I	1, 21
2	HvSF6	GRAB2-Protein	377	pBluescript	<i>Sma</i> I	<i>Eco</i> R I	1, 21
3	HvSF27		420	pBluescript	<i>Sma</i> I	<i>Eco</i> R I/ <i>Hind</i> III	1
4	HvSF31		456	pCRII	T/A	<i>Eco</i> R I	1
5	HvSF42	Cysteinprotease	500	pCRII	T/A	<i>Eco</i> R I	1, 21
6	HvSF11	α -Galaktosidase II	805	pBluescript	<i>Eco</i> R I	<i>Eco</i> R I	2
7	HvSF23	α -Galaktosidase I	739	pBluescript	<i>Eco</i> R I	<i>Eco</i> R I	2
8	HvSF33		447	pBluescript	<i>Eco</i> R I	<i>Eco</i> R I	2
9	HvS40		340	pBluescript	<i>Eco</i> R I	<i>Eco</i> R I	3
Durch DDRT-PCR aus dunkelinduzierten Primärblättern isolierte Klone							
10	HvSD1		750	pBluescript	<i>Eco</i> R I	<i>Eco</i> R I	4
11	HvSD5		342	pUC18	<i>Sma</i> I	<i>Xba</i> I / <i>Sac</i> I	4
12	HvSD8	Homologie zu <i>nif</i>	950	pBluescript	<i>Eco</i> R I	<i>Eco</i> R I	4
13	HvSD10	Proteinaseinhibitor	550	pBluescript	<i>Eco</i> R I	<i>Eco</i> R I	4, 22
14	HvSD11		88	pUC18	<i>Sma</i> I	<i>Xba</i> I / <i>Sac</i> I	4
15	HvSD15		124	pUC18	<i>Sma</i> I	<i>Xba</i> I / <i>Sac</i> I	4
16	HvSD22		330	pUC18	<i>Sma</i> I	<i>Xba</i> I / <i>Sac</i> I	5
17	HvSD26		2000	pBluescript	<i>Eco</i> R I	<i>Eco</i> R I	4
18	HvSD34		153	pUC18	<i>Sma</i> I	<i>Xba</i> I / <i>Sac</i> I	5

2. Material & Methoden

lfd. Nr.	Name	Protein	Insert [Bp]	Vektor	Klonierungsstelle	Restriktions-enzym	Referenz
19	HvSD36	Hydroxyphenyl-pyruvatdioxygenase	800	pBluescript	<i>EcoR</i> I	<i>EcoR</i> I	4, 23
20	HvSD37		120	pUC18	<i>Sma</i> I	nicht bestimmt	4
Organellengene und Vektor-DNA							
21	Ubi I	Ubiquitin	728	pUC18		<i>EcoR</i> I	6
22	pt16S rDNA		560	pBluescript		<i>Hind</i> III / <i>Xho</i> I	7
23	PC222	26S-rDNA	450	pBR322	<i>Pst</i> I		8
25	mtCoxI	Untereinheit I der Cytochrom-Oxidase	1949	pBluescript		<i>EcoR</i> I	9
25	mtCoxII	Untereinheit II der Cytochrom-Oxidase	2300	pBluescript	<i>EcoR</i> I / <i>Pst</i> I		10
26	pUC18		2961				
Photosynthesegene (PG)							
27	HvSD21/ <i>rbcS</i>	SSU	400	pUC18	<i>Sma</i> I	<i>EcoR</i> I	5
28	LF2 / <i>cab</i>	LHCP	900	PBluescript	<i>Pst</i> I	<i>Pst</i> I	11
29	A8 / <i>petC</i>	Rieske	650	PBluescript	<i>EcoR</i> I	<i>EcoR</i> I	12
Andere interessante Gene (AiG)							
30	179M16T7	Actin-EST	651	pZL1	<i>Sal</i> I / <i>Not</i> I		13
31	pG22-69	Aldosereduktase	1092	pUC19			14
32	P2-195	Cysteinprotease	580	pUC19	<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI	15
33	CKO	Cytokininoxidase	728	PBluescript	<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI	16
34	pBnicl-1	Isocitratlyase	1728				
35	pHvJ611	Thionin	1880	pUC18	<i>EcoR</i> I	<i>EcoR</i> I	17
36	pHvJ3015	JIP-23	940	PBluescript	<i>EcoR</i> I	<i>EcoR</i> I	17
37	pZ54143	Katalase	1685	PBluescript	<i>EcoR</i> I / <i>Not</i> I	<i>EcoR</i> I	18
38	pWW 110/3	Saccharosesynthase	2600	pUC9		<i>EcoR</i> I	19
39	47/11 SAM	SAM-Decarboxylase	1893	Pbluescript		<i>EcoR</i> I	20

Referenzen: **1** = QUAST (1995), **2** = CHROST & KRUPINSKA (2000), **3** = BECKER & APEL (1992), **4** = KLEBER-JANKE & KRUPINSKA (1997), **5** = KLEBER-JANKE (1996), **6** = HAUSSÜHL (1999), **7** = KRUPINSKA & FALK (1994), **8** = FORDE *et al.* (1981), **9** = HIESEL *et al.* (1987), **10** = HIESEL & BRENNICKE (1983), **11** = APEL *et al.* (1983), **12** = von HUMBECK, Halle, zur Verfügung gestellt, **13** = NEWMAN *et al.* (1994), **14** = BARTELS *et al.* (1991), **15** = von ROUSTER, Carlsberg (DK), zur Verfügung gestellt, **16** = von SCHLÜTER, Botanisches Institut der Universität Greifswald, zur Verfügung gestellt, **17** = BECKER (1991), **18** = von FEIERABEND, Frankfurt, zur Verfügung gestellt, **19** = WERR *et al.* (1985), **20** = DRESSELHAUS *et al.* (1996), **21** = SCHARRENBURG *et al.*, **22** = VAN DER KOOIJ *et al.* (2002), **23** = FALK *et al.* (2002)

2.5 Allgemeine Methoden

2.5.1 Anzucht von Bakterien und Plasmidisolierung

LB-Medium

Trypton	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	1 % (w/v)

Die Bakterienstämme, die Plasmide mit einer der Gensonden (2.4) als kloniertes Insert enthielten, wurden in 200 ml LB-Medium mit Ampicillin (0,1 mg / ml) nach Animpfen mit Zellen aus einer Stammkultur über Nacht bei 37°C und 180 UpM in einem Schüttelinkubator angezogen.

Aus diesen Bakterienkulturen wurden die Plasmide mit dem „CONCERT™ Rapid Plasmid Midiprep System“ (Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.5.2 Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen

DNA wurde sequenzspezifisch mit niedrig (10 u / µl) oder hoch (50 u / µl) konzentrierten Endonukleasen (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers geschnitten. Für „Southern-Blots“ wurden je 15 µg DNA mit den hoch konzentrierten [50 u / µl] Restriktionsendonukleasen *BamH* I, *EcoR* I, *Hind* III und *Xba* I über Nacht bei 37°C restringiert. Die Restriktionsfragmente wurden in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt (SAMBROOK *et al.* 1989) (2.5.7.1).

2.5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgte nach Angaben des Herstellers der *Taq* DNA-Polymerase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) in einem Primus 96 Plus PCR-Gerät (MWG Biotech). Die „Primer“ wurden von den Firmen MWG Biotech (Ebersberg) oder Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

2.5.4 Sequenzierung klonierter DNA-Fragmente

Klonierte DNA-Fragmente wurden mit Hilfe von IRD81-fluoreszenzmarkierten, vektorspezifischen Oligonukleotiden (MWG Biotech, Ebersberg oder Invitrogen, Karlsruhe) sequenziert. Die Sequenzreaktion, ein PCR-gekoppeltes Verfahren („cycle sequencing“), wurde entweder mit dem „SequiTherm EXCEL™ II Long-Read™ DNA Sequencing Kit“ (Biozym Diagnostics GmbH, Hess. Oldendorf) oder mit dem „Cycle Reader™ Auto DNA Sequencing Kit“ (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers in einem Primus 96 Plus PCR-Gerät (MWG Biotech) durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte über ein denaturierendes Polyacrylamidgel (7,5 % Rapid Gel™ XL der Firma USB) in einem DNA-Sequenzierer vom Typ „LI-COR DNA Sequencer 4000L“ (MWG Biotech, Ebersberg).

2.5.5 Extraktion von Nukleinsäuren aus Pflanzenmaterial

2.5.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA nach CHIRGWIN *et al.* (1979)

Zur Extraktion von großen Mengen hochreiner RNA (bis zu 1 mg) aus größeren Mengen Pflanzenmaterial (ca. 5 g) wurde die Methode von CHIRGWIN *et al.* (1979) leicht modifiziert, wie von HUMBECK *et al.* (1994) beschrieben, angewendet.

2.5.5.2 Isolierung von Gesamt-RNA mit dem TRIzol[®]-Reagenz

Für eine schnelle RNA-Extraktion von bis zu 2 g Pflanzenmaterial wurde das TRIzol™-Reagenz (Invitrogen) verwendet.

Das in flüssigem Stickstoff zu einem feinem Pulver verarbeitete Blattmaterial (2 g) wurde mit 7 ml TRIzol™-Reagenz versetzt, gründlich durchmischt, nach Zugabe von weiteren 3 ml TRIzol™-Reagenz erneut durchmischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml Chloroform/Isoamylalkohol (99:1) wurde die Suspension ca. 15 s geschüttelt und 2 bis 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation (7500 UpM, 30 min, 4°C) wurde die wässrige von der organischen Phase getrennt. Nach Abnahme der wässrigen Phase wurden aus dieser mit 1 Vol. Isopropanol während einer zehnminütigen Inkubation die Nu-

kleinsäuren gefällt. Nach einer Zentrifugation (7500 UpM, 15 min, 4°C) wurden die sedimentierten Nukleinsäuren mit 1 ml 70% (v/v) eiskaltem Ethanol gewaschen. Das Sediment wurde an der Luft getrocknet und je nach Größe des Sediments in 100 – 500 µl mit DEPC behandeltem Wasser aufgenommen. Die RNA wurde portioniert bei –80°C gelagert.

2.5.5.3 Isolierung von DNA aus Pflanzenmaterial

Extraktionspuffer		TE-Puffer	
Tris/HCl pH 7,5	25 mM	Tris/HCl pH 8	10 mM
Guanidiniumthiocyanat	4 M	EDTA	1 mM
N-Lauroylsarcosinat	2 % (w/v)		
EDTA	10 mM		
β-Mercaptoethanol	100 mM		
(immer frisch zugegeben)			

Die Isolierung von DNA aus Gerstenblättern erfolgte nach ALBAUM (1993). 5 g Pflanzenmaterial wurden mit flüssigem Stickstoff zu einem feinem Pulver gemörsert und in 30 ml Extraktionspuffer aufgenommen. Nach einer Zentrifugation (10 min, 8000 UpM, 4°C) wurde der klare Überstand zweimal mit je 0,5 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert, gefolgt von einer Extraktion mit 0,25 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1). Die Nukleinsäuren wurden mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat und 1 Vol. Isopropanol gefällt und durch eine Zentrifugation (30 min, 8000 UpM, 4°C) sedimentiert. Nach einem Waschschriff mit 70% (v/v) Ethanol wurde das getrocknete Sediment in 900 µl TE-Puffer mit 90 µg RNase A (Roche, Mannheim) resuspendiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurde dann erneut einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion unterzogen und die DNA durch eine Fällung (2.5.5.4) konzentriert und in 100 – 500 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.5.5.4 Fällung von Makromolekülen

In wässriger Lösung vorliegende Nukleinsäuren wie DNA oder RNA wurden mit 0,1 Vol. 4 M NaCl und 2,5 Vol. eiskaltem absoluten Ethanol sorgfältig vermischt und während einer Inkubation bei –80°C (30 min) aus der Lösung gefällt. Durch eine Zentrifugation (14000 UpM,

4°C, 30 min) wurden die Nukleinsäuren sedimentiert und dann ein- bis zweimal mit 70 % (v/v) eiskaltem Ethanol gewaschen. Das Sediment wurde abschließend 10 min an der Luft getrocknet und in einem kleinen Volumen Puffer oder mit DEPC behandeltem Wasser aufgenommen.

Proteine wurden nach den Angaben in der Produktbeschreibung „The QIAexpressionist- The high level expression & protein purification system“ der Firma Qiagen (Hilden) von 1992 mit 10% (w/v) Trichloressigsäure (TCA) aus dem Extraktionspuffer (2.5.5.6) gefällt und in Wasser aufgenommen.

2.5.5.5 Markierung von DNA-Sonden

Die Markierung von restringierten, mit dem „CONCERT™ Matrix Gel Extraction System“ (Invitrogen) aus einem Agarosegel (2.5.7.1) extrahierten DNA-Fragmenten erfolgte entweder radioaktiv durch Einbau von α -³²P-dCTP oder nichtradioaktiv durch den Einbau von Digoxigenin-11-dUTP in die DNA.

Die radioaktive Markierung wurde mit dem „HexaLabel™ DNA Labeling Kit“ (MBI Fermentas) nach Angaben des Herstellers mit 100 ng DNA durchgeführt. Nicht eingebaute freie Nucleotide wurden durch Gelfiltration über „MicroSpin™ G-25 Columns“ (Amersham Pharmacia) nach Angaben des Herstellers abgetrennt.

Die nichtradioaktive Markierung wurde nach Angaben des „DIG System User's Guide for Filter Hybridization“ (Roche) mit 300 ng DNA während einer Inkubation von 20 h Dauer durch sogenanntes „random primed DIG-labeling“ mit Hexanukleotiden als „Primer“ durchgeführt.

2.5.5.6 Extraktion von Proteinen aus isolierten Kernen

Extraktionspuffer

Tris/HCl pH 6,8	62,5 mM
SDS	1 % (v/v)
Glyzerin	10 % (v/v)
β-Mercaptoethanol	5 % (v/v)

(immer frisch zugegeben)

Aus 5×10^6 bis 1×10^7 Kernen (2.7.1.2 bzw. 2.7.2.1) wurden Proteine nach der von KLEBER-JANKE (1996) beschriebenen Methoden isoliert. Die sedimentierten Kerne wurden in 1 ml Extraktionspuffer aufgenommen und für 5 Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Aus dem Extraktionsansatz wurden durch eine kurze Zentrifugation (14000 UpM, 10 min) unlösliche Bestandteile entfernt. Die Kernproteine wurden gefällt (2.5.5.3) und in Wasser aufgenommen. Aus dieser Proteinlösung wurde die Proteinkonzentration mit dem „Bio-Rad DC (*Detergent Compatible*) Protein Assay“ (Bio-RAD, München) nach LOWRY *et al.* (1951) bestimmt. Die Konzentration der Kernproteine wurde nach den Angaben im „DC Protein Assay Instruction Manual“ mit dem „Standard Assay Protocol“ durch Vergleich mit einer BSA-Eichreihe (0,08 – 1,4 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$) bestimmt. Die gelösten Proteine wurden zur Auftrennung in SDS-Polyacrylamidgelen (2.5.6.3.1) verwendet oder bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

2.5.6 Herstellung von DNA-„Dot Blot“-Membranen

Mit Hilfe der „Dot Blot“-Apparatur SRC96D Minifold (Schleicher & Schuell, Dassel) wurden die in Tabelle 2.4 aufgeführten Gensonden nach Angaben des Membranherstellers in einer Reihe von drei Verdünnungen auf Nylonmembranen (Zeta Probe GT, Biorad, München) übertragen. Der Auftrag erfolgte jeweils in den Konzentrationen 4000/1000/250 fmol, für stark exprimierte Gene in den Konzentrationen 800/200/50 fmol bzw. 320/80/20 fmol.

2.5.7 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren und Proteinen

2.5.7.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Desoxyribonukleinsäuren (DNA) und Ribonukleinsäuren (RNA) zu analytischen oder präparativen Zwecken erfolgte in Agarose- (DNA), bzw. Formaldehyd-Agarosegelen (RNA) nach den von SAMBROCK *et al.* (1989) beschriebenen Methoden.

2.5.7.2 Immobilisierung von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

Die Übertragung von DNA oder RNA aus Elektrophoresegelen auf Nylonmembranen (Hybond N⁺, Amersham Pharmacia) („Southern-“ bzw. „Northern-Blot“) und deren Immobilisierung wurde durch Kapillartransfer (SOUTHERN 1975) nach den Angaben des Membranherstellers in einem „reversen“ Blot durchgeführt.

2.5.7.3 Nachweis von immobilisierten Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

Färbelösung

Natriumacetat pH 5,2	0,5 M
Methylenblau	0,004 % (w/v)

Die Membranen mit den fixierten Nukleinsäuren (30 min, 80°C) wurden 10 min in 5 % Essigsäure inkubiert. Nach einer Inkubation von 5 bis 10 min Dauer in der Färbelösung wurde die Membran mehrmals mit Wasser gespült bis die angefärbten Nukleinsäuren auf der Membran deutlich sichtbar wurden. Die angefärbten Membranen wurden mit einer Videodokumentationsanlage (MultiImage™ Light Cabinet, Alpha Innotech Corporation über Biozym, Hess. Oldendorf) abgebildet.

2.5.7.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen

Die Auftrennung von Kernproteinen (2.5.5.6) erfolgte durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in einem 14%igen SDS-Polyacrylamidgel nach der Methode von LAEMMLI (1970).

2.5.7.5 Färbung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen

Die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliantblau R250 mit der Methode von KRAUSE (1999) gefärbt. Die Entfärbung des Hinter-

grundes erfolgte durch zweimaliges Aufkochen des Polyacrylamidgels in destilliertem Wasser.

2.5.7.6 Trocknen von Proteingelen

Proteingele wurden zur langfristigen Lagerung zwischen Einmachfolie (Einmach-Fix Zellglas, Folia) getrocknet (KRAUSE 1999).

2.5.7.7 Elektrotransfer von Proteinen auf Membranen („Western-Blot“)

Die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine (2.5.7.4) wurden mit einer „semi-dry“-Elektroblot-Apparatur (BioTec Fisher, Reiskirchen) auf Nitrozellulose (Optitran BA-S 83 Reinforced NC, Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen (HUMBECK *et al.* 1994).

2.5.8 Hybridisierung

2.5.8.1 Hybridisierung von DNA-Membranen

Die Hybridisierung von Membranen, auf denen DNA-Sonden immobilisiert wurden (2.5.7.2), und die sich anschließenden Waschschriffe erfolgten nach den Angaben des Handbuchs der „Hybond™-N⁺“ - positiv geladenen Nylonmembran (Version 2.0, Amersham Pharmacia). In den Hybridisierungs- bzw. Waschlösungen wurde 20 × SSC-Lösung (3 M NaCl, 300 mM tri-Natriumcitrat, pH 7) anstelle der dort angegebenen 20 × SSPE-Lösung verwendet. Die Sonden wurden mit 1×10^6 cpm pro ml Hybridisierungslösung eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 60°C. Die Detektion der Hybridisierungssignale erfolgte wie in 2.5.8.4 beschrieben.

2.5.8.2 Hybridisierung von RNA-Membranen

Dextransulfatpuffer

Dextransulfat	5 % (w/v)
NaCl	0,75 mM
SDS	1 % (v/v)
40 µg / ml denaturierte Heringssperma-DNA	

Die Hybridisierung von Membranen, auf denen RNA-Sonden immobilisiert wurden (2.5.7.2), erfolgte nach KLEBER-JANKE & KRUPINSKA (1997) in Dextransulfatpuffer bei 65 - 68°C über Nacht. Es wurden 500.000 cpm der Sonden pro ml Hybridisierungslösung eingesetzt. Nach der Hybridisierung wurden die Membranen zweimal je 10 min in $2 \times$ SSC, 0.1 % (v/v) SDS, einmal 15 min in $1 \times$ SSC, 0.1 % (v/v) SDS und einmal 10 min in $0,1 \times$ SSC, 0.1 % (v/v) SDS gewaschen. Der erste Waschschrift erfolgte bei Raumtemperatur, alle anderen bei der jeweiligen Hybridisierungstemperatur. Die Detektion der Hybridisierungssignale erfolgte wie in 2.5.8.4 beschrieben.

2.5.8.3 Hybridisierung von DNA-„Dot Blot“-Membranen

20 \times SSPE

NaCl	3,6 M
EDTA	20 mM
Na-Phosphat pH 7,7	200 mM

100 \times Denhardt's Lösung

BSA	2 % (w/v)
Ficoll	2 % (w/v)
Polyvinylpyrrolidon	2 % (w/v)

Hybridisierungslösung

SSPE	5 \times
Denhardt's Lösung	5 \times
SDS	0,5 % (v/v)
40 µg / ml denaturierte Heringssperma-DNA	

Die Hybridisierung der DNA-„Dot Blot“-Membranen mit „Run-on“-Transkripten (2.8) oder radioaktiv markierter cDNA (2.9) erfolgte bei 63°C für ca. 18 h in Röhren im Hybridisierungsofen. Nach vier- bis fünfstündiger Prähybridisierung in der Hybridisierungslösung wurde die

denaturierte Sonde (100°C, 10 min) auf Eis abgekühlt und im Fall von „Run-on“-Transkripten als Sonde komplett oder im Fall von cDNA-Sonden in einer Konzentration von 500.000 cpm pro ml Hybridisierungslösung zugegeben. Nach Beendigung der Hybridisierung wurden die Membranen 10 min in $2 \times$ SSPE, 0.1 % (v/v) SDS bei Raumtemperatur, 15 min in $2 \times$ SSPE, 0.1 % (v/v) SDS bei Hybridisierungstemperatur, und jeweils 10 min bei Hybridisierungstemperatur in $1 \times$ SSPE, 0.1 % (v/v) SDS, in $0,5 \times$ SSPE, 0.1 % (v/v) SDS, in $0,2 \times$ SSPE, 0.1 % (v/v) SDS und in $0,1 \times$ SSPE, 0.1 % (v/v) SDS gewaschen. Die Membranen wurden zwischen Filterpapier kurz abgetrocknet und in Folie eingeschlagen. Die Detektion der Hybridisierungssignale erfolgte wie in 2.5.8.4 beschrieben.

2.5.8.4 Detektion von Hybridisierungssignalen

Die in Folie eingeschlagenen Membranen wurden von außen sorgfältig getrocknet und in einer Autoradiographiekassette mit einer „Imaging Plate“ (IP, Fuji) belegt. Nach einer Exposition von 20 h bei Raumtemperatur wurde die IP in den FLA-5000 BioImager (Fuji) eingelegt und ausgelesen. Der Auslesevorgang erfolgte mit einer Auflösung von 200 μm und einer Farbtiefe von 16 Bit und ermöglichte eine Darstellung der Hybridisierungssignale mit bis zu 65556 Graustufen.

In der Regel wurden die Membranen anschließend in einer Autoradiographiekassette mit ein bis zwei Verstärkerfolien (Trimax Regular 16, Imation, Rochester, NY, USA) bei -80°C auf Röntgenfilm (Hyperfilm MP, Amersham Pharmacia, Braunschweig) für 2 Tage exponiert.

2.5.8.5 Densitometrische Auswertung von Hybridisierungssignalen

Die Auswertung der mit dem FLA-5000 BioImager ausgelesenen Signale, die durch Hybridisierungen von DNA-„Dot blot“-Membranen (2.5.8.4) erhalten wurden, erfolgte densitometrisch mit der Spezialsoftware AIDA Image Analyzer v3.10 (Raytest, Straubenhardt). Die Software quantifizierte und integrierte die Signalintensitäten über vorher definierte Kreisfläche von $22,6 \text{ mm}^2$ über den Hybridisierungssignalen und gab sie als numerischen Wert aus. Diese wurden in Microsoft EXCEL™ weiter bearbeitet.

2.5.8.6 Durchführung einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA)

Mit den Daten aus den Untersuchungen zur Genexpression während der dunkelinduzierten Seneszenz von Gerstenprimärblättern wurde analog zu SASAKI *et al.* (2001) eine Varianzanalyse durchgeführt. Es wurde eine „single classification anova“ mit ungleicher Probengröße nach SOKAL & ROHLF (1995) (siehe Anhang) auf die Ergebnisse angewendet, indem die Daten in Microsoft EXCEL™ mit der Analysefunktion „Einfaktorielle Varianzanalyse“ und einem Signifikanzfaktor von 0,05 untersucht wurden.

2.5.8.7 Entfernung von hybridisierten Sonden von Membranen

Die gebundenen Sonden wurden von den hybridisierten Nylonmembranen in Anlehnung an die Angaben des Membranherstellers (Hybond N⁺, Amersham Pharmacia) entfernt. Abweichend von diesen Angaben wurde 0,1 % (v/v) SDS statt 0,5 % (v/v) SDS verwendet und der Vorgang einmal wiederholt.

2.5.8.8 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen durch „ECL“

Die Immundekoration von membranfixierten Proteinen (2.5.7.7) mit spezifischen Antikörpern erfolgte mit dem „Enhanced chemiluminescence“ (ECL)-System wie in HUMBECK *et al.* (1994) beschrieben. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2.5.8.8 angegeben.

Tabelle 2.5.8.8: Übersicht über die verwendeten Antikörper. Die Verdünnungen erfolgten in 1 × TBST-Puffer (¹ Cell Signaling Technology™ über New England Biolabs, Frankfurt / Main, ² von H. OUGHAM, Wales, bezogen, ³ MÖGELSVANG & SIMPSON 1998).

<i>Antiserum gegen</i>	<i>Zielorganell</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Herstellung</i>	<i>Referenz</i>
Histone H2A, H2B, H3 und H4 (Ac-K-103)	Kern (acetyliertes Lysin)	1:1000	synthetisches Peptid, Maus, monoklonal	1
LSU (Deutsches Weidelgras)	Chloroplast (große UE der Rubisco)	1:1000	Kaninchen, polyklonal	2
Calreticulin (CRH1 35) (Gerste)	Endoplasmatisches Retikulum (Lumen)	1:1000	Kaninchen, polyklonal	3

2.6 Nichtradioaktives Durchmusteren von Genbibliotheken

2.6.1 Titerbestimmung von Phagenbibliotheken

Vor der Durchmusterung wurde der Titer der Phagenbibliothek nach den Angaben im Handbuch des „ZAP-cDNA[®] Synthesis Kit“ (Stratagene) bestimmt. Der Titer hat die Dimension [pfu / ml] und wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der Plaques} \times \text{Verdünnung} \times 1000}{\text{ausplattierte Menge (10 } \mu\text{l)}} = [\text{pfu / ml}]$$

2.6.2 Plattierung der Bakterien und Infektion mit Bakteriophagen

Die Behandlung der Bakterien und ihre Infektion mit 20.000 bis 30.000 pfu der Phagenbibliothek erfolgte nach den Angaben im Handbuch des „ZAP-cDNA[®] Synthesis Kit“ (Stratagene) und in Anlehnung an HAUSSÜHL (1999).

2.6.3 Transfer der Phagen-Plaques auf Nylonmembranen

Auf den Agarplatten waren nach 12 – 16 h Inkubation bei 30°C durch die Bakteriophagen verursachte Infektionsereignisse als Löcher im Bakterienrasen („Plaques“) sichtbar. Von den Platten wurden zwei Negative hergestellt, indem die DNA der Phagen auf Nylonmembran (Hybond N⁺, Amersham Pharmacia) übertragen wurde („Plaque lifts“). Dies geschah nach den Angaben von HAUSSÜHL (1999) und dem „DIG System User’s Guide for Filter Hybridization“ (Roche). Von der Vorschrift abweichend wurde beim Transfer der Phagen-DNA auf die Nylonmembran die erste Membran 1 min und die zweite Membran 3 min auf den Agarplatten belassen.

2.6.4 Hybridisierung der Plattenabzüge

Die Abzüge der Agarplatten mit den Phagen-Plaques (2.6.3) wurden mit der DIG-markierten HvSF27-Sonde (2.5.5.5) bei 68°C über Nacht hybridisiert. Die Hybridisierung, das anschließende Waschen der Membranen sowie der colorimetrische Nachweis der hybridisierten Sonde auf den Membranen erfolgte nach den Angaben im „DIG System User’s Guide for Filter Hybridization“ (Roche).

2.6.5 Identifizierung und Isolierung von spezifischen Phagen-Plaques

Die Ergebnisse der Hybridisierung mit der DIG-markierten HvSF27-Sonde (2.6.4) wurden auf durchsichtige Folien übertragen. Mit Hilfe dieser Schablonen und den Markierungen auf der zugehörigen Platte wurden die zugehörigen „Phagen-Plaques“ identifiziert und aus dem Agar ausgeschnitten. Die Behandlung der isolierten Phagen und die Durchführung zweier Wiederholungen des Durchmusterens der Genbibliotheken erfolgte wie bei HAUSSÜHL (1999) beschrieben.

2.6.6 „In vivo“-Exzision mit dem „ExAssist“ Helferphagen

Aus den isolierten Phagen der λ -ZAP II-cDNA-Bank „C“ wurde das klonierte DNA-Insert mit einem „ExAssistTM“-Helferphagen nach Angaben des „ZAP-cDNA[®] Synthesis Kit“ (Stratagene) herausgetrennt und lag dann von pBluescript SK⁻ - Sequenzen flankiert in Phagemiden in *Escherichia coli*-Bakterien des Stammes SOLR (Stratagene) vor. Nach Wachstum auf LB-Agarplatten in Gegenwart von Ampicillin wurde aus diesen die Plasmid-DNA isoliert (2.5.1).

2.6.7 λ -DNA-Präparation aus Plattenlysaten

SM-Puffer

Tris/HCl pH 7,4	50 mM
NaCl	0,1 M
MgSO ₄	8 mM
Gelatine	0,01 % (v/v)

PEG 8000 / NaCl

PEG 8000	30 % (w/v)
NaCl	1,5 M

Phagenpuffer

Tris/HCl pH 7,4	20 mM
NaCl	100 mM
MgSO ₄	10 mM

Um die λ -DNA aus Phagen der „Lambda FIX[®] II Custom Genomic Library“ zu isolieren, wurden die Platten aus 2.6.2 nach konfluenter Lyse mit 15 ml SM-Puffer überschichtet und 60 min auf einem Schüttler leicht bewegt. Die Lösung wurde in 50 ml - Reaktionsgefäße überführt und mit 4 ml SM-Puffer nachgespült. Nach einer Zentrifugation (3500 UpM, 10 min, 4°C) wurden dem Überstand pro ml 10 μ g RNase A und 2 μ g DNase I zugegeben und dieser eine Stunde bei 37°C inkubiert. Es schloß sich eine einstündige Inkubation auf Eis nach Zugabe von 0,33 Vol PEG 8000 / NaCl an, bevor der Ansatz 30 min mit 8000 UpM bei 4°C zentrifugiert wurde. Das Sediment wurde in 10 ml Phagenpuffer je 100 ml Ausgangsmenge aufgenommen und erneut 2 min mit 8000 UpM bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und nach Zugabe von 50 μ l 20 % (v/v) SDS und 100 μ l 0,5 M EDTA pH 8 pro ml Überstand 15 min bei 68°C inkubiert. Aus dieser Lösung wurde die λ -DNA mit einer Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol-Extraktion, gefolgt von einer einmaligen Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und mit 1 Vol. Isopropanol aus der wäßrigen Phase gefällt. Die gewaschene und getrocknete λ -DNA wurde in TE-Puffer pH 8 (200 μ l / ml SM-Puffer, der für die Plattenabschwemmung verwendet wurde) aufgenommen und bei 4°C gelagert. Die Konzentration der λ -DNA wurde in einem 0,7 % - Agarosegel (2.5.7.1) mit λ -DNA (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) als Größenmarker (ca. 48 kBb) bestimmt.

2.6.8 λ -DNA-Präparation aus Flüssiglysaten

Phagenpuffer		PEG 8000 / NaCl	
Tris/HCl pH 7,4	20 mM	PEG 8000	30 % (w/v)
NaCl	100 mM	NaCl	3 M
MgSO ₄	10 mM		

In einem anderen Ansatz zur Isolierung von λ -DNA aus Phagen der „Lambda FIX[®] II Custom Genomic Library“ wurde in 5 ml LB-Medium (2.5.1) mit 50 mM MgSO₄ und 0,2 % (w/v) Maltose ausgehend von einer Kolonie XL1-Blue MRA (Stratagene) über Nacht bei 37°C eine Vorkultur angezogen. 400 μ l Phagenaufschwemmung (2.6.5) wurden mit 1000 μ l der Vorkultur 20 min bei 37°C inkubiert und zu 100 ml LB gegeben, das auf 37°C vorgewärmt und mit 20 mM MgSO₄ versehen wurde, und schließlich kräftig schüttelnd bei 37°C bis zur Lyse inkubiert. Nach 4 – 6 h trat die Lyse der Bakterienkultur ein, es wurden 2 % (v/v) Chloroform zugeben und weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Umfüllen in 50 ml - Reaktionsgefäße wurde die DNA 15 min bei Raumtemperatur mit 8000 UpM sedimentiert.

Zum Überstand wurden RNase A (Endkonzentration 10 μ g / ml) und DNase I (Endkonzentration 20 μ g / ml) zugegeben und der Ansatz 30 - 60 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 Vol. PEG8000 / NaCl wurde der Ansatz durchmischt und mindestens 1 h auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (30 min, 8000 UpM und 4°C) wurde der Überstand sorgfältig entfernt und das Sediment in 5 ml Phagenpuffer aufgenommen. Nach Zugabe von 0,4 % (v/v) SDS und 10 mM EDTA wurde der Ansatz gründlich durchmischt, 20 min bei 70°C im Wasserbad inkubiert und dann auf Eis abgekühlt. Aus der Suspension wurden Proteine durch 15 min Inkubation mit 15 mg Proteinase K bei 37°C entfernt und dann die Nukleinsäuren durch zweimalige Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isopropylalkohol, gefolgt von einer Fällung mit 0,8 Vol. Isopropanol gewonnen. Die sedimentierten Nukleinsäuren wurden sorgfältig gewaschen (2.5.5.3) und nach Trocknung in einer geringen Menge TE-Puffer pH 8 aufgenommen. Die Konzentration der λ -DNA wurde in einem 0,7 % - Agarosegel (2.5.7.1) mit λ -DNA (MBI Fermentas) als Größenmarker (ca. 48 kbb) bestimmt.

2.6.9 Charakterisierung der HvSF27-spezifischen Sequenzen

Die aus der λ -ZAP II-cDNA-Bank „C“ und der Lambda FIX[®] II Genbank isolierten DNA-Fragmente (2.6.6 bzw. 2.6.7 und 2.6.8) wurden durch Restriktionsendonukleasen aus dem Plasmidvektor geschnitten (2.5.2), mit Restriktionsendonukleasen in kleinere Fragmente zerlegt, in Agarosegelen aufgetrennt (2.5.7.1) und auf Nylonmembranen übertragen (2.5.7.2). Die Nylonmembranen wurden mit der DIG-markierten HvSF27-Sonde (2.5.5.5) nach Angaben des „DIG System User’s Guide for Filter Hybridization“ (Roche) hybridisiert, um spezifische Fragmente durch einen colorimetrischen Nachweis mit NBT und BCIP zu identifizieren. Spezifische Fragmente wurden sequenziert (2.5.4) und mit Hilfe der Software DNasis for Windows v2.5 (Hitachi Software Engineering) mit der Sequenz des HvSF27 verglichen.

2.7 Isolierung transkriptionsaktiver Kerne aus Blattmaterial

Transkriptionsaktive Kerne wurden aus schockgefrorenen Primärblättern von Gerstenpflanzen aus der Klimakammer (2.2.1) oder aus Fahnenblättern von Gerstenpflanzen aus dem Freiland (2.2.2) isoliert.

2.7.1 Kernisolierung nach COX & GOLDBERG (1988)

Die Zellkerne werden in einem isoosmotischen Puffer unter Verwendung des nichtionischen Detergenz Triton X-100 isoliert. Der Puffer ist so optimiert, daß Schäden an den Kernen während der Isolierung minimiert und andere Zellorganellen zerstört werden. Nach der Lyse der Zellen werden die Zellbestandteile mit geringer Geschwindigkeit zentrifugiert und anschließend über einen Percollgradienten aufgetrennt. Die Kerne sammeln sich zwischen der 76%igen Percollschicht und dem Saccharosekissen und können dann aus dem Gradienten entnommen werden.

Mit Ausnahme des Spermin wurden alle Lösungen mit DEPC behandelt und autoklaviert.

2.7.1.1 Percolldichtegradient

10⁻⁷ Percoll-Gradientenpuffer

Tris/HCl pH 8,5	250 mM
MgCl ₂	100 mM
DEPC	0,05 %

(autoklavieren)

Zur Trennung und Anreicherung der Kerne aus der Zellsuspension wurde ein diskontinuierlicher Percollgradient in 50 ml - Zentrifugenröhrchen verwendet. Der Gradient bestand aus einem Saccharosekissen und drei aufeinanderfolgenden Schichten von 76 %, 60 % und 40 % Percoll. Die Lösungen für die vier Gradientenschichten wurden anhand der Tabelle 2.7.1.1 angesetzt und über Nacht im Kühllabor gelagert.

Tabelle 2.7.1.1: Pipettierschema für die Lösungen der einzelnen Schichten des Percolldichtegradienten.

% Percoll	<i>Percoll</i> [ml]	<i>3 M Saccharose</i> [ml]	<i>10⁻⁷ Percoll-Gradientenpuffer</i> [ml]	<i>H₂O</i> [ml]	<i>Gesamtvolumen</i> [ml]
40	8	3	2	7	20
60	12	3	2	3	20
76	32	6	4	0	42
0	0	13	2	6	21

Mit einer 5 ml-Pipette wurden von der Saccharosekissenlösung (0 % Percoll) jeweils 4,5 ml in den Zentrifugenröhrchen vorgelegt, die mit 9 ml der 76 %-Percolllösung vorsichtig überschichtet wurden. Von der 60 %-Percolllösung wurden 4,5 ml mit einer Pasteurpipette vorsichtig auf die 76%-Fraktion geschichtet, gefolgt von 4,5 ml der 40 %-Percolllösung. Die geschichteten Gradienten wurden vor Benutzung mindestens 30 min bei 4°C gelagert.

2.7.1.2 Isolierung der Kerne

Honda-Ausgangspuffer (HONDA et al. 1966)

Dextran T40	6,6 % (w/v)
Tris/HCl pH 8,5	33 mM (w/v)
MgCl ₂	6,6 mM (w/v)
Triton X-100	3,3 % (v/v)
Ficoll	3,3 % (w/v)
DEPC	0,05 % (w/v)

(autoklavieren)

Kernwaschpuffer

Tris/HCl pH 8,5	50 mM
MgCl ₂	5 mM
Glyzerin	20 % (v/v)
DEPC	0,05 % (v/v)

(autoklavieren)

Kernresuspensionspuffer

Tris/HCl pH 8,5	50 mM
MgCl ₂	5 mM
Glyzerin	50 % (v/v)
DEPC	0,05 % (v/v)

(autoklavieren)

Honda-Puffer I

Honda-Ausgangspuffer	145 ml
2 M Saccharose	44 ml
200 mM Spermin	1,89 ml
14 M β-Mercaptoethanol	140 µl
H ₂ O	ad 200 ml
DEPC	72,5 µl

(nicht autoklavieren)

Honda-Puffer II

Honda-Ausgangspuffer	73 ml
2 M Saccharose	22 ml
14 M β-Mercaptoethanol	70 µl
H ₂ O	ad 100 ml

20 g Pflanzenmaterial (2.2) wurden in einem vorgekühlten Mörser mit flüssigem Stickstoff zu einem sehr feinen Pulver verrieben. Nach Abdampfen des Stickstoffs wurde das Pflanzenpulver in einem „Waring Industrial Blendor“ überführt, in dem 1 ml Honda-Puffer I / g Pflanzenmaterial vorgelegt wurden (Endkonzentrationen: 5 % Dextran T-40, 25 mM Tris/HCl pH 8,5, 5 mM MgCl₂, 2,5 % Triton X-100, 2,5 % Ficoll, 0,2 M Saccharose, 2 mM Spermin, 10 mM β-Mercaptoethanol). Durch zwei Impulse von ca. 10 s auf der niedrigen Leistungsstufe und zwei Impulsen der gleichen Länge auf der hohen Leistungsstufe wurde die Lösung

homogenisiert und die Suspension anschließend durch zwei Lagen Miracloth (Calbiochem) gefiltert. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurden die beiden Lagen Miracloth durch leichten Druck ausgepreßt. Es folgten weitere Filtrationen durch zwei Lagen Nylonfilter der Maschenweite 60 µm, gefolgt von einer Lage Nylonfilter der Maschenweite 41 µm und abschließend einer Lage Nylonfilter der Maschenweite 20 µm. Die angereicherten Kerne wurden in 50 ml - Reaktionsgefäßen aus dem Filtrat durch Zentrifugation mit 4000×g für 5 Minuten bei 4°C sedimentiert (Eppendorf Centrifuge 5804R mit Rotor F34-6-38). Die Sedimente wurden in wenig Honda-Puffer II (Endkonzentrationen: 5 % Dextran T-40, 25 mM Tris/HCl pH 8,5, 5 mM MgCl₂, 2,5 % Triton X-100, 2,5 % Ficoll, 0,2 M Saccharose, 10 mM β-Mercaptoethanol) aufgenommen und mit dem gleichen Puffer auf 20 ml Volumen aufgefüllt. Gleiche Mengen des resuspendierten Sediments wurden mit einer Pasteurpipette vorsichtig auf vorbereitete Percollgradienten (2.7.1.1) geschichtet. In einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor (Kontron Centrifuge T-124 mit Rotor AS4.13) erfolgte mit 6000 UpM und 4°C eine dreißigminütige Auftrennung der Suspension. Nach Beendigung der Zentrifugation wurde die gelbliche Kernfraktion auf dem Saccharosekissen mit einer Pasteurpipette vorsichtig und möglichst komplett abgenommen und in ein 50 ml - Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 15 - 20 ml Honda-Puffer II wurden vorhandene Aggregate durch vorsichtiges Schwenken gelöst und die Kerne durch fünfminütige Zentrifugation (4000×g, 4°C in einer Eppendorf Centrifuge 5804R mit Rotor F34-6-38) sedimentiert. Der Waschschrift wurde durch Lösen des Sediments in 2 ml Honda-Puffer II und Auffüllen auf 20 ml mit der gleichen Lösung wiederholt. Nach erneuter Zentrifugation (4000×g, 4°C, 5 min; Eppendorf Centrifuge 5804R mit Rotor F34-6-38) wurde das Sediment in 2 ml Kernwaschpuffer / 10 mM β-Mercaptoethanol resuspendiert und mit Kernresuspensionspuffer / 10 mM β-Mercaptoethanol auf 20 ml aufgefüllt. Die anschließend sedimentierten Kerne (4000×g, 4°C, 5 min; Eppendorf Centrifuge 5804R mit Rotor F34-6-38) wurden nach sorgfältigem Entfernen des letzten Waschpuffers in einem geringem Volumen Kernresuspensionspuffer / 10 mM β-Mercaptoethanol aufgenommen und komplett resuspendiert. Diese Kernsuspension wurde in 50 µl - 100 µl-Portionen auf 1,5 ml - Reaktionsgefäße verteilt und mit Ausnahme von 10 µl für die Bestimmung der Kernausbeute (2.7.1.3) bei -80°C-Schrank gelagert oder sofort für „Run-on“-Transkriptionsexperimente (2.8.1) verwendet.

2.7.1.3 Bestimmung der Kernaussbeute

Fixierpuffer (Hondapuffer nach ROYO et al. 1996)

Saccharose	0,44 M
Tris/HCl pH 7,6	25 mM
MgCl ₂	10 mM
Phenylmethylsulfonylfluoride	0,2 mM (v/v)

Das für die Bestimmung der Ausbeute der Kernisolierung vorgesehene Volumen von 10 µl aus der Kernisolierung nach COX & GOLDBERG (1988) (2.7.1.2) wurde in einer Zentrifuge sedimentiert (4000×g, 4°C, 5 min; Eppendorf Centrifuge 5804R mit Rotor F34-6-38) und nach Abnahme des Überstandes in 18 µl Fixierpuffer und 2 µl 25 % Glutardialdehyd aufgenommen und resuspendiert. Nach fünfzehnminütiger Inkubation bei 4°C wurden die Kerne erneut sedimentiert. Das Sediment wurde in 180 µl DEPC-H₂O aufgenommen, mit 20 µl 0,01 % DAPI-Lösung versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Anzahl der gefärbten Kerne in 100 µl der Suspension wurde mit Hilfe einer Thomakammer unter dem Mikroskop (Axiophot, Zeiss) nach Anregung des DAPI-Farbstoffs mit UV-Licht bestimmt. Dazu wurde die Zahl der Kerne in 8 Großfeldern, bestehend aus 4 mal 4 Kleinfeldern mit 0,05 mm Kantenlänge und einer Höhe von 0,1 mm, einzeln ausgezählt. Diese Werte wurden gemittelt und anhand der im folgenden angegebenen Formel konnte die Zahl der Kerne errechnet werden:

$$\frac{\text{Mittelwert der Zählung} \times 10^3 \times 20 (\text{Verdünnungsfaktor})}{4} = \text{Kerne pro } \mu\text{m}^2$$

2.7.2 Kernisolierung nach KANAZAWA et al. (2000)

2.7.2.1 Isolierung der Kerne

Hamilton-Puffer I (HAMILTON et al. 1972)

Saccharose	1,14 M
Tris/HCl pH 7,6	10 mM
MgCl ₂	5 mM
1,10-Phenanthrolin	0,1 mM (v/v)
Phenylmethylsulfonylfluorid	0,1 mM (v/v)
Thiodiglykol	0,1 % (v/v)

Hamilton-Puffer II

wie Hamilton-Puffer I, aber zusätzlich mit	
Triton X-100	0,15 % (v/v)

2 × TP(-NTP)-Puffer		Saccharosekissen	
(NH ₄) ₂ SO ₄	200 mM	Saccharose	3 M
Tris/HCl pH 7,6	20 mM	Tris/HCl pH 7,6	10 mM
MgCl ₂	20 mM	MgCl ₂	5 mM
Thiodiglykol	0,1 % (v/v)		
RNase-Inhibitor	40 u		

Das Thiodiglykol wurde immer frisch zu den Lösungen gegeben.

10 bis 20 g des Pflanzenmaterials aus 2.2 wurden in einem vorgekühlten Mörser mit flüssigem Stickstoff zu einem sehr feinen Pulver verrieben und in Hamilton-Puffer I aufgenommen (4 ml pro g Pflanzenmaterial). Das Pulver wurde durch vorsichtiges Rühren im Puffer aufgetaut und dann durch zwei Lagen Miracloth (Calbiochem) filtriert. In einem 50 ml-Reaktionsgefäße wurden 5 ml Saccharosekissen vorgelegt und mit dem Filtrat überschichtet. Dieser Einstufen-Gradient wurde 15 min bei 4°C und 1800×g zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5804R mit Rotor A-4-44). Mit einer Pipette wurde die Kernfraktion vollständig von dem Saccharosekissen abgenommen, mit 1 Vol. Hamilton-Puffer II vermischt und auf Eis 30 min inkubiert. Die Kerne wurden durch Zentrifugation (1000×g, 10 min, 4°C) sedimentiert und in 100 µl 1 × TP(-NTP)-Puffer aufgenommen. Während 10 µl dieser Suspension für eine Bestimmung der Kernkonzentration pro µl herangezogen wurden (2.7.2.2), wurde der Rest der Suspension bis zur Verwendung im „Run-on“-Ansatz (2.8.2) auf Eis gelagert.

2.7.2.2 Bestimmung der Kernaussbeute

10 µl der Kernresuspension aus der Kernisolierung nach KANAZAWA *et al.* (2000) (2.7.2.1) wurden mit 90 µl 2 × TP(-NTP)-Puffer I (2.7.1.2) versetzt. Nach Zugabe von 2 µl 0,01 % DAPI-Lösung wurde 5 min bei auf Eis inkubiert. Die Auszählung der Kerne mit Hilfe einer Thomakammer unter dem Mikroskop (Axiophot, Zeiss) erfolgte wie unter 2.7.1.3 beschrieben.

2.8 „Run-on“-Transkriptionsexperimente mit isolierten Kernen

Für die „Run-on“-Transkriptionsexperimente wurden zwei verschiedene Protokolle verwendet. Für Hybridisierungen von DNA-„Dot blot“-Membranen mit „Run-on“-Transkripten und beim Einsatz von großen Mengen isolierter Kerne ($> 1-2 \times 10^7$) wurde das Protokoll für Plastriden-„Run-on“-Transkriptionsexperimente von KLEIN & MULLET (1990) und KRUPINSKA (1992) leicht abgeändert. Für Einbaubestimmungen mit einer großen Anzahl von Proben und einer geringen Menge isolierter Kerne wurde das Protokoll nach KANAZAWA *et al.* (2000) verwendet.

2.8.1 „Run-on“-Transkription nach KRAUSE *et al.* (1998)

2 × Transkriptionspuffer		Stoppuffer (DENG <i>et al.</i> 1987)	
HEPES / KOH pH 8	100 mM	Tris/HCl pH 8	5 mM
Kaliumacetat	50 mM	EDTA	25 mM
MgCl ₂	20 mM	Natriumsarcosinat	5 % (w/v)
DTT	20 mM		
Heparin	1 mg / ml		
ATP-Lithiumsalz	250 μM		
GTP-Lithiumsalz	250 μM		
UTP-Lithiumsalz	250 μM		
RNase-Inhibitor	40 u		

Pro Transkriptionsexperiment wurden 2.5×10^7 Kerne aus 2.7.1.2 verwendet, die vorsichtig auf Eis aufgetaut wurden. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation mit $4000 \times g$ bei 4°C wurden die sedimentierten Kerne mit $800 \mu\text{l}$ 50 mM HEPES / KOH pH 8, 330 mM Sorbit gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in $50 \mu\text{l}$ 50 mM HEPES / KOH pH 8, 330 mM Sorbit resuspendiert.

Zur Vorbereitung der „Run-on“-Transkription wurden $100 \mu\text{l}$ 2 × Transkriptionspuffer nach Zugabe von $\sim 500 \mu\text{Ci}$ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-CTP}$ [10 mCi / ml] gut durchmischt und einige Minuten im Heizblock auf 30°C vortemperiert. Diese Lösung wurde komplett zu den Kernen gegeben und nach Durchmischung 45 min bei 30°C inkubiert. Während der Inkubation wurde der Ansatz alle 10 bis 15 min durchmischt. Nach Ende der Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe

von 40 µl Stoppuffer beendet. Der Transkriptionsansatz wurde nach Entnahme von 2 µl des Transkriptionsansatzes für die Bestimmung der Einbaueffizienz (2.8.3) und Zugabe von 100 u RNase-freier DNaseI (Roche) weitere 10 min bei 30°C inkubiert.

Der Ansatz wurde mit 450 µl TRIzol™ versetzt, gut durchmischt und nach Zugabe von weiteren 150 µl TRIzol™ 5 min inkubiert. Nach Durchmischung mit 150 µl Chloroform / Isoamylalkohol (99:1) wurde die Suspension weitere 3 min inkubiert. Die wäßrige Phase wurde durch eine Zentrifugation (15 min, 14000 UpM) von der organischen Phase getrennt, vorsichtig abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß mit 1 Vol. Isopropanol versetzt. Nach zehnmütiger Inkubation wurden die präzipitierten Nukleinsäuren durch Zentrifugation (10 min, 14000 UpM) sedimentiert und mit 1 ml 70 % (v/v, mit DEPC behandeltes Wasser) Ethanol gewaschen. Das getrocknete Sediment wurde in 100 µl Wasser (mit DEPC behandelt) aufgenommen und nach zehnmütiger Denaturierung bei 100°C auf Eis abgekühlt und komplett als Sonde zur Hybridisierung von DNA-„Dot blot“-Membranen (2.5.8.3) verwendet.

2.8.2 „Run-on“-Transkription nach KANAZAWA *et al.* (2000)

2 ⁻ TP(-NTP)-Puffer		TP(+NTP)-Puffer	
(NH ₄) ₂ SO ₄	200 mM	2 × TP(-NTP)-Puffer	70 µl
Tris/HCl pH 7,6	20 mM	ATP-Lithiumsalz	250 µM
MgCl ₂	20 mM	GTP-Lithiumsalz	250 µM
Thiodiglykol	0,1 % (v/v)	UTP-oder CTP-Lithiumsalz	250 µM
RNase-Inhibitor	40 u	H ₂ O (DEPC-behandelt)	ad 100 µl

Die „Run-on“-Transkriptionsexperimente nach KANAZAWA *et al.* (2000) wurden mit 1×10^6 Kernen pro Ansatz durchgeführt.

Die Kernsuspension aus Kapitel 2.7.2.1 wurde in Portionen von je 1×10^6 Kernen auf Reaktionsgefäße verteilt und mit 1000×g bei 4°C für 5 min sedimentiert. Das Sediment wurde vorsichtig in TP(+NTP)-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von ~ 10 µCi α-³²P-CTP oder α-³²P-UTP [10 mCi / ml] und sorgfältigem Durchmischen wurde die Reaktion 30 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Überführung des Reaktionsansatzes auf Eis gestoppt. Für die Bestimmung der Einbaueffizienz (2.8.3) wurden dem Reaktionsansatz 6 µl entnommen.

2.8.3 Bestimmung der Einbaueffizienz

Die Transkriptionsrate isolierter Kerne (2.8.1 oder 2.8.2) und die Effizienz der cDNA-Synthese (2.9) wurde über den prozentualen Einbau der Radioaktivität in die neu synthetisierten Nukleinsäure in Relation zur Gesamtaktivität ermittelt. Dies erfolgte durch Anwendung der Methode von KRUPINSKA & FALK (1994), die eine modifizierte Version des Protokolls von HALLICK *et al.* (1976) darstellt.

Für die Bestimmung wurden DE81-Rundfilter (Whatman, 2,3 cm Durchmesser) verwendet, auf die 2 bzw. 6 µl des Reaktionsansatzes pipettiert wurden. Die Radioaktivität auf den Filterstücken wurde in 2,5 ml Rotiszint22-Scintillationscocktail in einem Scintillationszähler (WinSpectral™ 1414 Liquid Scintillation Counter von Wallac) bestimmt. Die Bestimmung des Einbaus erfolgte über die Formel:

$$\left(\frac{cpm_{nachdemWaschen}}{cpm_{vor demWaschen} \times 3} \right) \times 100 = \text{Aktivität} [\%]$$

2.8.4 Versuche zur Charakterisierung der Transkriptionsaktivität isolierter Kerne

Die Transkriptionsaktivität der RNA-Polymerasen in den isolierten Zellkerne wurde in verschiedenen „Run-on“-Transkriptionsexperimenten im Beisein von radioaktiv markiertem α-³²P-CTP genauer charakterisiert.

Tabelle 2.8.4: Behandlung der Kernfraktion vor oder nach der „Run-on“-Transkription mit einem Radionukleotid zur Ermittlung der Transkriptionsaktivität isolierter Kerne.

<i>Behandlung der Kerne</i>	<i>Dauer</i>	<i>vor der Transkription</i>	<i>nach der Transkription</i>
α-Amanitin	2,5 min RT, 3 min Eis, 30 min 30°C	ja	nein
Rifampicin	2,5 min RT, 3 min Eis, 30 min 30°C	ja	nein
Streptolydigin	2,5 min RT, 3 min Eis, 30 min 30°C	ja	nein
Hitzenaturierung	10 min 95°C	ja	nein
Kälteschock	kurz in flüssigem Stickstoff	ja	nein
20 µg RNase A	10 min 30°C	nein	ja
20 u DNase I	10 min 30°C	ja	ja
8 µg Proteinase K	10 min 30°C	ja	ja

Erste Versuche zur Bestimmung der Transkriptionsaktivität durch „Run-on“-Transkriptionsexperimente erfolgten bei 30°C für 30 min an 5×10^6 Kernen. Dabei wurde die Kernfraktion vor oder nach dem eigentlichen „Run-on“-Transkriptionsexperiment (2.8.1) unterschiedlichen Behandlungen unterzogen (Tabelle 2.8.4) und der Einfluß der Behandlung auf die Transkriptionsaktivität bestimmt.

2.8.5 Einfluß von Hemmstoffen auf die Transkription

Für den Einsatz von Transkriptioninhibitoren wurden Kerne in $5 \mu\text{l}$ $2 \times$ Transkriptionspuffer (2.8.1) aufgenommen und der Ansatz nach Zugabe von $100 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ Hemmstoff mit Wasser auf $10 \mu\text{l}$ aufgefüllt. Nach einer Vorinkubation auf Eis (2 min) wurde der Transkriptionsansatz nach den Angaben aus 2.8.2 vervollständigt und 30 min bei 30°C inkubiert. Die Bestimmung der Einbaueffizienz erfolgte wie in 2.8.3 beschrieben.

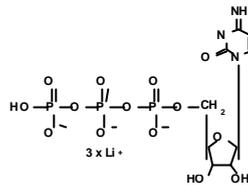
Zum Einsatz kamen Hemmstofflösungen von α -Amanitin [0,1 mg / ml] (Roche), Rifampicin [30 mg / ml] (Merck) und Streptolydigin [0,36 ml / ml in Methanol] (Upjohn, Kalamazoo, MI, USA).

2.8.6 „Run-on“-Transkription mit nichtradioaktiv markierten Nukleotiden

Transkriptionsaktive Kerne (2.7.1 und 2.7.2) wurden in kleinen Reaktionsansätzen für verschiedene „Run-ons“ verwendet, mit denen Alternativen zur radioaktiven Markierung getestet wurden. Pro Ansatz wurden $1 - 2,5 \times 10^6$ Kerne in einem Gesamtansatz von $20 \mu\text{l}$ (1/10 des Normalansatzes) bei einer „Run-on“-Reaktion nach KRAUSE *et al.* (1998) (2.8.1) und bis $50 \mu\text{l}$ bei einer „Run-on“-Reaktion nach KANAZAWA *et al.* (2000) (2.8.2) verwendet. Soweit nicht anders angegeben, wurden jeweils drei Parallelansätze durchgeführt.

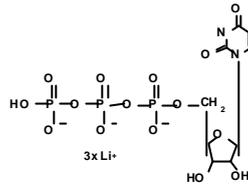
In diesen „Run-on“-Transkriptionsexperimenten wurde die Transkriptionsaktivität in Anwesenheit von diversen Nukleotiden mit unterschiedlicher nichtradioaktiver Markierung (Tabelle 2.8.6, Abbildung 2.8.6.1 und 2.8.6.2) getestet. Es wurden für diese Versuche ausschließlich markierte Cytosin - und Uridintriphosphate verwendet (Abbildung 2.8.6.1 und 2.8.6.2). Die

A. Referenznukleotide



MG 484,2

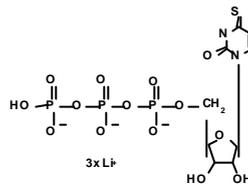
Cytosin-5'-triphosphat



MG 484,2

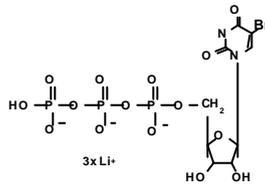
Uridin-5'-triphosphat

B. Substitution eines Atoms in der Base des Nukleotids



MG 500,2

4-Thiouridin-5'-triphosphat(sUTP)



MG 519,2

5-Bromo-Uridin-5'-triphosphat

Abbildung 2.8.6.1: Chemische Struktur und Molekulargewicht (MG) der verwendeten Nukleotide. A) Cytosin-, bzw. Uridin-5'-triphosphat als Referenznukleotid, B) Nukleotide mit einer Markierung, die durch eine Substitution in der Seitenkette der Base entstanden ist. Die Größe der Kreise repräsentiert das Molekulargewichte der Nukleotide in Relation zu den Referenznukleotiden.

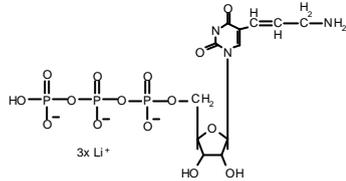
Markierungen unterschieden sich in Größe und Struktur deutlich. Teilweise waren die Nukleotide durch Substitution eines Atoms in der Base markiert (Abbildung 2.8.6.1), in den anderen Fällen war eine Seitenkette der Base mit einer komplexen Struktur substituiert (Abbildung 2.8.6.2).

C. Substitution der Seitenkette der Base des Nukleotids

Cytosin- oder Uridin-5'-triphosphat

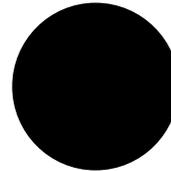
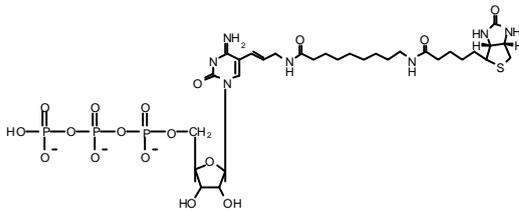


MG 484,2



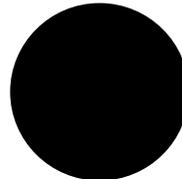
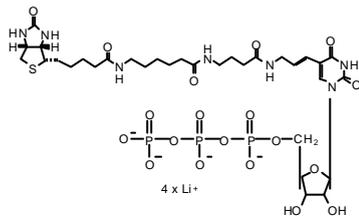
MG 539,2

Aminoallyluridin-5'-triphosphat



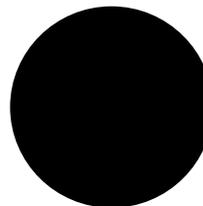
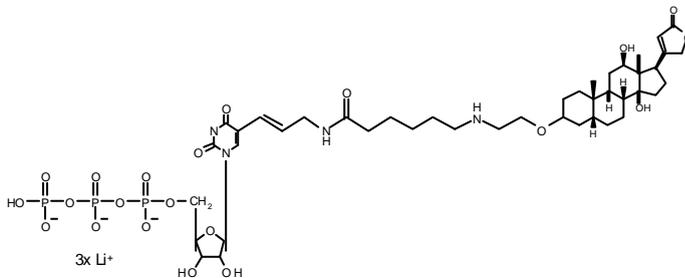
MG 922

Biotin-14-Cytosin-5'-triphosphat



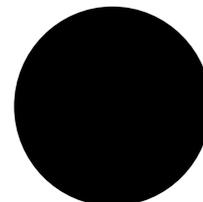
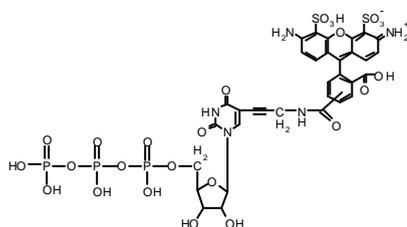
MG 987,5

Biotin-16-Uridin-5'-triphosphat



MG 1106,7

Digoxigenin-11-Uridin-5'-triphosphat



MG ~1090

ChromaTide™ Alexa Fluor® 488-5-Uridin-5'-triphosphat

Abbildung 2.8.6.2: Chemische Struktur und Molekulargewicht (MG) der Nukleotide mit einer Substitution an der Seitenkette der Base. Als Referenzen sind Cytosin-, bzw. Uridin-5'-triphosphat eingerahmt bzw. als weißer Kreis dargestellt. Die Größe der Kreise repräsentiert das Molekulargewichte der Nukleotide in Relation zu den Referenznukleotiden.

Tabelle 2.8.6: Liste der verwendeten nichtradioaktiv markierten Nukleotide und ihrer Hersteller.

<i>Nukleotid</i>	<i>Hersteller</i>
4-thio-Uridintriphosphat (sUTP)	Eigensynthese (2.8.6.1)
5-Bromouridin-5'-triphosphat	
Aminoallyl-Uridin-5'-triphosphat	Sigma
Biotin-14-Cytosin-5'-triphosphat	Invitrogen
Biotin-16-Uridin-5'-triphosphat	Roche
ChromaTide Alexa Fluor™ 488-5-Uridin-5'-triphosphat	Molecular Probes
Digoxygenin-11-Uridin-5'-triphosphat	Roche

Diese Tests wurden als Doppelmarkierung durch Kombination zweier markierter Nukleotide durchgeführt, von denen eines die zu untersuchende nichtradioaktive Markierung und das andere eine Markierung mit radioaktiven Phosphor trug. Enthielt das Cytosintriphosphat die nichtradioaktive Markierung, wurde für die Parallelmarkierung radioaktiv markiertes Uridintriphosphat gewählt und umgekehrt. Die Parallelmarkierung mit dem radioaktiv markierten Nukleotid diente der Bestimmung der Einbaueffizienz des nichtradioaktiv markierten Nukleotids in die neu synthetisierte RNA, da über den Einbau der Radioaktivität Rückschlüsse auf den Einbau des nichtradioaktiv markierten Nukleotids gezogen wurden (2.8.6.2).

2.8.6.1 Synthese von 4-thio-Uridintriphosphat

Das Nukleotid 4-thio-Uridintriphosphat (sUTP) wurde nach der von FALK (1994) beschriebenen Methode, die auf STADE *et al.* (1989) beruht, aus sUDP durch enzymatische Phosphorylierung selbst hergestellt. Die Konzentration der synthetisierten sUTP-Lösung betrug 10 mM.

2.8.6.2 Bestimmung der Einbaueffizienz

Proteolysepuffer

NH ₄ (CO ₃) ₂	0,1 M
SDS	1 % (v/v)

Die Effizienz des Einbaus von radioaktiv markierten Nukleotiden in 1×10^6 Kernen in kleinen Reaktionsansätzen (2.8.6) wurde analog zu 2.8.3 ermittelt. Nach Beendigung der „Run-on“-Transkription (30 min, 30°C) und vor der Präparation der DE81-Filterstücke wurden 2,5 Vol. Proteolysepuffer zu den Ansätzen gegeben, diese durchmischt und 5 min bei 95°C inkubiert. Nachdem die Ansätze auf Eis abgekühlt waren, wurden jeweils 10 µg Proteinase K (Merck) zugegeben und die Ansätze 60 min bei 37°C inkubiert. Durch diese Behandlung wurden Proteine abgebaut und die Viskosität der Reaktionsansätze herabgesetzt. Abschließend wurden DE81-Filter mit dem Reaktionsansatz präpariert (2.8.3) und die Einbaueffizienz bestimmt.

2.9 cDNA-Synthese

Zur Bestimmung der relativen Menge an spezifischen Transkripten in der Gesamtpopulation von Ribonukleinsäuren wurden diese mit Hilfe von Oligo-(dT)-Nukleotiden in cDNA umgeschrieben. Bei der reversen Transkription wurde der Reversen Transkriptase ein radioaktiv markiertes Nukleotid in einem „pulse chase“-Verfahren angeboten, so daß die gebildete cDNA radioaktiv markiert wurde.

dNTP-Mix (-dCTP)

dATP-Natriumsalz	10 mM
dGTP-Natriumsalz	10 mM
dTTP-Natriumsalz	10 mM

dNTP-Mix

dATP-Natriumsalz	10 mM
dCTP-Natriumsalz	10 mM
dGTP-Natriumsalz	10 mM
dTTP-Natriumsalz	10 mM

„Mastermix“

First-Strand buffer	2 ×
MgCl ₂	10 mM
DTT	20 mM
RNase Inhibitor	5 u

RT-Reaktionsansatz

RNA (aus 2.5.5.2)	20 µg
Not I – (dT) ₁₇	0,05 µg
dNTP-Mix (-dCTP)	1 mM
α- ³² P-dCTP [10mCi/ml]	40 µCi

Der RT-Reaktionsansatz wurde im Heizblock bei 65°C 5 min denaturiert und dann für mindestens eine Minute auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe des auf 42°C vortemperierten „Mastermix“ wurde der Ansatz kurz zentrifugiert und bei 42°C 2 min inkubiert. Nach Zugabe von 800 u

Superscript™ II RNase H Reverse Transcriptase (Invitrogen) wurde die Reaktion 10 min und nach anschließender Zugabe von 1 mM dNTP-Mix weitere 40 min bei 42°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch zehnmütiges Erwärmen auf 70°C inaktiviert und der Ansatz danach auf Eis gekühlt. Nach Entnahme von 2 µl für die Bestimmung der Menge eingebauter Nukleotide (2.8.3) wurden aus dem restlichen Ansatz das RNA-Template mit 8 u RNase H (Invitrogen) entfernt (37°C, 20 min) und über eine „MicroSpin™ G-25 Column“ (Amersham Pharmacia) die RNA-Abbauprodukte und nicht eingebaute Nukleotide nach Angaben des Herstellers abgetrennt. Die Hybridisierung der DNA-„Dot blot“-Membranen mit der radioaktiv markieren cDNA erfolgte wie in 2.5.8.3 beschrieben.

3. Ergebnisse

3.1 Seneszenzassoziierte cDNA-Klone der Gerste

In verschiedenen Untersuchungen zur Seneszenz von Primär- und Fahnenblättern der Gerste wurde eine größere Anzahl von verschiedenen Genfragmenten isoliert, die Transkripte repräsentieren, deren Anteil an der Gesamt-RNA während der dunkelinduzierten Seneszenz der Primärblätter (HvSD-Gene) oder während der Seneszenz des Fahnenblatts im Freiland (HvSF-Gene) zunimmt.

3.1.1 HvSD-cDNA-Klone

Die HvSD-Klone (*Hordeum vulgare* Seneszenz dunkel) wurden von KLEBER-JANKE (1996) aus Primärblättern der Gerste isoliert, die nach Dunkelinkubation seneszierten. Dazu gehören neun Klone, deren Transkriptgehalt im Verlauf der dunkelinduzierten Seneszenz jeweils zunimmt, zwei Klone, deren Transkripte vor und nach der Dunkelinkubation akkumulieren und ein weiterer Klon, dessen Transkript nach der Dunkelinkubation akkumuliert (Tabelle 3.1.1.1).

Tabelle 3.1.1.1: Mit der „Differential Display Reverse Transcription PCR“ (DDRT-PCR) - Technik in Primärblättern der Gerste identifizierte HvSD-cDNA-Klone. Die mit einem Sternchen gekennzeichneten Klone wurden zusätzlich für die Durchmusterung einer cDNA-Bank verwendet (Tabelle verändert nach KLEBER-JANKE 1996).

<i>Transkriptakkumulation</i>	<i>Nummer der HvSD-cDNA</i>
während der zweitägigen Dunkelinkubation	1 [*] , 5, 8 [*] , 10 [*] , 11, 15, 26 [*] , 36 [*] , 37
vor und nach der Dunkelinkubation	21, 22
nur nach der Dunkelinkubation	34

Da cDNA-Klone, die durch DDRT-PCR isoliert werden, sehr kurz sind, wurden fünf der cDNA-Klone (mit Sternchen gekennzeichnet) von KLEBER-JANKE (1996) als Sonde für ein „Plaque-Screening“ einer cDNA-Bibliothek seneszenten Fahnenblätter eingesetzt und damit längere cDNA-Fragmente erhalten (Tabelle 3.1.1.2).

Tabelle 3.1.1.2: Angaben aus KLEBER-JANKE (1996) zur Länge der DDRT-PCR-Fragmente bzw. der spezifischen cDNA-Fragmente der HvSD-Klone aus der cDNA-Bank (n. d. = nicht durchgeführt).

<i>HvSD</i>	<i>Länge des DDRT-PCR-Fragments [Bp]</i>	<i>Länge der spezifischen cDNA aus der cDNA-Bank [Bp]</i>
1	382	750
5	342	n. d.
8	256	950
10	169	550
11	88	n. d.
15	124	n. d.
26	210	2000
36	240	800
37	120	n. d.
21	400	n. d.
22	330	n. d.
34	153	n. d.

Durch Datenbankrecherchen konnten für die cDNA HvSD21 hohe Homologien zur kleinen Untereinheit der Rubisco, für die cDNA HvSD10 hohe Homologien zu einem Proteinaseinhibitor und für die cDNA HvSD36 hohe Homologien zu einer 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (KLEBER-JANKE 1996) gefunden werden.

3.1.2 Neue Ergebnisse zu den HvSD-cDNA-Klonen

Die HvSD-Klone 1, 5, 8, 11, 15, 22, 26, 34 und 37 wurden erneut für die Suche nach homologen Sequenzen in verschiedenen Datenbanken verwendet. Im ersten Schritt wurden in einer Gersten-EST-Datenbank (IPK, Gatersleben) homologe Sequenzen gesucht. Diese wurden dann für die Suche nach homologen Sequenzen in einer allgemeinen Nukleotid-Datenbank („Genebank“, NCBI) verwendet (Tabelle 3.1.2).

Für die cDNAs HvSD5 und HvSD15 konnten keine homologen Sequenzen in der Gersten-EST-Datenbank gefunden werden.

Die Suche nach EST-Sequenzen der Gerste mit der cDNA HvSD1 als Sonde ergab acht homologe EST-Sequenzen. Bei Verwendung der Sequenzen mit der höchsten Homologie als

Sonde in einer allgemeinen Nukleotid-Datenbank wurden Homologien zu vielen genomischen Sequenzen aus unterschiedlichen Organismen gefunden. Die Homologien erstrecken sich jedoch nur über sehr kurze Bereiche von ca. 20 Bp. Die Sequenzen kodieren für Proteine unbekannter Funktion.

Table 3.1.2: Homologe Sequenzen zu den untersuchten HvSD-Klonen und mögliche dadurch kodierte Proteine. Von den EST-Sequenzen der Gerste mit der höchsten Homologie und den homologen Sequenzen aus der „Genebank“ ist jeweils die „accession number“ angegeben.

HvSD	homologe Gersten-EST	homologe Sequenz aus „Genebank“	kodiertes Protein
1	8 Sequenzen	chromosomale DNA	unbekannt
5	Keine	-	-
8	310 Sequenzen, u.a. BE602811 und BE454679	u.a. AF428267 (<i>Chlamydomonas r.</i>), X13303 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	„iron-sulfur cluster assembly protein“, „nif gene cluster“
11	208 Sequenzen, u.a. HW04O16u und HW02C02u	u.a. U55873 und D88378 (beide <i>Oryza sativa</i>), bzw. AJ243091 (<i>Brassica napus</i>)	Asparaginsynthase bzw. β-Oxyacyl-[Acyl-Carrier Protein]-Reduktase
15	Keine	-	-
22	HY06016u	u.a. Y10149 bzw. Y17276 (p69b) und Y17277 (p69c) (Tomate)	subtilisinähnliche Prozessie- rungsprotease
26	116 Sequenzen, u.a. BE517227 und BE213516	u.a. L41869 und AF022725 (beide Gerste)	β-Glukosidase und Dextrinase
34	7 Sequenzen, u.a. BF255507 und BF619808	u.a. U76261 und AF254799 (Gerste)	hochrepetitive, retrotranspo- sonähnliche Sequenz, bzw. „tonoplast intrinsic protein“ (TIP1 und 2 bzw. Rar1)
37	3 Sequenzen, u.a. BE421409	viele Vektorsequenzen in einem kurzen Sequenzbereich	-

Zur HvSD8-Sequenz gab es eine sehr große Zahl homologer EST-Sequenzen in der Gersten-EST-Datenbank. Die beiden ESTs mit der größten Homologie zeigten in einer Nukleotid-Datenbank Homologien zu Proteinen mit Eisen-Schwefel-„Clustern“ aus *Chlamydomonas reinhardtii* (82 % über 138 Bp und 83 % über 89Bp) und *Klebsiella pneumoniae* (91 % über 45 Bp), zu denen die verschiedenen *nif*-Gene gehören.

Der cDNA-Klon HvSD10 wurde von VAN DER KOOIJ *et al.* (2002) weiter charakterisiert und kodiert für einen Proteinaseinhibitor der Chymotrypsin/Trypsin Familie I.

Die Suche mit der HvSD11-Sequenz lieferte eine sehr hohe Anzahl homologer EST-Sequenzen, von denen die beiden mit der höchsten Homologie für die Suche in einer Nukleotid-Datenbank verwendet wurden. Die Suche ergab Homologien zu einer Sequenz aus Reis, die für eine Asparaginsynthase (SASAKI *et al.* 1994) kodiert (82 % über 110 Bp), und zu einer Sequenz aus Raps, die für eine „ β -Oxyacyl-[Acyl-Carrier Protein]-Reduktase“ (*gbkr1*-Gen) kodiert (82 % über 80 Bp).

Für die cDNA HvSF22 konnte nur eine homologe EST-Sequenz identifiziert werden, zu der in der Nukleotid-Datenbank u. a. drei homologe Sequenzen aus der Tomate existieren. Diese zeigen eine hundertprozentige Homologie über einen sehr kurzen Bereich von 20 Bp zu der Gensequenz einer subtilisinähnlichen Prozessierungsprotease (TORNERO *et al.* 1997) bzw. zu der Sequenz zweier Mitglieder (p69b und p69c) eines Genclusters mit vier subtilisinähnlichen Prozessierungsproteasen (JORDÁ *et al.* 1999).

In der Gersten-EST-Datenbank fanden sich auch für die cDNA HvSD26 eine große Anzahl homologer EST-Sequenzen. Die beiden EST-Sequenzen mit der höchsten Homologie zeigen Homologien zu verschiedenen Sequenzen in einer Nukleotid-Datenbank. Der EST L41869 hat u.a. Homologien zu zwei Sequenzen aus der Gerste. Eine dieser Sequenzen (94 % über 35 Bp und 93 % über 29 Bp) kodiert für eine β -Glukosidase (BGQ60, LEAH *et al.* 1995), die andere Sequenz (82% über 82 Bp) für eine „limit dextrinase“ (HvLD99, KRISTENSEN *et al.* 1999) für den Abbau des Rest-Dextrins bei der Hydrolyse des Amylopektins. Der andere EST (AF022725) zeigt Homologie zu einer Sequenz aus Mais (92 % über 68 Bp), die für das Kaliumkanalprotein ZMK2 kodiert (PHILIPPAR *et al.* 1999).

Für den Gerstenklon HvSD34 sind zur Zeit 7 homologe Gersten-EST-Sequenzen identifizierbar. Die beiden EST-Sequenzen mit der höchsten Homologie sind über einen sehr langen Sequenzbereich homolog zu Gerstensequenzen aus der Nukleotid-Datenbank. Zu diesen gehören eine hochrepetitive Sequenz mit Ähnlichkeit zu Retrotransposonsequenzen, die eine Homologie von 89 % über 629 Bp haben und ein Genbereich, der für die intrinsischen Proteine TIP1 und TIP2 aus dem Tonoplasten sowie das Rar1-Protein kodiert (SHIRASU *et al.* 2000). Die Homologie zu diesem Genbereich erstreckte sich über drei Bereiche mit 87 % über 85 Bp, 87 % über 86 Bp und 82 % über 226 Bp.

Der cDNA-Klon HvSD36 kodiert für die 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase der Gerste (KLEBER-JANKE 1996) und wurde von FALK *et al.* (2002) unabhängig von dieser Arbeit weiter charakterisiert.

Drei Gersten-EST-Sequenzen zeigen Homologien zum HvSD37. Die Suche mit dem EST BE421409 in der Nukleotid-Datenbank ergab eine große Anzahl homologer Sequenzen. Der Bereich mit ca. 95 % Homologie befindet sich im vorderen Bereich der EST-Sequenz und ist identisch mit Sequenzen von verschiedenen Vektoren. Zum hinteren Bereich der Sequenz wurden keine Homologien gefunden.

3.1.3 HvSF-cDNA-Klone

Die verschiedenen HvSF-Klone (*Hordeum vulgare* Seneszenz Fahnenblatt oder Freiland) aus der Gerste stammen aus einer cDNA-Bank, die die Genexpression von Fahnenblättern vier Tage nach Beginn der Seneszenz unter Freilandbedingungen repräsentiert. Ein partieller Klon der cDNA HvS40 wurde von BECKER & APEL (1992) isoliert und von HAUSSÜHL (1999) vervollständigt. CHROST & KRUPINSKA (2000) isolierten die Klone HvSF11 und HvSF23, die für α -Galaktosidasen spezifisch sind, sowie den cDNA-Klon HvSF33. Die übrigen HvSF-Klone wurden von QUAST (1995) isoliert (Tab. 3.1.3).

Tabelle 3.1.3: HvSF-Klone aus der cDNA-Bank „D“ (QUAST 1995) mit Angaben zur Länge der cDNA und zum kodierten Protein.

<i>HvSF</i>	<i>Länge des cDNA-Klons [Bp]</i>	<i>kodiertes Protein</i>
2	800	Glykosyltransferase
6	377	Unbekannt
11	805	α -Galaktosidase II
23	739	α -Galaktosidase I
27	420	Unbekannt
31	460	Unbekannt
33	447	Unbekannt
42	500	Cysteinprotease

3.1.4 Weitere Untersuchungen zu den HvSF-cDNA-Klonen

Die cDNA-Klone HvSF2, HvSF6 und HvSF42 wurden als Sonde für die Hybridisierung von genomischer DNA nach Restriktion mit vier verschiedenen Enzymen verwendet (Abbildung 3.1.4.1).

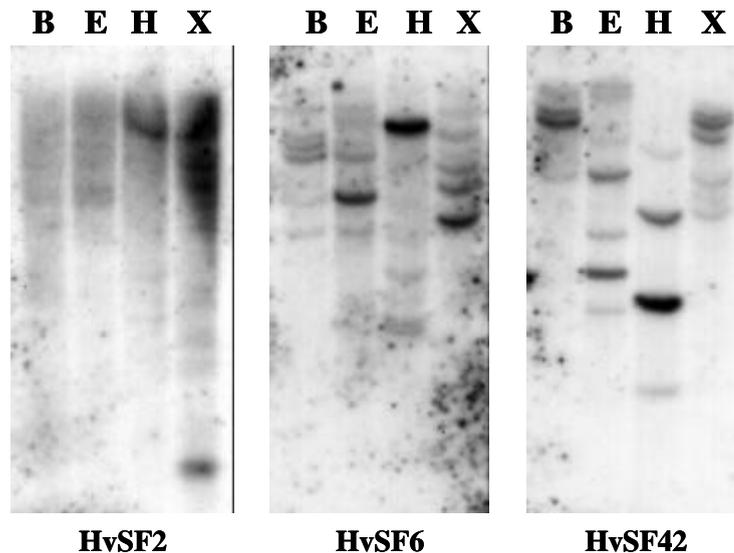


Abbildung 3.1.4.1: „Southern-Blot“-Analyse der cDNAs HvSF2, HvSF6 und HvSF42. Jede Spur enthält 15µg genomische DNA, die mit *Bam*H I (B), *Eco*R I (E), *Hind* III (H) und *Xba* I (X) restringiert wurde.

Die Hybridisierungen ergaben, daß die Transkripte des HvSF6 und des HvSF42 zu einer kleinen Genfamilie mit wenigen Mitgliedern gehören, während das Transkript des HvSF2 eine große Multigenfamilie repräsentiert (Abbildung 3.1.4.1).

Durch Hybridisierungen von „Northern-Blots“ mit den cDNA-Fragmenten HvSF2, HvSF6 und HvSF42 wurden die Änderungen im Gehalt der spezifischen Transkripte während der dunkelinduzierten (Abbildung 3.1.4.2) und der natürlichen Seneszenz von Primärblättern (Abbildung 3.1.4.3) in der Klimakammer untersucht.

Mit den cDNA-Fragmenten HvSF6 und HvSF42 konnte während der Dunkelinkubation jeweils ein akkumulierendes Transkripts hybridisiert werden (Abbildung 3.1.4.2). Die Menge des vom HvSF42 detektierten Transkripts ist sehr gering und nimmt mit fortschreitender Dunkelinkubation nur geringfügig zu, während mit dem HvSF6 eine Transkriptmenge detektiert wurde, die im Verlauf der Dunkelinkubation deutlich zunimmt. Mit der gleichen Sonde

3. Ergebnisse

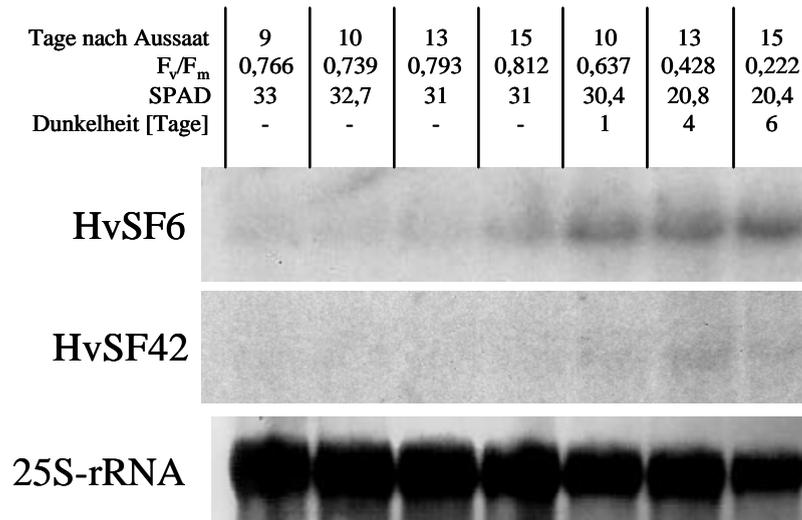


Abbildung 3.1.4.2: Autoradiogramme von „Northern-Blots“ nach Hybridisierung mit den α - 32 P-CTP-markierten cDNA-Fragmenten HvSF6 und HvSF42 zur Untersuchung des Transkriptgehalts während der dunkelin-duzierten Seneszenz von Primärblättern. Das Alter der Pflanzen, die gemessenen physiologischen Parameter und die Dauer der Dunkelinkubation sind über den Autoradiogrammen angegeben. Als Beladungskontrolle der RNA-Gele ist die 25S-rRNA-Bande der aufgetrennten und auf einer Nylonmembran immobilisierten RNA nach Methylenblaufärbung abgebildet.

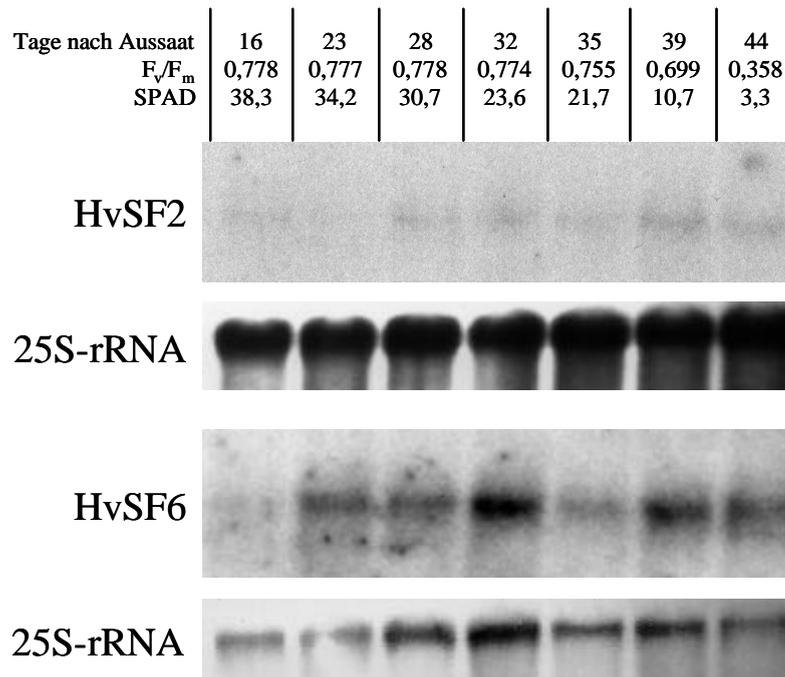


Abbildung 3.1.4.3: Autoradiogramme von „Northern-Blots“ nach Hybridisierung mit den α - 32 P-CTP-markierten cDNA-Fragmenten HvSF2 und HvSF6 zur Untersuchung des Transkriptgehalts während der natürlichen Seneszenz von Primärblättern in der Klimakammer. Das Alter der Pflanzen und die gemessenen physiologischen Parameter sind über den Autoradiogrammen angegeben. Die einzelnen cDNA-Fragmente wurden mit unterschiedlichen „Northern-Blot“-Filter hybridisiert, als jeweilige Beladungskontrolle der RNA-Gele ist die 25S-rRNA-Bande der aufgetrennten und auf einer Nylonmembran immobilisierten RNA nach Methylenblaufärbung abgebildet.

konnte auch in den Blättern der Kontrollpflanzen, die im Licht-/Dunkel-Rhythmus kultiviert wurden, Spuren eines Transkripts detektiert werden. Mit dem cDNA-Fragment HvSF2 konnte weder in den dunkelinkubierten Blättern noch in den Blättern der Kontrollpflanzen ein Transkript hybridisiert werden.

Um den Einfluß veränderlicher äußerer Faktoren auf die Transkriptakkumulation während der Seneszenz auszuschließen, wurde die Seneszenz von Gerstenblättern untersucht, die unter kontrollierten Bedingungen in der Klimakammer kultiviert wurden. Aus Primärblättern von 16, 23, 28, 32, 36, 39 und 44 Tage alten Pflanzen (MIERSCH *et al.* 2000) wurde RNA isoliert.

Die Hybridisierung der "Northern-Blot"-Filter mit den cDNA-Fragmenten HvSF2 und HvSF6 zeigte eine Zunahme des zugehörigen Transkripts mit fortschreitendem Alter der Blätter. Die Hybridisierung mit den Sonden ergab für den HvSF2 schwache und für den HvSF6 starke Signale. Mit dem cDNA-Fragment HvSF2 ist das erste Transkript in 16 Tage alten Pflanzen und mit dem cDNA-Fragment HvSF6 in 9 Tage alten Pflanzen detektierbar (Abbildung 3.1.4.3).

Es wurde nun versucht, über Datenbankrecherchen die Klone HvSF2, HvSF6, HvSF27 und HvSF42 *in silico* zu verlängern und eine Funktion der kodierten Proteine anhand von homologen Sequenzen aus der Datenbank abzuleiten. Der Klon HvSF27 wurde darüber hinaus genauer charakterisiert (Kapitel 3.1.4.4).

3.1.4.1 HvSF2

Diese von QUASt (1995) aus seneszenten Fahnenblättern der Gerste isolierte cDNA ist 800 Bp lang. Die Transkriptlänge des zugehörigen Gens wurde in seneszenten Fahnenblättern der Gerste durch ein „Northern-Blot“-Experiment von QUASt (1995) auf 1800 nt geschätzt, d.h. der vorliegenden cDNA-Sequenz fehlen ca. 1000 Bp bis zur Volllänge.

Datenbankrecherchen zeigen signifikante Homologien zu einer Vielzahl von pflanzlichen Glykosyltransferasen. Drei homologe Sequenzen aus der Datenbank wurden aufgrund ihres hohen Homologiegrades ausgewählt und mit der Aminosäuresequenz des HvSF2 abgeglichen (Abbildung 3.1.4.1.1). Die erste homologe Sequenz stammt vom Protein ZOX1 (P56725) aus *Phaseolus vulgaris*, das Xylose auf das Cytokinin Zeatin überträgt (MARTIN *et al.* 1999), die

zweite Sequenz vom Protein IAGLU (Q41819) aus *Zea mays*, das UDP-Glukose auf Indolesigsäure (IAA) überträgt (SZERSZEN *et al.* 1994) und die dritte Sequenz hat Homologie zum *Bronze-1* Protein aus Gerste (P14726), das UDP-Glukose auf Flavonoide überträgt (WISE *et al.* 1990).

```

HvSF2 : LASKDMAVRGTDAPS-DADSCLRRLDAKAGSVVYVSEGLTKFAPAEIXLARADLSCVNEVMI-----GAAAGQDSAE : 164
P56725 : PLAVEKKDSIGF--SHE----CMERLLDKQEPSSVIVYVSEGLTALRDEQIQSLATLEEQSKQKPIWLRDADKGDIFDGSEAKR : 308
Q41819 : AGANGRITYG-ANLVRPEEA--CTKRLDKKEDRSVAVYVSEGLASLGNQKQELARGLLAACKPFLWVR-ASDE----- : 319
P14726 : LLFGAEP TADTNEA--EADPHGCLAWLDRREARSVAIVSEGLNATARPDELOQLAAGLEBASGAPFLWVSLR-----GVV : 317

HvSF2 : WM-DEAD-ADLIARGDRRFMVRGWAPODAES*SHAALGGFVTHCGWNSVLEAVSAGVPMVTVWRGTRTSSTTRSSWMSFSRSASAS : 246
P56725 : YELDEGE-EBRVE--GMGLVVRDWAPOMEIT--SHSSTGCEMSHCGWNSCHEESLTVEMATWAMHSDCPRNAVLVTDVLRKVLIV : 389
Q41819 : HQVRYLLAB-ATATGAAMVY-ETCPQLDVI-ABPVGCEVTHCGWNSLLEALSEGVEMVAMALWTDPTNARNWELAWGAVRA : 401
P14726 : AAADRGEL-ERAPGL---MV-ETAPQGVLR-REAVGAEVTHAGMASVMEGVSSGVEMACRPFPGDCTMNAARSVASVWGEETAF : 395
    
```

Abbildung 3.1.4.1.1: Auswahl von HvSF2-homologen Glykosyltransferasesequenzen aus der Datenbank nach Sequenzabgleich mit dem GENEDOC-Programm (P56725 = ZOX1, Q41819 = IAAG_Maize, P14726 = UFOG_Horvu). Der Rahmen repräsentiert den Bereich der Glykosyltransferase-Erkennungssequenz.

Seit der Etablierung von PROSITE zur Vorhersage der Funktion von bestimmten Sequenzbereichen („sites and patterns“) in Proteinen durch BAIROCH (1991) war eine Aminosäureabfolge als „UDP-glykosyltransferase signature sequence“ bekannt (Abbildung 3.1.4.1.2), die ein Protein als Glykosyltransferase klassifiziert. Die Autoren HUGHES & HUGHES (1994) haben diese Sequenz genauer studiert und schlugen als glykosyltransferasespezifische Sequenz die „Proposed PROSITE UDP-glycosyltransferase signature for secondary plant product metabolism“ (PSPG) als leicht modifizierte Form von PROSITE vor. Von VOGT & JONES (2000) wurde der glykosyltransferasespezifische Sequenzbereich auf zwei kurze und spezifische Peptidbereiche reduziert (Abbildung 3.1.4.1.2).

```

Signaturpeptide      WPAQV                HCGWNS
HvSF2      182 MVRGWAPODAES*SHAALGGFVTHCGWNSVLEAVSAGVPMVTVWRGTRTSST 231
PROSITE      WXXQXXLL-XHXXXXAFLSXSGXXSXXXSLXXXLPLXXXPLLSDQ
PSPG      WSPQIXIL-XHPSXGXFLSHXGWNSILESLXXSVPIXXXPLYADQ
    
```

Abbildung 3.1.4.1.2: Homologien zwischen Teilen der Aminosäuresequenz des HvSF6 und der Glykosyltransferase-Erkennungssequenz. Es ist der eingerahmte Bereich aus Abbildung 3.1.4.1.1 dargestellt. Die Signaturpeptidsequenz stammt von VOGT & JONES (2000) (die fettgedruckten Aminosäuren sind hochkonserviert), die Erstellung der PROSITE-Sequenz wurde von BAIROCH (1991) und die PSPG-Sequenz von HUGHES & HUGHES (1994) beschrieben.

Bei einer Untersuchung der von der cDNA HvSF2 abgeleiteten Aminosäuresequenz im Bereich der Glykosyltransferasesignatur (Abbildung 3.1.4.1.2) findet man deutliche Übereinstimmungen mit den verschiedenen vorgeschlagenen Konsensussequenzen. Besonders die

beiden für Glykosyltransferasen kennzeichnenden Signaturpeptide sind annähernd komplett in der Aminosäuresequenz des HvSF2 vorhanden.

3.1.4.2 HvSF6

Diese cDNA hat eine Länge von 377 Bp. Ein „Northern-Blot“, bei dem mit dieser Sonde zwei spezifische Transkripte in seneszenten Fahnenblättern der Gerste mit einer Länge von 1800 und 950 nt nachgewiesen wurden, zeigte, daß noch ein Großteil der Sequenzinformation fehlt (QUAST 1995).

1996 konnten bei Datenbankrecherchen keine homologen Sequenzen gefunden werden. In der seit wenigen Jahren am IPK Gatersleben zur Verfügung stehenden Datenbank wurden jetzt bei der Suche nach homologen Gersten-ESTs vier Sequenzen (HY05J06u, BF253696, BF258859 und HW08I23u) gefunden, die über die gesamte Sequenz des HvSF6 höchst homolog sind. Durch *in silico*-Abgleich der Sequenzen wurde die cDNA-Sequenz HvSF6 auf 465 Bp verlängert. Einige der EST-Sequenzen reichen erheblich über den 3'-Bereich des HvSF6 hinaus. Dazu gehören der EST HY05J06u mit einer Homologie von 95 % über 372 Bp und der EST HW08I23u mit einer Homologie von 87 % über 174 Bp, die beide für eine weitergehende Suche nach homologen Sequenzen in der „Genebank“ (NCBI) benutzt wurden. Das Ergebnis der Suche war in beiden Fällen eine mRNA-Sequenz aus Weizen (AJ010830), die jeweils Homologie von 85 bis 90 % über maximal 225 Bp zu den EST-Sequenzen aufweist (Abbildung 3.1.4.2.1). Die homologe mRNA kodiert für das GRAB2-Protein (XIE *et al.* 1999).

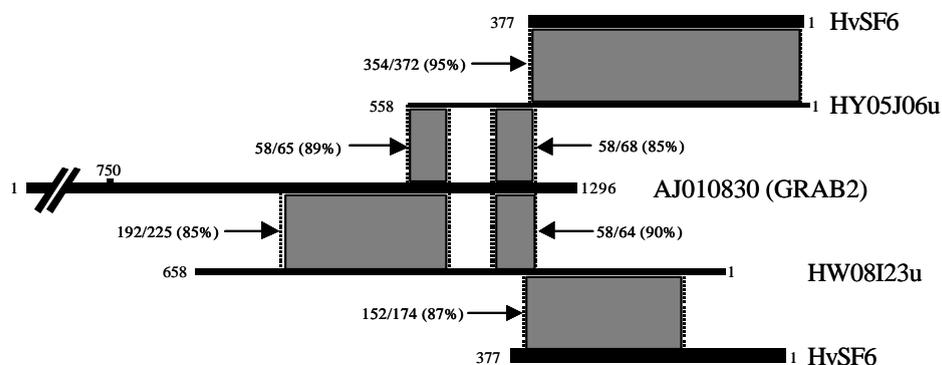


Abbildung 3.1.4.2.1: Anordnung der zur HvSF6-cDNA homologen Sequenzen aus der EST-Datenbank (HY05J06u und HW08I23u) und aus der Genbank (GRAB2). Homologe Bereiche sind schraffiert dargestellt; deren Länge und der Grad der Homologie ist angegeben.

Die Homologien zwischen der GRAB2-Sequenz und den EST-Sequenzen ließen sich nur im Fall des EST HW08I23u auch auf der Ebene der Aminosäuren wiederfinden (Abbildung 3.1.4.2.2). Auf Nukleotidebene überlappt die Sequenz der cDNA HvSF6 über 30 Nukleotide direkt mit der Sequenz des GRAB2 (Abbildung 3.1.4.2.1). Auf Aminosäureebene kommt es zu keiner Überlappung, da der Homologiebereich des GRAB2-Proteins das C-terminale Ende betrifft und der kodierende Bereich dieser Aminosäure ca. 20 AS vor Beginn der Aminosäuresequenz des HvSF6 endet. Die Aminosäuresequenz des EST, der Homologie mit der cDNA HvSF6 zeigt, ragt über das C-terminale Ende des GRAB2 hinaus. Das bedeutet, daß sich der größte Teil der von der cDNA abgeleiteten homologen Aminosäuren außerhalb der Sequenz des GRAB2-Proteins befindet.

```

HvSF6      : ----- : -
HW08I23u   : TARAPDITFFHKRRATAQFAKT--GGAGVLDLRLTRKFMGDDQQAATRMHCKPBA--ASSALLSPSLGLFDTCALAGAAGTSPFEM : 81
GRAB2      : PVLHPEQQQSPNYFFMBAFANGNLGGAEYSFYQA--MGDQQAATRRYCKPRAEVASSALLSPSLGLDTA-ALAGAE-TSFLM : 324

HvSF6      : -----XTRVDIISLHTFGIK-GLGLTATDPRRRRIVV-C : 32
HW08I23u   : PSSRSYVDLEELCRGEFMDFSNMWINLSIHMPDWIVXVCFLVAIGGFHWLVLARGLSLSCINFDGLGLGGDPSRRKRIVV-C : 164
GRAB2      : PSSRSYLDLEELFRGEBLMDYSNMWKI----- : 351

HvSF6      : MIVVDASRRHNDGLARGSADSLGCDIRLLVGGMHLFVHTSPDASPYSLAIRGRWTGGREVCRRDRVDWILCAADNELFPFS---- : 111
HW08I23u   : LMR-A--RRHNDGLARGSADSARVLTIVTNEKRLCSKKKKKKKKK----- : 206
GRAB2      : ----- : -
    
```

Abbildung 3.1.4.2.2: Vergleich der Aminosäuresequenzen, die vom EST HW08I23u und der cDNA HvSF6 abgeleitet wurden, mit dem GRAB2-Protein.

3.1.4.3 HvSF42

Diese von QUAST (1995) isolierte cDNA ist 500 Bp lang. „Northern-Blot“-Untersuchungen zeigten, daß in seneszenten Fahnenblättern der Gerste mit der HvSF42-Sequenz als Sonde ein spezifisches Transkript von 1600 nt Länge hybridisiert. Daher repräsentiert auch dieser cDNA-Klon nur ein unvollständiges Transkript.

Bei den Datenbankrecherchen aus dem Jahr 1996 ergaben sich signifikante Homologien zu einigen Cysteinproteasen. Bei einer Suche mit der HvSF42-Sequenz in der Gersten-EST-Datenbank wurden eine Vielzahl von homologen EST-Sequenzen gefunden, die es erlaubten, die Sequenz *in silico* auf 884 Bp zu verlängern. Mit dieser Sequenz wurde erneut die EST-Datenbank durchsucht. Es ergaben sich Homologien zu einigen neuen EST-Sequenzen und es war nun möglich, die Sequenz am 5'-Ende weiter zu verlängern. Aus dieser Prozedur ergab sich eine 1274 Bp lange Sequenz, die eine Konsensussequenz verschiedener EST-Sequenzen

mit Homologie zum HvSF42 darstellt. Sie wurde zur Suche in einer Nukleotid-Datenbank mit dem Algorithmus TBLASTX (ALTSCHUL *et al.* 1997) verwendet. Diese Suche auf Ebene der Aminosäuren erbrachte eine Vielzahl von homologen Aminosäuresequenzen von vor allem pflanzlichen Cysteinproteasen. Zu den Sequenzen mit der höchsten Homologie gehören jeweils eine Cysteinprotease aus *Zea mays* (D45402, 82 % über 94 AS und 87 % über 8 AS), aus *Sandersonia aurantiaca* (AF411121, 82 % über 81 AS) und aus *Phaseolus vulgaris* (Z99953, 72 % über 75 AS und 85 % über 7 AS).

Beim Abgleich der homologen Sequenzbereiche fällt auf, daß diese in den ausgewählten Sequenzen beinahe identisch sind (Abbildung 3.1.4.3.1). Zusätzlich ergab ein Vergleich der Sequenz des HvSF42 mit anderen bekannten, während der Seneszenz exprimierten Cysteinproteasen, daß auch diese große Homologien in diesem Bereich besitzen. Zu diesen seneszenzinduzierten Cysteinproteasen gehören die Proteine SenU3 aus Tomate (DRAKE *et al.* 1996), See1 aus *Lolium multiflorum* (LI *et al.* 2000) und NTCP-23 aus Tabak (UEDA *et al.* 2000).



Abbildung 3.1.4.3.1: Darstellung von Teilen ausgewählter Sequenzen aus der Datenbank und bekannten Cysteinproteasen mit Homologie zur verlängerten Sequenz der cDNA HvSF42 (CCP1 aus Mais (D45402), PRT22 aus *Sandersonia aurantiaca* (AF411121), CP41 aus *Phaseolus vulgare* (Z99953), SenU3 aus Tomate (Z48736), See1 aus *Lolium multiflorum* (AJ249847) und NTCP-23 aus Tabak (AB032168)). Pfeil = Schnittstelle der posttranslationalen Prozessierung, Kreis = Aminosäuren für Ausbildung des aktiven Zentrums, Raute = Aminosäuren, die eine Disulfidbrücke ausbilden können.

Im homologen Sequenzbereich des HvSF42 befinden sich einige der für Cysteinproteasen typischen Merkmale. Dazu gehören die Aminosäure (AS) 149 (Leucin, siehe Pfeil in Abbildung 3.1.4.3.1) als vermutete Schnittstelle der posttranslationalen Prozessierung zur Erzeugung des reifen Proteins und die AS167 (Glutamin) und AS173 (Cystein), die in Abbildung 3.1.4.3 beide als Kreis dargestellt sind. Diese beiden Aminosäuren bilden zusammen mit drei weiteren Aminosäuren das aktive Zentrum von Cysteinproteasen (KAMPHUIS *et al.* 1984, DRAKE *et al.* 1996), wobei die AS173 den katalytischen Aminosäurerest trägt. Die AS170 und AS204 (Cystein, Rauten in der Abbildung) bilden mit zwei weiteren Cysteinen im NTCP-23

Disulfidbrücken aus (HOLWERDA *et al.* 1990, UEDA *et al.* 2000). Im klonierten homologen Sequenzbereich der cDNA HvSF42 konnte weder das ERFNIN-Konsensusmotiv (EX₃RX₂(V/I)FX₂NX₃IX₃N) als Charakteristikum des Propeptids der H- und L-Cathepsin-Familie (KARRER *et al.* 1993) noch das Vakuolen-Sortiersignal (HOLWERDA *et al.* 1990, CHRISPEELS & RAIKHEL 1992, NAKAMURA & MATSOUKA 1993) und ein in der Mehrzahl aller Cysteinproteasen konserviertes GCNGG-Motiv (KARRER *et al.* 1993) gefunden werden.

3.1.4.4 HvSF27

Der aus der Arbeit von QUAST (1995) stammende cDNA-Klon HvSF27 repräsentiert einen der interessantesten Seneszenzklone in bezug auf deutliche Transkriptakkumulation während der Seneszenz des Fahnenblattes im Freiland oder unter dem Einfluß von Phytohormonen im Primärblatt. Während der Seneszenz konnte in Fahnenblättern der Gerste von QUAST ein HvSF27-spezifisches Transkript detektiert werden, dessen Gehalt mit Fortschreiten der Seneszenz deutlich zunahm. In Primärblättern konnte während der dunkelinduzierten Seneszenz kein Transkript detektiert werden, da es ausschließlich in seneszenten Fahnenblättern vorkommt. Bei Inkubationsversuchen von abgeschnittenen Primärblättern auf Phytohormonlösungen zeigte sich, daß die Expression des HvSF27 durch Ethylen oder Methyljasmonat induzierbar ist, durch gleichzeitige Gabe beider Phytohormone jedoch unterdrückt wird. In verschiedenen Datenbanken konnten keine homologen Sequenzen gefunden werden. Um die vollständige Sequenz zu erhalten und damit Aussagen über das kodierte Protein machen zu können, wurde diese cDNA näher untersucht.

Der cDNA-Klon hat eine Länge von 423 Bp, repräsentiert aber nicht das vollständige Transkript, da sowohl das Startcodon ATG als auch der Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende fehlen. Die Sequenz liegt über die *Sma* I-Schnittstelle der multiplen Klonierungsstelle des Vektors pUC18 kloniert vor und besitzt zusätzliche flankierende Sequenzbereiche, die aus der Herstellung der λ -ZAP - Phagenbibliothek und der Isolierung der cDNA aus dem λ -Phagen resultieren (Abbildung 3.1.4.4). Allerdings fehlt einer der für die Klonierung der cDNA in einen λ -Phagen unabdingbaren, eigentlich auf beiden Seiten der HvSF27-Sequenz erwarteten 8Bp - *Eco*R I-Adaptoren (grün markiert). Auf der Seite des 8 Bp - *Eco*R I-Adaptors ist eine zusätzliche multiple Klonierungsstelle vorhanden (blau markiert), die zwischen dem Adaptor und der multiplen Klonierungsstelle des pUC18-Vektors (rot markiert) liegt. Dieser Sequenzbereich, der 5 Restriktionsschnittstellen umfaßt und identisch mit der multiplen Klonierungsstelle des

pBluescriptII ist, entstand beim Herausschneiden der cDNA aus dem λ -Phagen durch den „ExAssist“-Helferphagen („*In vivo*“ Exzision, 2.6.7). Auf der anderen Seite der cDNA fehlen mit dem 8 Bp - *EcoR* I-Apaptor und der multiplen Klonierungsstelle aus pBluescriptII zwei charakteristische Bestandteile eines aus einer λ -ZAP - Phagenbibliothek stammenden cDNA-Klons.

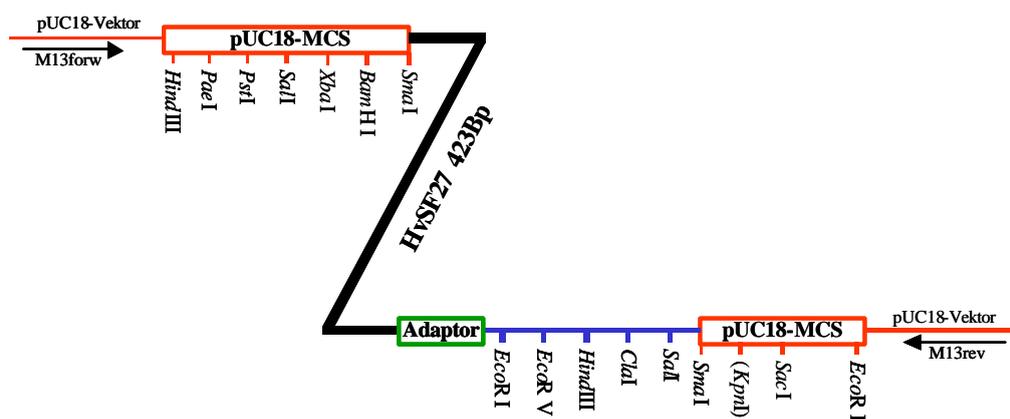


Abbildung 3.1.4.4: Aufbau der Sequenz des cDNA-Klon HvSF27 mit flankierenden Sequenzen

3.1.4.5 Sequenzhomologien der HvSF27-cDNA

Übersetzt man die Nukleotidsequenz der cDNA HvSF27 in Aminosäuresequenzen, ergibt sich ein offener Leserahmen von 104 AS Länge, der ohne Startcodon direkt am vermuteten 5'-Ende beginnt. Die Leserahmen 1 und 2 sind mit 9 bzw. 13 Stoppcodons durchsetzt und ergeben keinen hinreichend langen offenen Leserahmen.

Ein Abgleich neueren Datums mit Datenbanksequenzen ergab für die Nukleinsäuresequenz ausschließlich Homologien über sehr kurze Bereiche von max. 18-22 Nukleotiden. Datenbankrecherchen mit den abgeleiteten Aminosäuresequenzen ergaben keine aussagekräftigen Ergebnisse.

3.1.4.6 5' - 3' - Orientierung der HvSF27-cDNA

Das Fehlen einer Poly(A)-Sequenz bzw. eines Startcodons machte es unmöglich, die cDNA-Sequenz eindeutig und zweifelsfrei in 5' - 3' - Richtung zu orientieren, wodurch sich die Zahl

der potentiellen Aminosäuresequenzen für die Datenbankrecherche von sechs auf drei reduzieren würde. Zur Ermittlung der Sequenzorientierung wurde eine PCR mit „revers“ transkribierter Gesamt-RNA aus seneszenten Gerstenfahnenblättern als Template verwendet. Für die Polymerase-Kettenreaktion (2.4.3) wurden jeweils einer von vier HvSF27-cDNA-spezifischen Oligonukleotiden in Kombination mit einem Oligonukleotid mit 17 Thymidinen (*NotI*-(dT)₁₇-„Primer,“) eingesetzt, der spezifisch Poly(A)-Bereiche wie den Poly(A)-Schwanz von mRNAs erkennen soll (Tabelle 3.1.4.6). Jeweils zwei der sequenzspezifischen „Primer“ zeigten in der gleichen Richtung aus der cDNA-Sequenz heraus.

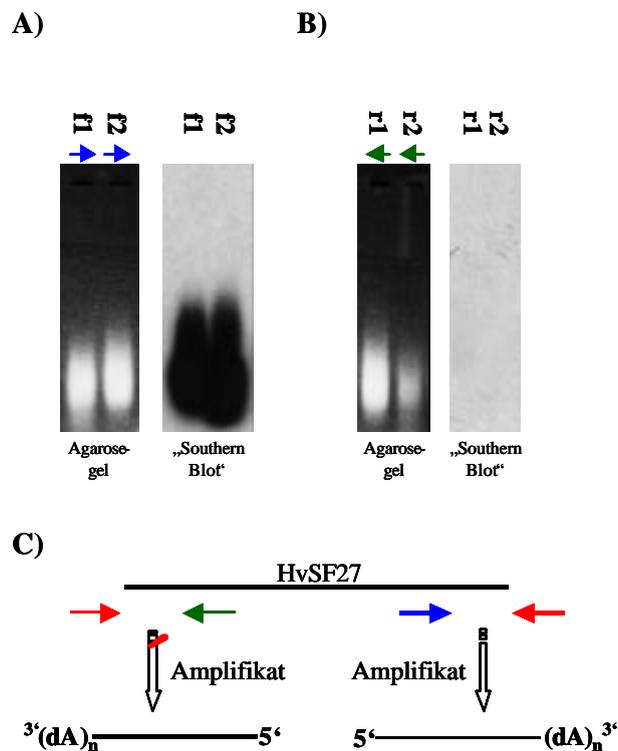


Abbildung 3.1.4.6: Polymerase-Kettenreaktion zur Ermittlung der Orientierung der cDNA HvSF27. Agarosegel zur Auftrennung der Amplifikate und Detektion spezifischer Amplifikate nach Transfer auf eine Nylonmembran und Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten HvSF27-Sonde. **A)** PCR mit Kombinationen aus dem (dT)₁₇-„Primer“ und den „forward-Primern“ (blau, f1 = HvSF27forw1, f2 = HvSF27forw2), sowie **B)** mit den „reverse-Primern“ (grün, r1 = HvSF27rev1, r2 = HvSf27rev2). **C)** Prinzip der Orientierungssuche und Darstellung der HvSF27-cDNA-Sequenz in der ermittelten 5' - 3' - Orientierung. (rot: (dT)₁₇-„Primer“; blau und grün: sequenzspezifischer „Primer“).

Durch die Hybridisierung der in einem Agarosegel aufgetrennten und auf einer Membran immobilisierten Amplifikate aus den Kombinationen des (dT)₁₇-„Primer“ mit den cDNA-spezifischen Oligonukleotiden (Abbildung 3.1.4.6 A, B) wurden mit der radioaktiv markierten cDNA HvSF27 als Sonde spezifische Amplifikate erhalten (Abbildung 3.1.4.6 A). Es wurden nur Amplifikate aus der Kombination aus HvSF27-spezifischem "forward-Primer" und dem

(dT₁₇)-„Primer“ spezifisch markiert. Dadurch konnte die bisher verwendete Orientierung als eindeutige 5' - 3' - Orientierung des cDNA-Fragments HvSF27 ermittelt werden (Abbildung 3.1.4.6 C).

Tabelle 3.1.4.6: Kombination der Oligonukleotide zur Ermittlung der Orientierung der Sequenz des HvSF27 durch PCR.

Nr.	Sequenzspezifisches Oligonukleotid	Richtung	Oligonukleotidsequenz	NotI – (dT) ₁₇ – Primer
# 1	HvSF27forw1	⇒	5' CAGAGT GATCGAGTT AACCCG ^{3'}	5' ATATATATGCGGCCGC TTTTTTTTTTTTTTTTTT ^{3'}
# 2	HvSF27forw2	⇒	5' GTA AACTCGCTCTTGG CAGAC ^{3'}	5' ATATATATGCGGCCGC TTTTTTTTTTTTTTTTTT ^{3'}
# 3	HvSF27rev1	⇐	5' CCAGAAACGTAGCAT TTTATGGCC ^{3'}	5' ATATATATGCGGCCGC TTTTTTTTTTTTTTTTTT ^{3'}
# 4	HvSF27rev2	⇐	5' CCAATGATCAAATTT ACTCAGTCCG ^{3'}	5' ATATATATGCGGCCGC TTTTTTTTTTTTTTTTTT ^{3'}

3.1.4.7 Durchmustern einer „λ-ZAP“-Phagenbibliothek

Analog zum Vorgehen von KLEBER-JANKE (1996) wurde zur Vervollständigung der fehlenden Sequenzinformation der cDNA HvSF27 die λ-ZAP II-cDNA-Bank „C“, die von QUAST (1995) mit dem „ZAP-cDNA[®] Synthesis Kit“ der Firma Stratagene aus mRNA frühseneszen-ter Fahnenblätter der Sommergerste *Hordeum vulgare* cv. Carina hergestellt wurde und cDNA-Fragmente mit einer Länge von 650 – 2800 Bp enthält, nach homologen Sequenzen durchsucht.

Durch Hybridisierung mit einer durch Digoxygenin markierten HvSF27-Sonde konnten im ersten Durchgang 5 unabhängige λ-Phagenklone gefunden werden, die mit der Sonde hybridisierten. In zwei weiteren Zyklen wurden diese λ-Phagen vereinzelt und die klonierte Gersten-cDNA aus den λ-Phagen herausgeschnitten (*In vivo*-Exzision, 2.6.7), die daraufhin als „Phagemide“ im Vektor Bluescript SK⁻ kloniert vorlagen.

Durch Restriktion mit *EcoR* I wurde die Größe der klonierten cDNAs in den Bluescript-Vektoren bestimmt. Einer enthält eine 348 Bp-Sequenz, die anderen jeweils ein Insert von ca. 1 kBp. Durch Restriktion dieser 1 kBp - Inserts mit *EcoR* I entstehen 3 weitere Restriktionsfragmente, die in der Summe ihrer Einzellängen (ca. 520 + 400 Bp, ca. 800 + 300 Bp sowie 500 + 350 Bp) das 1 kBp-Fragment ergeben. Dies deutet auf eine interne *EcoR* I-Restriktionsschnittstelle im Insert hin, die in der cDNA-Sequenz des HvSF27 nicht enthalten ist. Zur

Kontrolle wurde zusätzlich mit *NotI* und *SalI* restringiert. Diese Restriktionen ergeben jeweils ein einzelnes Fragment mit einer Größe von 1 kBp.

Auf einer Membran mit RNA aus seneszenten Fahnenblättern der Gerste markiert eine radioaktiv markierte HvSF27-cDNA eine RNA mit einer ungefähren Größe von 450 nt (QUAST 1995). Da die aus der cDNA-Bank isolierten Sequenzen eine Größe von ca. 1000 Bp besitzen, repräsentieren die isolierten Klone aus der cDNA-Bibliothek möglicherweise Fusionsklone, zu deren Bestandteilen unter anderem die cDNA des HvSF27 gehört. Um Aufschluß über die Zusammensetzung der isolierten cDNA-Sequenzen zu bekommen, wurden die isolierten Klone mit den Oligonukleotiden „M13forward“ und „M13reverse“ ansequenziert. Die Teilssequenzen aus Sequenzierung mit dem „M13reverse“- oder dem „M13forward“-Sequenzier-Primern konnten problemlos untereinander anhand ihrer homologen Sequenzen abgeglichen werden (Abbildung 3.1.4.7.1 und 3.1.4.7.2). Alle Sequenzen zeigen über eine Länge von

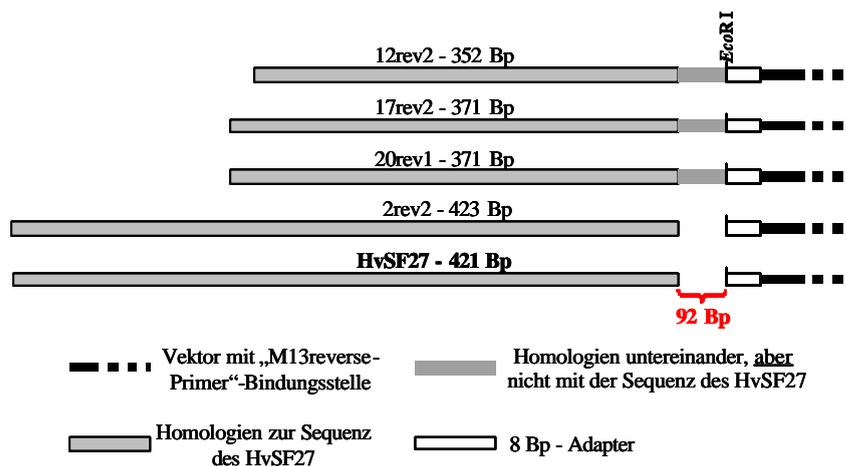


Abbildung 3.1.4.7.1: Darstellung der Sequenzhomologien der isolierten cDNA-Sequenzen untereinander und mit der cDNA HvSF27 nach Sequenzierung mit dem „M13reverse-Primer“.

280 Bp eine hundertprozentige Homologie zur Sequenz des HvSF27. Anhand dieser Sequenzen konnte ein Bereich von 92 Bp Länge ermittelt werden, der am 5'-Ende der HvSF27-Sequenz fehlt, aber in dreien von vier Sequenzen aus der cDNA-Bibliothek vorhanden ist (Abbildung 3.1.4.7.1).

Bei der Sequenzierung mit dem „M13forward“-Sequenzier-„Primer“ traten Probleme auf, da sich drei der fünf Sequenzen aus der cDNA-Bibliothek von dieser Seite nur mit großen Schwierigkeiten und die beiden anderen Sequenzen gar nicht ansequenzieren ließen. Alle Sequenzen zeigen einen hohen Grad an Identität untereinander in einem Bereich, der jedoch

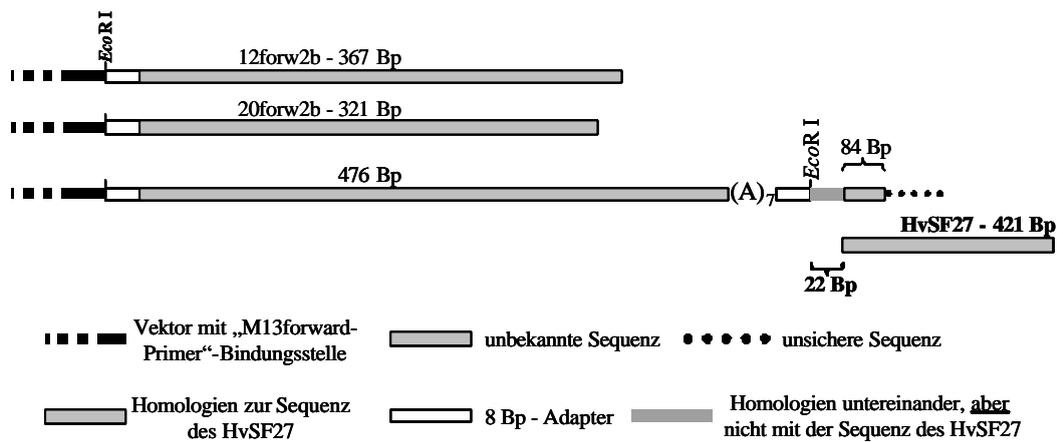


Abbildung 3.1.4.7.2: Darstellung der Sequenzhomologien der isolierten cDNA-Sequenzen untereinander und mit der cDNA HvSF27 nach Sequenzierung mit dem „M13forward-Primer“.

keinerlei Homologie zum HvSF27 aufweist (Abbildung 3.1.4.7.2). Nur eine der Sequenzen besitzt eine 100%ige Homologie zur Sequenz des HvSF27, allerdings nur über einen vergleichsweise kurzen Bereich von 84 Bp. Dieser Klon besitzt zusätzlich ein charakteristisches Merkmal eines Fusionsklons. Der HvSF27-homologe Bereich wird einseitig von einem eindeutig identifizierbaren *EcoR* I-Adaptor und einer Poly(dA)-Sequenz begrenzt, hinter der eine durch Homologiesuche in Datenbanken nicht identifizierbare Sequenz von 476 Bp Länge folgt.

Mit Hilfe der isolierten cDNA-Sequenzen konnte die Sequenz des HvSF27 am 5'-Ende um 92 Bp verlängert werden. Am 3'-Ende konnten keine neuen Sequenzbereiche identifiziert werden.

Die am 5'-Ende um 92 Bp verlängerte Sequenz des HvSF27 wurde in die Aminosäuresequenz übersetzt. Die Leserahmen 1 und 2 sind weiterhin von einer großen Anzahl Stoppcodons (10 bzw. 14) durchsetzt und ergeben keinen sinnvollen und ausreichend langen offenen Leserahmen. Im dritten Leserahmen hat sich der offene Leserahmen um 30 Aminosäuren von 104 AS auf 134 AS verlängert und beginnt wiederum ohne erkennbares Startcodon direkt am 5'-Ende der Sequenz.

Ein Vergleich der verlängerten Sequenz mit Sequenzen aus verschiedenen Datenbanken ergab auf Nukleinsäure- und auf Aminosäureebene keine zusätzlichen Informationen.

3.1.4.8 Durchmustern einer genomischen „Lambda FIX II“-Bibliothek

Auch nach Durchmusterung der λ -ZAP-cDNA-Bibliothek war die cDNA HvSF27 unvollständig. Zudem waren auch weiterhin entscheidende 5'-Bereiche der Sequenz unvollständig oder fehlten komplett. Daher wurde versucht, den Klon HvSF27 mit Sequenzen aus der „Lambda FIX[®] II Custom Genomic Library“ der Firma Stratagene, die genomische Fragmente von 8 Tage alten etiolierten Primärblättern der Wintergerste *Hordeum vulgare* cv. Igrü mit einer Größe von 9 - 22 kBp enthält, zu vervollständigen und in einem ausreichend großen Fragment spezifischer genomischer DNA möglicherweise gleichzeitig den Promotorbereich des Gens zu identifizieren. Die Lambda FIX II-Bibliothek wurde mit der unverlängerten digoxigenin-markierten Sequenz des HvSF27 durchmustert.

Das Durchmustern der genomischen Bibliothek ergab nur einen spezifischen Phagenklon, der bei der Hybridisierung mit der Sonde ein positives Signal gab. Die in dem λ -FIX II-Phagen vorliegende DNA besitzt eine Größe von ca. 16 kBp. Nach Lyse der Phagen auf den Bakterienplatten wurde die Phagen-DNA isoliert (2.6.8) und durch Restriktion mit verschiedenen Enzymen charakterisiert. Dabei wurde nach Restriktion der λ -DNA mit *Sac* I bzw. *Sal* I und durch anschließende Hybridisierung mit der HvSF27-Sonde ein spezifisches 500 Bp - *Sac* I- und ein 550 Bp - *Sal* I-Fragment identifiziert und kloniert. Die Sequenzierung dieser Fragmente ergab jedoch für das *Sal* I-Fragment eine 100%ige Homologie zu ca. 10 verschiedenen λ -Phagen-DNA-Typen und nur unbedeutende Homologie zum HvSF27. Das *Sac* I-Fragment weist eine 100 %ige Homologie über einen Bereich von 270 Bp zu über 400 verschiedenen Sequenzen aus der Datenbank auf. Zu der Sequenz des HvSF27 ist nur ein Bereich von 30 Bp 100 % homolog. Dieser Bereich liegt jedoch nicht im Bereich der 270 Bp, sondern schließt sich direkt an ihn an und ist nicht in den anderen Sequenzen vorhanden, die hohe Homologie zum 270 Bp-Bereich aufweisen.

Von den Phagen-Plaques auf dem Bakterienrasen wurden zur Präparation der λ -Phagen-DNA zusätzlich Flüssiglysate hergestellt. Nach Restriktion der isolierten DNA konnten durch Hybridisierung mit der HvSF27-Sonde weitere spezifische Restriktionsfragmente identifiziert werden. Dazu gehören ein 0,6 kBp - *Hind* III-, ein 1,1 kBp - *Pst* I-, ein 1,5 kBp - *Bam*H I-, ein 4,3 kBp - *Nco* I-, ein 6 kBp - *Sma* I- und ein 8 kBp - *Dra* I-Fragment, die während einer Hybridisierung reproduzierbar von der HvSF27-Sonde erkannt wurden. Das 1,5 kBp - *Bam*H I- und das 4,3 kBp - *Nco* I-Fragment wurden isoliert, in pBluescriptII kloniert und sequenziert. Da es wegen der Größe der Fragmente nicht möglich war, sie in einem Durchgang komplett

zu sequenzieren, wurden zusätzlich zu den „M13reverse“ und „M13forward“-Sequenzier-
„Primern“ zwei zusätzliche sequenzspezifische Oligonukleotide verwendet. Diese Oligonuk-
leotide sind in der Mitte der Sequenz des HvSF27 mit dem 5'-Ende nach außen angeordnet
und ermöglichen eine Sequenzierung zu den Enden hin.

Die Sequenzierung des 4,3 kbp - *Nco* I-Fragment erbrachte keine verwertbaren Ergebnisse,
da nur einer der verwendeten Oligonukleotide eine Sequenz lieferte, in der aber weder
HvSF27- noch Vektorsequenzen identifiziert werden konnten. Probleme gab es auch bei der
Sequenzierung des 1,5 kbp - *Bam*H I-Fragments. Die vektorspezifischen Oligonukleotide lie-
ferten nur sehr kurze Teilsequenzen, bevor die Sequenzreaktion abbrach. Nur eines der beiden
sequenzspezifischen Oligonukleotide ergab eine gut lesbare Sequenz, wobei jedoch nach ca.
200 Bp lesbarer Sequenz der „Primer“ offensichtlich zweifach gebunden hat und dadurch eine
Mischsequenz hervorbrachte, die aus zwei übereinander liegenden Sequenzen besteht. Eine

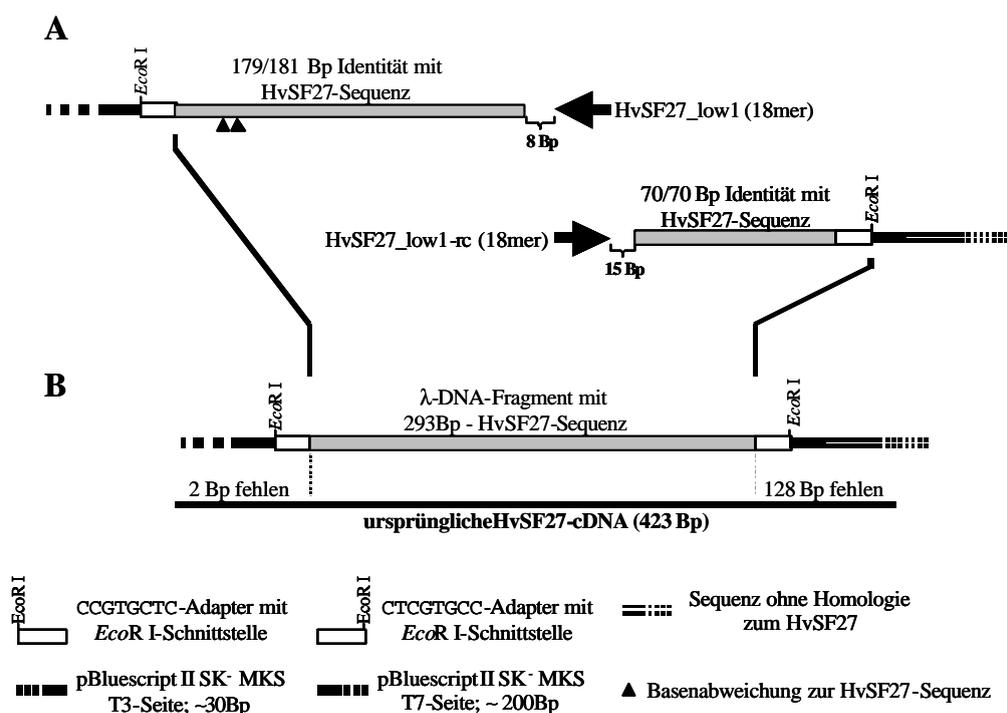


Abbildung 3.1.4.8: Sequenzanalyse des HvSF27-spezifischen 1.5 kbp - *Bam*H I-Fragments: **A)** Einzelsequenzen aus der Sequenzierung mit den beiden verwendeten sequenzspezifischen Oligonukleotiden; **B)** die aus A) resultierende Konsensussequenz ohne Angabe der „Primer“-Sequenzen.

Untersuchung der verschiedenen neuen Sequenzen lieferte keine neue zusätzlichen Sequenz-
informationen. Eine genauere Untersuchung zeigte, daß das 1,5 kbp - *Bam*H I-Fragment aus
der genomischen Bibliothek keine Sequenzinformation zur Ergänzung der schon bekannten
HvSF27-cDNA-Sequenz enthielt, sondern lediglich eine um 128 Bp verkürzte, annähernd

100 % homologe Sequenz des HvSF27 (Abbildung 3.1.4.8 B).

Neben dieser reduzierten Form der HvSF27-Sequenz finden sich unerwartet im genomischen Klon, die HvSF27-Sequenz rechts und links begrenzend, jeweils ein 8 Bp - Adaptor inklusive einer unvermuteten *EcoR* I-Schnittstelle (Abbildung 3.1.4.8 A). Weiterhin grenzen an beide Adaptoren außen Sequenzen der Multiklonierungsstellen aus pBluescript (30 Bp auf der Seite des T3- bzw. ca. 200 Bp auf der Seite des T7-Promotors) und erst danach finden sich die Sequenzen der für die Sequenzierung benutzten Oligonukleotide.

Die Bearbeitung der anderen λ -DNA-Fragmente wurde zurückgestellt, da sich gezeigt hatte, daß die kleineren Fragmente in den größeren enthalten sind. Daher war anzunehmen, daß auch in den Fragmenten, die größer als das untersuchte 1,5 kbp - *Bam*HI-Fragment sind, keine zusätzliche Sequenzinformation über den cDNA-Klon HvSF27 enthalten ist. Die Durchmusterung der genomische Bibliothek und die Charakterisierung des isolierten Phagenklons erbrachte somit keine neuen zusätzlichen Sequenzinformationen zum HvSF27.

3.2 Isolierung transkriptionsaktiver Kerne

Zur Untersuchung von Veränderungen in der Transkription ausgewählter Gene während der dunkelinduzierten Seneszenz und der Seneszenz im Freiland durch „Run-on“-Transkriptionsexperimente wurden Zellkerne aus Blättern benötigt, deren Transkriptionsaktivität auch nach der Isolierung erhalten blieb.

3.2.1 Kernisolierung nach COX & GOLDBERG (1988)

Zur Isolierung transkriptionsaktiver Kerne wurde die Methode von COX & GOLDBERG (1988) verwendet.

Während der Isolierung der Kerne mit dieser Methode werden wiederholte Filtrationen mit Nylonnetzen durchgeführt. Für eine Optimierung der Methode waren genaue Angaben der Kerngröße notwendig. Die Bestimmung der Kerngröße in Gerstenblättern in einem lichtmikroskopischen Ansatz war nicht hinreichend genau, jedoch ergaben elektronenmikroskopische Aufnahmen von Kernen, die von Frau Dr. Dörr einer Negativkontrastierung mit 1 % Osmiumtetroxid und 1 % Siliziumwolframsäure unterzogen wurden (Abbildung 3.2.1.1 F), Werte von ca. 10 μ m. Es kommt jedoch während der Fixierung zu Formveränderungen der Kerne

(„Spiegeleffekt“). Mit Hilfe von Herrn Pfeiffer und einem Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM, Zentrale Mikroskopie des Botanischen Instituts der Universität Kiel) wurde die Größe der Kerne aus Gerstenprimärblättern auf einen Bereich von etwa 5 bis kleiner 10 μm festgelegt. Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wurden während der Extraktion nach COX & GOLDBERG (1988) für die Filtrationen Nylonnetze mit den Maschengrößen 60, 42 und 20 μm in absteigender Reihenfolge gewählt, um die Zellkerne befriedigend an- und

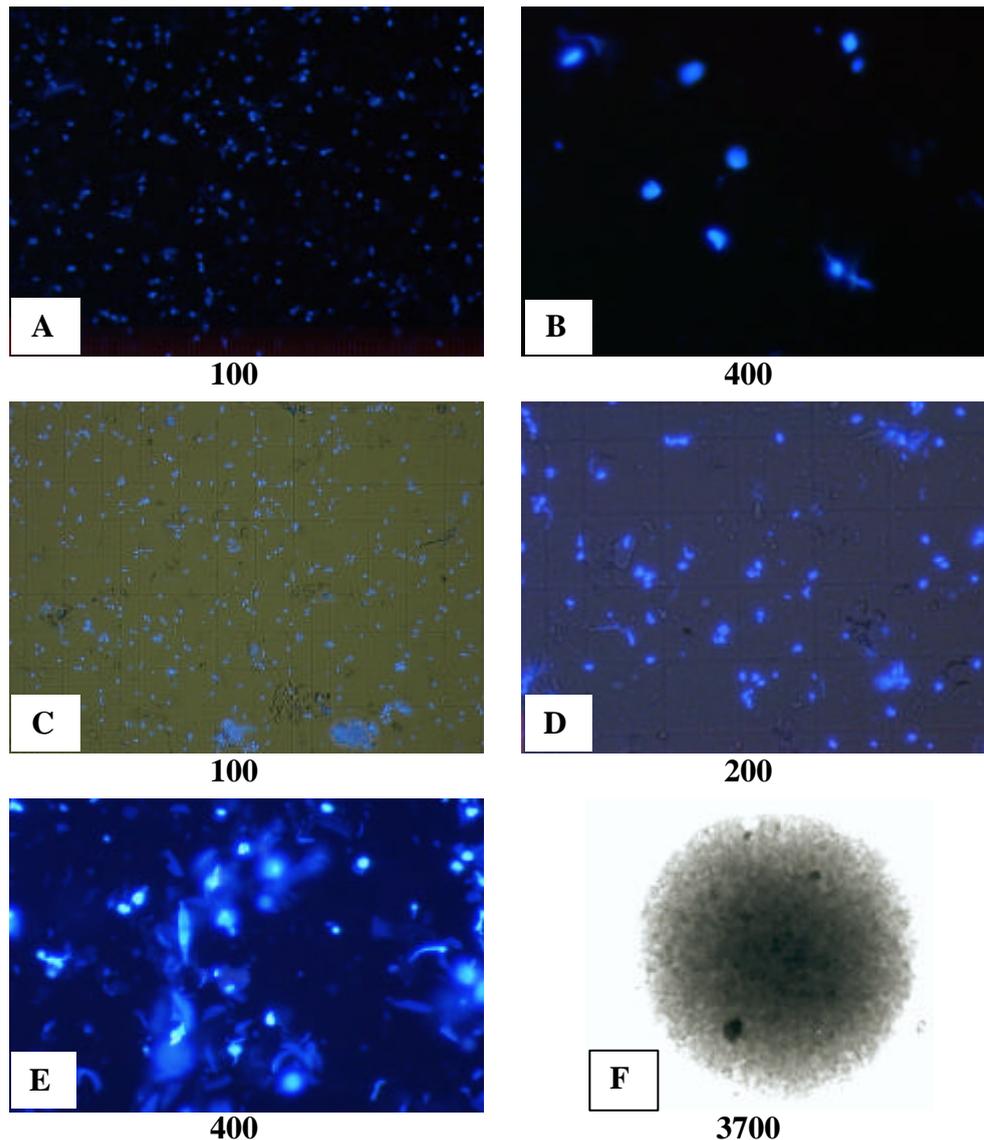


Abbildung 3.2.1.1: Mikroskopie von Kernen aus verschiedenen Kernfraktionen. A bis E sind Bilder von mit DAPI gefärbten Kernen, F ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme. A) und B) Kernfraktionen nach Anregung mit UV-Licht, C) Kernfraktion auf den „Großfeldern“ einer Thomakammer im Hellfeld mit gleichzeitiger UV-Bestrahlung, D) Darstellung eines „Großfeldes“ einer Thomakammer für die Auszählung der Kerne, E) Beispiel einer Kernfraktion mit starken Verunreinigungen, F) Kern nach Negativkontrastierung mit 1 % Osmiumtetroxid und 1 % Siliziumwolframsäure im Elektronenmikroskop. Die jeweilige Vergrößerung ist unter den Bildern angegeben.

Verunreinigungen mit Bruchstücken von Zellorganellen abzureichern (Abbildung 3.2.1.1 E). Ein geringer Grad an Verunreinigungen, die annähernd die gleiche Größe und Dichte wie die Kerne besitzen, ist methodenbedingt nicht zu vermeiden. Sie sind aber für die folgenden Untersuchungen nicht bedeutend.

Die isolierten Zellkerne sind intakt und liegen in der Kernfraktion vereinzelt oder in Aggregaten von wenigen Kernen vor (Abbildung 3.2.1.1 A, B). In Abbildung 3.2.1.1 F ist das Bild eines intakten Kerns dargestellt, dessen Kernmembran vermutlich durch die Fixierung verlorengegangen ist. Nur selten und unregelmäßig kommt es zur Ausbildung von Klumpen an verklebten Zellkernen (Abbildung 3.2.1.1 C, D). Mit einer Thomakammer wurden die Kerne ausgezählt (Abbildung 3.2.1.1 C, D). Im Hellfeld bei gleichzeitiger Anregung des DAPI-Farbstoffs mit UV-Licht werden acht „Großfelder“ (Abbildung 3.2.1.1 C) ausgezählt.

Ausgehend von 20 g Blattmaterial können mit der Methode von COX & GOLDBERG (1988) über den Einsatz eines Percollgradienten (Abbildung 3.2.1.2) Ausbeuten von mindestens 5×10^7 Kernen und bis zu 9×10^7 Kernen erzielt werden. Um Kerne mit einer schnelleren Methode zu isolieren, wurde zusätzlich auf die Methode von KANAZAWA *et al.* (2000) zurückgegriffen. Mit dieser Methode zur Isolierung von Zellkernen werden mit ungefähr $1,5 \times 10^7$ Kernen aus 20 g Pflanzenmaterial allerdings geringere Kernaussbeuten erzielt.

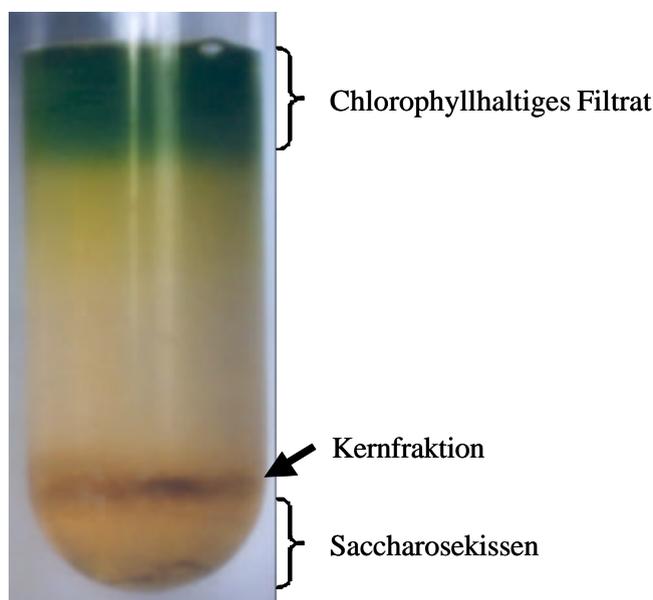


Abbildung 3.2.1.2: Percollgradient nach COX & GOLDBERG (1988) zur Anreicherung der Kerne nach erfolgter Zentrifugation mit der angereicherten Kernfraktion (Pfeil) auf dem Saccharosekissen. Die Schichtung des Gradienten ist nicht mehr erkennbar.

3.2.2 Charakterisierung der isolierten Kerne

Um in den Kernfraktionen nach COX & GOLDBERG (1988) solche Verunreinigungen nachweisen zu können, die im Lichtmikroskop nicht sichtbar sind, wurden aus einer Kernfraktion Proteine isoliert und neben Gesamtproteinen aus Gerstenprimärblättern auf Nylonmembranen immobilisiert und mit Antikörpern immundekoriert, die spezifisch für einzelne Organellenproteine sind. In Abbildung 3.2.2 sind die Ergebnisse der Untersuchungen der Kernfraktion mit diesen Antikörpern dargestellt.

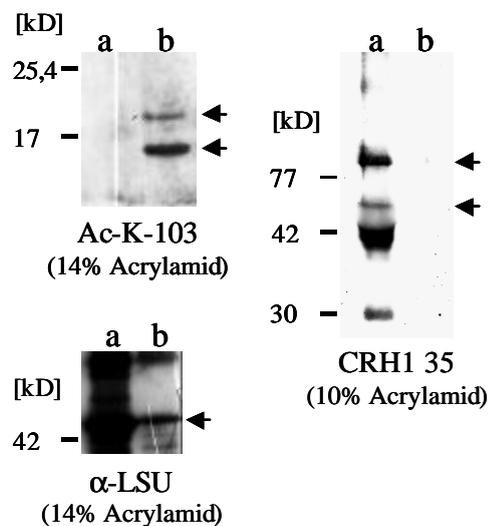


Abbildung 3.2.2: Immundekoration von Proteinen aus Kernfraktionen und in Gesamtproteinextrakten aus Gerstenprimärblättern mit spezifischen Antikörpern: Ac-K-103 = Antikörper gegen Histone (H2A, H2B, H3 und H4), α -LSU = Antikörper gegen die große Untereinheit der Rubisco, CRH1 35 = Antikörper gegen Calreticulin. a = Gesamtproteine aus einem Gerstenprimärblatt, b = Proteine aus der Kernfraktion. Die Pfeile kennzeichnen spezifisch markierte Proteine. Die Konzentration des Trenngels ist unter dem jeweiligen Immunnachweis, die Molekulargewichte eines Proteinstandards sind links angegeben.

Der Antikörper gegen acetylierte Histone (Antikörper Ac-K-103) markiert ausschließlich in der Kernfraktion spezifisch Proteine mit Molekulargewichten von kleiner 20 kD (Abbildung 3.2.2).

Ein Antikörper gegen die große Untereinheit der Rubisco (LSU) markiert das entsprechende Protein mit einer Größe von 50 kD (Pfeil) und einige größere Proteine im Gesamtproteinextrakt, während in der Kernfraktion nur das spezifische Protein markiert wird (Abbildung 3.2.2). Erwartungsgemäß ist die Menge an spezifisch markierter LSU in der Gesamtproteinfraktion größer als im Kernextrakt.

Der Antikörper gegen Calreticulin (CRH1 35) erkennt zwei spezifische Proteine, das Calreticulin mit einer Größe von 59 kD und das Calnexin mit einer Größe von 74 kD (MÖGELSVANG

& SIMPSON 1998). Die beiden Proteine sind nur im Gesamtproteinextrakt neben weiteren unspezifisch markierten Proteinen nachweisbar (Abbildung 3.2.2).

Verunreinigungen durch Mitochondrien konnten nicht überprüft werden, da kein geeigneter Antikörper zur Verfügung stand.

3.2.3 Charakterisierung der Transkriptionsaktivität in isolierten Kernen

Vor der Verwendung der isolierten Zellkerne zur Herstellung von „Run-on“-Transkripten für die Hybridisierung von DNA-„Dot Blot“-Membranen wurde die Transkriptionsaktivität der nukleären RNA-Polymerasen unter verschiedenen Bedingungen und unter Verwendung verschiedener Nukleotide analysiert. Die Bestimmung der Transkriptionsaktivität erfolgte dabei über die Messung eines in die synthetisierten Transkripte eingebauten radioaktiven Nukleotids.

Die ersten Versuche zur Bestimmung der Transkriptionsaktivität durch „Run-on“-Transkriptionsexperimente erfolgten bei 30°C für 30 min. Der durchschnittliche Einbau des radioaktiv markierten α -³²P-CTP lag bei 8,7 %. Dieser Standardansatz wurde systematisch verändert, um den Einfluß unterschiedlicher Behandlungen der Kerne vor oder nach dem eigentlichen „Run-on“-Transkriptionsexperiment auf die Einbaurrate zu testen.

Die einzelnen Versuche wurden mit bis zu 10 Wiederholungen durchgeführt und aus den Einzelwerten der verschiedenen Wiederholungen wurde der Mittelwert für den Einbau des Radionukleotids ermittelt (Tabelle 3.2.3.1).

Tabelle 3.2.3.1: Verschiedene Behandlungen der Kerne vor und nach den „Run-on“-Experimenten und deren Einflüsse auf die Transkriptionsaktivität. Für Einzelheiten der Versuchsbedingungen siehe Tabelle 2.8.6. Die verwendete DNase I war RNase-frei.

<i>Behandlung</i>	<i>Transkriptionsaktivität in Relation zum Standardansatz</i>
Unmodifiziert	100 %
Hitzenaturierung	0,2 %
Kälteschock	97 %
RNase A, nachher	16,7 %
DNase I, vorher	3,3 %
DNase I, nachher	73,3 %
Proteinase K, vorher	14,1 %
Proteinase K, nachher	177 %

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, daß eine Hitzebehandlung der Kernfraktion den Einbau des radioaktiv markierten α -³²P-CTP durch eine irreversible Hitzedenaturierung des Transkriptionsapparates um annähernd 100 % verringert, während eine Kälteschockbehandlung mit flüssigem Stickstoff nur eine geringe Reduktion des Einbaus bewirkt. Eine Behandlung der Kernfraktion mit RNase hat erwartungsgemäß eine drastische Reduktion des Einbaus um knapp 83 % zur Folge, da die synthetisierte RNA abgebaut wird. Eine Behandlung der Kernfraktion mit DNase I vor dem „Run-on“-Experiment führt zu einer Verringerung der Einbau-rate auf 3,3 %; die gleiche Behandlung nach der Transkription hat mit einer Verringerung des Einbaus auf 73 % nur einen geringfügigen Effekt, da die bereits gebildete RNA von der DNase I nicht angegriffen wird. Eine Behandlung der Kernfraktion mit Proteinase K vor der Transkription bewirkt eine Reduktion des Einbaus auf 14 %, während die gleiche Behandlung nach der Transkription einen Zuwachs der meßbaren eingebauten Radioaktivität um 77 % verursacht. Diese Zunahme beruht vermutlich auf dem Abbau von Proteinstrukturen wie der Kernmembran, durch die mehr Radioaktivität als in der Kontrolle freisetzt wird.

Um zu überprüfen, ob die Kernfraktion mit RNA-Polymerasen aus Chloroplasten oder Mitochondrien verunreinigt ist, wurde der Einbau von Radionukleotiden in die Transkripte in Gegenwart von Hemmstoffen der eukaryotischen und prokaryotischen Transkription ermittelt (Tabelle 3.2.3.2).

Tabelle 3.2.3.2: Transkriptionsaktivität der Kernfraktionen in Gegenwart von verschiedenen Transkriptionshemmstoffen (α -Amanitin = Hemmstoff der eukaryotischen Transkription, Rifampicin = Hemmstoff der prokaryotischen Transkriptionsinitiation, Streptolydigin = Hemmung der prokaryotischen Transkriptionselongation).

<i>Hemmstoff</i>	<i>Reduktion der Transkriptionsaktivität</i>
α -Amanitin [0,025 μ g / μ l]	92,6 %
α -Amanitin [0,05 μ g / μ l]	91,7 %
α -Amanitin [0,0125 μ g / μ l]	91,9 %
Rifampicin [100 μ g/ml]	1,1 %
Streptolydigin [100 μ g/ml]	0 %

Bei Behandlung der Kernfraktion mit α -Amanitin, einem Hemmstoff der eukaryotischen Transkription, reduziert sich der Einbau um über 90 % gegenüber einer Kontrolle, die keinen Hemmstoff enthält. Hierbei ist die Konzentration des Hemmstoffs, der hauptsächlich die Aktivität der RNA-Polymerase II im Kern, bei hohen Konzentrationen aber auch die RNA-Poly-

merase III hemmt, im eingesetzten Bereich unerheblich für die Wirkung des Hemmstoffs. Weiterhin wurden zwei Hemmstoffe der prokaryotischen Transkription getestet. Rifampicin hemmt die Transkription der Prokaryoten durch Unterbindung der Transkriptionsinitiation. Die Transkriptionsaktivität in der Kernfraktion wird durch diesen Hemmstoff mit einer Abnahme um 1 % erwartungsgemäß kaum beeinflusst. Ähnlich verhält es sich mit Streptolydigin, einem Hemmstoff, der die Elongation der Transkripte in Prokaryoten unterbindet, aber keinen Einfluß auf die Transkriptionsinitiation besitzt. Dieser Hemmstoff hat keinen Einfluß auf die Transkriptionsaktivität der Kernfraktion (Tabelle 3.2.3.2).

3.2.4 Verwendung von modifizierten Nukleotiden zur Markierung neu synthetisierter RNA

Für die Markierung von „Run-on“-Transkripten bieten sich neben der Nutzung von Radionukleotiden auch andere modifizierte Nukleotide an. Diese Nukleotide unterscheiden sich von den in dieser Arbeit verwendeten Radionukleotiden α -³²P-CTP und α -³²P-UTP im Molekulargewicht und in der Position der Markierung am Nukleotid (Abbildung 2.8.6.1 und 2.8.6.2). Das Molekulargewicht der Nukleotide wird als einfach bestimmbarer Faktor für einen Vergleich der Nukleotide verwendet, auch wenn er keine Rückschlüsse auf die sterische Konformation der Nukleotide zuläßt. Der Einsatz von nichtradioaktiven Markierungen ist nur dann eine Alternative zur radioaktiven Markierung, wenn damit keine deutliche Erniedrigung der Aktivität der RNA-Polymerasen während der „Run-on“-Transkription einhergeht.

Für die Bestimmung der Transkriptionsaktivität in isolierten Zellkernen wurden zuerst Transkriptionsansätze untersucht, bei denen zur Markierung der Transkripte nur die standardmäßig verwendeten radioaktiv markierten Nukleotide angeboten wurden. Die Einbauraten der Kerne in diesen Ansätzen, die ca. 9 % beträgt, diente als Vergleichswert für die Einbauraten bei Verwendung anderer Nukleotide.

Im Anschluß wurde die Transkriptionsaktivität der RNA-Polymerasen in Anwesenheit der verschiedenen nichtradioaktiv markierten Nukleotide getestet. Diese Tests fanden bei gleichzeitiger Anwesenheit eines radioaktiv markierten Nukleotids statt (Tabelle 3.2.4), dessen Konzentration sich nicht von der des Standardansatzes unterschied. Wird während der „Run-on“-Transkription die Aktivität der RNA-Polymerasen durch sterische Probleme beim Einbau

Tabelle 3.2.4: Einbaueffizienz bei Verwendung verschiedener Kombinationen von nichtradioaktiv und radioaktiv markierten Nukleotiden. Bezugspunkt für die Molekülgröße und die Einbaurrate sind die entsprechenden Werte von α - P^{32} -CTP und α - P^{32} -UTP.

Nukleotid	Zweitmarkierung	Molekulargewicht	Einbaueffizienz
α - P^{32} -NTP	-	100%	100 %
Biotin-14-Cytosin-5'-triphosphat	α - P^{32} -UTP	190,4 %	77,2 %
Aminoallyl-Uridin-5'-triphosphat	α - P^{32} -CTP	111,4 %	55,8 %
5-Bromouridin-5'-triphosphat	α - P^{32} -CTP	107,2 %	129 %
Biotin-16-Uridin-5'-triphosphat	α - P^{32} -CTP	203,9 %	53,9 %
ChromaTide™ Alexa Fluor® 488-5-Uridin-5'-triphosphat	α - P^{32} -CTP	225,1 %	62,3 %
Digoxigenin-11-Uridin-5'-triphosphat	α - P^{32} -CTP	228,6 %	41,4 %
4-Thiouridin-5'-triphosphat	α - P^{32} -CTP	103,3 %	60,5 %

des zu testenden modifizierten Nukleotids reduziert, so ist auch eine Verringerung im Einbau von radioaktiven Nukleotiden in die synthetisierten Transkripte zu erwarten. Diese Veränderungen im Einbau sind in Tabelle 3.2.4 in Relation zu den Standardansätzen dargestellt.

Abgesehen vom 5-Bromo-Uridin-5'-triphosphat, das den Einbau um 29 % erhöht, wird der Einbau in Anwesenheit von modifizierten nichtradioaktiv markierten Nukleotide in unterschiedlichem Maße reduziert (Abbildung 3.2.4). Die geringste Abnahme der Einbaurrate liegt bei knapp 23 % (Biotin-14-Cytosin-5'-triphosphat), die höchste im Bereich von 59 % bei Verwendung des Digoxigenin-11-Uridin-5'-triphosphats. Die Mehrheit der untersuchten Nukleotide verringert die Einbaurrate um etwa 38 bis 46 %. Das ChromaTide™ Alexa Fluor® 488-5-Uridin-5'-triphosphat als einziges verwendetes fluoreszenzmarkiertes Nukleotid reduziert die Transkriptionsaktivität der RNA-Polymerasen um 38 %, das Aminoallyl-Uridin-5'-triphosphats als mögliche Vorstufe für eine Fluoreszenzmarkierung um 44 %.

Entgegen erster Annahmen konnte kein Zusammenhang zwischen der Zunahme der Molekülgröße der angebotenen modifizierten Nukleotide und einer Abnahme der Einbauaktivität während der „Run-on“-Transkription festgestellt werden (Abbildung 3.2.4). Bei der Betrachtung der Zunahme des Molekulargewichts wird das Molekulargewicht des α - P^{32} -CTP und -UTP als Referenz verwendet. Bei zwei der kleineren eingesetzten Nukleotide, Aminoallyl-Uridin-

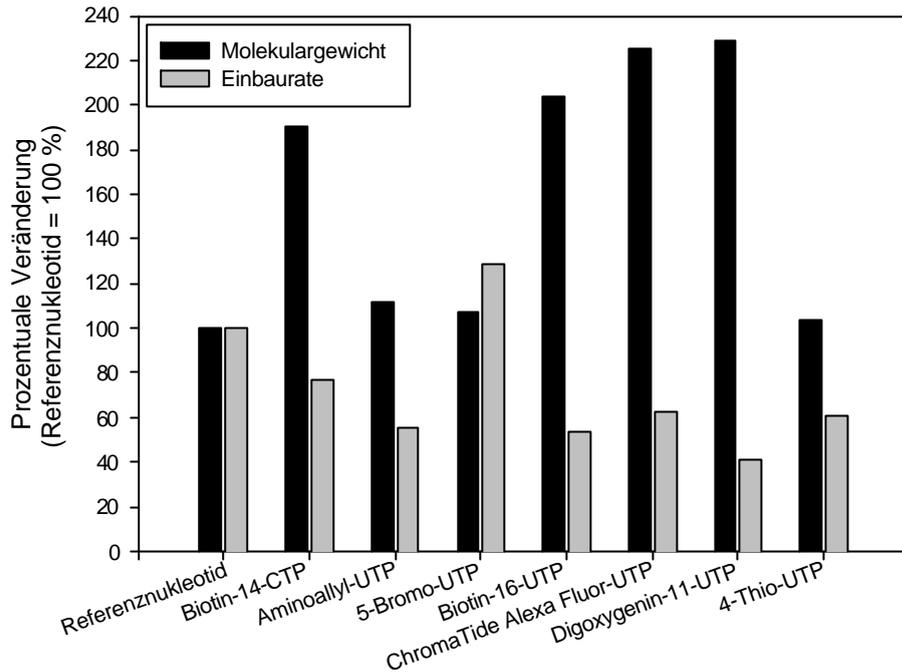


Abbildung 3.2.4: Prozentuale Einbaurate isolierter Kerne bei Verwendung verschiedener nichtradioaktiv markierter Nucleotide und Darstellung des Molekulargewichts dieser Nucleotide im Vergleich zu den im Standardansatz (= 100%) verwendeten radioaktiv markierten Referenznucleotiden α - 32 P-CTP und α - 32 P-UTP. Alle Nucleotide sind Cytosin- oder Uridin-5'-triphosphate.

5'-triphosphat mit einem um 11,4 % vergrößerten und 4-Thiouridin-5'-triphosphat mit einem um 3,3 % vergrößerten Molekulargewicht, wird die Einbaurate um 40 % bzw. 44 % reduziert. Demgegenüber stehen die größeren Nucleotide Biotin-14-Cytosin-5'-triphosphat (+90,4 % Molekulargewicht) und ChromaTide™ Alexa Fluor® 488-5-Uridin-5'-triphosphat (+125 % Molekulargewicht), die beide die Aktivität der RNA-Polymerase um 23 % bzw. 38 % reduzieren. Auch beinahe gleich große Nucleotide haben einen unterschiedlichen Einfluß auf die Einbauaktivität. Das Biotin-16-Uridin-5'-triphosphat verringert die Einbaurate um 46 % und somit doppelt so stark wie das etwa gleich große Biotin-14-Cytosin-5'-triphosphat mit 23 %. Bei den beiden größten Nucleotiden, dem Digoxigenin-11-Uridin-5'-triphosphat (+129 % Molekulargewicht) und dem ChromaTide™ Alexa Fluor® 488-5-Uridin-5'-triphosphat (+125% Molekulargewicht), weichen die Werte für die Aktivitätsabnahme 59 % bzw. 38 % relativ zum Referenzwert um knapp 20 % voneinander ab.

3.2.5 Optimierung der „Run-on“-Transkriptionsbedingungen

Für die Durchführung der „Run-on“-Transkriptionsexperimente wurden zunächst die Inkubationsbedingungen gewählt, die von KRAUSE (1999) für „Run-on“-Experimente mit isolierten Plastiden verwendet wurden (6 min, 25°C). Ausschließlich die Inkubationsdauer (30 min) und -temperatur (30°C) wurde in Anlehnung an die Arbeiten von LUTHE & QUATRANO (1980b), MANSFIELD & RAIKHEL (1990), FEJES *et al.* (1990) und DEROCHER & BOHNERT (1993) variiert.

Tabelle 3.2.5.1: Einfluß der Inkubationstemperatur auf die Transkriptionsaktivität isolierter Kerne. Die Werte sind Mittelwerte aus je drei Einzelmessungen mit Angabe der Standardabweichung.

<i>Parameter</i>	<i>Einbau [%]</i>	<i>Standardabweichung [%]</i>
25°C Inkubationstemperatur	4,22	1,33
30°C Inkubationstemperatur	7,26	2,13

In einer späteren Phase dieser Arbeit wurden die Inkubationsbedingungen für „Run-on“-Transkriptionsexperimente mit isolierten Kernen weiter optimiert. Dazu wurden neben der Inkubationstemperatur (Tabelle 3.2.5.1) und Inkubationsdauer (Tabelle 3.2.5.2) die Konzentrationen der unmarkierten Nukleotide ATP, GTP und UTP verändert (Tabelle 3.2.5.3).

Tabelle 3.2.5.2: Einfluß der Inkubationsdauer auf die Transkriptionsaktivität isolierter Kerne. Die Werte sind Mittelwerte aus je drei Einzelmessungen mit Angabe der Standardabweichung.

<i>Parameter</i>	<i>Einbau [%]</i>	<i>Standardabweichung [%]</i>
5 min Inkubation	2,93	1,01
10 min Inkubation	5,78	1,41
20 min Inkubation	5,31	1,3
30 min Inkubation	6,96	1,44
60 min Inkubation	7,45	1,26
90 min Inkubation	10,67	0,77

Es zeigte sich, daß bei einer Erhöhung der Inkubationstemperatur von 25°C auf 30°C die Transkriptionsaktivität beinahe doppelt so hoch ist (Tabelle 3.2.5.1). Eine Inkubationstemperatur von 25°C entspricht der Inkubationstemperatur nach KRAUSE (1999) für Plastiden, die allerdings von SHEU *et al.* (1994), HAHN *et al.* (1996) und WINICOV & KRISHNAN (1996) auch

für „Run-on“-Transkriptionsexperimente mit isolierten Kernen verwendet wird, während verschiedene Autoren (LUTHE & QUATRANO 1980b, MANSFIELD & RAIKHEL 1990, FEJES *et al.* 1990, DEROCHER & BOHNERT 1993) als Inkubationstemperatur 30°C bevorzugen.

Die Inkubationsdauer für „Run-on“-Transkriptionsexperimente mit Plastiden beträgt 6 Minuten (KRAUSE 1999), während bei der Untersuchung von Kernen eine stetige Zunahme der Inkubationsdauer bis auf 90 min mit einer Erhöhung der Einbaurate einhergeht (Tabelle 3.2.5.2). Da es bei zu langen Inkubationszeiten zu Abbauprozessen kommen kann, werden bei Standardansätzen Inkubationen von 45 min durchgeführt.

125 µM unmarkierte Nukleotide (ATP, GTP und UTP) im Transkriptionsansatz entsprechen der Konzentration, die KRAUSE (1999) für Plastiden verwendet. Für „Run-on“-Transkriptionsexperimente mit Kernen wird am häufigsten eine Nukleotidkonzentration von 500 µM verwendet (YI *et al.* 1999, FENNOY & BAILEY-SERRES 1995, MANSFIELD & RAIKHEL 1990, FEJES *et al.* 1990, LU *et al.* 1990, MÖSINGER & SCHÄFER 1984), aber auch Konzentrationen von 325 µM (HELD *et al.* 1997) bis 1 mM (SHEU *et al.* 1994) sind beschrieben. In dieser Arbeit wurde an einer Kernfraktion der Einfluß verschiedener Konzentrationen von unmarkierten Nukleotiden auf die Einbaurate untersucht (Tabelle 3.2.5.3).

Tabelle 3.2.5.3: Abhängigkeit der Einbaurate von der Konzentration an unmarkierten Nukleotiden. Die Werte sind Mittelwerte aus je drei Einzelmessungen mit Angabe der Standardabweichung.

<i>Parameter</i>	<i>Einbau [%]</i>	<i>Standardabweichung [%]</i>
0 µM ATP, GTP, UTP	0,1	0,003
125 µM ATP, GTP, UTP	10,6	1,9
250 µM ATP, GTP, UTP	5,5	0,2
375 µM ATP, GTP, UTP	4,1	0,7
500 µM ATP, GTP, UTP	4,1	0,9

Mit einer Konzentration von 125 µM für die unmarkierten Nukleotide ATP, GTP und UTP werden sowohl bei Plastiden- als auch bei Kern- „Run-on“-Transkriptionsexperimenten die besten Einbauraten erzielt. Eine weitere Erhöhung der Nukleotidkonzentration führt zu einer Abnahme der Einbaueffizienz. Bei einer Nukleotidkonzentration von 250 µM liegt die Einbaurate knapp 50 % unter der Einbaurate, die mit einer Nukleotidkonzentration von 125 µM erzielt werden kann. Bei einer Erhöhung der Nukleotidkonzentration erniedrigt sich die Ein-

baurate, verändert sich ab 375 μM aber nicht mehr weiter. In Reaktionsansätzen, die neben dem radioaktiv markiertem CTP keine weiteren Nukleotide (0 μM ATP, GTP und UTP) enthalten, ist eine geringe Transkriptionsaktivität nachweisbar.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde für die Durchführung der „Run-on“-Experimente mit isolierten Kernen und anschließender Hybridisierung der Transkripte schließlich standardmäßig eine Inkubationstemperatur von 30°C, eine Inkubationsdauer von 45 min wie bei FEJES *et al.* (1990) und eine Konzentration von 125 μM an unmarkierten Nukleotiden gewählt. Lediglich die oben dargestellten Untersuchungen zur Bestimmung der Transkriptionsaktivität isolierter Kernfraktionen ohne Hybridisierung der Transkripte wurden mit einer Inkubationsdauer von 30 min bei sonst identischen Bedingungen durchgeführt.

3.2.6 Aufreinigung der Transkripte

Um die Transkription der untersuchten Gene zu analysieren, wurden die während der „Run-on“-Transkription radioaktiv markierten Transkripte zur Hybridisierung von DNA-„Dot Blot“-Membranen mit immobilisierten DNA-Fragmenten verwendet.

Während bei „Run-on“-Transkriptionsexperimenten mit Plastiden der Transkriptionsansatz nach Beendigung der Inkubation ausschließlich durch eine Gelfiltration aufgereinigt und danach direkt zur Hybridisierungslösung gegeben werden kann (KRAUSE 1999), sind bei der Verwendung von Kernen die gebildeten Transkripte im Anschluß an die Inkubation aus dem Ansatz zu extrahieren (LUTHE & QUATRANO 1980b).

Der Einfluß einer Transkriptextraktion auf das Hybridisierungsergebnis wurde anhand von zwei kleinen Testmembranen untersucht. Auf die Membranen wurden Verdünnungsreihen von vier verschiedenen Plasmiden aufgetragen, die die Gene für zwei kernkodierte Proteine (Actin und *rbcs*), für eine plastidär kodierte RNA (16S-rRNA) und für die mitochondrial kodierte Untereinheit II der Cytochrom-Oxidase (CoxII) repräsentierten. Die Verdünnungsreihen bestehen aus 6 Konzentrationen, die sich jeweils um den Faktor 4 erhöhen (1,5/6,25/25/100/400/1600 fmol). Es wurden parallel zwei „Run-on“-Transkriptionen mit isolierten Kernen durchgeführt und nach Abschluß der Inkubation die RNA aus einem der Ansätze durch eine TRIZOL™-Präparation isoliert. Der zweite Ansatz wurde unverändert bei 4°C gelagert. Beide Ansätze wurden durch eine Gelfiltration aufgereinigt und zur Hybridisierung der

Testmembranen verwendet. Beide Testmembranen wurden gleichermaßen hybridisiert, gewaschen und ausgewertet (Abbildung 3.2.6).

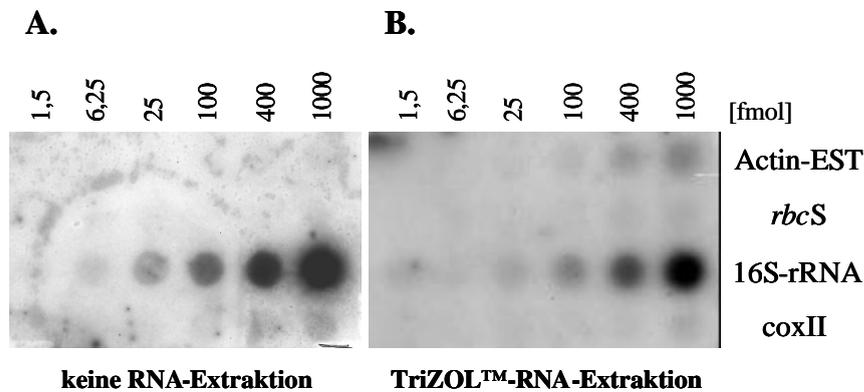


Abbildung 3.2.6: Vergleich der Hybridisierungsmuster bei unterschiedlicher Isolierung der Transkripte aus den Kernen im „Run-on“-Transkriptionsansatz. Hybridisierungsmuster von Testmembranen nach Hybridisierung mit einem unbehandeltem „Run-on“-Ansatz (A.) und der extrahierten RNA eines „Run-on“-Ansatzes (B.). Die Zahlen über den Membranen geben die Plasmidkonzentration in fmol an.

Während die nicht im Kern kodierten Gene für die 16S-rRNA aus dem Chloroplasten und die Untereinheit II der Cytochrom-Oxidase (CoxII) aus dem Mitochondrium auch ohne Extraktion der Kerne starke Signale ergeben (Abbildung 3.2.6 A), sind die Transkripte der aufgetragenen Kerngene für Actin und *rbcS* erst nach der Extraktion nachweisbar (Abbildung 3.2.6 B).

3.3 Densitometrie und Auswertung

Die durch Hybridisierung der DNA-„Dot Blot“-Membranen mit „Run-on“-Transkripten (3.4.3 und 3.5.3) oder mit radioaktiv markierter cDNA (3.4.4 und 3.5.4) erhaltenen Signale können mit Hilfe einer Bildplatte („Imaging Plate“, Fuji) im „BioImager“ als digitales Bild und nachfolgend auf Röntgenfilmen als Autoradiogramm dokumentiert werden.

Die im „BioImager“ von den Bildplatten ausgelesenen Hybridisierungssignale werden in digitale Signale umgewandelt. Diese Digitalisierung erlaubt die densitometrische Auswertung der Signale mit Unterstützung der entsprechenden Software, die eine Unterscheidung von bis zu 65.556 Graustufen ermöglicht.

3.3.1 Detektionsbereich des „BioImager“

Bei der Exponierung einer Bildplatte mit einer hybridisierten Membran regt die β -Strahlung der hybridisierten radioaktiv markierten Sonde im Innern der „Imaging Plate“ Elektronen an, die in Fluorohalidkristallen als angeregter metastabiler Zustand festgehalten werden. Durch Bestrahlung mit einem Laser im „BioImager“ werden die angeregten Elektronen in ihren Grundzustand entlassen und strahlen ihre Energie als Licht ab, das vom Gerät in ein digitales Abbild der radioaktiven Strahlung auf der Membran umgewandelt wird.

Für eine reproduzierbare Auswertung der Signale ist es wichtig, daß die Umwandlung der radioaktiven Strahlung in ein digitales Signal einer linearen Gesetzmäßigkeit folgt. Schwache radioaktive Strahlung darf nur ein schwaches digitales Signal erzeugen und die Stärke des digitalen Signals muß im Detektionsbereich des „BioImager“-Geräts linear mit der Menge an Radioaktivität zunehmen. Nur unter dieser Voraussetzung kann von den numerischen Werten der Signalstärke zuverlässig auf die radioaktive Strahlung auf den Membranen geschlossen werden. Um die Linearität bei der Umwandlung der radioaktiven Strahlung auf einer Membran in detektierbare Signale auf einer Bildplatte zu prüfen, wurde eine ansteigende Reihe von

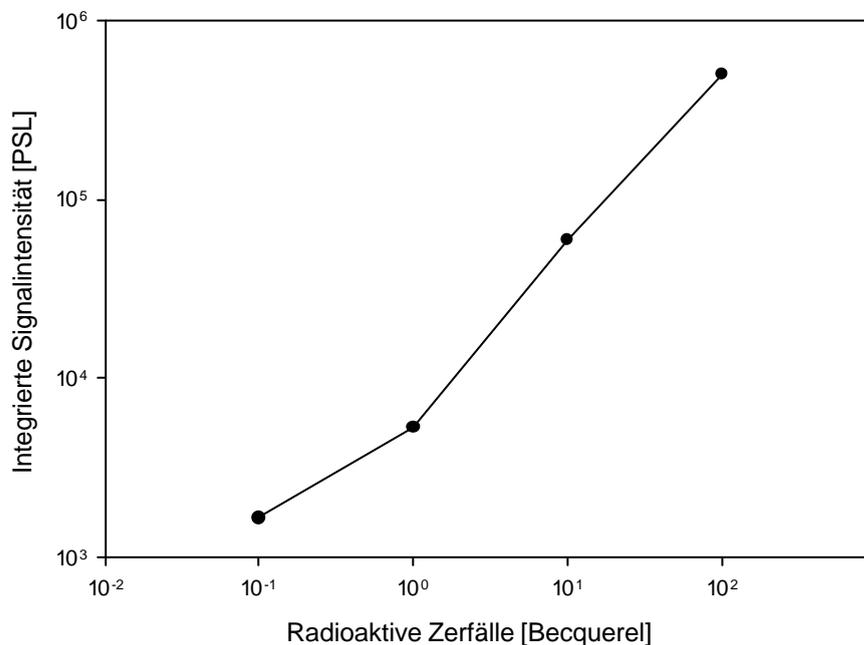


Abbildung 3.3.1: Darstellung der digitalen Signalstärken in Abhängigkeit von der Konzentration des α - ^{32}P -CTP auf einer Membran nach densitometrischer Auswertung mit dem „BioImager“. PSL („photo-stimulated luminescence“) ist das gerätespezifische Maß für die Signalintensität.

verdünntem α - ^{32}P -CTP in der Größenordnung von 10^{-7} bis 10^2 Becquerel auf eine Membran aufgetragen. Nach Exponierung mit einer Bildplatte wurden die Signalintensitäten als „photo-stimulated luminescence“ (PSL) über einer Fläche von $22,6 \text{ mm}^2$ über den Signalen integriert und in bezug zur aufgetragenen Becquerelmenge gesetzt (Abbildung 3.3.1).

Auch nach einer Expositionszeit von 20 h sind bei Verdünnungen bis zur Größenordnung von 10^{-1} Bq keine Signale detektierbar. Im meßbaren Bereich von 1 bis 100 Bq verläuft der Anstieg der detektierten Signalintensität linear zur Zunahme der Radioaktivität auf der Membran.

3.3.2 Korrelation zwischen der Signalstärke des „BioImagers“ und der Plasmidkonzentration auf den DNA-„Dot Blot“-Membranen

In Anlehnung an DENG *et al.* (1987) wurden jeweils drei Verdünnungen einer Plasmid-DNA, die ein Gen oder Genfragment enthält, auf einer DNA-„Dot Blot“-Membran immobilisiert. Für die visuelle Quantifizierung der Autoradiogramme sind mehrere Verdünnungen nützlich, da bei sehr starker Schwärzung des „Dots“ mit der höchsten DNA-Konzentration auf nächstniedrigere Konzentrationen ausgewichen werden kann. Bei einer Verwendung des „Bio-Imager“ ist zunächst zu prüfen, ob sich die Stärke der einzelnen Hybridisierungssignale in linearer Abhängigkeit von der zugehörigen Plasmidkonzentration verändert.

Für Testzwecke wurden Plasmide mit der DNA von zwei verschiedenen Genen (Ubiquitin I und Cytokininoxidase) in jeweils 8 Konzentrationen im Bereich von 7,5 bis 1000 fmol auf einer Membran immobilisiert und mit „Run-on“-Transkripten aus Kernen hybridisiert. Die Intensitäten der Hybridisierungssignale wurden mit Hilfe des „BioImagers“ ausgewertet und als „photo-stimulated luminescence“ (PSL) angegeben. Diese Werte wurden im Verhältnis zur Konzentration der Plasmide betrachtet (Abbildung 3.3.2).

Beim Vergleich der Verdünnungsreihen der beiden Plasmide zeigen sich beim Ubiquitin I deutlich höhere Signalintensitäten (Abbildung 3.3.2). In der Hybridisierungslösung befanden sich folglich mehr Ubiquitin-Transkripte, die eine durchgehend stärkere Hybridisierung und somit ein stärkeres Signal bei den aufgetragenen Ubiquitin-Plasmiden verursachten. Der Kurvenverlauf ist bei beiden Plasmiden fast identisch. Der Anstieg der Kurve verläuft bis zur Konzentration von 250 fmol (Pfeil in Abbildung 3.3.2) annähernd linear und nähert sich da-

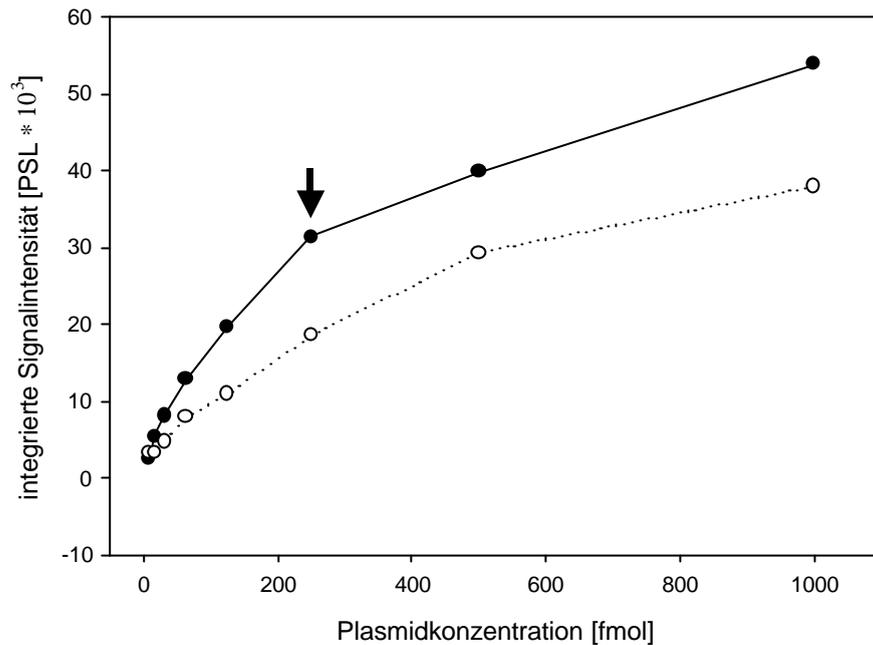


Abbildung 3.3.2: Abhängigkeit der integrierten Signalintensität von der Konzentration der Plasmide, die die Gene Ubiquitin I (schwarz) und Cytokinin oxidase (weiß) repräsentieren, nach Hybridisierung mit Kern-„Run-on“-Transkripten und Auswertung im „BioImager“. Der Pfeil kennzeichnet die 250 fmol-Konzentration.

nach dem Verlauf einer Sättigungskurve an. Dieser Kurvenverlauf zeigt, daß die Signalintensität ab einer Konzentration von 250 fmol nicht mehr linear mit der Zunahme der Plasmidkonzentration ansteigt. Daher können für die densitometrische Auswertung nur Konzentrationen bis zur Größenordnung von 250 fmol ausgewertet und die auf den Membranen ebenfalls aufgetragenen Plasmidkonzentrationen von 1000 und 4000fmol dementsprechend bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden.

3.3.3 Korrelation zwischen der Signalstärke des „BioImagers“ und der Sondenkonzentration in der Hybridisierungslösung

Um die Hybridisierungssignale im „BioImager“ über ihre Signalintensitäten auswerten zu können, ist ein linearer Zusammenhang zwischen der Stärke der Hybridisierungssignale und der Menge an radioaktiv markierten Transkripten in der Hybridisierungslösung Voraussetzung. Bei einer linearen Abhängigkeit der beiden Faktoren voneinander sollte eine gesteigerte Transkriptkonzentration zu einer entsprechend erhöhten Signalintensität führen.

Um zu überprüfen, ob die Signalintensität nach Hybridisierung von „Run-on“-Transkripten mit DNA-„Dot Blot“-Membranen linear von der Transkriptmenge abhängt, wurden drei gleiche DNA-Filter mit unterschiedlichen Transkriptmengen der gleichen Sonde hybridisiert. Die

Abhängigkeit der Signalintensität (PSL) vom Transkriptgehalt in der Hybridisierungslösung ist für das Beispiel des ubiquitinspezifischen Plasmids in Abbildung 3.3.3 dargestellt.

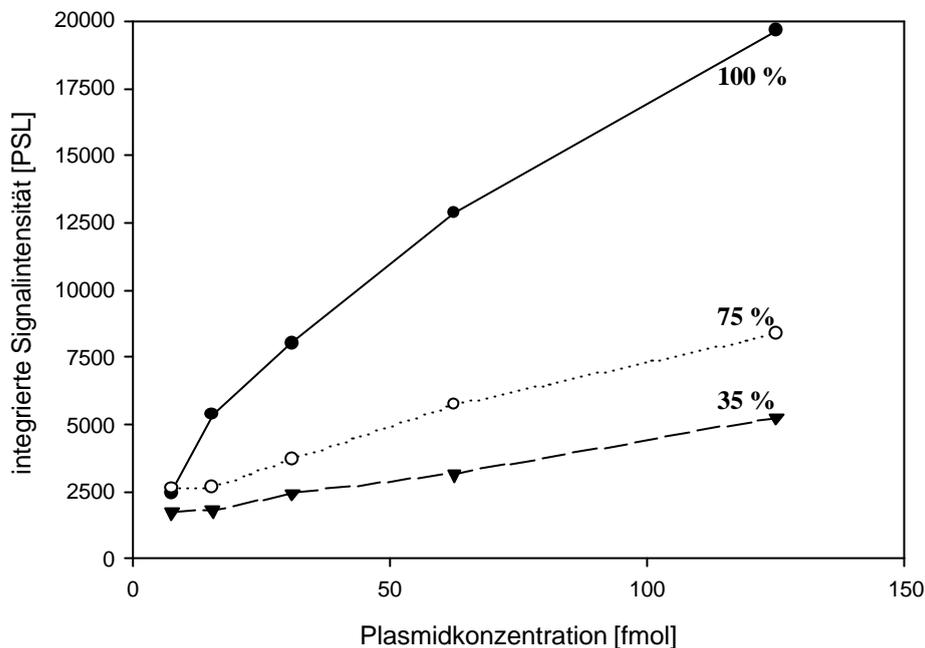


Abbildung 3.3.3: Integrierte Signalintensität in Abhängigkeit von der Plasmidkonzentration nach Hybridisierung mit drei verschiedenen Mengen von markierten Transkripten in der Hybridisierungslösung am Beispiel des ubiquitinspezifischen Plasmids. Jede Kurve repräsentiert ein individuelles Hybridisierungsexperiment. Die Prozentzahlen geben die relative Menge an Radioaktivität in der Hybridisierungslösung an.

Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigen, daß die Signalintensität keine lineare Korrelation mit der Menge der Transkripte in der Hybridisierungslösung aufweist (Abbildung 3.3.3). Eine Zunahme der Transkriptmenge verursacht zwar stärkere Hybridisierungssignale, die Steigerung folgt aber keiner erkennbaren mathematischen Gesetzmäßigkeit. Um die Ergebnisse der verschiedenen Hybridisierungsansätze dennoch miteinander vergleichen zu können, ist eine Normalisierung der Signalintensitäten notwendig.

3.3.4 Optimierung der densitometrischen Auswertung von Hybridisierungssignalen am „BioImager“

Bei der Auswertung der Hybridisierungssignale im „BioImager“ wird eine Signalfäche auf der Membran definiert, über die der Computer die Signalintensität integriert. Der resultierende Wert repräsentiert die Summe der Graustufen aller Pixel in der definierten Fläche. Dieser Wert wird in jedem Experiment vom Hintergrundsignal beeinflusst, dessen Intensität von Ex-

periment zu Experiment schwankt. Es ist daher nicht erlaubt, Signalwerte aus verschiedenen Hybridisierungen direkt miteinander zu vergleichen. Die im folgenden dargestellten Auswertungsmodi wurden daraufhin getestet, um die Werte von verschiedenen Hybridisierungen vergleichen zu können.

Als Beispiel zur Optimierung der Auswertung wurden die in Abbildung 3.3.3 gezeigten Ergebnisse der Hybridisierung von drei gleichen Membranen mit verschiedenen Mengen an radioaktiver Transkriptsonde in der Hybridisierungslösung verwendet. Auf diesen Membranen wurden nun verschiedene Signale verglichen. Da nur die absolute Menge der Transkripte in der Hybridisierungslösung und nicht die Zusammensetzung der Transkripte variierte, sollten sich bei Anwendung eines geeigneten Auswertungsmodus bei dem Vergleich der verschiedenen Signale auf einer Membran die gleichen Verhältnisse zu einem gewählten Bezugspunkt ergeben. Bei einer Steigerung der Radioaktivitätsmenge in der Hybridisierungslösung sollten die Werte für die Probe und für den Hintergrund gleichförmig ansteigen, so daß das Verhältnis von Signal und Hintergrund bei den drei Versuchen gleich sein sollte. Eine grafische Darstellung der auf das Hintergrundsignal bezogenen Signalintensitäten aus den drei verschiedenen Hybridisierungen sollte dann theoretisch zu einer einzigen Kurve führen.

Im ersten Auswertungsmodus wird pro Membran ein interner Standard definiert, dessen relative Signalintensität sich idealerweise bei allen Versuchsbedingungen nicht ändern sollte. Als Standard bieten sich konstitutiv exprimierte Gene an. Unter der Voraussetzung einer konstitutiven Transkription des als Standard verwendeten Gens sollten sich die Signalintensitäten der anderen untersuchten Gene mit veränderter Transkription auf dessen Signalintensität beziehen lassen, d.h. relative Veränderungen werden in bezug auf die Intensität des Standards ausgewertet. Für die Versuche in dieser Arbeit stand jedoch kein geeignetes Gen zur Verfügung, das unter allen untersuchten Bedingungen konstitutiv transkribiert wird. Es wurde daher auf die Plasmide pUC18 oder pBluescriptII (pBsc) zurückgegriffen, die als Vektoren für die Klonierung der meisten untersuchten Gene bzw. cDNA-Fragmente verwendet wurden. Hybridisierungssignale bei diesen Plasmiden repräsentieren keine vektorspezifischen Transkripte, da die Plasmide in Kernextrakten nicht transkribiert werden; sie sind vielmehr ein Maß für den Hintergrund der Hybridisierung.

Im ersten Auswertungsmodus werden die Signalintensitäten der in verschiedenen Konzentrationen auf der Membran aufgetragenen Plasmide auf das Signal eines Vektors bezogen. Das Verhältnis zwischen der Signalintensität von Ubiquitin I und dem pBsc-Plasmid als internem Standard in Abhängigkeit von der Plasmidkonzentration auf der Membran in drei Hybridisie-

rungen mit unterschiedlichen Mengen an radioaktiven Transkripten ist in Abbildung 3.3.4.1 dargestellt.

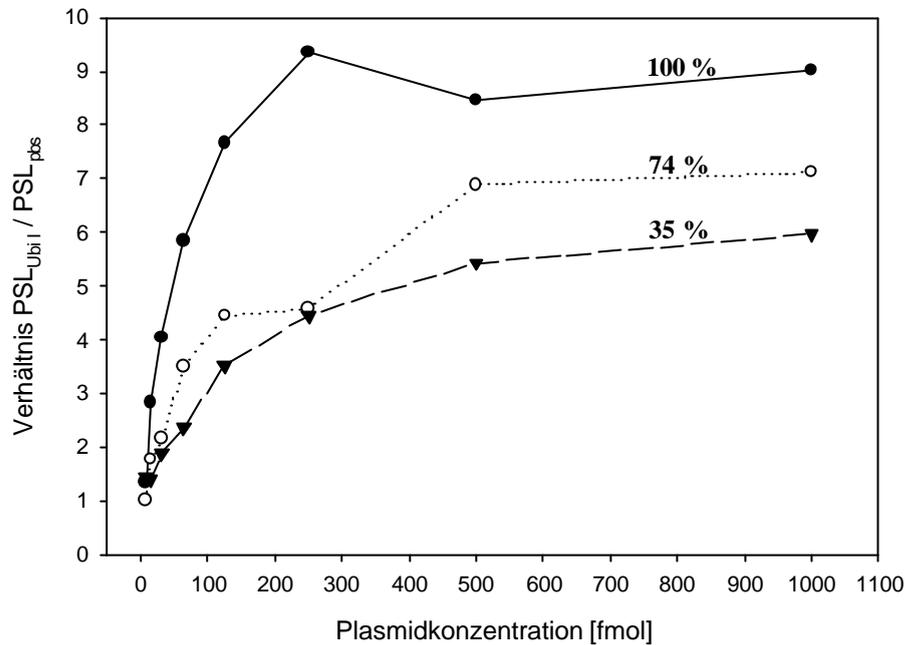


Abbildung 3.3.4.1: Ergebnis der Quantifizierung von Hybridisierungssignalen beim Einsatz von pBluescriptII als internen Standard. Dargestellt ist die integrierte Signalintensität [PSL] von Ubiquitin I im Verhältnis zur integrierten Signalintensität [PSL] von pBluescriptII der gleichen Konzentration. Die Prozentzahlen geben die relative Menge an Radioaktivität der gleichen Transkriptsonde in der Hybridisierungslösung an.

Werden die Signalintensitäten verschiedener Mengen der Ubiquitin-DNA auf die Signalintensitäten von verschiedenen Mengen des internen Standards pBluescriptII als Wert für den Hintergrund bezogen, erhält man für die drei Einzelversuche Kurven mit deutlich voneinander abweichendem Verlauf (Abbildung 3.3.4.1). Die Ursache für diese deutlichen Unterschiede im Kurvenverlauf ist darin begründet, daß sich die Signalintensität der pBluescriptII-DNA auch bei der Hybridisierung mit unterschiedlichen Transkriptmengen kaum verändert.

Um diesen Zusammenhang am Beispiel von zwei Hybridisierungsansätzen aus Abbildung 3.3.4.1 (100 % und 35 % Transkriptgehalt in der Hybridisierungslösung) zu verdeutlichen, wurden in Abbildung 3.3.4.2 die jeweiligen Signalintensitäten für Ubiquitin I (Kreise) und pBluescriptII (Dreiecke) aufgetragen. Die Werte für die Signalintensität der pBluescriptII-DNA ändert sich nicht in Abhängigkeit von der Sondenkonzentration, während durch die

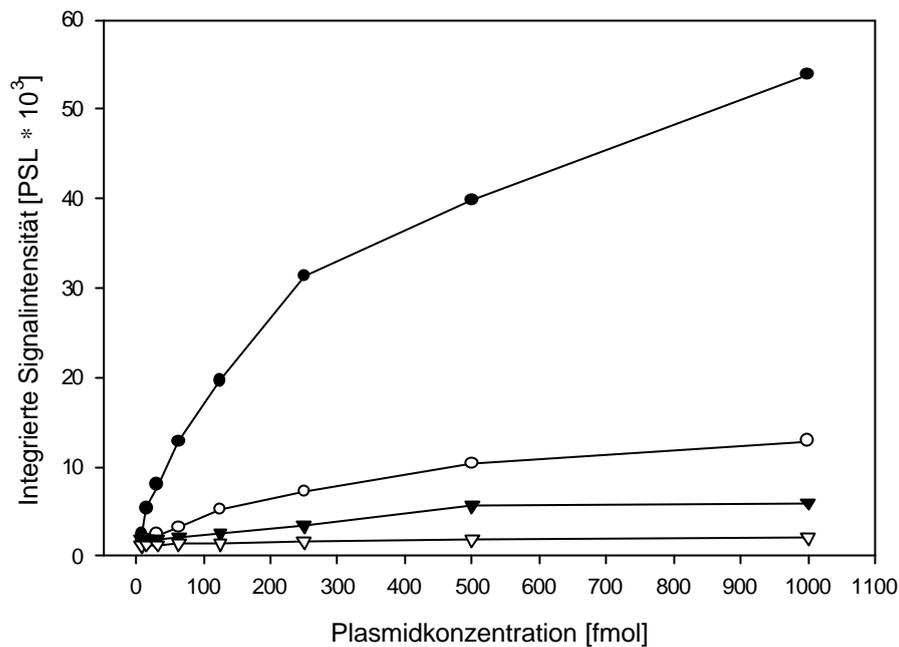


Abbildung 3.3.4.2: Vergleichende Darstellung der Signalintensitäten [PSL] in Abbildung 3.3.4.1 von der Plasmidkonzentration des Ubiquitin (Kreise) und des pBluescriptII (Dreiecke) nach Hybridisierung mit einer Referenzmenge (100 %, schwarze Symbole) und einer auf 35 % reduzierten Menge an Transkripten (weiße Symbole) der jeweils gleichen Transkriptsonde in der Hybridisierungslösung.

Steigerung der Transkriptmenge in der Hybridisierungslösung die Signalintensität der Ubiquitin-DNA deutlich zunimmt. Das spezifische Signal und der Hintergrund verändern sich somit nicht proportional zueinander. Da das Verhältnis aus dem spezifischen Signal und dem Hintergrund gebildet werden soll, ist die Signalintensität des pBluescript II als Bezugspunkt für die Signalintensitäten der untersuchten Gene nicht verwendbar.

Ein anderer Auswertungsmodus stammt von GIEGÉ *et al.* (2000) und wurde von den Autoren für die Auswertung von „Run-on“-Transkriptionsexperimenten mit Mitochondrien verwendet. Hierbei wird auf den Einsatz eines internen Standards verzichtet. Statt dessen wird von jedem DNA-Filter die gesamte hybridisierte Aktivität als Summe der numerischen Werte der Intensitäten aller einzelnen Hybridisierungssignale berechnet. Damit ist es möglich, die Einzelsignale als relativen Anteil an der gesamten Radioaktivität auf einer Membran zu berechnen. Diese Auswertung ist damit unabhängig von den spezifischen Hybridisierungsbedingungen. In Abbildung 3.3.4.3 sind die Ergebnisse bei Anwendung dieser Methode zur Auswertung der Hybridisierungssignale nach Hybridisierung von den gleichen Membranen mit unterschiedlichen Transkriptgehalten in der Hybridisierungslösung dargestellt.

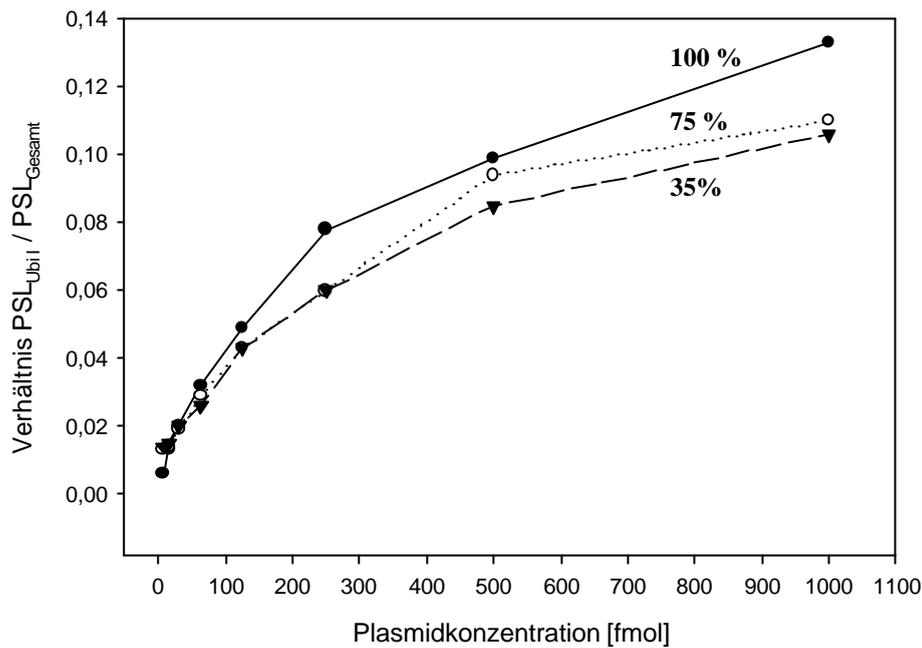


Abbildung 3.3.4.3: Anteil des Ubiquitinsignals an der Summe aller Signalintensitäten auf der Membran in Abhängigkeit von der Plasmidkonzentration bei Hybridisierung mit drei unterschiedlichen Transkriptgehalten in der Hybridisierungslösung. Der Berechnung des Anteils der Signalintensität [PSL] von Ubiquitin (Ubi I) an der Gesamtsignalintensität auf der Membran liegt die Formel $PSL_{Ubi I} / \sum PSL$ zugrunde. Die Prozentzahlen geben die relative Menge an Radioaktivität der gleichen Transkriptsonde in der Hybridisierungslösung an.

Die Anwendung des Auswertungsmodus von GIEGÉ *et al.* (2000) zeigt, daß eine Auswertung ohne internen Standard für die Quantifizierung besser geeignet ist (Abbildung 3.3.4.3). Durch die Verwendung der Gesamtsignalintensität einer Membran als Bezugspunkt für die Berechnung ist diese unabhängig vom Hintergrund der Hybridisierung, dessen Einbeziehung die Auswertung nach dem ersten Modus verfälscht. Die Kurven der Einzelexperimente verlaufen annähernd gleichförmig. Während sie sich im Bereich niedriger Konzentrationen überlappen, weichen sie erst im Bereich höherer Plasmidkonzentrationen geringfügig voneinander ab.

Eine dritte Auswertungsmethode stammt von SASAKI *et al.* (2001) und stellt eine leicht modifizierte Version des Modus von GIEGÉ *et al.* (2000) dar. Anstatt den Anteil der Einzelsignale am Gesamtsignal zu berechnen, nutzen die Autoren den Mittelwert aller Signalintensitäten auf einer Membran, um die relative Signalintensität der Einzelsignale als Verhältnis von Einzelsignal und dem Mittelwert der Signale auf der Membran anzugeben. Die Anwendung dieses Modells zur Auswertung der drei oben beschriebenen Hybridisierungsansätze mit unterschiedlichen Transkriptmengen in der Hybridisierungslösung ergibt ebenfalls annähernd gleiche Kurvenverläufe für die Abhängigkeit der Signalintensität von der Plasmidkonzentration,

ähnlich wie bei Anwendung der Methode von GIEGÉ *et al.* (Abbildung 3.3.4.3). Da statt der Gesamtintensität die Mittelwerte der Einzelintensitäten als Bezug verwendet werden, unterscheidet sich bei den beiden Auswertungsmodi lediglich die Dimension der Werte.

Im folgenden findet der Auswertungsmodus von SASAKI *et al.* (2001) zur Berechnung relativer Signalintensitäten auf der Basis der „BioImager“-Daten Verwendung.

3.3.5 Einfaktorielle ANOVA-Varianzanalyse

Die Untersuchung von Veränderungen in der Transkription spezifischer Gene während der dunkelinduzierten Seneszenz lieferte in mehreren Versuchsserien eine Reihe von Einzelwerten für jedes untersuchte Gen und Entwicklungsstadium. Mit einer „single classification anova“ mit ungleicher Probengröße nach SOKAL & ROHLF (1995) wurde überprüft, ob sich die Varianz zwischen den Einzelwerten verschiedener Stadien deutlich von der Varianz innerhalb der Einzelwerte für ein Entwicklungsstadium unterscheidet. Nur bei einem signifikanten Unterschied (Signifikanzfaktor 0,05) der Varianz zwischen den Stadien kann von einer Veränderung in der Transkription der untersuchten Gene während der Entwicklung ausgegangen werden.

Die Untersuchungen wurden mit einer unterschiedlichen Anzahl von Wiederholungen durchgeführt (3.4.2). 6 Tage alte Pflanzen und 13 Tage alte Pflanzen nach der Revertierung im Licht wurden nur jeweils zweimal, 9 und 11 Tage alte Kontrollpflanzen sowie dunkelinkubierte Pflanzen wurden drei- oder viermal untersucht. Die Werte von Duplikaten auf den DNA-„Dot Blot“-Membranen jeweils vor der statistischen Untersuchung gemittelt.

Die Untersuchungen zur Änderung der Gehalte an untersuchten Transkripten während der dunkelinduzierten Seneszenz und die gesamten Untersuchung der Fahnenblattseneszenz (3.5.3 und 3.5.4) konnten keiner Varianzanalyse unterzogen werden, da zu wenige Werte vorlagen.

Zu Beginn der Untersuchung der Fahnenblattseneszenz stand der „BioImager“ noch nicht zur Verfügung und die Daten aus den Untersuchungen zur Fahnenblattseneszenz in den ersten beiden Versuchsdurchführungen konnten nur visuell bewertet werden. Die mit dem „BioImager“ quantifizierten Ergebnisse wurden daher mit der visuellen Einschätzungen der ersten beiden Versuchsdurchführungen ohne Varianzanalyse verglichen.

3.4 Dunkelinduzierte Seneszenz von Primärblättern

Während der dunkelinduzierten Seneszenz von Primärblättern der Gerste in der Klimakammer wurden Veränderungen in der Transkription und im Transkriptgehalt in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium untersucht. Zuvor wurde von allen untersuchten Stadien der relative Chlorophyllgehalt (SPAD-Messung) und die Effizienz des Photosystem II (PAM-Messung) bestimmt. Zu den untersuchten Stadien während der Entwicklung der Primärblätter gehörten nicht ausgewachsene Primärblätter von 6 Tage alten und ausgewachsene Primärblätter von 9 Tage alten Pflanzen. Die Seneszenz von Primärblättern wurde nach 9 Tagen Anzucht durch zweitägige Dunkelinkubation induziert, während Kontrollpflanzen für die gleiche Zeit weiter im Licht- / Dunkelrhythmus kultiviert wurden. Zur Revertierung der dunkelinduzierten Seneszenz wurden Pflanzen im Anschluß an die Dunkelinkubation weitere 48 h im Licht- / Dunkelrhythmus kultiviert.

3.4.1 Charakterisierung der untersuchten Primärblätter mit physiologischen Parametern

Primärblätter der unterschiedlich angezogenen Gerstenpflanzen wurden zur physiologischen Charakterisierung und zur Untersuchung der Transkription eingesetzt. In Tabelle 3.4.1 sind die Meßwerte für den Chlorophyllgehalt und die Effizienz des Photosystem II der Primärblätter der einzelnen Pflanzen angegeben (Tabelle 3.4.1).

In Versuchsreihe A (Tabelle 3.4.1) blieb der Chlorophyllgehalt in den Primärblättern während der Dunkelinkubation annähernd konstant, sank jedoch während der Revertierung im Licht deutlich ab. Die Effizienz des Photosystems II nahm hingegen über den ganzen Versuchszeitraum kontinuierlich ab. Die 11 Tage alten Kontrollpflanzen besaßen einen leicht erniedrigten Chlorophyllgehalt gegenüber den Versuchspflanzen aus der Dunkelinkubation, während die Effizienz des Photosystems II höhere Werte aufwies. In Versuchsreihe B (Tabelle 3.4.1) wurden nur 9 Tage alte Pflanzen untersucht. Die 9 Tage alten Pflanzen aus dieser Serie zeigten analog zur Versuchsserie A hohe Werte für den Chlorophyllgehalt und die Effizienz des Photosystem II. In der dritten Versuchsreihe (C in Tabelle 3.4.1) wurden zusätzlich die Primärblätter von 6 Tage alten Gerstenpflanzen als sehr junges Entwicklungsstadium untersucht.

Tabelle 3.4.1: Der relative Chlorophyllgehalt (relative SPAD-Werte) und die Effizienz des Photosystems II (F_v / F_m) von Primärblättern der Gerste in verschiedenen Versuchsreihen (A bis C) vor und nach der dunkel-induzierten Seneszenz in der Klimakammer. Die Werte sind Mittelwerte aus jeweils 10 Einzelmessungen, die Standardabweichung ist in Klammern hinter dem Mittelwert angegeben. Aus den unterstrichenen Proben wurde zusätzlich RNA für die cDNA-Synthese extrahiert (3.4.4).

Versuch		6 Tage	9 Tage	48 h Dunkel-	11 Tage	48 h Rever-
		Licht/Dunkel	Licht/Dunkel	inkubation	Licht/Dunkel	tierung
A	SPAD	-	<u>35,67</u> (3,281)	<u>36,55</u> (1,875)	32,42 (2,23)	<u>26,617</u> (5,468)
	F_v / F_m	-	<u>0,823</u> (0,003)	<u>0,78</u> (0,011)	0,813 (0,006)	<u>0,729</u> (0,04)
B	SPAD	-	32,03 (2,249)	-	-	-
	F_v / F_m	-	0,813 (0,004)	-	-	-
C	SPAD	<u>33,025</u> (2,519)	<u>33,72</u> (2,453)	<u>28,99</u> (2,185)	<u>28,72</u> (2,245)	<u>32,97</u> (2,867)
	F_v / F_m	<u>0,768</u> (0,008)	<u>0,806</u> (0,004)	<u>0,746</u> (0,025)	<u>0,727</u> (0,025)	<u>0,784</u> (0,017)

Während der Chlorophyllgehalt unverändert blieb, stieg die Chlorophyllfluoreszenz während der Entwicklung zum adulten 9 Tage alten Primärblatt an. Im Vergleich zu den Kontrollpflanzen sind in allen Versuchen beide Parameter nach der Dunkelinkubation deutlich erniedrigt. Während der Revertierung im Licht nimmt der relative Chlorophyllgehalt und die Effizienz des Photosystems II wieder zu und erreichen annähernd das Niveau der Primärblätter von 9 Tage alten Pflanzen.

3.4.2 Transkriptionsaktivität in Kernen aus Primärblättern

Aus den Primärblättern der untersuchten Entwicklungsstadien wurden Kerne isoliert und für „Run-on“-Transkriptionsexperimente verwendet. Die Transkriptionsaktivität der Kerne der einzelnen Stadien wurden mindestens zweimal, in der Regel jedoch drei- oder viermal bestimmt (Tabelle 3.4.2). In zwei Fällen (4a und 4b, bzw. 5a und 5b) wurden die Wiederholungen mit Kernen aus der gleichen Kernfraktion durchgeführt. In den anderen Fällen wurden die Wiederholungen mit neuem Blattmaterial und den daraus extrahierten Kernen durchgeführt.

Hier zeigt sich, daß die Transkriptionsaktivität der Kerne durch die zweitägige Inkubation der Primärblätter in der Dunkelheit abnimmt (Tabelle 3.4.2). Durch eine Überführung der dunkelbehandelten Pflanzen ins Licht im Anschluß an die Dunkelinkubation kann der Verlust an Transkriptionsaktivität teilweise wiederhergestellt werden. Die Transkriptionsaktivität der

Tabelle 3.4.2: Prozentualer Einbau von radioaktiven Nukleotiden vor, während und nach der dunkelinduzierten Seneszenz. Die Nummern bezeichnen „Run-on“-Transkriptionsexperimente, die Buchstaben a und b Wiederholungen mit Kernen aus der gleichen Kernfraktion.

„Run-on“-Transkription	1	2	3	4 a	4 b	5 a	5 b
6 Tage Licht / Dunkel						11,4 %	33,5 %
9 Tage Licht / Dunkel	20,6 %		15,4 %	33,4 %	13,6 %		
+ 48 h Dunkelinkubation	16,1 %			11,5 %	13,4 %		
11 Tage Licht / Dunkel		21,7 %				1,6 %	7,4 %
+ 48 h Revertierung im Licht	16,4 %			30,9 %	19,8 %		

Kerne erreicht jedoch in keinem Fall die Höhe wie vor der Dunkelinkubation. Auffallend ist die Schwankung der Transkriptionsaktivität bei Kernen aus Pflanzen des gleichen Stadiums. Diese Schwankung tritt auch bei der Verwendung von Kernen aus identischem Blattmaterial in zwei getrennten Experimenten auf.

3.4.3 Hybridisierungsexperimente zur Untersuchung der Transkription und des relativen Transkriptgehalts ausgewählter Gene während der dunkelinduzierten Seneszenz

Mit den markierten Transkripten aus den „Run-on“-Transkriptionsexperimenten wurden DNA-„Dot Blot“-Membranen hybridisiert, auf denen Plasmide immobilisiert waren, die 19 Seneszenzgene (SAG) aus der Gerste, 3 Photosynthesegene und 15 andere interessante Gene (AiG) entweder komplett oder teilweise enthalten. Die Hybridisierungssignale wurden densitometrisch ausgewertet (Abbildung 3.4.3) und nach SASAKI *et al.* (2001) normalisiert (3.3.4). Die Untersuchung der 6 Tage und 11 Tage alten Pflanzen wurde zweimal, die der 9 Tage alten Pflanzen viermal, die Dunkelinkubation und die Revertierung jeweils dreimal durchgeführt. Für jede Wiederholung wurde pro Genfragment ein Wert für die Transkription ermittelt. Eine Ausnahme waren die vier SAGs HvSF31, HvSD11, HvSD15 und HvSD37 sowie die drei AiGs für Aldosereduktase, ELIP und die 26S-rDNA, die jeweils nur ein- bis zweimal untersucht wurden. Da von diesen Genfragmenten pro Versuchsbedingung nur ein oder zwei Werte vorlagen, wurden sie von der Varianzanalyse ausgeschlossen.

Zur Bestimmung des relativen Transkriptgehalts wurden dieselben Membranen, die bei den „Run-on“-Transkriptionsexperimenten verwendet wurden, mit „revers“ transkribierter und

dabei radioaktiv markierter Gesamt-RNA aus den einzelnen Stadien hybridisiert. Dadurch wurde der relative Transkriptgehalt der gleichen Gene bestimmt, bei denen auch die relative Transkription untersucht wurde (Abbildung 3.4.3). Die Ermittlung des relativen Transkriptgehalts erfolgte mit der Methode von SASAKI *et al.* (2001) (3.3.4). Die Untersuchungen zum relativen Transkriptgehalt wurden mit einer geringeren Anzahl von Wiederholungen als die

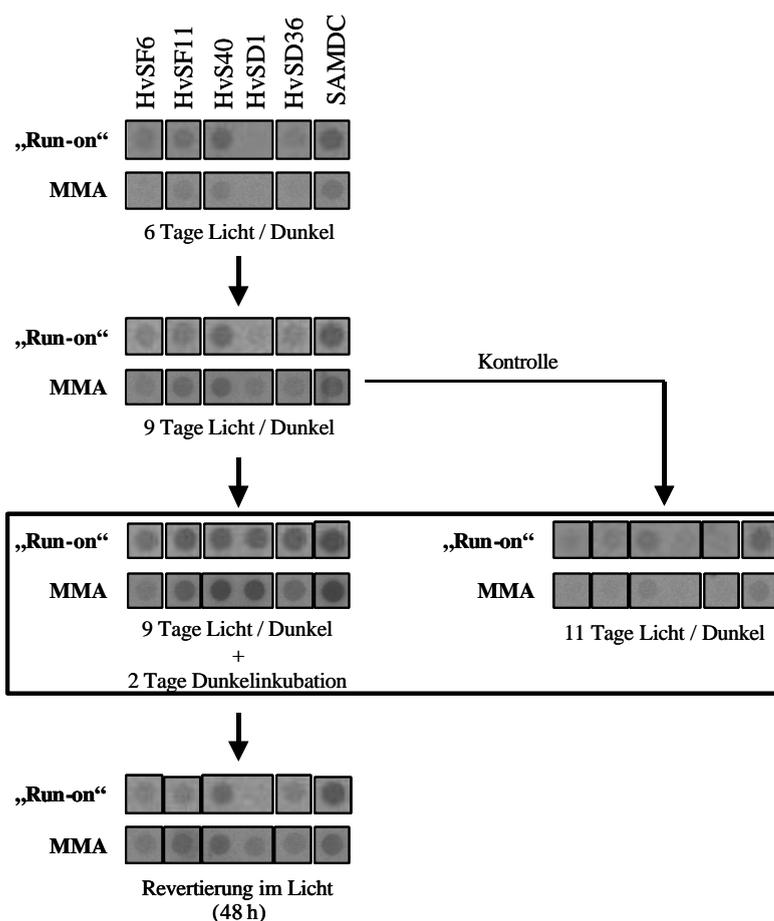


Abbildung 3.4.3: Abbildung der Hybridisierungsmuster nach Verwendung von „Run-on“-Transkripten und komplexen cDNA-Sonden („multiplex messenger assay“ MMA) während der dunkelinduzierten Seneszenz in Primärblättern der Gerste am Beispiel der Gene mit signifikant veränderter Transkriptionsrate. Die DNA-„Dot Blot“-Membranen mit immobilisierten Genfragmenten (250 fmol) wurden mit radioaktiv markierten Transkripten bzw. radioaktiv markierter cDNA hybridisiert. Der Rahmen kennzeichnet Primärblätter des gleichen Alters, die unterschiedlich behandelt wurden.

Untersuchungen zur relativen Transkription durchgeführt. Von den 2 zwei 3 Wiederholungen pro Stadium konnten die Werte einer Versuchsserie nicht in die Auswertung einbezogen werden, da die densitometrische Auswertung der Signale dieses Versuchsdurchgangs unerwartet hohe Werte ergab, die bei der Berechnung des Mittelwertes und der Varianz das Ergebnis verzerrten. Die Anzahl der verbliebenen Einzelwerte war somit für eine Varianzanalyse nicht ausreichend.

Nach dem Muster von GIEGÉ *et al.* (2000) wurde zusätzlich als Quotient aus den Werten für den relativen Transkriptgehalt und der relativen Transkription die relative Transkriptstabilität jedes Gens und die Veränderung dieses Wertes während der dunkelinduzierten Seneszenz bestimmt.

Im folgenden Kapitel 3.4.3.1 sind zuerst die Ergebnisse der Varianzanalyse zur relativen Transkriptionsrate während der dunkelinduzierten Seneszenz dargestellt. Danach schließen sich grafische Darstellungen der Veränderungen in der relativen Transkription, im relativen Transkriptgehalt und in der resultierenden Transkriptstabilität vor, während und nach Revertierung der dunkelinduzierten Seneszenz in Primärblättern an. Die untersuchten Gene wurden in Gruppen zusammengefaßt (3.4.3.2 bis 3.4.3.6). Um die Abbildungen übersichtlicher zu gestalten, sind die entsprechenden Werte für die 11 Tage alten Kontrollpflanzen in der Regel nicht abgebildet.

3.4.3.1 Varianzanalyse mit den Daten aus der „Run-on“-Transkriptionsanalyse während der dunkelinduzierten Seneszenz

Für die Varianzanalyse wurde folgende Nullhypothese aufgestellt: Die „Varianz der Einzelwerte der relativen Transkription in einem Entwicklungsstadium ist gleich der Varianz der Werte zwischen den untersuchten Stadien vor und nach der dunkelinduzierten Seneszenz bzw. nach ihrer Revertierung im Licht“. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt. Das bedeutet in anderen Worten: Wenn die Prüfung der Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % einen Unterschied feststellt (die Prüfgröße F ist größer als die kritische Prüfgröße $F_{0,05}$), wird die Nullhypothese verworfen und eine Alternativhypothese angenommen. Diese besagt, „daß ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Varianzen bzw. eine signifikant veränderte relative Transkription des betreffenden Gens während der dunkelinduzierten Seneszenz vorliegt“.

Bei fünf der 20 untersuchten SAGs der Gerste wurde die Nullhypothese verworfen, d.h. die Veränderung der relativen Transkription während der dunkelinduzierten Seneszenz ist jeweils signifikant. Von diesen fünf Genen gehören mit den Genen HvSF6, HvSF11 und HvS40 drei in die Gruppe der HvSF- und mit den Genen HvSD1 und HvSD36 zwei in die Gruppe der

HvSD-Gene (Tabelle 3.4.3.1.1). Als einzigem Vertreter der 15 untersuchten AiGs wurde bei der SAM-Decarboxylase die Nullhypothese verworfen (Tabelle 3.4.3.1.3).

Tabelle 3.4.3.1.1: Prüfung der Nullhypothese für die Transkription der SAG während der dunkelinduzierten Seneszenz. Die Nullhypothese wird verworfen, wenn die Prüfgröße F größer als die kritische Prüfgröße $F_{0,05}$ ist (durch Fettdruck dargestellt). Eine Verschärfung des Signifikanzniveaus ist in der Tabelle in Klammern angegeben.

<i>CDNA</i>	<i>Prüfgröße [F]</i>	<i>kritische Prüfgröße [$F_{0,05}$]</i>
HvSF2	1,37665	3,47805
HvSF6	7,19124	6,42206 ($F_{0,01}$)
HvSF11	13,79059	12,56012 ($F_{0,001}$)
HvSF23	0,81049	3,63309
HvSF27	0,14542	4,12031
HvSF31	0,36402	6,38823
HvSF33	1,12815	3,83785
HvSF42	1,33040	3,63309
HvS40	4,40608	4,12031
HvSD1	19,40466	12,56012 ($F_{0,001}$)
HvSD8	0,68799	3,47805
HvSD10	2,64380	3,83785
HvSD11	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar
HvSD15	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar
HvSD22	0,29995	4,12031
HvSD26	2,64228	3,47805
HvSD34	0,46816	3,63309
HvSD36	6,82274	5,99437
HvSD37	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar

Die Nullhypothese wurde bei den cDNAs HvS40 und HvSD36 mit einer normalen Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %, bei der cDNA HvSF6 mit einer erhöhten Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % und bei den cDNAs HvSF11 und HvSD1 mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,1 % verworfen (Tabelle 3.4.3.1.1). Die Veränderungen in der relativen Transkription reichen damit von signifikant (HvS40 und HvSD36) über hochsignifikant (HvSF6) bis zu höchstsignifikant (HvSF11 und HvSD1).

3. Ergebnisse

Tabelle 3.4.3.1.2: Prüfung der Nullhypothese für die Transkription ausgewählter Photosynthesegene während der dunkelinduzierten Seneszenz.

<i>Gen- oder Genfragment</i>	<i>Prüfgröße [F]</i>	<i>kritische Prüfgröße [F_{0,05}]</i>
<i>PetC</i> (Rieske-Protein)	3,30205	3,47805
<i>Cab</i>	0,3777	3,83785
<i>RbcS</i> (HvSD21)	1,471382	3,83785

Für keines der Photosynthesegene wurde die Nullhypothese verworfen (Tabelle 3.4.3.1.2).

Tabelle 3.4.3.1.3: Prüfung der Nullhypothese für die Transkription der AiG während der dunkelinduzierten Seneszenz. Die Nullhypothese wird verworfen, wenn die Prüfgröße F größer als die kritische Prüfgröße F_{0,05} ist (durch Fettdruck dargestellt).

<i>Genprodukt</i>	<i>Prüfgröße [F]</i>	<i>kritische Prüfgröße [F_{0,05}]</i>
16S-rRNA	3,21523	3,47805
26S-rRNA	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar
Actin	2,96592	3,83785
Aldosereduktase	0,37596	5,19216
CoxII	0,37954	3,83785
Cysteinprotease	0,81932	3,63309
Cytokininoxidase	1,39350	3,47805
ELIP	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar
Katalase	2,13659	4,12031
Isocitratlyase	0,58922	3,83785
JIP-23 (pHvJ3015)	0,83443	3,83785
Saccharosesynthase	0,62987	3,63309
SAM-Decarboxylase	5,93003	3,47805
Thionin (pHvJ611)	1,61517	3,47805
Ubiquitin I	2,21896	3,47805

Für die SAM-Decarboxylase wurde die Nullhypothese verworfen, die Veränderung der relativen Transkription ist damit signifikant (Tabelle 3.4.3.1.3).

3.4.3.2 Relative Transkription, relativer Transkriptgehalt und relative Transkriptstabilität der Gene mit signifikant veränderter Transkription während der dunkelinduzierten Seneszenz

Die relative Transkription des HvSF6-Gens steigt im Primärblatt während der Entwicklung von der sechs bis zur neun Tage alten Pflanze an (+ 56 %) und wird bei Dunkelinkubation weiter gesteigert (+ 39,8 %). Im Vergleich zu den 11 Tage alten Kontrollpflanzen ist die relative Transkription bei Dunkelinkubation mehr als doppelt so hoch, erniedrigt sich nach der Revertierung im Licht aber wieder auf das Niveau der 9 oder 11 Tage alten Pflanzen (- 50,5 %, Tabelle 3.4.3.2).

Tabelle 3.4.3.2: Entwicklungsabhängige Veränderung in der relativen Transkriptionsrate der Gene mit signifikant veränderter Transkriptionsrate während der dunkelinduzierten Seneszenz. Die Messung erfolgte nach SASAKI *et al.* (2001). Die Zahl in Klammern hinter dem Mittelwert repräsentiert die Anzahl der Versuchswiederholungen.

		<i>HvSF6</i>	<i>HvSF11</i>	<i>HvS40</i>	<i>HvSD1</i>	<i>HvSD36</i>	<i>SAMDC</i>
6 Tage Licht / Dunkel	Mittelwert	0,244 (2)	0,448 (2)	0,947 (2)	0,048 (2)	0,19 (2)	1,323 (2)
	Varianz	0,015	0,043	0,13	0,001	0,003	0,018
9 Tage Licht / Dunkel	Mittelwert	0,381 (4)	0,423 (4)	0,776 (3)	0,231 (4)	0,316 (4)	1,577 (4)
	Varianz	0,008	0,018	0,041	0,012	0,009	0,133
48 h Dunkel- inkubation	Mittelwert	0,533 (3)	1,119 (3)	1,266 (2)	1,061 (3)	1,237 (3)	2,366 (3)
	Varianz	0,001	0,028	0,011	0,092	0,395	0,319
11 Tage Licht / Dunkel	Mittelwert	0,239 (3)	0,339 (3)	0,512 (3)	0,134 (3)	0,213 (3)	1,179 (3)
	Varianz	0,002	0,038	0,043	0,005	0,012	0,002
48 h Revertie- rung im Licht	Mittelwert	0,264 (2)	0,193 (2)	0,633 (2)	0,09 (2)	0,243 (3)	1,404 (3)
	Varianz	0,014	0,0060	0,002	0,045	0,011	0,013

Die relative Transkription des HvSF11-Gens, das für die α -Galaktosidase II kodiert, wird durch die Dunkelinkubation erhöht. Die meßbare Zunahme der relativen Transkription ist sehr stark und liegt deutlich über den Werten der 11 Tage-Kontrolle (+ 230 %). Nach der Revertierung im Licht geht die relative Transkription auf niedrige Werte wie vor der Dunkelinkubation zurück (- 83 %, Tabelle 3.4.3.2).

Das HvS40-Gen zeigt ebenfalls als Reaktion auf die Dunkelinkubation einen deutlich meßbaren Anstieg der relativen Transkription (+ 147 %) im Vergleich zur 11 Tage-Kontrolle. Durch

die Revertierung im Licht geht die relative Transkription deutlich auf Werte zurück, die für 9 Tage alte Pflanzen typisch sind (- 50 %).

Durch die Dunkelinkubation ist die relative Transkription des HvSD1-Gens im Vergleich zur 11 Tage-Kontrolle sehr stark erhöht (+ 690 %) und geht durch die Revertierung wieder auf das sehr niedrige Niveau der Kontrollpflanzen zurück.

Ebenso steigt die relative Transkription des HvSD36-Gens als Folge der Dunkelinkubation im Vergleich zur 11 Tage-Kontrolle deutlich an (+ 482 %) und nimmt durch die Revertierung im Licht deutlich ab, wodurch Werte erreicht werden, die dem Transkriptionsniveau in 9 Tage alten Pflanzen entsprechen.

Auch bei der SAM-Decarboxylase als einzigem Gen aus der Gruppe der AiG steigt die relative Transkription durch die Dunkelinkubation im Vergleich zu den 11 Tage alten Kontrollpflanzen an (+ 100 %). Auch hier erniedrigt sich durch die Revertierung im Licht die relative Transkription auf die Werte der Kontrollpflanzen.

Bei der grafischen Darstellung der relativen Transkriptionsaktivität dieser Gene fällt auf, daß die Mehrzahl der Gene abgesehen vom HvSF6-Gen und dem für die SAM-Decarboxylase kodierenden Gen ungefähr das gleiche Transkriptionsniveau besitzt. Die cDNA HvSF6 besitzt eine schwächere, die SAM-Decarboxylase eine stärkere Transkriptionsaktivität (Abbildung 3.4.3.2 A).

Die in Grafik A in Abbildung 3.4.3.2 dargestellten Gene zeigen in unterschiedlichem Maß eine deutlich erhöhte relative Transkription als Folge der Dunkelinkubation, die sich in allen Fällen durch die Überführung der Pflanzen zurück ins Licht revertieren läßt.

Der relative Transkriptgehalt dieser Gene vor und nach der dunkelinduzierten Seneszenz bzw. nach deren Revertierung im Licht ist in Grafik B (Abbildung 3.4.3.2) dargestellt. Allein die cDNAs HvSF6 und HvSD36 zeigen keine Zunahme der relativen Transkriptmenge während der dunkelinduzierten Seneszenz, während die anderen Gene als Folge der Dunkelinkubation der Pflanzen einen deutlich gesteigerten relativen Transkriptgehalt aufweisen. Auf die Darstellung der Werte der 11 Tage alten Kontrollpflanzen wurde verzichtet, da der Transkriptgehalt zu diesem Zeitpunkt dem Wert entspricht, den die Primärblätter nach 2 Tagen im Licht / Dunkel-Rhythmus im Anschluß an die Dunkelphase aufweisen.

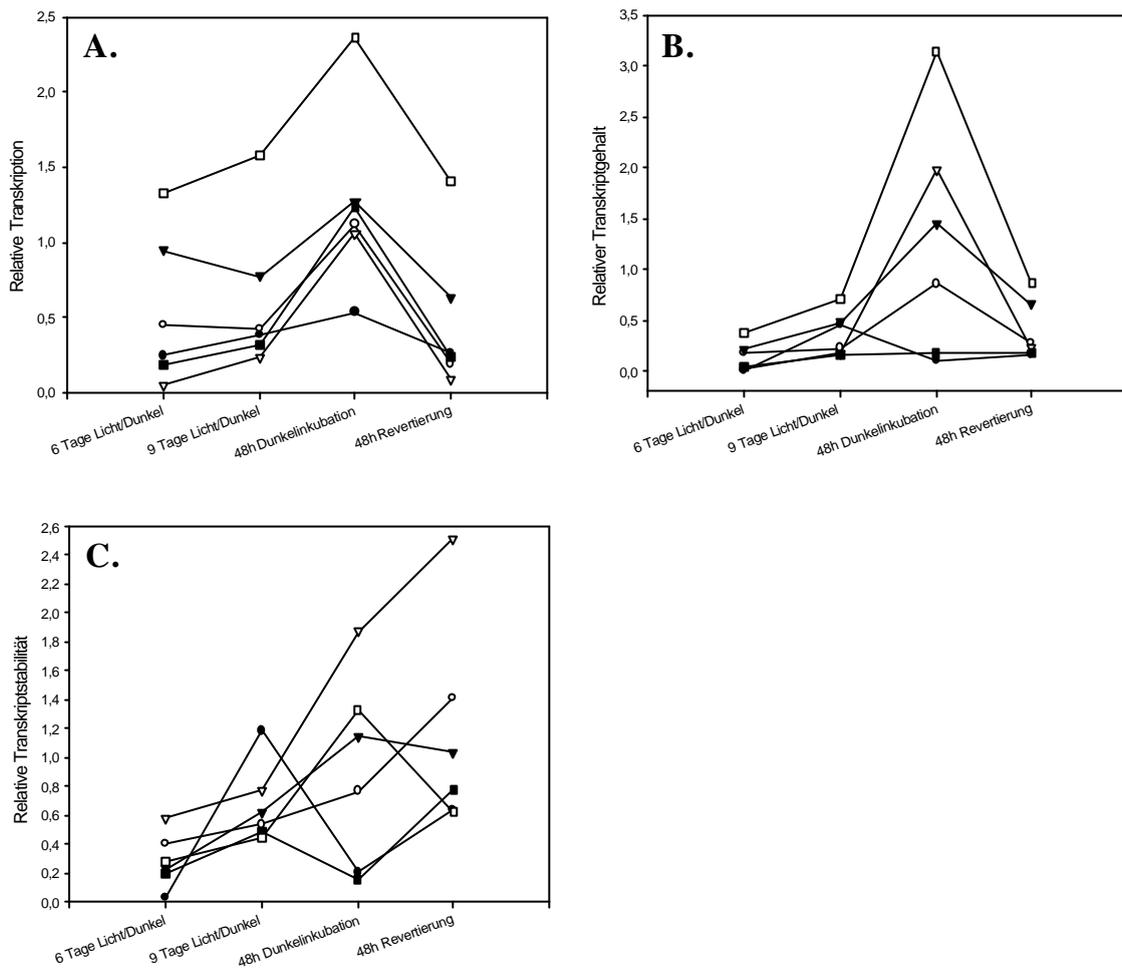


Abbildung 3.4.3.2: Relative Transkription (A.), relativer Transkriptgehalt (B.) und relative Transkriptstabilität (C.) vor und nach der dunkelinduzierten Seneszenz bzw. nach deren Revertierung in Primärblättern der Gerste. Dargestellt sind die Daten für die Gene mit signifikant veränderter Transkription während der Dunkelphase. Die Werte für die 11 Tage-Kontrolle sind nicht abgebildet (# = HvSF6, . = HvSF11, & = HvS40, , = HvSD1, ! = HvSD36, □ = SAM-Decarboxylase).

Aus der relativen Transkription (Grafik A) und dem relativen Transkriptgehalt (Grafik B) wurde nach GIEGÉ *et al.* (2000) die relative Transkriptstabilität vor und nach der dunkelinduzierten Seneszenz bzw. deren Revertierung ermittelt und in Grafik C der Abbildung 3.4.3.2 dargestellt. Bei den cDNAs HvSF11, HvS40, HvSD1 und dem für die SAM-Decarboxylase kodierenden Gen kommt es während der Dunkelinkubation zu einer deutlichen Zunahme der relativen Transkriptstabilität. Die Zunahme der relativen Transkriptmenge beruht in diesen Fällen möglicherweise nicht nur allein auf einer erhöhten relativen Transkription, sondern zusätzlich auf einer Stabilisierung der Transkripte. Die geringen relativen Transkriptgehalte der cDNAs HvSF6 und HvSD36 könnten trotz einer stark (HvSD36) oder leicht erhöhten (HvSF6) relativen Transkription während der Dunkelinkubation ihre Ursache in einer niedrigen relativen Transkriptstabilität haben (Abbildung 3.4.3.2 C).

3.4.3.3 **Relative Transkription, relativer Transkriptgehalt und relative Transkriptstabilität der HvSF-Gene während der dunkelinduzierten Seneszenz**

Von den 9 SAGs, deren Transkripte während der Fahnenblattseneszenz im Freiland akkumulieren (HvSF-cDNA-Klone), zeigen nur drei (HvSF6, HvSF11 und HvS40) eine signifikante Änderung in der Transkriptionsrate während der Dunkelinkubation (Abbildung 3.4.3.2 A). Die Veränderungen in der relativen Transkriptionsrate, im relativen Transkriptgehalt und in der relativen Transkriptstabilität der anderen HvSF-Gene unter diesen Bedingungen ist in Abbildung 3.4.3.3 dargestellt.

Während der Dunkelinkubation der Pflanzen steigt die relative Transkription bei keinem der abgebildeten HvSF-Gene an (Abbildung 3.4.3.3 A). Sie bleibt bei den cDNAs HvSF27, HvSF33 und HvSF42 über den gesamten Versuchszeitraum nahezu unverändert. Im Vergleich zu 9 Tage alten Pflanzen ist die relative Transkription im Fall der cDNAs HvSF2, HvSF23 und HvSF31 während der Dunkelinkubation sogar deutlich erniedrigt und steigt nach der Revertierung wieder an. Bei 11 Tage alten Kontrollpflanzen (nicht dargestellt) befindet sich die relative Transkription des HvSF2 ungefähr auf dem Niveau der 6 Tage alten Pflanzen, ist bei den cDNAs HvSF23 und HvSF33 aber noch weiter erniedrigt. Demnach ist die relative Transkription der cDNA HvSF2 während der gesamten untersuchten Blattentwicklung in unbehandelten Pflanzen hoch, wird durch die Dunkelinkubation drastisch erniedrigt und erholt sich durch die Revertierung jedoch sofort wieder. Die relative Transkription der cDNAs HvSF23 und HvSF33 nimmt entwicklungspezifisch vom Stadium der 6 bzw. 9 Tage alten Pflanzen an ab. Diese Abnahme wird durch die Dunkelinkubation etwas verlangsamt, da die Werte in der 11 Tage-Kontrolle niedriger sind. Nach Revertierung der dunkelinduzierten Seneszenz ist die relative Transkription beider Gene wieder stark erhöht (Abbildung 3.4.3.3 A). Der relative Transkriptgehalt der cDNA HVSF23 steigt unbeeinflusst von der Dunkelinkubation während der gesamten Entwicklung an. Bei der cDNA HvSF33 sinkt der relative Transkriptgehalt durch die Dunkelinkubation geringfügig im Vergleich zur 11 Tage-Kontrolle ab, während sie beim HvSF31 auch in der 11 Tage-Kontrolle erniedrigt ist und sich nach der Revertierung nicht wieder erhöht. Allein die cDNA HvSF2 besitzt einen leicht erhöhten relativen Transkriptgehalt während der Dunkelphase (Abbildung 3.4.3.3 B).

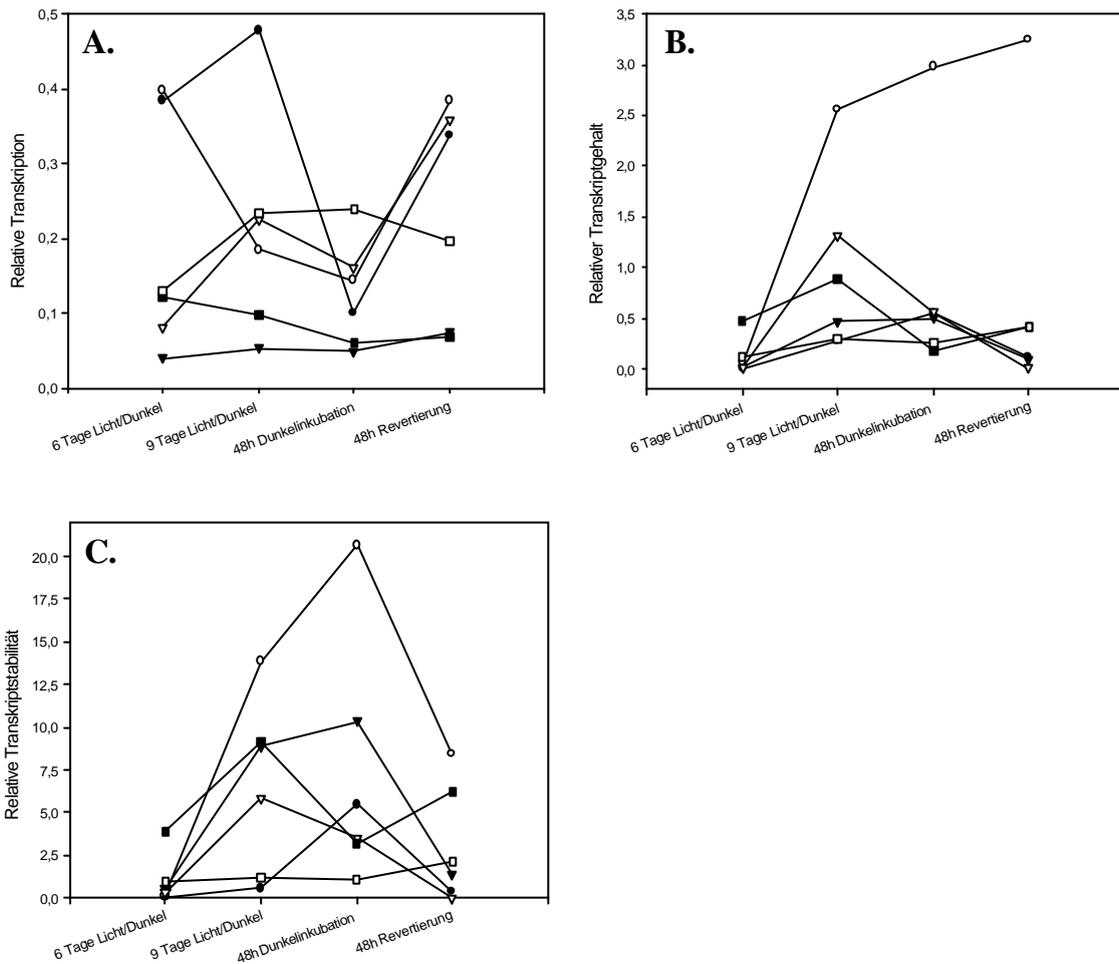


Abbildung 3.4.3.3: Relative Transkription (A.), relativer Transkriptgehalt (B.) und relative Transkriptstabilität (C.) vor und nach der dunkelinduzierten Seneszenz bzw. nach deren Revertierung in Primärblättern der Gerste. Dargestellt sind die Daten für die **HvSF**-Gene mit nichtsignifikant veränderter Transkription während der Dunkelphase. Die Werte für die 11 Tage-Kontrolle sind nicht abgebildet. (# = HvSF2,) = HvSF23, & = HvSF27, , = HvSF31, ! = HvSF33, □ = HvSF42)

Die relative Transkriptstabilität (Abbildung 3.4.3.3 C) ermittelt sich aus den Werten der relativen Transkription und des relativen Transkriptgehalts. Trotz fehlendem Anstieg der relativen Transkription während der dunkelinkubierten Seneszenz (Abbildung 3.4.3.3 A), steigen während der Dunkelinkubation die relativen Transkriptgehalte der cDNAs HvSF2 und HvSF27 leicht und der cDNA HvSF23 stark an. Die relative Transkriptstabilität des HvSF42 bleibt über den gesamten Versuchszeitraum auf niedrigem Niveau, während sie sich bei den cDNAs HvSF31 und HvSF33 während der Dunkelinkubation verringert. Im Gegensatz zum HvSF33-Gen erhöht sich die relative Transkriptstabilität durch die Revertierung der dunkelinduzierten Seneszenz beim HvSF31-Gen nicht, sondern verringert sich weiter.

3.4.3.4 Relative Transkription, relativer Transkriptgehalt und relative Transkriptstabilität der HvSD-Gene während der dunkelinduzierten Seneszenz

Von den ursprünglich 11 SAGs, deren Transkripte während der dunkelinduzierten Seneszenz der Primärblätter akkumulieren (HvSD-cDNA-Klone), zeigen nur zwei (HvSD1 und HvSD36) eine signifikante Änderung in der relativen Transkription während der Dunkelinkubation (Abbildung 3.4.3.2 A). Der cDNA-Klon HvSD21 repräsentiert das *rbcS*-Gen, das für die kleine Untereinheit der Rubisco kodiert und damit zu den Photosynthesegenen (PG) zählt.

In Abbildung 3.4.3.4 ist die Veränderung in der relativen Transkription, im relativen Transkriptgehalt und in der relativen Transkriptstabilität der verbleibenden 8 HvSD-Gene dargestellt.

Der HvSD26 ist das einzige HvSD-Gen, dessen relative Transkription während der Dunkelinkubation gegenüber der 11 Tage-Kontrolle erhöht ist (Abbildung 3.4.3.4 A). Die relative Transkription des HvSD10-Gens ist während der Dunkelinkubation leicht erhöht, jedoch bleibt sie niedriger als in der 11 Tage-Kontrolle, während die relative Transkription im Fall der cDNAs HvSD8 und HvSD34 durch die Dunkelinkubation auch gegenüber der jeweiligen 11 Tage-Kontrolle deutlich erniedrigt ist. Auffallend sind die Veränderungen in der relativen Transkription im Fall der cDNAs HvSD8, HvSD10 und HvSD26, die in den 6 Tage Pflanzen sehr hoch, in 9 Tage alten Pflanzen aber schon deutlich erniedrigt ist (Abbildung 3.4.3.4 A). Für die Gene HvSD15, HvSD22 und HvSD37 können keine Veränderungen in der relativen Transkription während der Dunkelinkubation festgestellt werden.

In Abbildung 3.4.3.4 B sind mit Ausnahme der cDNAs HvSD11, HvSD15 und HvSD22, für die keine Werte der 11 Tage alten Kontrollpflanzen bestimmt werden konnten, die Veränderungen der relativen Transkriptgehalte während der dunkelinkubierten Seneszenz abgebildet. Bei den cDNAs HvSD10 und HvSD37 erhöht sich, bei der cDNA HvSD8 verringert sich der relative Transkriptgehalt während der Dunkelinkubation im Vergleich zur 11 Tage-Kontrolle (Abbildung 3.4.3.4 B). Bei der cDNA HvSD37 bleibt der relative Transkriptgehalt auch nach der Revertierung stark erhöht, während er sich bei der cDNA HvSD10 durch die Revertierung im Licht wieder stark erniedrigt. Der relative Transkriptgehalt der cDNAs HvSD26 und HvSD34 bleibt während des Versuches unverändert.

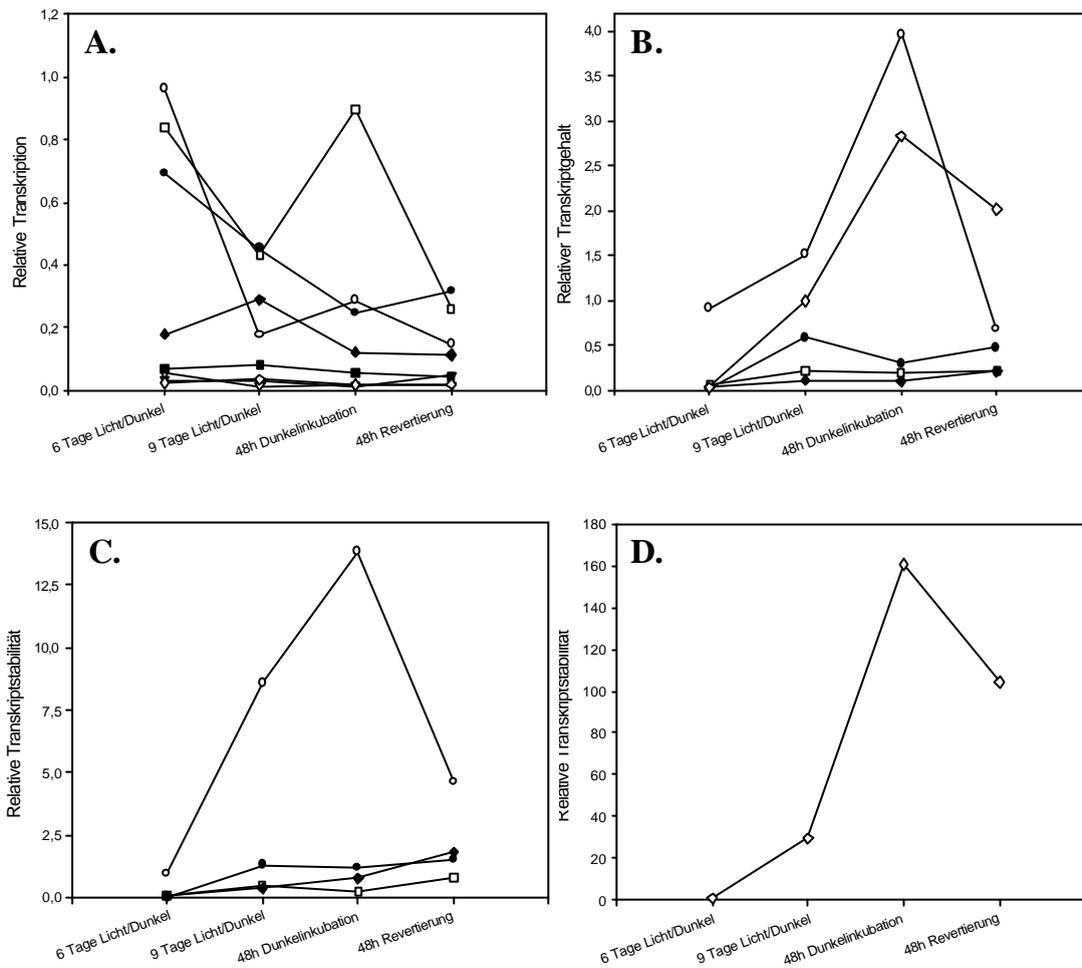


Abbildung 3.4.3.4: Relative Transkription (A.), relativer Transkriptgehalt (B.) und relative Transkriptstabilität (C. und D.) vor und nach der dunkelinduzierten Seneszenz bzw. nach deren Revertierung in Primärblättern der Gerste. Dargestellt sind die Daten für die **HvSD**-Gene mit nichtsignifikant veränderter Transkription während der Dunkelphase. Wegen der hohen Werte ist die relative Transkriptstabilität der cDNA HvSD37 in D) separat abgebildet. Die Werte für die 11 Tage-Kontrolle sind nicht abgebildet. (# = HvSD8,) = HvSD10, & = HvSD11, , = HvSD15, ! = HvSD22, □ = HvSD26, ◆ = HvSD34, (= HvSD37).

Wegen der fehlenden Werte für den relativen Transkriptgehalt der drei cDNAs HvSD11, HvSD15 und HvSD22 kann für diese Gene auch die relative Transkriptstabilität nicht bestimmt werden.

Eine Änderung in der relativen Transkriptstabilität während der dunkelinduzierten Seneszenz erfolgt nur im Fall der cDNAs HvSD10 (Abbildung 3.4.3.4 C) und HvSD37 (Abbildung 3.4.3.4 D). Bei beiden ist diese vermutlich für die Steigerung des relativen Transkriptgehalts bei unveränderter relativer Transkription während der Dunkelinkubation gegenüber der 11 Tage-Kontrolle verantwortlich. Im Fall der cDNA HvSD26 führt die deutlich erhöhte relative Transkription während der Dunkelphase nicht zu einem erhöhten relativen Transkriptgehalt

(Abbildung 3.4.3.4 A und B). Dies beruht vermutlich auf einer niedrigen relativen Transkriptstabilität.

3.4.3.5 Relative Transkription, relativer Transkriptgehalt und relative Transkriptstabilität ausgewählter Photosynthesegene während der dunkelinduzierten Seneszenz

Die Veränderung in der relativen Transkription, im relativen Transkriptgehalt und in der relativen Transkriptstabilität der untersuchten Photosynthesegene vor und nach der dunkelinduzierten Seneszenz bzw. nach deren Revertierung in Primärblättern der Gerste ist in Abbildung 3.4.3.5 dargestellt.

Das durch die cDNA LF2 repräsentierte *cab*-Gen (Chlorophyll *a/b*-Bindepotein) und die cDNA HvSD21 für das *rbcS*-Gen zeigen eine ähnlich verlaufende, durch die Dunkelinkubation gegenüber der 11 Tage-Kontrolle erniedrigte relative Transkription, die sich durch die Revertierung im Licht nur geringfügig wieder erhöht (Abbildung 3.4.3.5 A). Dagegen nimmt die relative Transkription des *petC* (Rieske-Gen) während der Dunkelinkubation deutlich ab und erreicht erst durch die Revertierung wieder das Transkriptionsniveau der Primärblätter vor der Dunkelinkubation.

Die Änderung des relativen Transkriptgehalts kann nur für das *petC* dargestellt werden (Abbildung 3.4.3.5 B), da für die beiden anderen Photosynthesegene keine Werte für die 11 Tage alten Kontrollpflanzen erhoben werden konnten. Der relative Transkriptgehalt des *petC* nimmt während der Dunkelinkubation gegenüber der 11 Tage-Kontrolle, die in Abbildung 3.4.3.5 B durch eine gestrichelte Linie dargestellt ist, deutlich ab. Erst durch die Revertierung im Licht werden wieder hohe Werte erreicht, die sogar über denen der 9 Tage alten Pflanzen liegen.

Die relative Transkriptstabilität konnte nur im Fall des *petC* ermittelt und in Abbildung 3.4.3.5 C dargestellt werden.

Die relative Transkription, der relative Transkriptgehalt und die relative Transkriptstabilität verringern sich während der Dunkelinkubation beim *petC* annähernd gleichförmig. Dieser Befund deutet darauf hin, daß der verringerte Transkriptgehalt während der Dunkelphase durch beides, eine verringerte Transkription und eine verringerte Stabilität, verursacht wird (Abbildung 3.4.3.5 C).

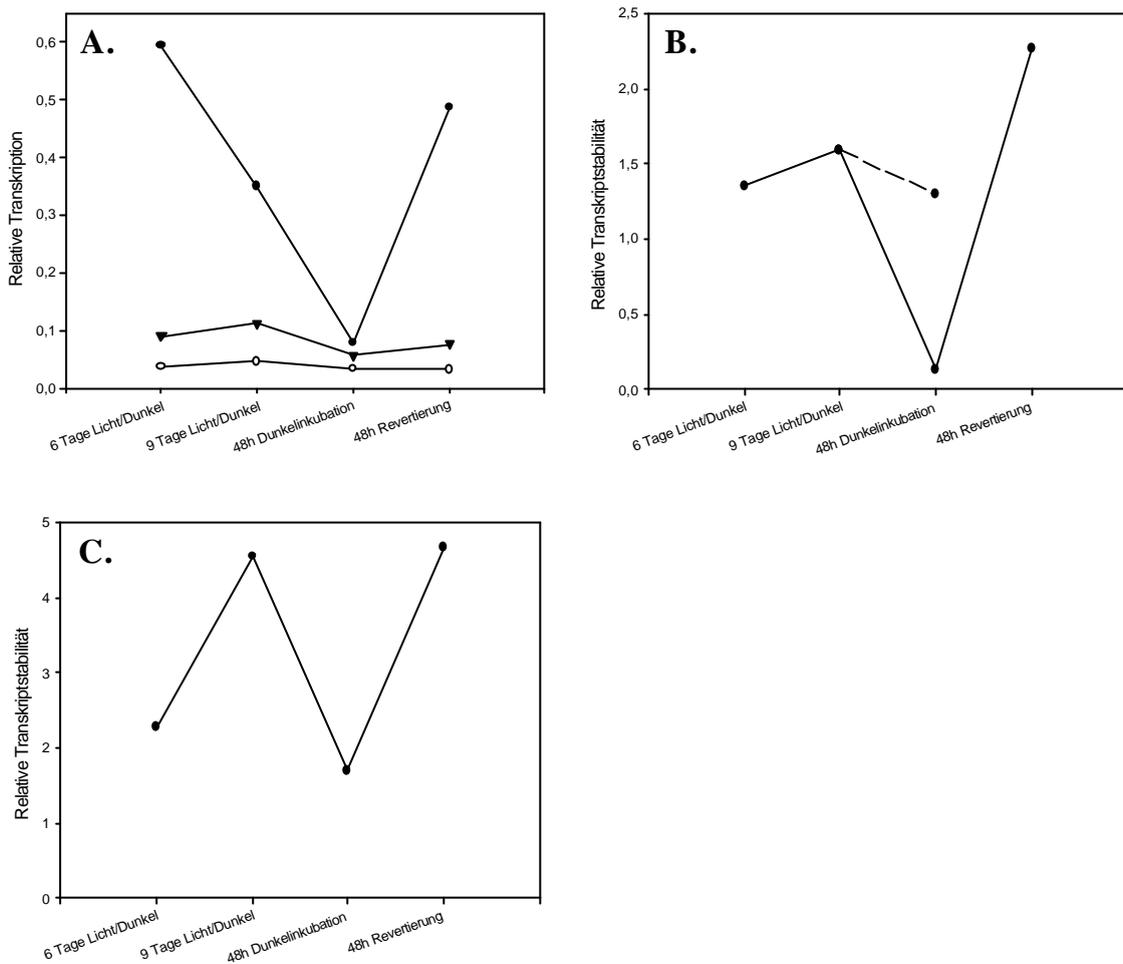


Abbildung 3.4.3.5: Relative Transkription mit Darstellung der 11-Tage-Kontrolle (A.), relativer Transkriptgehalt (B.) und relative Transkriptstabilität (C.) vor und nach der dunkelinduzierten Seneszenz bzw. nach deren Revertierung in Primärblättern der Gerste. In A) sind die Daten für ausgewählte **Photosynthese gene**, in B) und C) nur die Werte für das *petC* dargestellt. Die Werte für die 11 Tage-Kontrolle sind in A.) und C.) nicht abgebildet (# = *petC*,) = *cab*, & = *rbcS*).

3.4.3.6 Relative Transkription, relativer Transkriptgehalt und relative Transkriptstabilität der AiGs während der dunkelinduzierten Seneszenz

Die anderen untersuchten Gene (AiG) werden im folgenden aufgrund der Stärke ihrer relativen Transkription in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe umfaßt 8 AiGs mit einer vergleichsweise hohen relativen Transkription. Dessen Veränderung und die Veränderung im relativen Transkriptgehalt und in der relativen Transkriptstabilität sind in Abbildung 3.4.3.6.1 dargestellt.

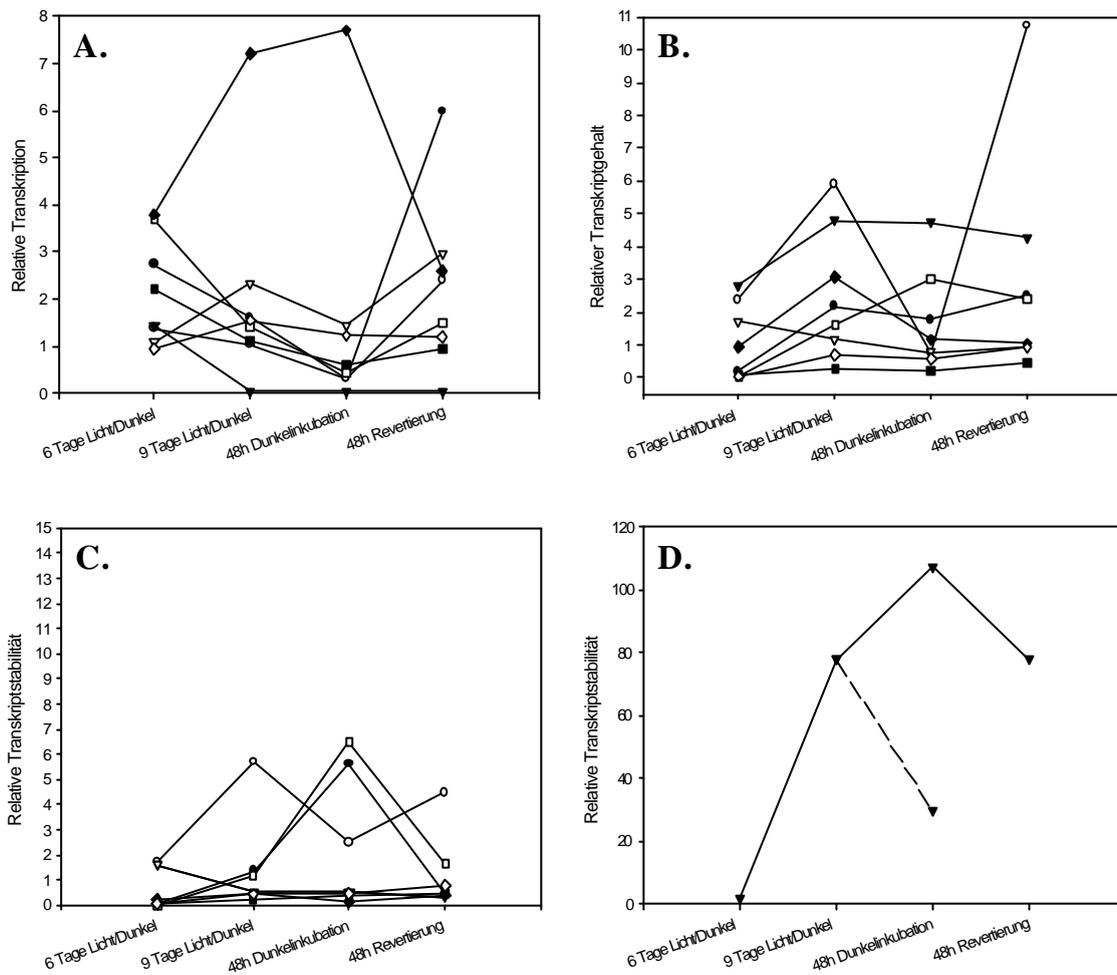


Abbildung 3.4.3.6.1: Relative Transkription (A.), relativer Transkriptgehalt (B.) und relative Transkriptstabilität (C. und D.) vor und nach der dunkelinduzierten Seneszenz bzw. nach deren Revertierung in Primärblättern der Gerste. Dargestellt sind die Daten für die AiGs mit einer hohen relativen Transkription. Wegen der hohen Werte ist die relative Transkriptstabilität des Actin-Gens mit den Werten der 11 Tage-Kontrolle (gestrichelt) in D) separat abgebildet. Die Werte für die 11 Tage-Kontrolle der anderen Gen sind nicht abgebildet. (# = 16S-rRNA,) = 26S-rRNA, & = Actin, , = Aldosereduktase, ! = Cytokininoxidase, □ = ELIP, ◆ = Katalase, (= Ubiquitin).

Mit Ausnahme der Katalase nimmt die relative Transkription aller AiGs in Abbildung 3.4.3.6.1 A während der Dunkelinkubation ab. Die relative Transkription der Katalase erreicht in 9 Tage alten und in dunkelinkubierten Pflanzen ihre höchsten Werte, geht während der Revertierung aber zurück. Das Transkriptionsniveau der Katalase in 11 Tage alten Kontrollpflanzen liegt auf dem Niveau der 6 Tage alten Pflanzen. Die Katalase besitzt von allen in dieser Arbeit untersuchten Genen die höchste relative Transkriptionsrate. Während der Dunkelinkubation ist die relative Transkription aller anderen Gene mit Ausnahme der Gene für das Actin und das Ubiquitin I, deren Werte sich nur sehr geringfügig verändern, erniedrigt und steigt durch die Revertierung im Licht wieder an (Abbildung 3.4.3.6.1 A). Die relative

Transkription der 16S-rRNA und der 26S-rRNA ist in den 11 Tage-Kontrollpflanzen stark erhöht und bleibt auch nach der Überführung der Pflanzen ins Licht auf hohem Niveau.

Die Veränderung des relativen Transkriptgehalts ist in Abbildung 3.4.3.6.1 B dargestellt. Das „Early Light Induced Protein“ (ELIP) zeigt als einziges AiG im Vergleich zu den 11 Tage-Kontrollpflanzen überraschend eine Steigerung des relativen Transkriptgehalts während der Dunkelphase. Der relative Transkriptgehalt des Actingens ist bereits bei 9 Tage alten Pflanzen deutlich erhöht und behält dieses erhöhte Niveau unabhängig von der Dunkelinkubation. Die relativen Transkriptgehalte des Katalasegens und des Gens für die 26S-rRNA nehmen während der Dunkelinkubation im Vergleich zur Kontrolle ab. Während der Transkriptgehalt des Gens für die 26S-rRNA durch die Revertierung wieder zunimmt und schließlich Werte erreicht, die höher als die in 9 Tage alten Pflanzen sind, bleibt der relative Transkriptgehalt des Katalasegens auch während der Revertierung unverändert.

Die relative Transkriptstabilität der AiGs mit ihrer Veränderung während der dunkelinduzierten Seneszenz ist in Abbildung 3.4.3.6.1 C dargestellt. Da die relative Transkriptstabilität im Fall des Actingens sehr hoch ist, sind die betreffenden Werte einschließlich der 11 Tage-Kontrolle unter D in Abbildung 3.4.3.6.1 separat dargestellt.

Die relative Stabilität der 26S-rRNA ist in 9 Tage alten Pflanzen, die der ELIP-RNA und der 16S-rRNA während der Dunkelinkubation erhöht. Da keine entsprechende Veränderung in der Transkription nachzuweisen ist (Abbildung 3.4.3.6.1 A), beruht die Akkumulation der ELIP-Transkripte (Abbildung 3.4.3.6.1 B) auf der hohen relativen Stabilität, die im Dunkeln gegenüber den 11 Tage-Kontrollpflanzen erhöht ist und auf dem Niveau der 9 Tage alten Pflanzen liegt (Abbildung 3.4.3.6.1 C). Obwohl beim Actin nur in 6 Tage alten Pflanzen eine Transkriptionsaktivität meßbar ist (Abbildung 3.4.3.6.1 A), weisen alle untersuchten Stadien einen hohen relativen Transkriptgehalt auf. Die Ursache dafür ist in einer sehr hohen relativen Transkriptstabilität begründet (gestrichelte Linie in Abbildung 3.4.3.6.1 D).

Die zweite Gruppe umfaßt 6 AiGs mit einem relativ niedrigen Transkriptionsniveau (Abbildung 3.4.3.6.2).

Das Thionin-Gen, das durch den cDNA-Klon pHvJ611 repräsentiert wird, ist das einzige AiG dieser Gruppe, dessen relative Transkription bei Dunkelinkubation erhöht ist (Abbildung 3.4.3.6.2 A). Während der Revertierung nimmt die Transkription wieder ab. Im Gegensatz dazu verringert sich die relative Transkription des Saccharosesynthasegens während der Dunkel-

inkubation und nimmt nach der Revertierung wieder zu. Bemerkenswert ist die Veränderung der relativen Transkription des Gens für die Untereinheit II der Cytochrom-Oxidase. Dieses Gen, das mitochondrienkodiert ist und somit nicht im Kern transkribiert wird, zeigt in einigen Stadien eine hohe relative Transkriptionsrate, die auf einer Verunreinigung der Kernfraktion mit transkriptionsaktiven Mitochondrien bzw. dem Transkriptionsapparat der Mitochondrien beruhen muß.

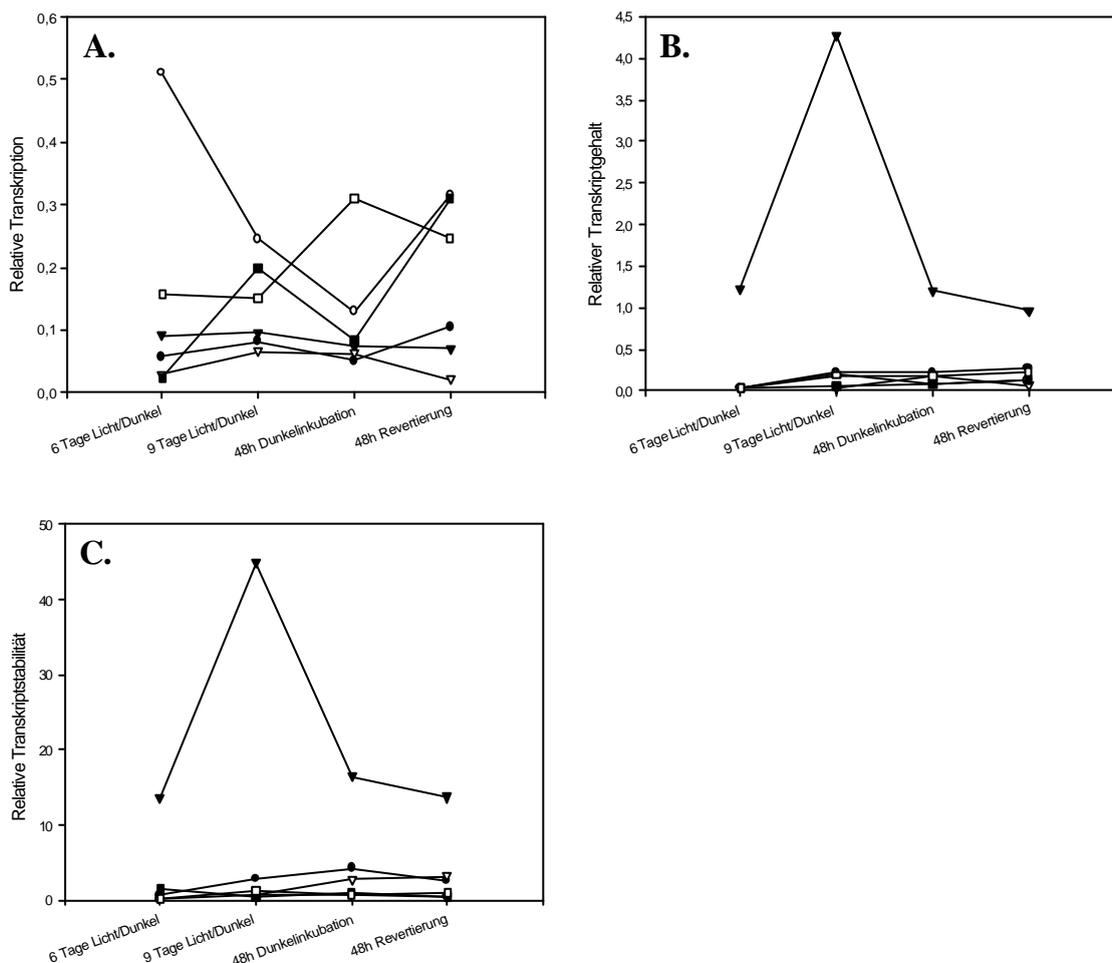


Abbildung 3.4.3.6.2: Relative Transkription (A.), relativer Transkriptgehalt (B.) und relative Transkriptstabilität (C.) vor und nach der dunkelinduzierten Seneszenz bzw. nach deren Revertierung in Primärblättern der Gerste. Dargestellt sind die Daten für die **AiGs mit einer niedrigen relativen Transkription**. Die Werte für die 11 Tage-Kontrolle sind nicht abgebildet (# = Cysteinprotease,) = Untereinheit II der Cytochrom-Oxidase, & = JIP-23, , = Isocitratlyase, ! = Saccharosesynthase, □ = Thionin).

Der relative Transkriptgehalt und seine Veränderung während der Dunkelinkubation ist in Abbildung 3.4.3.6.2 B ohne die Werte der 11 Tage alten Kontrollpflanzen dargestellt. Eine Änderung des relativen Transkriptgehalt ist nur beim Gen für das JIP-23-Protein (cDNA pHvJ3015) festzustellen. Dieser ist in den 9 Tage alten Pflanzen stark erhöht, während er in den anderen Stadien gleichförmig ein deutlich niedrigeres Niveau hat. Die anderen AiGs ha-

ben über den gesamten Versuchszeitraum einen sehr niedrigen und sich nicht verändernden relativen Transkriptgehalt.

Die Werte für die Veränderungen in der relativen Transkriptstabilität während der dunkelin-duzierten Seneszenz der zweiten Gruppe verhalten sich ähnlich (Abbildung 3.4.3.6.2 C).

3.5 Seneszenz von Fahnenblättern der Gerste unter Freilandbedingungen

Entsprechende Untersuchungen wie zur dunkelinduzierten Seneszenz wurden auch zu der Seneszenz von Fahnenblättern der Gerste an Freilandmaterial durchgeführt. Im Jahr 2000 wurde auf einem Versuchsfeld des Botanischen Gartens der Universität Kiel ein frühes Entwicklungsstadium von Fahnenblättern der Sommergerste Carina untersucht. Eine spätere Probenahme zur Untersuchung der Seneszenz war wegen eines starken Befalls mit Pilzpathogenen nicht möglich. Daher wurde für die Untersuchung von weiteren Entwicklungsstadien auf Pflanzenmaterial von einem Versuchsfeld der Norddeutschen Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG (NPZ) in Hohenlieth ausgewichen. Dort wurden drei verschiedene Entwicklungsstadien von Fahnenblättern der Gerstensorte Carina geerntet. Im Jahr 2001 wurde zusätzlich ein frühes Entwicklungsstadium von Fahnenblättern der Wintergerstensorte Nickel vom Standort Hohenlieth in die Untersuchung mit einbezogen.

Mit Ausnahme des frühseneszenten Entwicklungsstadiums der Fahnenblätter aus dem Jahr 2000 aus Hohenlieth wurde aus allen Fahnenblättern neben den Kernen auch RNA für die cDNA-Synthese isoliert.

3.5.1 Physiologische Charakterisierung der untersuchten Fahnenblätter

Das Entwicklungsstadium der ausgewachsenen Fahnenblätter von im Botanischen Garten angebauter Gerste zeichnete sich durch einen hohen relativen Chlorophyllgehalt (SPAD 48) und eine hohe Effizienz des Photosystems II (0,76) aus (Abbildung 3.5.1). Ein ähnliches Entwicklungsstadium repräsentieren die im Jahr 2001 untersuchten Fahnenblätter der Wintergerste Nickel aus Hohenlieth. Bei diesen Blättern betrug der relative Chlorophyllgehalt 56,9 und die Effizienz des Photosystems II 0,803. Das zum frühen Zeitpunkt im Jahr 2000 geerntete Stadium aus Hohenlieth wies einen geringfügig verringerten relativen Chlorophyllgehalt von 39, aber eine deutlich erniedrigte Effizienz des Photosystems II (0,561) auf. Die Verringerung

der Photosyntheseeffizienz ohne gleichzeitige Abnahme des Chlorophyllgehalts könnte auf einen temporären Streßfaktor hindeuten, z.B. starke Trockenheit. Wegen des nur leicht erniedrigten Chlorophyllgehalts wurden die Blätter trotz der reduzierten Effizienz des Photosystems II als nichtsenescentes, einem Streß ausgesetztem Stadium klassifiziert. Das zweite im Jahr

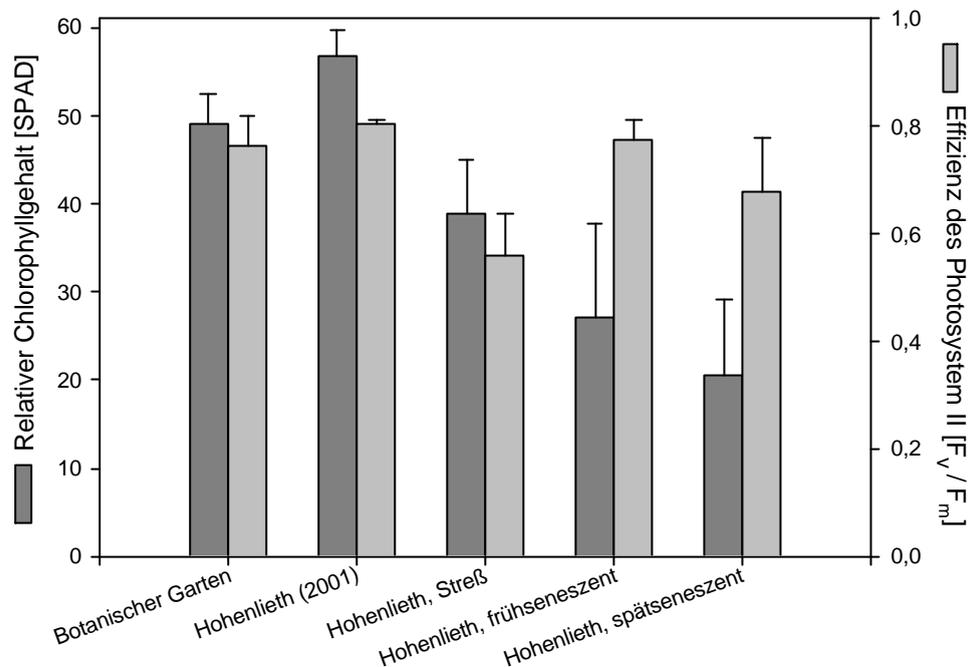


Abbildung 3.5.1: Der relative Chlorophyllgehalt (relative SPAD-Werte) und die Effizienz des Photosystems II (PAM) in den verschiedenen untersuchten Entwicklungsstadien des Fahnenblattes der Gerste während der Seneszenz unter Freilandbedingungen.

2000 geerntete Stadium aus Hohenlieth besaß einen weiter erniedrigten relativen Chlorophyllgehalt (27,1), jedoch hohe Werte für die Effizienz des Photosystems II (0,775). Aufgrund der deutlichen Abnahme des Chlorophyllgehalts wurden diese Blätter als frühseneszent eingestuft. Das dritte Stadium zeigte noch stärker erniedrigte relative Chlorophyllgehalte (20,5), die nun auch von einer erniedrigten Effizienz des Photosystems II (0,679) begleitet wurden. Wegen der Abnahme beider Parameter wird dieses Material als spätseneszentes Stadium der Fahnenblattentwicklung klassifiziert.

3.5.2 Transkriptionsaktivität der Kerne aus Fahnenblättern

Die aus den Fahnenblättern der fünf verschiedenen Entwicklungsstadien isolierten Zellkerne wurden für bis zu drei „Run-on“-Transkriptionsversuche verwendet. Dabei wurde zunächst

die gesamte Transkriptionsaktivität der isolierten Kerne aus den Fahnenblättern der einzelnen Entwicklungsstadien über Einbaubestimmungen bestimmt (Tabelle 3.5.2). Die markierten Transkripte wurden darüber hinaus zur Hybridisierung von DNA-„Dot Blot“-Membranen verwendet.

Tabelle 3.5.2: Prozentualer Einbau radioaktiver Nukleotide durch Kerne aus Fahnenblättern der Gerste zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung. Soweit nicht anders angegeben handelt es sich um die Sommergerste Carina. Die Nummern bezeichnen verschiedene „Run-on“-Transkriptionsexperimente.

„Run-on“-Transkription	1	2	3	4
Botanischer Garten		14,3 %		24,1 %
Hohenlieth 2001 (Nikel)				38,8 %
Hohenlieth, Streß	16,7 %	20,4 %	24,5 %	
Hohenlieth, frühseneszent	22,4 %	10,9 %	40 %	
Hohenlieth, spätseneszent	6 %	7,8 %	16 %	

Die Untersuchungen ergaben, daß die Kerne aus dem frühseneszenten Entwicklungsstadium des Fahnenblatts (Probe „Hohenlieth, frühseneszent“) in allen Versuchsserien mit einer Ausnahme eine höhere Transkriptionsaktivität als die ausgewachsenen, aber nicht seneszenten Fahnenblättern (Proben „Botanischer Garten“, „Hohenlieth 2001“ und „Hohenlieth, Streß“) haben (Tabelle 3.5.2). Das spätseneszente Entwicklungsstadium des Fahnenblatts (Probe „Hohenlieth, spätseneszent“) weist erwartungsgemäß die niedrigste Transkriptionsaktivität auf. Dies weist auf eine deutliche Abnahme der Transkriptionsaktivität im Kern während der Seneszenz des Fahnenblattes hin.

Ähnlich wie bei den Untersuchungen zur dunkelinduzierten Seneszenz (Tabelle 3.4.2) schwanken die Werte für die Transkriptionsaktivität bei Wiederholungen mit Kernen derselben Probe erheblich. Auch hier kann nicht geklärt werden, ob eine methodische Ungenauigkeit bei der Messung vorliegt oder ob die Transkriptionsaktivität auch bei Kernen aus demselben Material natürlichen Schwankungen unterliegt.

3.5.3 Hybridisierungsexperimente zur Untersuchung der Transkription und des Transkriptgehalts während der Seneszenz des Fahnenblattes unter Freilandbedingungen

In einer ersten Reihe von „Run-on“-Transkriptionsexperimenten („Run-on“-Versuchsserie A) zur Herstellung radioaktiv markierter Transkripte wurden jeweils $2,5 \times 10^7$ Kerne aus Fahnenblättern der einem Streß ausgesetzten Pflanzen, sowie aus früh- und spätseneszentem Blattmaterial verwendet, das von dem Versuchsfeld in Hohenlieth stammte. Mit den markierten Transkripten wurden DNA-„Dot Blot“-Membranen hybridisiert. Da eine densitometrische Auswertung mit einem „BioImager“ zu diesem Zeitpunkt nicht möglich war, erfolgte die Auswertung der Autoradiogramme nur durch visuellen Vergleich der einzelnen untersuchten Stadien.

In einer zweiten Reihe von „Run-on“-Transkriptionsexperimenten („Run-on“-Versuchsserie B) wurde zusätzlich die Transkription in nichtseneszenten ausgewachsenen Fahnenblättern aus dem Botanischen Garten der Universität Kiel mit in die Untersuchung einbezogen. Mit den Transkripten aus $2,5 \times 10^7$ isolierten Kernen aus diesem Blattmaterial und der gleichen Menge Kerne aus den anderen Stadien, die aus der gleichen Kernextraktion wie bei der Versuchsserie A stammten, wurden neue DNA-„Dot Blot“-Membranen mit einem veränderten Auftragsmuster hybridisiert. Die Autoradiogramme wurden wegen der fehlenden Möglichkeit einer densitometrischen Auswertung am „BioImager“ ebenfalls nur visuell ausgewertet (Abbildung 3.5.3). Bei der visuellen Auswertung der „Run-on“-Versuchsserien A und B kann nur eine Ab- oder Zunahme des Hybridisierungssignals und gegebenenfalls die Stärke der Veränderung subjektiv beurteilt werden.

Nach der Beschaffung eines „BioImagers“ für das Biozentrum der Universität Kiel konnten die Ergebnisse der nächsten Reihe von „Run-on“-Transkriptionsexperimenten („Run-on“-Versuchsserie C) densitometrisch ausgewertet werden. Für diese Serie wurden jeweils $2,5 \times 10^7$ Kerne aus den vorher isolierten Fraktionen der schon untersuchten Entwicklungsstadien mit Ausnahme der einem Streß ausgesetzten Fahnenblätter und Kerne aus einer neu isolierten Kernfraktion aus dem nichtseneszenten Fahnenblattmaterial der Sorte Nickel verwendet. Die markierten Transkripte der untersuchten Entwicklungsstadien wurden für die Hybridisierung von DNA-„Dot Blot“-Membranen benutzt und das Ergebnis densitometrisch mit der Methode von SASAKI *et al.* (2001) (Kapitel 3.3.4) ausgewertet. Es konnte kein weiteres „Run-on“-Transkriptionsexperiment mit anschließender densitometrischer Auswertung zur Beschaffung von

Parallelwerten durchgeführt werden, da von den Entwicklungsstadien aus dem Jahr 2000 nur noch eine begrenzte Menge Kerne und nicht genügend Blattmaterial für eine erneute Kernisolierung zur Verfügung standen. Eine Varianzanalyse konnte daher nicht durchgeführt werden.

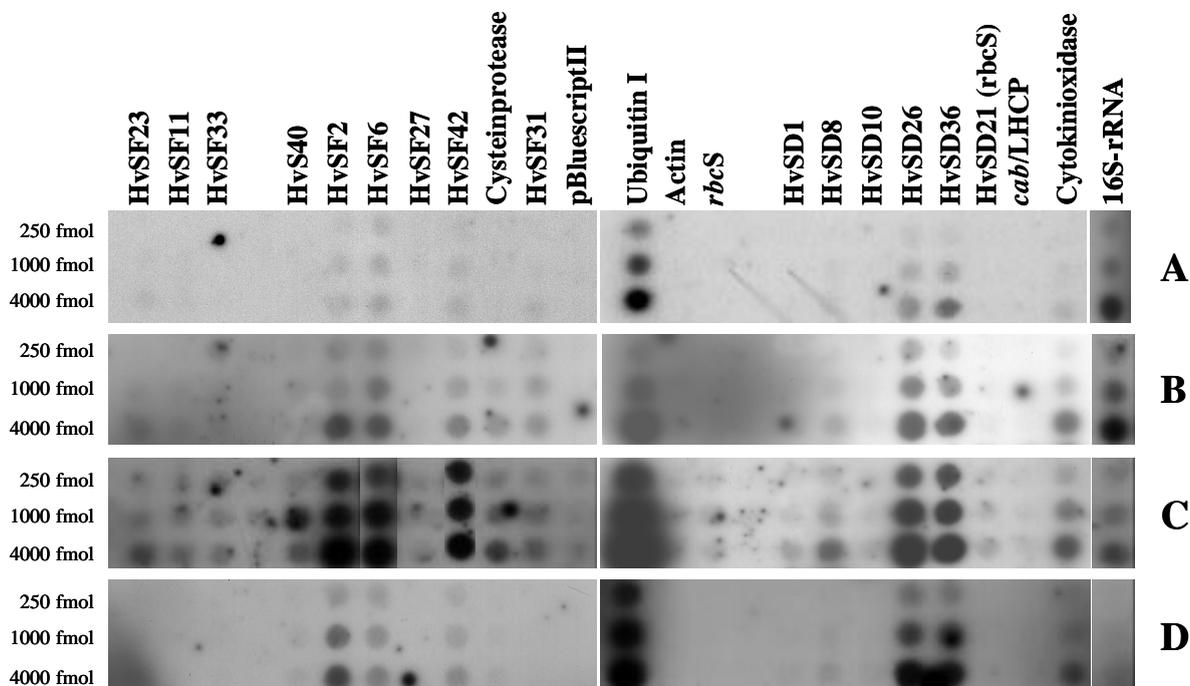


Abbildung 3.5.3: „Run-on“Transkriptionsmuster der Kerne aus verschiedenen Entwicklungsstadien von Fahnenblättern der Gerste im Freiland (Versuchsserie B). **A)** Stadium „Botanischer Garten“, **B)** Stadium „Hohenlieth, Streß“, **C)** „Hohenlieth, frühseneszent“ und **D)** „Hohenlieth, spätseneszent“. Die mit jeweils $2,5 \times 10^7$ Kernen erhaltenen radioaktiv markierten Transkripte wurden mit Nylonmembranen hybridisiert, auf denen genspezifische Sonden in drei Verdünnungsstufen immobilisiert waren (250 / 1000 / 4000 fmol). Alle Membranen wurden für die gleiche Zeit exponiert.

Die Veränderung des relativen Transkriptgehalts während der Seneszenz von Fahnenblättern unter Freilandbedingungen wurde in jedem Entwicklungsstadium einmal untersucht und densitometrisch ausgewertet. Das frühseneszente Entwicklungsstadium der Fahnenblätter aus Hohenlieth konnte nicht untersucht werden, da kein Blattmaterial für die Extraktion von Gesamt-RNA zur Verfügung stand.

Die untersuchten Gene werden im folgenden in Gruppen zusammengefaßt. Für jede Gruppe werden die Veränderungen in der relativen Transkription und im relativen Transkriptgehalt während der Fahnenblattseneszenz unter Freilandbedingungen unter Verwendung der Daten aus der Densitometrie der „Run-on“-Serie C und aus der einmaligen Bestimmung des relativen Transkriptgehalts dargestellt. Auf eine Berechnung der relativen Transkriptstabilität nach GIEGÉ *et al.* (2000) wurde verzichtet.

3.5.3.1 Relative Transkription und relativer Transkriptgehalt der HvSF-Gene während der Seneszenz von Fahnenblättern der Gerste unter Freilandbedingungen

Die Transkription der einzelnen HvSF-Gene der Gerste während der Seneszenz des Fahnenblattes unter Freilandbedingungen wurde in drei unabhängigen Serien von „Run-on“-Transkriptionsexperimenten („Run-on“-Serien A, B und C) untersucht.

Bei der Auswertung der Ergebnisse der ersten beiden Serien (A und B, Abbildung 3.5.3), die durch eine subjektive Abschätzung der Signalstärken auf den Autoradiogrammen erfolgt, wird für die cDNAs HvSF2, HvSF6, HvSF23, HvSF42 und HvS40 eine starke Transkription zu Beginn der Seneszenz des Fahnenblattes unter Freilandbedingungen festgestellt. Die Transkription dieser Gene nimmt im spätseneszenten Stadium wieder ab und zeigt somit einen transienten Verlauf während der Seneszenz. Die Transkription der cDNAs HvSF11, HvSF27, HvSF31 und HvSF33 kann entweder nicht gemessen (HvSF27) werden oder bewegt sich ohne erkennbare Veränderung auf einem sehr niedrigen Niveau (Abbildung 3.5.3).

Die mit „Run-on“-Transkripten aus Durchgang C erhaltenen Hybridisierungssignale wurden densitometrisch ausgewertet und sind zusammen mit den Werten für den relativen Transkriptgehalt in Abbildung 3.5.3.1 dargestellt.

Die densitometrische Auswertung der „Run-on“-Versuchsserie C liefert von der visuellen Auswertung der Serien A und B abweichende Ergebnisse für die relative Transkription der HvSF-Gene während der Fahnenblattseneszenz (Abbildung 3.5.3.1 A). Nur die cDNAs HvSF27 und HvSF42 zeigen eine transiente Expression, während die relative Transkription der cDNAs HvSF2, HvSF6 und HvS40 im Verlauf der Seneszenz stetig ansteigt. Annähernd unverändert auf einem niedrigem Niveau bleibt die relative Transkription der cDNAs HvSF23, HvSF31 und HvSF33. In nichtseneszenten Fahnenblättern aus dem Botanischen Garten ist die relative Transkription dreier Gene (HvSF2, HvSF11 und HvS40) leicht erhöht. Die relative Transkription dieser Gene ist in nichtseneszenten Fahnenblättern aus Hohenlieth deutlich erniedrigt und steigt im Falle der cDNAs HvSF2 und HvS40 im frühseneszenten und spätseneszentem Stadium wieder an, während die relative Transkription der cDNA HvSF11 auf niedrigem Niveau verbleibt. HvS40-Transkripte sind auf den Autoradiogrammen der Versuchsserien A und B bei der visuellen Auswertung kaum sichtbar, erreichen bei der Densitometrie der Versuchsserie C im „BioImager“ aber die höchsten Werte (Abbildung 3.5.3.1 A).

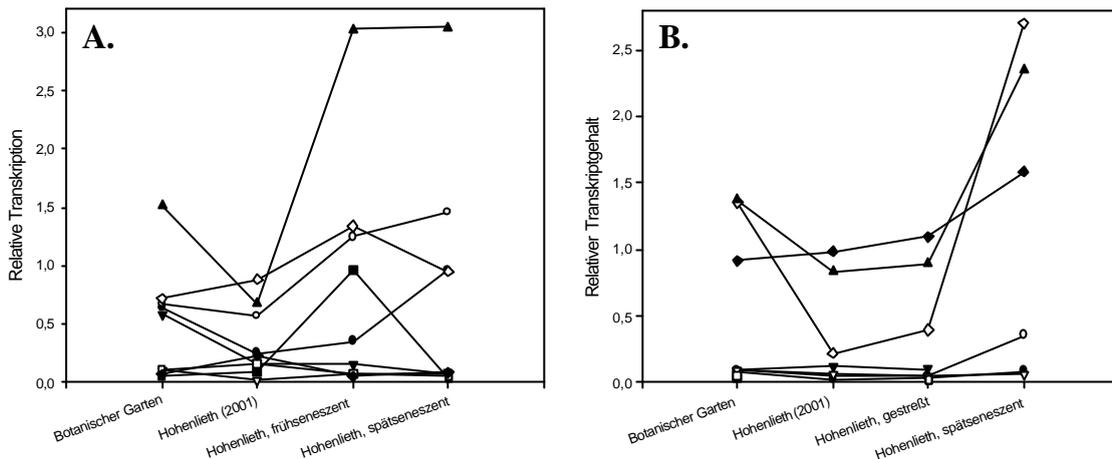


Abbildung 3.5.3.1: Vergleich der relativen Transkription (A.) und des relativen Transkriptgehalts (B.) der **HvSF-Gene** in verschiedenen Entwicklungsstadien von Fahnenblättern der Gerste unter Freilandbedingungen. Die Werte beruhen auf der densitometrischen Auswertung einer Hybridisierung mit „Run-on“-Transkripten bzw. einer Hybridisierung mit markierter cDNA (# = HvSF2,) = HvSF6, & = HvSF11, , = HvSF23, ! = HvSF27, □ = HvSF31, ◆ = HvSF33, (= HvSF42, % = HvS40).

Die relativen Transkriptgehalte der Klone HvSF6, HvSF33, HvSF42 und HvS40 zeigen eine deutliche Erhöhung während der Fahnenblattseneszenz (Abbildung 3.5.3.1 B). Während der Gehalt an HvSF6-Transkripten nur geringfügig steigt, ist der Gehalt der Transkripte im Fall der anderen drei cDNAs erheblich höher. Der relative Transkriptgehalt des HvSF33-Gens steigt während der Fahnenblattalterung stetig an, während er bei den cDNAs HvSF42 und HvS40 auch in dem nichtseneszentem Fahnenblattmaterial aus dem Botanischen Garten erhöht ist, danach aber wieder abnimmt.

Die Zunahme in der relativen Transkription der cDNAs HvSF6, HvSF42 und HvS40 in spät-seneszenten Fahnenblättern (Abbildung 3.5.3.1 A) bewirkt offensichtlich einen erhöhten relativen Transkriptgehalt (Abbildung 3.5.3.1 B), während die Steigerung des Transkriptgehalts im Fall der cDNA HvSF33 nicht unmittelbar auf eine erhöhte Transkription zurückgeht.

3.5.3.2 Relative Transkription und relativer Transkriptgehalt der HvSD-Gene während der Seneszenz von Fahnenblättern der Gerste unter Freilandbedingungen

Die Transkription der einzelnen HvSD-Gene der Gerste während der Seneszenz des Fahnenblattes unter Freilandbedingungen wurde in drei unabhängigen Serien von „Run-on“-Transkriptionsexperimenten untersucht und zweimal durch subjektive Abschätzung der Signalstärke auf den Autoradiogrammen („Run-on“-Versuchsserien A und B) bzw. in einem Fall durch Quantifizierung am „BioImager“ bestimmt („Run-on“-Versuchsserie C, Abbildung 3.5.3.2)

Die cDNAs HvSD8, HvSD26, HvSD34 und HvSD36 besitzen eine gesteigerte Transkription während der Seneszenz des Fahnenblatts unter Freilandbedingungen (Abbildung 3.5.3). Der Verlauf der Transkription der cDNAs HvSD26, HvSD34 und HvSD36 ist nicht transient, sondern in den seneszenten Stadien konstitutiv. Einen transienten Verlauf der Transkription besitzen die cDNAs HvSD8 auf einem hohem, die cDNAs HvSD22, HvSD34 und HvSD37 auf einem sehr niedrigem Niveau. Die Transkription von HvSD1 und HvSD10 ist dagegen schwach und konstitutiv. Nicht meßbar ist die Transkription im Fall der cDNAs HvSD5, HvSD11 und HvSD15.

Die densitometrische Auswertung der Versuchsserie C am „BioImager“ liefert wie bei den HvSF-Genen etwas abweichende Ergebnisse. Eine starke Steigerung der relativen Transkription während der Fahnenblattseneszenz ist für die cDNAs HvSD26, HvSD34 und HvSD36 meßbar, eine leichte Steigerung für die Gene HvSD1, HvSD22 und HvSD37 (Abbildung 3.5.3.2 A). Keine dieser seneszenzabhängigen Steigerungen ist transient. Die relative Transkription des HvSD8-Gens ist in nichtseneszentem Blattmaterial gegenüber seneszentem Blattmaterial deutlich erhöht.

Die cDNAs HvSD1, HvSD8, HvSD10, HvSD26, HvSD36 und HvSD37 besitzen einen unterschiedlich hohen relativen Transkriptgehalt im spätseneszenten Fahnenblatt (Abbildung 3.5.3.2 B). Die deutlichste Zunahme findet sich bei der cDNA HvSD36 und der cDNA HvSD10, die den höchsten relativen Transkriptgehalt aller HvSD-cDNAs besitzt. Da bei den cDNAs HvSD1, HvSD26, HvSD36 und HvSD37 in den jüngeren Stadien nur eine geringe Menge an spezifischem Transkript meßbar ist, fällt die Steigerung des relativen Transkriptge-

halts während der späten Seneszenz bei diesen Genen deutlicher aus als bei der cDNA HvSD10, deren Transkript in allen Stadien deutlich nachweisbar ist. Im Fall des HvSD8-Gens ist auch im nichtseneszenten Fahnblattmaterial aus dem Botanischen Garten ein hoher relativer Transkriptgehalt meßbar.

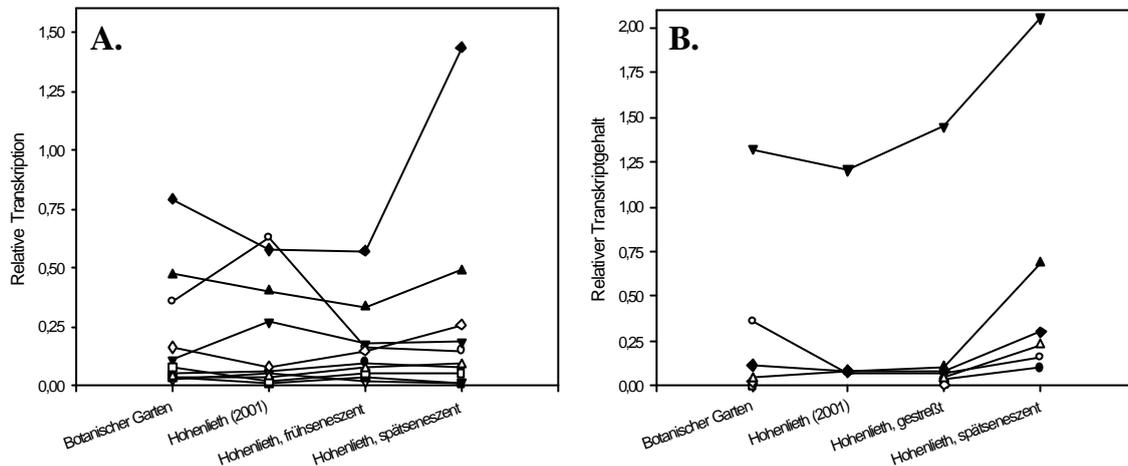


Abbildung 3.5.3.2: Vergleich der relativen Transkription (A.) und des relativen Transkriptgehalts (B.) der HvSD-Gene in verschiedenen Entwicklungsstadien von Fahnblättern der Gerste unter Freilandbedingungen. Die Werte beruhen auf der densitometrischen Auswertung einer Hybridisierung mit „Run-on“-Transkripten bzw. einer Hybridisierung mit markierter cDNA (# = HvSD1, , = HvSD8, & = HvSD10, ! = HvSD11, □ = HvSD15, □ = HvSD22, ◆ = HvSD26, (= HvSD34, % = HvSD36, + = HvSD37).

Die Zunahme der relativen Transkriptgehalte der durch die cDNAs HvSD26, HvSD34 und HvSD36 (Abbildung 3.5.3.2 A) repräsentierten Gene korreliert mit einer erhöhten relativen Transkription (Abbildung 3.5.3.2 B), während die deutliche Steigerung des relativen Transkriptgehalts des HvSD10-Gens nicht unmittelbar auf eine gesteigerte Transkription zurückführbar ist.

3.5.3.3 Relative Transkription und relativer Transkriptgehalt ausgewählter Photosynthesegene während der Seneszenz von Fahnblättern der Gerste unter Freilandbedingungen

Bei den „Run-on“-Versuchsserien A und B sind für die untersuchten Photosynthesegene (PG) bei visueller Abschätzung keine Hybridisierungssignale erkennbar. Alle Angaben zur Veränderung der Transkription und des relativen Transkriptgehalts beruhen daher auf der densitometrischen Auswertung der Versuchsserie C am „BioImager“ (Abbildung 3.5.3.3).

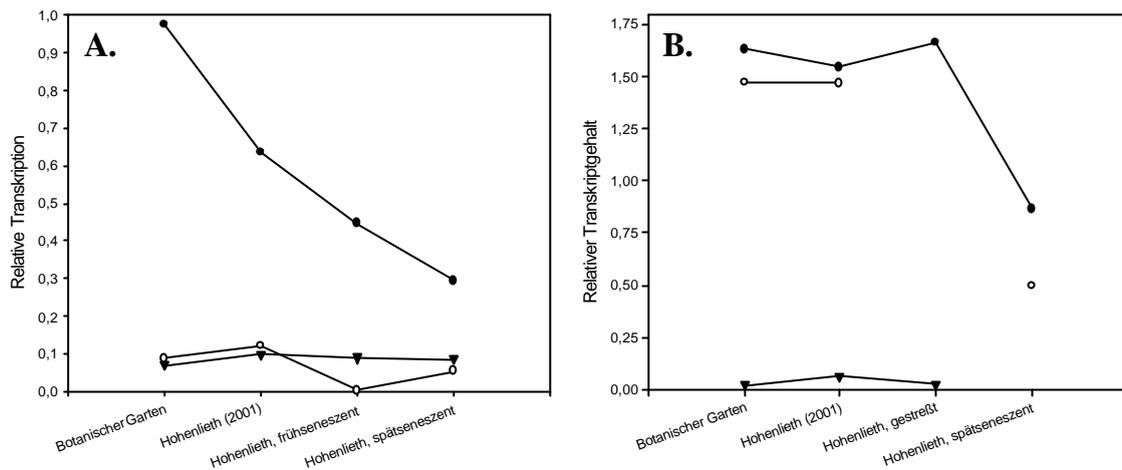


Abbildung 3.5.3.3: Vergleich der relativen Transkription (A.) und des relativen Transkriptgehalts (B.) ausgewählter **Photosynthesegene** in verschiedenen Entwicklungsstadien von Fahnenblättern der Gerste unter Freilandbedingungen. Die Werte beruhen auf der densitometrischen Auswertung einer Hybridisierung mit „Run-on“-Transkripten bzw. einer Hybridisierung mit markierter cDNA (# = *petC*,) = *cab*, & = *rbcS*).

Die relative Transkription des durch den cDNA-Klon LF2 repräsentierten *cab*-Gens und des *rbcS*-Gens (HvSD21) ist in allen untersuchten Entwicklungsstadien des Fahnenblatts sehr niedrig (Abbildung 3.5.3.3 A). Die relative Transkription des *rbcS*-Gens bleibt unverändert, die relative Transkription des *cab* nimmt in frühseneszentem Material leicht ab. Eine deutliche Veränderung der relativen Transkription während der Seneszenz des Fahnenblatts zeigt das *petC*. Dessen relative Transkription nimmt mit zunehmendem Alter des Blattmaterials deutlich ab.

Während der relative Transkriptgehalt des *rbcS*-Gens, soweit bestimmbar, unverändert bleibt, nimmt er im Fall des *petC* und des *cab* während der Seneszenz der Fahnenblätter ab (Abbildung 3.5.3.3 B).

Die Abnahme des relativen Transkriptgehalts für das *petC* erfolgt deutlich zeitverzögert gegenüber der Abnahme in der relativen Transkription.

3.5.3.4 Relative Transkription und relativer Transkriptgehalt der AiGs während der Seneszenz von Fahnenblättern der Gerste unter Freilandbedingungen

Die Werte für die relative Transkription der anderen interessanten Gene (AiG) der Gerste stammen aus einer visuellen Abschätzung von Hybridisierungssignalen auf Autoradiogram-

men („Run-on“-Versuchsserien A und B) und einer densitometrischen Auswertung im „Bio-Imager“ („Run-on“-Versuchsserie C). Die verschiedenen AiGs wurde zur besseren Darstellung alphabetisch geordnet und in zwei Gruppen aufgeteilt.

In der ersten Gruppe befinden sich die Gene für die 16S- und die 26S-rRNA, die Gene für das Actin, für die Aldosereduktase, für die Untereinheit II der Cytochrom-Oxidase, für die Cytokininoxidase, für eine Cysteinprotease und für das ELIP. Von diesen ist nach visueller Abschätzung die Transkription des Cytokininoxidasegens und des ELIP-Gens während der gesamten Fahnenblattseneszenz unter Freilandbedingungen deutlich erhöht. Die Transkription des Cysteinprotease-Gens, das durch die cDNA P2-195 repräsentiert wird, zeigt während der Fahnenblattseneszenz einen transienten Verlauf mit einer verringerten Transkription in spätseneszentem Blattmaterial. Eine Transkription des Actingens und des Gens für die Untereinheit II der Cytochrom-Oxidase kann in keinem Stadium festgestellt werden. Die Kontrollgene 16S- und 26S-rRNA sind in den einem Streß ausgesetzten Fahnenblättern und den frühseneszenten Fahnenblättern stark bzw. schwach transkribiert.

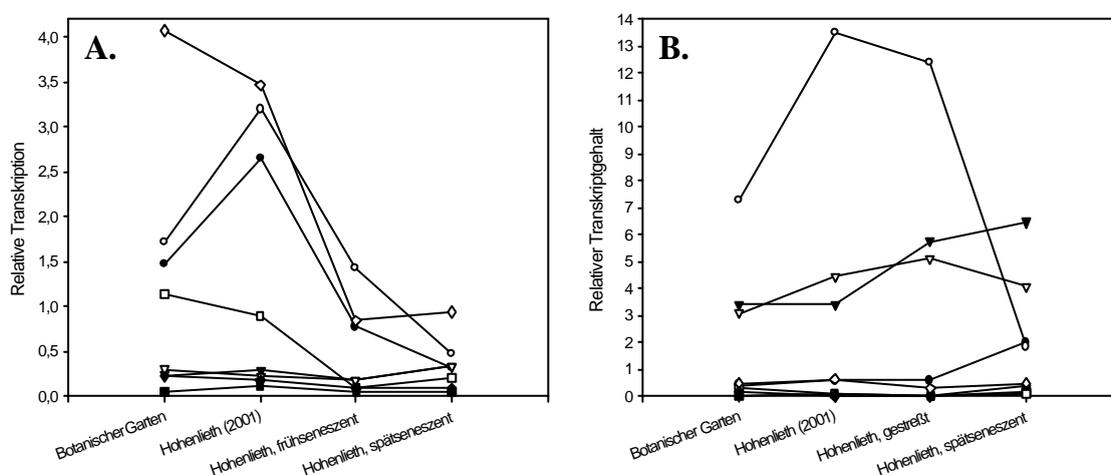


Abbildung 3.5.3.4.1: Vergleich der relativen Transkription (A.) und des relativen Transkriptgehalts (B.) der AiGs der ersten Gruppe in verschiedenen Entwicklungsstadien von Fahnenblättern der Gerste unter Freilandbedingungen. Die Werte beruhen auf der densitometrischen Auswertung einer Hybridisierung mit „Run-on“-Transkripten bzw. einer Hybridisierung mit markierter cDNA (# = 16S-rRNA, , = 26S-rRNA, & = Actin, . = Aldosereduktase, ! = Untereinheit II der Cytochrom-Oxidase, □ = Cytokininoxidase, ◆ = Cysteinprotease, (= ELIP).

Bei den densitometrisch bestimmten Veränderungen in der relativen Transkription (Abbildung 3.5.3.4.1 A) nimmt nur die relative Transkription des Aldosereduktasegens und des Cytokininoxidasegens im Verlauf der Fahnenblattseneszenz geringfügig zu. Dabei ist anzumerken, daß in beiden Fällen die relative Transkription in grünem Fahnenblattmaterial deutlich

höher ist als in frühseneszentem Blattmaterial und erst im spätseneszentem Blatt wieder leicht zunimmt. Die relative Transkription der 16S- und 26S-rRNA-Gene sowie des ELIP-Gens ist in nichtseneszentem Blattmaterial erhöht und nimmt im Verlauf der Fahnenblattseneszenz deutlich ab. Eine Transkription des Actingens ist auch bei Verwendung des „BioImagers“ nicht nachweisbar.

Der relative Transkriptgehalt verändert sich bei vier AiGs aus der ersten Gruppe (Abbildung 3.5.3.4.1 B). Dies sind die Gene für die 16S- und die 26S-rRNA, für die Aldosereduktase und das Actin. Während der relative Gehalt der 16S-rRNA nur im spätseneszenten Stadium erhöht ist, verändert sich der relative Gehalt der 26S-rRNA von hohen Werten in den nichtseneszenten Entwicklungsstadien auf niedrige Werte im spätseneszenten Stadium. Der relative Transkriptgehalt des Actingens steigt während der Entwicklung des Fahnenblattes kontinuierlich an. Der relative Transkriptgehalt der Aldosereduktasegens ist in allen Stadien gleichbleibend relativ hoch (Abbildung 3.5.3.4.1 B).

Trotz einer sehr starken relativen Transkription ist im Fall des ELIP-Gens nur ein sehr geringer relativer Transkriptgehalt meßbar. Für das Actingen und das Aldosereduktasegen geht umgekehrt ein hoher relativer Transkriptgehalt mit einer geringfügigen relativen Transkription einher.

Die zweite Gruppe der AiGs, zu der die Gene für die Isocitratlyase, das JIP-23, die Katalase, die Saccharosesynthase, die SAM-Decarboxylase, das Thionin und das Ubiquitin I gehören, wurde analog zur ersten Gruppe untersucht.

In den ersten Serien von „Run-on“-Transkriptionsexperimenten („Run-on“-Versuchsserie A und B) wurden aus dieser Gruppe nur die Gene für die Isocitratlyase und das Ubiquitin I (Abbildung 3.5.3) untersucht. Auf den Autoradiogrammen kann ein spezifisches Transkript des Isocitratlyasegens als sehr schwaches Signal nur in spätseneszenten Fahnenblättern detektiert werden, während die Transkripte des Ubiquitingens während der gesamten Entwicklung des Fahnenblattes ein annähernd konstant starkes Signal erzeugen, dessen Intensität nur in nichtseneszenten Fahnenblättern leicht erniedrigt ist.

Bei der densitometrischen Auswertung der „Run-on“-Versuchsserie C am „BioImager“ zeigen nur vier der AiGs der zweiten Gruppe Veränderungen der relativen Transkription (Abbildung 3.5.3.4.2 A). Die relative Transkription steigt bei der für das Thionin spezifischen

cDNA pHvJ611 während der Seneszenz geringfügig an. Stärker ist dagegen der Anstieg der relativen Transkription als Folge der Seneszenz des Fahnenblattes bei den Genen für die SAM-Decarboxylase und das Ubiquitin I, während sich die relative Transkription des Katalasegens mit fortschreitender Blattentwicklung verringert.

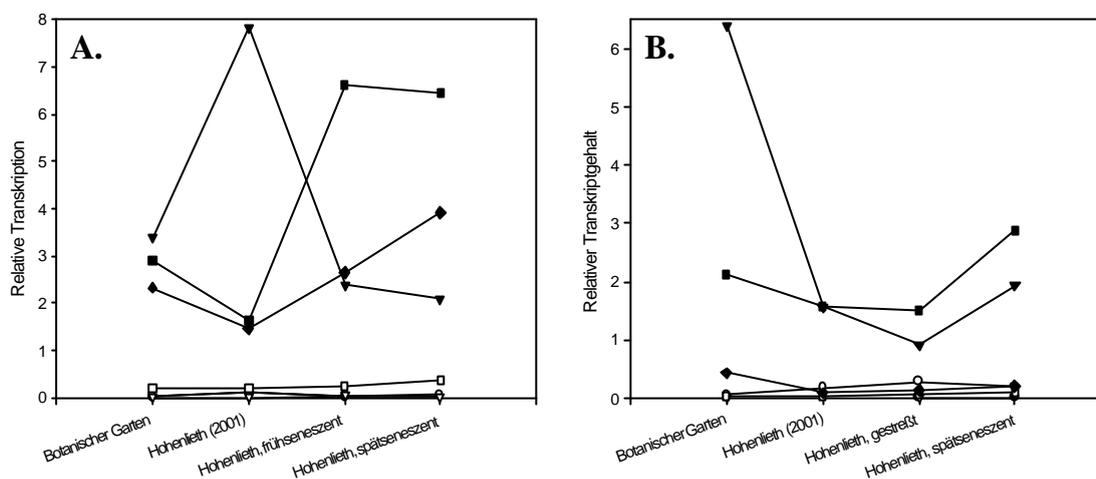


Abbildung 3.5.3.4.2: Vergleich der relativen Transkription (A.) und des relativen Transkriptgehalts (B.) der AiGs der zweiten Gruppe in verschiedenen Entwicklungsstadien von Fahnenblättern der Gerste unter Freilandbedingungen. Die Werte beruhen auf der densitometrischen Auswertung einer Hybridisierung mit „Run-on“-Transkripten bzw. einer Hybridisierung mit markierter cDNA (# = Isocitratlyase,) = JIP-23 (cDNA pHvJ3015), & = Katalase, , = Saccharosesynthase, ! = SAM-Decarboxylase, □ = Thionin (cDNA pHvJ611), ◆ = Ubiquitin I).

Bei der Bestimmung der relativen Transkriptgehalte konnte ebenfalls bei nur vier AiGs der zweiten Gruppe eine Veränderung festgestellt werden (Abbildung 3.5.3.4.2 B). Der relative Transkriptgehalt des Ubiquitins nimmt geringfügig in seneszierenden Blättern ab, während sich der relative Transkriptgehalt der für das JIP-23 spezifischen cDNA pHvJ3015 während der frühen Seneszenz geringfügig erhöht. Deutliche Veränderungen zeigt dagegen der relative Transkriptgehalt der Gene für die Katalase und die SAM-Decarboxylase. Beide besitzen einen erhöhten relativen Transkriptgehalt im grünen Entwicklungsstadium der Fahnenblätter aus dem Botanischen Garten, der sich in den folgenden Stadien verringert und erst während der Spätseneszenz wieder ansteigt (Abbildung 3.5.3.4.2 B).

Die starken Veränderungen in der relativen Transkription der Gene für die Katalase, für die SAM-Decarboxylase und das Ubiquitin I (Abbildung 3.5.3.4.2 A) führen nicht zu einer gleichförmigen Veränderung des relativen Transkriptgehalts (Abbildung 3.5.3.4.2 B). Beide Größen sind, wie im Fall der Katalase zu sehen, gegenläufig.

3.5.4 Vergleichende Betrachtung der Genexpression während der dunkelinduzierten Seneszenz in Primärblättern und der Seneszenz von Fahnenblättern unter Freilandbedingungen

Im folgenden sind die Ergebnisse zur Untersuchung der relativen Transkription und des relativen Transkriptgehalts für die dunkelinduzierte Seneszenz in Primärblättern und die Seneszenz von Fahnenblättern der Gerste unter Freilandbedingungen zusammengefaßt. Die Zunahme eines Wertes während der Seneszenz, d.h. während der Primärblattseneszenz nach einer Dunkelinkubation bzw. während der Fahnenblattseneszenz, wird durch das Symbol „↑“, eine Erniedrigung durch das Symbol „↓“ und ein unveränderter Wert durch ein „=“ gekennzeichnet. Die Symbole geben keine Auskunft über die Stärke der Veränderung.

Zusätzlich werden für die SAGs und die ausgewählten Photosynthesegene der Gerste die Ergebnisse der klassischen „Northern-Blot“-Analysen angegeben.

Das HvS40-Gen besitzt als einziges SAG eine gesteigerte relative Transkription und einen gesteigerten relativen Transkriptgehalt bei beiden untersuchten Seneszenzbedingungen, während bei den cDNAs HvSD11, HvSD15 und HvSD22 keine Veränderung in der relativen Transkription und im relativen Transkriptgehalt des jeweils repräsentierten Gens festgestellt werden kann. Bei den cDNAs HvSF6, HvS40, HvSD10, HvSD37 und beim *petC*-Gen verändern sich die Transkription und der Transkriptgehalt bei beiden Seneszenzbedingungen jeweils in identischer Weise (rot eingrahmt in Tabelle 3.5.4.1). Diese Gene eignen sich daher als „Markergene“ für beide Seneszenzbedingungen. Bei 9 von 18 Genen (50 %) werden die durch „Northern-Blot“-Analysen bestimmten Veränderungen im Transkriptgehalt während der dunkelinduzierten Seneszenz von einer gleichgerichteten Veränderung in der Transkriptionsrate begleitet (grau unterlegte Felder in Tabelle 3.5.4.1). Bei 9 von 13 Genen (69 %) läßt sich während der Seneszenz des Fahnenblatts ein solcher Zusammenhang zwischen der Veränderung in der Transkription und im Transkriptgehalt feststellen (Tabelle 3.5.4.1). Dies bedeutet umgekehrt, daß bei 42 % der Gene, die im Zusammenhang mit der Blattseneszenz der Gerste untersucht wurden, keine Korrelation zwischen der Veränderung der Transkription und der Veränderung des Transkriptgehalts besteht.

Gleichförmige Änderungen in der Transkription und im Transkriptgehalt während der natürlichen und der künstlich induzierten Seneszenz sind nur bei acht von 37 (22 %) untersuchten Genen festzustellen. Diese sind die Gene HvSF6, HvS40, HvSD10, HvSD37 und *petC*, die

3. Ergebnisse

Tabelle 3.5.4.1: Gegenüberstellung der Ergebnisse der Untersuchungen zum Transkriptgehalt (TG) durch „Northern-Blot“-Analysen und durch das „multiplex messenger assay“-Verfahren, sowie zur Transkription (T) durch „Run-on“-Analysen von seneszenzassoziierten Genen und Photosynthesegenen der Gerste während der dunkelinduzierten Seneszenz des Primärblatts (DS) und der Fahnenblattseneszenz unter Freilandbedingungen (FS). Namen von Genen mit signifikant veränderter Transkription während der dunkelinduzierten Seneszenz sind fettgedruckt und unterstrichen, eine gleichförmige Veränderung in der Transkription und im Transkriptgehalt ist grau unterlegt. Der rote Rahmen hebt gleichförmige Veränderungen bei beiden Seneszenzbedingungen hervor. Die Zahl gibt die Referenzliteratur an (n.a. = nicht auswertbar, n.d. = nicht detektierbar).

	klassischer „Northern-Blot“		„Run-on“-Transkription		„multiplex messenger assay“	
	DS – TG	FS – TG	DS - T	FL – T	DS – TG	FL – TG
HvSF2	= 6	Ý 5	B	Ý	Ý	Ý
HvSF6	Ý 6	Ý 5	Ý (+ 123 %)	Ý	=	=
HvSF11	Ý 1	B 1	Ý (+ 230 %)	=	Ý	=
HvSF23	Ý 1	Ý 1	B	=	Ý	=
HvSF27	n.d. 6	Ý 5	=	Ý	=	=
HvSF31		Ý 5	B	=	B	=
HvSF33			=	=	B	Ý
HvSF42	Ý 6	Ý 5	Ý	Ý	=	Ý
HvS40	Ý 4	Ý 2	Ý (+ 147 %)	Ý	Ý	Ý
HvSD1	Ý 4		Ý (+ 690 %)	=	Ý	=
HvSD8	Ý 4	Ý 4	B	B	B	=
HvSD10	Ý 4	n.d. 4	=	=	Ý	Ý
HvSD11	Ý 3		=	=	n. a.	=
HvSD15	Ý 3		=	=	n. a.	=
HvSD22	B 3		=	=	n. a.	=
HvSD26	Ý 4	Ý 4	Ý	Ý	=	Ý
HvSD34	Ý 3		B	Ý	=	=
HvSD36	Ý 4	Ý 4	Ý (+ 482 %)	Ý	=	Ý
HvSD37	Ý 3		=	=	Ý	Ý
<i>petC</i>		B 2	B	B	B	B
<i>cab</i>	B 4		B	B	n. a.	B
<i>rbcS</i>	B 4	B 2	B	=	n. a.	=

1 = CHROST & KRUPINSKA (2000), 2 = HUMBECK *et al.* (1996), 3 = KLEBER-JANKE (1996), 4 = KLEBER-JANKE & KRUPINSKA (1997), 5 = QUAST (1995), 6 = vorliegende Arbeit

Gene für die 26S-rRNA, die Cytokininoxidase und die SAM-Decarboxylase, die in den Tabellen 3.5.4.1 und 3.5.4.2 rot eingerahmt dargestellt sind. Darunter befinden sich nur vier als SAG eingestufte Gene. Dies Ergebnis zeigt, daß nur ein kleiner Teil, nämlich 20 % (vier von 20) der untersuchten SAGs auch während der dunkelinduzierten Seneszenz exprimiert werden.

Veränderungen im Transkriptgehalt während der Seneszenz wurden für die meisten AiGs bisher nicht untersucht. Daher gibt es keine „Northern-Blot“-Vergleichsdaten für die Ergebnisse des „multiplex messenger assay“ aus der vorliegenden Arbeit.

Tabelle 3.5.4.2: Veränderungen in der relativen Transkription, bestimmt durch „Run-on“-Transkriptionen, und im relativen Transkriptgehalt, bestimmt durch „multiplex messenger assays“, der AiG während der dunkelinduzierten Seneszenz der Primärblätter und der Seneszenz der Fahnenblätter unter Freilandbedingungen. Namen von Genen mit signifikant veränderter Transkription sind fettgedruckt und unterstrichen. Der rote Rahmen kennzeichnet gleichförmige Veränderungen bei beiden Seneszenzbedingungen.

	<i>dunkelinduzierte Seneszenz des Primärblatts</i>		<i>Seneszenz des Fahnenblatts unter Freilandbedingungen</i>	
	relative Transkription	relativer Transkriptgehalt	relative Transkription	relativer Transkriptgehalt
16S-rRNA	<u>β</u>	=	<u>β</u>	<u>Ý</u>
26S-rRNA	<u>β</u>	<u>β</u>	<u>β</u>	<u>β</u>
Actin	=	=	=	<u>Ý</u>
Aldose-reduktase	<u>β</u>	=	=	<u>β</u>
CoxII	=	=	=	=
Cytokininoxidase	<u>β</u>	=	<u>β</u>	=
Cysteinprotease	<u>β</u>	=	=	=
ELIP	<u>β</u>	<u>Ý</u>	<u>β</u>	=
Isocitratlyase	=	=	=	=
JIP-23	=	<u>β</u>	=	=
Katalase	<u>Ý</u>	<u>β</u>	<u>β</u>	<u>Ý</u>
Saccharose-synthase	<u>β</u>	=	=	=

3. Ergebnisse

	<i>dunkelinduzierte Seneszenz des Primärblatts</i>		<i>Seneszenz des Fahnenblatts unter Freilandbedingungen</i>	
	relative Transkription	relativer Transkriptgehalt	relative Transkription	relativer Transkriptgehalt
<u>SAM-Decarboxylase</u>	Ÿ (+ 100%)	Ÿ	Ÿ	Ÿ
Thionin	Ÿ	=	=	=
Ubiquitin I	=	=	Ÿ	=

Besonders interessant im Hinblick auf seneszenzabhängige Veränderungen ist das Expressionsverhalten des 26S-rRNA-Gens und des Gens für die SAM-Decarboxylase. Die relative Transkription und der relative Transkriptgehalt nehmen im Fall des 26S-rRNA-Gens ab (Tabelle 3.5.4.2), während sie beim Gen für die SAM-Decarboxylase unter beiden Seneszenzbedingungen zunehmen. Das bedeutet, daß das gegenläufige Expressionsverhalten der beiden Gene als „Marker“ für Seneszenzprozesse in Frage kommt.

Die Ergebnisse der „Run-on“-Experimente und die Ergebnisse der „Northern-Blot“-Analysen bzw. des „multiplex messenger assay“ (MMA) können verwendet werden, um die Ebene zu bestimmen, auf der die Expression bei einer Auswahl von Genen kontrolliert wird (Tabelle 3.5.4.3). Wenn sich die Transkriptionsrate und der Transkriptgehalt gleichförmig verändern, ist die Genexpression vorwiegend transkriptionell reguliert. Verändert sich der Transkriptgehalt unabhängig von der Transkription, erfolgt die Kontrolle der Genexpression während der dunkelinduzierten Seneszenz der Primärblätter bzw. der Seneszenz von Fahnenblättern vorwiegend auf posttranskriptioneller Ebene. Dies ist bei 32 % bzw. 39 % der untersuchten Seneszenz- und Photosynthesegene der Gerste der Fall (Tabelle 3.5.4.3). Auffällig ist hier das Ergebnis für die cDNA HvSF6, für die sich bei beiden Seneszenzbedingungen abhängig von der Methode, mit der der Transkriptgehalt bestimmt wurde, jeweils eine andere Ebene der Genexpressionskontrolle ergibt. Für die cDNAs HvSD8, HvSD26 und HvSD36 finden sich solche Abweichungen im Fall der dunkelinduzierten Seneszenz.

3. Ergebnisse

Tabelle 3.5.4.3: Regulation der Genexpression der untersuchten SAGs und Photosynthesegene während beider Seneszenzbedingungen. Die Ergebnisse ergeben sich aus der „Run-on“-Transkriptionsanalyse und der „Northern-Blot“- (NB) bzw. „MMA“-Analyse. Über nicht aufgeführte Gene liegen keine Ergebnisse vor.

dunkelinduzierte Primärblattseneszenz				Seneszenz von Fahnenblättern im Freiland			
Regulation der Genexpression vorwiegend				Regulation der Genexpression vorwiegend			
Transkriptionell	posttranskriptionell	transkriptionell	posttranskriptionell	transkriptionell	posttranskriptionell	transkriptionell	Posttranskriptionell
NB	NB	MMA	MMA	NB	NB	MMA	MMA
HvSF6	HvSF2		HvSF2	HvSF2		HvSF2	
HvSF11		HvSF11	HvSF6	HvSF6			HvSF6
	HvSF23		HvSF23		HvSF11		
				HvSF27	HvSF23		HvSF27
		HvSF31			HvSF31		
HvSF42			HvSF33				HvSF33
HvS40		HvS40	HvSF42	HvSF42		HvSF42	
HvSD1		HvSD1	HvS40	HvS40		HvS40	
	HvSD8	HvSD8			HvSD8		HvSD8
	HvSD10		HvSD10				HvSD10
	HvSD11						
	HvSD15						
	HvSD22						
HvSD26			HvSD26	HvSD26		HvSD26	
	HvSD34		HvSD34				HvSD34
HvSD36			HvSD36	HvSD36		HvSD36	
	HvSD37		HvSD37				HvSD37
<i>cab</i>		<i>petC</i>		<i>petC</i>		<i>petC</i>	
<i>rbcS</i>				<i>cab</i>	<i>rbcS</i>	<i>cab</i>	
9 / 22	9 / 22	6 / 22	10 / 22	9 / 22	5 / 22	7 / 22	7 / 22
41 %	41 %	27 %	45 %	41 %	23 %	32 %	32 %

4. Diskussion

Zu den Merkmalen der Blattseneszenz gehört neben der sichtbaren Abnahme des Gehalts an Chlorophyll und der Auflösung der Chloroplasten auch eine Abnahme des Nukleinsäure- und Proteingehalts der Zellen. Diese und verschiedene andere Abbauprodukte werden während der Seneszenz zur Versorgung anderer Pflanzenorgane verwendet. Zu Beginn der Seneszenz werden vor allem ribosomale RNAs, Transkripte von Photosynthesegenen und von Genen des anabolen Stoffwechsels abgebaut. Dies geschieht im Zusammenhang mit einer Umprogrammierung der Zelle, die zu einer Aktivierung von seneszenzspezifischen Genen führt. Diese kodieren in der Mehrzahl für Proteine, die am Abbau von Makromolekülen, an der Remobilisierung verschiedener Stoffe oder am Schutz des Blattes gegen biotische oder abiotische Streßfaktoren beteiligt sind. Durch den Erhalt der Lebensfähigkeit des Blattes bis zu einem späten Stadium der Seneszenz wird die Voraussetzung für die Remobilisierung der abgebauten Zellsubstanzen geschaffen.

Die Identifizierung dieser sogenannten seneszenzspezifischen Gene erfolgte in den meisten Fällen über seneszenzabhängige Veränderungen im Transkriptgehalt, die mit klassischen „Northern-Blot“-Analysen bestimmt wurden. Gene, deren Anteil an der Gesamt-RNA im Laufe der Seneszenz zunimmt, werden als SAG definiert (LOHMAN *et al.* 1994). Dabei muß aber berücksichtigt werden, daß die Gesamt-RNA einer seneszierenden Zelle abnimmt. Während die ribosomale RNA sehr schnell abgebaut wird (HENSEL *et al.* 1993), scheinen spezifische mRNAs während der Seneszenz unterschiedlich schnell abgebaut zu werden (CRAFTS-BRANDNER *et al.* 1996, DRAKE *et al.* 1996, NOODÉN *et al.* 1997). Bei einem Bezug der Transkriptmenge eines Gens auf eine normierte Menge an Gesamt-RNA beim „Northern-Blot“-Verfahren sind grundsätzlich zwei Ursachen für die Akkumulation der betreffenden genspezifischen RNA denkbar. Einerseits kann die verstärkte Akkumulation eines Transkripts durch eine erhöhte Transkription, andererseits aber auch durch eine erhöhte Stabilität der Transkripte verursacht werden. Da in der Seneszenzforschung nicht zwischen beiden Möglichkeiten unterschieden wird, handelt es sich in beiden Fällen bei den Genen um SAGs. Erst eine zusätzliche Analyse der Transkriptionsrate eines Gens während der Seneszenz kann Aufschluß darüber liefern, ob ein Transkript aufgrund seiner erhöhten Transkription oder einer erhöhten Transkriptstabilität akkumuliert.

Um die molekularen Grundlagen der Seneszenz zu verstehen, ist weiterhin die Identifizierung neuer SAGs von großen Interesse. Dies schließt die Suche nach Faktoren ein, die die seneszenzabhängige Expression der betreffenden Gene auf Transkriptionsebene steuern. Solche

Untersuchungen sind jedoch nur durch eine Analyse der Transkription möglich, erlauben aber die Identifizierung von interessanten, altersabhängig regulierten Promotoren.

4.1 „Run-on“-Transkription

Die „Run-on“-Transkriptionsanalyse hat den Vorteil, daß die Transkription direkt gemessen wird und daß nicht, wie bei der klassischen „Northern-Blot“-Analyse, indirekt über den Transkriptgehalt auf die Transkription geschlossen werden muß. Durch sofortiges Schockgefrieren des Probenmaterials wird die Transkription zum Zeitpunkt der Probennahme fixiert. Da während einer „Run-on“-Transkription keine Neuinitiation der Transkription stattfindet, sondern ausschließlich die vor der Probennahme begonnene Transkription fortgesetzt wird, repräsentieren die markierten Transkripte das Transkriptionsmuster zum Zeitpunkt der Probennahme. Die Elongation der Transkripte erfolgt durch Inkubation der Kerne in Anwesenheit eines radioaktiv markierten Nukleotids. Für die Durchführung eines „Run-ons“ mit Kernen sind mehrere Protokolle verfügbar. Das in dieser Arbeit angewendete Protokoll wurde ursprünglich für Plastiden-„Run-ons“ konzipiert, ist aber mit anderen Protokollen für die Verwendung von Kernen in „Run-on“-Transkriptionsexperimenten vergleichbar (WILLMITZER & WAGNER 1981, DEROCHER & BOHNERT 1993). Andere Protokolle stellen durch Zugabe von Phosphocreatin (Creatinphosphat) und Creatinphosphokinase (LUTHE & QUATRANO 1980b, MANSFIELD & RAIKHEL 1990, FENNOY & BAILEY-SERRES 1995, YI *et al.* 1999) bzw. Phosphoenolpyruvat und Pyruvatkinase (HAHN *et al.* 1996) im Transkriptionsansatz Energie in Form von energiereichen Phosphatgruppen zur Verfügung, was zu einer 50 %igen Erhöhung der RNA-Synthese führen kann (LUTHE & QUATRANO 1980b, KANAZAWA *et al.* 2000). Für die vorliegende Arbeit wurde mit isolierten Kernen die Einbaueffizienz bei der Anwendung des Protokolls für „Run-on“-Transkription mit isolierten Kernen von DEROCHER & BOHNERT (1993) und eines geringfügig modifizierten Protokolls für „Run-on“-Transkription mit Plastiden (DENG *et al.* 1987) verglichen. Das Protokoll für die Plastiden lieferte deutlich höhere Einbauraten und wurde fortan als Standardmethode verwendet.

Die Höhe des Einbaus an radioaktiv markierten Nukleotiden in die naszierenden Transkripte hängt vom Zustand der Kerne nach der Extraktion ab (KANAZAWA *et al.* 2000). Um eine Beschädigung der Kerne während der Extraktion zu vermeiden, werden für die Aufarbeitung des Pflanzenmaterials in der Literatur verschiedene Methoden vorgeschlagen. Dazu gehören Zerschneiden (THOMPSON *et al.* 1997, KANAZAWA *et al.* 2000), Mazeration zur Gewinnung von

Protoplasten (MÖSINGER & SCHÄFER 1984) oder Mörsern von Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff (COX & GOLDBERG 1988). Im Vergleich zum Mörsern, daß eine hohe Ausbeute intakter Kerne liefert, erscheint ein enzymatischer Aufschluß der Blätter zu aufwendig. Hin-gegen führt das Zerschneiden der Blätter unter Verzicht auf eine mechanische Zerkleinerung der Blätter durch Mörsern zu einer deutlich verringerten Kernaussbeute.

Ein Nachteil der „Run-on“-Transkription mit isolierten Kernen ist die große Menge an Blattmaterial, die für die Extraktion einer ausreichenden Kernmenge benötigt wird. Nach LUTHE & QUATRANO (1980a) bzw. FENNOY & BAILEY-SERRES (1995) wurden 20 g Blattmaterial für eine Extraktion verwendet. Die aus dieser Blattmenge isolierten Kerne reichen für mindestens zwei Transkriptionsexperimente mit jeweils $2,5 \times 10^7$ Kernen. Bei einem Ausweichen auf das Kernextraktionsprotokoll von KANAZAWA *et al.* (2000) wird zwar weniger Pflanzenmaterial benötigt, die Kernaussbeute ist aber so gering, daß nur durch eine höhere Menge an Pflanzenmaterial oder durch zeitaufwendige Modifikationen eine ausreichende Ausbeute für ein Transkriptionsexperiment mit $2,5 \times 10^7$ Kernen erzielt wird (BROSCH 2001). Nach Beendigung der „Run-on“-Transkription werden die Transkripte aus dem Transkriptionsansatz extrahiert. Die Kerne werden zu Beginn der Transkription nicht bewußt durch Scherkräfte beschädigt, wie es bei der Verwendung von Plastiden durch mehrmaliges Ansaugen mit einer Pipette erreicht wird (KRAUSE 1999). Erst durch eine anschließende Extraktion der Nukleinsäuren werden die im Kern eingeschlossenen Transkripte freigesetzt und stehen für die Hybridisierung zur Verfügung.

4.1.1 Nichtradioaktive Markierung von „Run-on-Transkripten

Neben der routinemäßig verwendeten Markierung der Transkripte durch den Einbau von Radionukleotiden bieten sich andere Nukleotide für eine nichtradioaktive Markierung an. Zu diesen gehören Nukleotide mit einem gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff, biotinmarkierte Nukleotide, digoxigeninmarkierte Nukleotide für einen Nachweis über Chemilumineszenz (MERSCHER *et al.* 1994) oder ein colorimetrisches Verfahren, sowie Nukleotide mit einer Schwefel-, einer Brom- oder einer Aminoallylgruppe. Eine Markierung der Transkripte mit einem Fluoreszenzfarbstoff ermöglicht eine Hybridisierung von in der Molekularbiologie inzwischen weit verbreiteten „DNA-Arrays“ auf Glaträgern zur Analyse der Transkription. Es können mit Biotin-16-Uridin-5'-triphosphat markierte „Run-on“-Transkripte spezifisch mit Hilfe von Streptavidin isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe einer PCR mit einem

Fluoreszenzfarbstoff markiert werden (PATRONE *et al.* 2000). Die Biotinmarkierung bietet sich weiterhin für eine Markierung über einen fluoreszenzmarkierten Antikörper (z.B. von Molecular Probes) an. Thio- und Bromogruppen eignen sich ebenso wie die Biotinmarkierung für eine spezifische Bindung an Säulenmaterial oder Magnetkügelchen zur Anreicherung und Aufreinigung der markierten Transkripte. Die Aminoallylgruppe stellt eine universelle Kopplungsgruppe dar, an der beliebige Liganden, die einen Succinimidylester tragen, ohne Energiezufuhr in einer einfachen Reaktion gebunden werden können. Solche Liganden können beispielsweise Fluoreszenzfarbstoffe oder Biotin für einen Nachweis der Transkripte sein. Dabei wird der aktivierte Ester von der freien reaktiven Aminogruppe des Aminoallylrests nukleophil angegriffen und es kommt zur Ausbildung einer stabilen Amidbindung. Problematisch ist die geringe Selektivität dieser Reaktion, weshalb dafür gesorgt werden muß, daß konkurrierende Aminogruppen z.B. im Puffer, aus dem Reaktionsansatz entfernt werden müssen. Erste Vorarbeiten zur Nutzung des Aminoallyl-Uridin-5'-triphosphat für eine Markierung von „Run-on“-Transkripten wurden bereits durchgeführt und zeigen, daß der Einbau des Nucleotids in naszierende Transkripte problemlos erfolgt und auch die Kopplung eines Fluoreszenzfarbstoffs an die aminoallylmarkierten „Run-on“-Transkripte stattfindet (SCHARRENBURG *et al.* 2001). Die Effizienz der Kopplungsreaktion ist jedoch noch sehr gering. Nach der Optimierung der Reaktionsbedingungen und der Entwicklung eines Nachweises für die fluoreszenzmarkierten Transkripte auf Objektträgern aus Glas, auf denen DNA immobilisiert wird, kann durch die einfache Nutzung einer universellen Kopplungsgruppe eine starke Verringerung der Transkription durch den Einsatz großer Nucleotide verhindert werden. Der Einbau einer Kopplungsgruppe ist damit eine Alternative zum Einsatz der radioaktiven Markierung.

Die Verwendung eines modifizierten Nucleotids für die Markierung von „Run-on“-Transkripten bietet sich nur dann an, wenn die Transkriptionsrate durch die teilweise sehr großen Nucleotide nicht zu stark vermindert wird. Die im Schnitt gemessene Abnahme von ca. 40 % ist unter Berücksichtigung der hohen Transkriptionsaktivität der Kerne während der „Run-on“-Transkription vertretbar, zumal durch eine Optimierung der Transkriptionsbedingungen diese Abnahme sicherlich noch verringert werden kann.

Die Steigerung der Einbauaktivität bei Verwendung von 5-Bromo-Uridin-5'-triphosphat (Tabelle 3.2.4) überrascht angesichts der Tatsache, daß das Molekül etwas größer als das Referenzmolekül ist. Allerdings ist zu berücksichtigen, daß das in dieser Arbeit verwendete Aliquot des 5-Bromo-uridin-5'-triphosphat schlecht dokumentiert und schon mehrere Jahre alt war, so daß Veränderungen in der Konzentration und im Zustand des Nucleotids vorstellbar

sind. Für eine Überprüfung dieser Ergebnisse müssen die Versuche mit neu synthetisiertem 5-Bromo-Uridin-5'-triphosphat wiederholt werden.

4.2 Hybridisierung mit „Run-on“-Transkripten und einer komplexen cDNA-Sonde

Bei der Herstellung von DNA-„Dot Blot“-Membranen wird eine große Zahl von verschiedenen DNA-Fragmenten auf der Membran immobilisiert, die die zu untersuchenden Gene als Ganzes oder in Teilen repräsentieren. Die genspezifische Sonde ist somit auf der Membran immobilisiert. Für die Hybridisierung dieser Membranen wird ein Gemisch verwendet, das entweder aus „Run-on“-Transkripten oder markierten cDNAs besteht, die spezifisch an die immobilisierten Sonden binden. Da bei dieser Art der Hybridisierung die Sonde auf der Membran gebunden und das „Target“ in der Hybridisierungslösung enthalten ist, kann man auch von einer „inversen Hybridisierung“ sprechen. Obwohl die Sonde im eigentlichen Sinn auf der Membran fixiert ist, wird die Nukleinsäure bei der Verwendung von DNA-„Dot Blot“-Membranen in der Hybridisierungslösung in Anlehnung an die „Northern-“ und „Southern-Blot“-Analyse weiterhin als Sonde bezeichnet, ob wohl sie der Nomenklatur nach eigentlich das sogenannte „Target“ darstellt.

Die Verwendung von DNA-„Dot Blot“-Membranen mit einer Vielzahl von immobilisierten Genen oder Genfragmenten erfolgt grundsätzlich wie bei der „Array“- oder „Chip“-Technologie, da sich nur das Trägermaterial, die Dichte der unterschiedlichen DNA-Proben auf diesem Träger und die Art der Sondenmarkierung von dieser unterscheiden. Die Immobilisierung einer großen Zahl von DNA-Fragmenten auf einer Membran und die Messung der Transkriptgehalte über die Hybridisierung dieser Membran mit einem cDNA-Gemisch ist vergleichbar mit einer großen Anzahl von parallelen „Northern-Blot“-Analysen und wird in der Literatur als „multiplex messenger assay“ (MMA) bezeichnet (BERNARD *et al.* 1996, JORDAN 1998). Zwischen dem MMA und dem klassischen „Northern-Blot“-Verfahren gibt es zwei grundlegende Unterschiede. Der „Northern-Blot“ erlaubt die gleichzeitige Untersuchung mehrerer RNA-Proben, dies können z.B. unterschiedliche Entwicklungsstadien einer Pflanze sein, mit jeweils einer DNA-Sonde. Dadurch kann der Anteil einer spezifischen RNA an der Gesamt-RNA in verschiedenen Entwicklungsstadien direkt miteinander verglichen werden, der Versuch muß aber für jedes Gen wiederholt werden. Die Technik des MMA erlaubt dagegen die gleichzeitige Untersuchung vieler Gene, jedoch nur mit einer komplexen RNA-Probe, die die gesamte RNA eines bestimmten Entwicklungsstadiums enthält. Daher muß für einen Ver-

gleich verschiedener RNA-Proben, die z.B. unterschiedliche Entwicklungsstadien repräsentieren, jede RNA-Probe mit dem MMA einzeln untersucht werden.

4.2.1 Die Qualität von Hybridisierungssignalen

Die Digitalisierung der Signale des „BioImagers“, die nach Hybridisierung mit „Run-on“-Transkripten oder cDNA-Proben (MMA) erhalten werden, ermöglicht eine densitometrische Auswertung, die auf Basis von Röntgenfilmen in dieser Genauigkeit nicht möglich ist, da hier die Schwärzung des Films nicht linear von der Strahlung abhängt (PELIZZARI *et al.* 2000). Röntgenfilme besitzen zwar eine höhere Schärfe, aber eine niedrigere Auflösung als eine „BioImager“-Bildplatte („Imaging Plate“), deren „gespeicherte“ Daten mit Unterstützung der entsprechenden Software mit bis zu 65.556 Graustufen dargestellt werden können und so eine graduelle Abstufung der Signalstärke über einen großen Bereich möglich ist.

Ähnlich wie bei allen Hybridisierungsexperimenten reicht eine einmalige Durchführung der Hybridisierung mit „Run-on“-Transkripten oder cDNA-Sonden nicht aus. Schwankungen in der Effizienz der Markierung, die Hybridisierungsbedingungen, das Waschen, unspezifische Hybridisierung, unspezifischer Hintergrund, unterschiedliche Expositionszeiten und die fortschreitende Degradation der Membranen können die Qualität der Hybridisierungssignale beeinträchtigen (BERNARD *et al.* 1996, SCHUCHHARDT *et al.* 2000, SEKI *et al.* 2001, WANG *et al.* 2001). Die durch diese Faktoren verursachte Variabilität der Ergebnisse kann durch die mehrfache Wiederholung der Experimente verringert werden. Die empfohlene Mindestanzahl der nötigen Wiederholungen zur Minimierung von Fehlklassifizierungen reicht je nach Autor von zwei bis drei (LEE *et al.* 2000) oder bis zu sechs Wiederholungen (HERWIG *et al.* 2001). Soweit es in dieser Arbeit möglich war, z.B. bei der „Run-on“-Transkriptionsanalyse mit Kernen aus dunkelinkubierten Primärblättern, wurden die Hybridisierungen daher mehrfach durchgeführt.

4.2.2 Korrelation zwischen der Signalstärke und der Sondenkonzentration

Im Gegensatz zu „Northern-“, oder „Southern-Blot“-Analysen, bei denen die Sonde im Überschuß vorliegt und es zu einer vollständigen Abdeckung der homologen RNA oder DNA

durch die Sonde kommt, wird bei der Transkriptionsanalyse mit der „Array“-Technologie eine sehr komplexe Sonde verwendet, in der die meisten Transkripte nur in sehr geringen Mengen vorkommen (JORDAN 1998, BERTUCCI *et al.* 1999). Unter diesen Bedingungen, bei denen es zu keinen sterischen Behinderungen einzelner Sondenmoleküle kommen kann, ist von einer linearen Abhängigkeit der Signalstärke vom Transkriptgehalt auszugehen. Bei ansteigender Sondenkonzentration, d.h. bei Genen mit einer hohen Transkriptabundanz bzw. Transkriptionsrate kann es dagegen zu einer Konkurrenz um Bindestellen auf der Membran kommen, bei der die lineare Abhängigkeit zwischen Signalstärke und Transkriptgehalt verlorengeht (BERTUCCI *et al.* 1999). Der umgekehrte Fall, eine Konkurrenz der gebundenen DNA um eine beschränkte Anzahl von Sondenmolekülen, tritt bei der Verwendung mehrerer „Dots“ mit der gleichen DNA auf einer Membran auf (RUAN *et al.* 1998). Diese Konkurrenz ist in der vorliegenden Arbeit durch die auf den Membranen immobilisierten Plasmid-DNA-Konzentrationsreihen oder bei Duplikaten einiger Gene auf einer Membran gegeben. Bei Genen mit einer niedrigen Transkriptabundanz verteilen sich die wenigen Transkripte in der Hybridisierungslösung gleichmäßig auf die „DNA-Dots“ und verursachen jeweils ein schwaches Signal, während es bei Genen mit einer hohen Transkriptabundanz zu einer Sättigung der „DNA-Dots“ kommen kann.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmidkonzentrationen, die ursprünglich für eine visuelle Auswertung ausgewählt wurden, haben sich als ungeeignet für eine densitometrische Auswertung erwiesen. Im Verlauf der Arbeit wurde deutlich, daß die verwendeten DNA-Konzentrationen ab 250 fmol für eine Auswertung als Verdünnungsreihe im „BioImager“ zu hoch waren, da nur bis zu einer DNA-Konzentration von 250 fmol ein linearer Zusammenhang zwischen Signalintensität und Plasmidkonzentration besteht. Daher wurden nur die für die 250 fmol-Konzentration erhaltenen Signale ausgewertet.

Über der Fläche eines „BioImager“-Signals, dem sogenannten „Spot“, ist die Signalverteilung uneinheitlich, da sich ein dunkles Zentrum bildet und sich das Signal zum Rand hin bis auf das Hintergrundniveau abschwächt (PELIZZARI *et al.* 2000). Daher ist es notwendig, eine Kreisfläche zu definieren, über die bei allen „Spots“ vom Computer die Signalintensität integriert wird. Bei „Spots“ mit einem starken Signal wird durch Überstrahlung eine Art Strahlenkranz ausgebildet, der die Fläche des „Spots“ scheinbar vergrößert. Durch die Auswertung einer definierten Kreisfläche wird dieser Strahlenkranz abgeschnitten und nur die Signalintensität über dem eigentlichen DNA-„Spot“ integriert. Empirisch wurde ermittelt, daß bei der Verwendung einer radioaktiv markierten Sonde eine gute Korrelation zwischen der gebunde-

nen Sonde und dem Signal ab einer Hybridisierungsdauer von 16 h erreicht wird, die jedoch ab einer Dauer von 48 h durch Sättigung kommt verlorengeht (PELIZZARI *et al.* 2000). Bei der in dieser Arbeit verwendeten Hybridisierungsdauer von 20 h entstanden kaum übersättigte „Spots“, sondern eher schwache Signale.

4.2.3 Normalisierung verschiedener Hybridisierungsexperimente

Um die systemabhängige Variabilität von Einzelexperimenten zu kompensieren und damit einen Vergleich der Ergebnisse verschiedener Hybridisierungsexperimente zu ermöglichen, ist eine Normalisierung erforderlich (DUDOIT *et al.* 2000, SCHUCHHARDT *et al.* 2000). Das am häufigsten angewendete Verfahren zur Normalisierung von Hybridisierungssignalen ist die Verwendung eines internen Standards, der sich auf jeder Membran befindet. Dieser Standard besitzt im Idealfall ein vom Experiment unbeeinflusstes Hybridisierungssignal, dessen Schwankung ein Wert für die Variabilität der Hybridisierungsbedingungen ist. Ideale Kandidaten sind die sogenannten „Haushaltsgene“, deren Transkription allerdings unter bestimmten Versuchsbedingungen schwanken kann (SCHADT *et al.* 2001) und deren Eignung zunächst für jedes Experiment getestet werden muß. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von DNA eines Organismus, der nicht verwandt mit dem untersuchten Organismus ist. Bei Pflanzen oder Tieren eignet sich zum Beispiel λ -DNA (SASAKI *et al.* 2001). In der Praxis hat sich die Nutzung menschlicher DNA als Standard bei der Untersuchung der Transkription von *Arabidopsis thaliana* (RUAN *et al.* 1998) und der umgekehrte Fall bewährt (BERNARD *et al.* 1996, BERTUCCI *et al.* 1999). Im letzteren Fall wird DNA aus *Arabidopsis* auf den Membranen immobilisiert und parallel dazu einzelsträngige DNA zur Erzeugung einer Sonde *in vitro* transkribiert, während einer „reversen“ Transkription markiert und als cDNA in einer festen Konzentration der Hybridisierungslösung beigegeben. Das Hybridisierungssignal der markierten *Arabidopsis*-cDNA wird für die Normalisierung verwendet. Bei einem Verzicht auf einen internen Standard bieten sich verschiedene rechnerische Möglichkeiten für die Normalisierung an, z.B. die Verwendung des Gesamtsignals einer Membran zur Normalisierung der Einzelsignale (GIEGÉ *et al.* 2000, SASAKI *et al.* 2001). Da in der vorliegenden Arbeit für die Untersuchung der Transkription während der Seneszenz kein Gen mit gleichbleibender Transkription zur Verfügung stand, wurde für die Normalisierung die Summe aller Signale auf einer Membran berechnet. Dieser Ansatz lieferte gute Ergebnisse und erlaubte einen Vergleich verschiedener Hybridisierungen.

4.2.4 Berechnung der Signalintensität

Trotz des linearen Zusammenhangs zwischen der Plasmidkonzentration und der Signalintensität auf der einen Seite und der Normalisierung der Signalintensitäten auf der anderen Seite, erwies sich in dieser Arbeit die Varianz in den Werten mehrerer Wiederholungen desselben Versuchs als relativ hoch und erforderte daher eine Varianzanalyse. Aufgrund der Zahl an Versuchswiederholungen war eine Varianzanalyse nur bei der Untersuchung der Veränderung der Transkription während der dunkelinduzierten Seneszenz möglich. Mit dieser Auswertung wurden sechs Gene ermittelt, bei denen sich statistisch abgesichert die Transkriptionsrate während der dunkelinduzierten Seneszenz signifikant verändert. Bei diesen Genen wurde der Unterschied der Signalstärke zwischen unabhängigen Hybridisierungen mit den Transkriptpopulationen unterschiedlicher Entwicklungsstadien ermittelt und konnte prozentual oder als x-fache Zu- oder Abnahme angegeben werden.

Die Identifikation der sechs Gene mit signifikant veränderter Transkription erfolgte ohne die Einführung eines Schwellenwerts. Dieser wird in anderen Untersuchungen benutzt, um ohne eine Varianzanalyse zu ermitteln, ab wann eine Schwankung der Ergebnisse zweier Experimente signifikant ist. Überschreitet eine gemessene Veränderung diesen Schwellenwert, wird sie als signifikant angesehen. Bei Einführung der „Array“-Technik wurde ein Gen als differentiell exprimiert betrachtet, wenn sich die mRNA-Gehalte eines Gens um den Faktor 5 voneinander unterschieden (SCHENA *et al.* 1995). Neuere Untersuchungen mit dieser Methode verwenden einen Schwellenwert von 2 (RUAN *et al.* 1998, KERR *et al.* 2001, SEKI *et al.* 2001) bis 3 (DERISI *et al.* 1996, SASAKI *et al.* 2001). Bei einer Verwendung dieser Schwellenwerte bleiben allerdings Gene mit geringfügigen, aber signifikanten Veränderungen der Transkription oder des Transkriptgehalts unberücksichtigt.

4.3 Veränderungen in der Transkription und im Transkriptgehalt von ausgewählten Genen während der Blattseneszenz

In dieser Arbeit wurde die Transkriptionsrate einer Auswahl von Genen während der Seneszenz von Primär- und Fahnenblättern der Gerste untersucht und mit dem zugehörigen Transkriptgehalt verglichen. Die Transkriptionsrate wurde dabei durch „Run-on“-Transkriptionsexperimente direkt, der Transkriptgehalt über MMA und „Northern-Blot“-Hybridisierungen bestimmt. Zu den untersuchten Genen gehören elf HvSD-cDNA-Klone aus der Gerste (Ta-

der Gerste (Tabelle 3.1.1.1), die aus Primärblättern nach zweitägiger Dunkelinkubation von jungen Gerstenpflanzen isoliert wurden (KLEBER-JANKE 1996, KLEBER-JANKE & KRUPINSKA 1997, FALK *et al.* 2002, VAN DER KOOIJ *et al.* 2002), 9 HvSF-cDNA-Klone, die aus einer cDNA-Bank von seneszierenden Fahnenblättern der Gerste stammen (Tabelle 3.1.3, QUAST 1995, HAUSSÜHL 1999, CHROST & KRUPINSKA 2000) und 17 weitere Gene, deren Expression im Hinblick auf die Seneszenz von Interesse sein könnte und die hier als andere interessante Gene (AiG) bezeichnet werden.

37 Gene wurden im Hinblick auf ihre Transkription während der dunkelinduzierten Seneszenz von Primärblättern untersucht. Bei fünf der untersuchten Seneszenzgene und bei einem untersuchten AiG wurde eine signifikante Veränderung der Transkription als Folge einer Dunkelinkubation festgestellt. Durch Hybridisierung von cDNA-Sonden mit den gleichen DNA-„Dot Blot“-Membranen war während der Dunkelinkubation auch ein erhöhter Transkriptgehalt dieser Gene nachweisbar.

4.3.1 Gene mit signifikant veränderter Transkription während der dunkelinduzierten Seneszenz

Zu den während der Dunkelphase verstärkt transkribierten Genen gehört die ursprünglich aus Fahnenblättern isolierte cDNA **HvSF6**. Durch „Run-on“-Transkriptionsexperimente wird eine signifikante Steigerung der Transkriptionsrate des HvSF6-Gens während der dunkelinduzierten Seneszenz um 123 % gemessen. Über „Northern-Blot“-Analysen wurde zudem gezeigt, daß das Transkript sowohl in seneszierenden Fahnenblättern im Freiland (QUAST 1995) als in Primärblättern von dunkelinkubierten Pflanzen akkumuliert (HAUSSÜHL 1999). Die Transkriptakkumulation als Folge der dunkelinduzierten Seneszenz der Primärblätter wird durch „Northern-Blot“-Analysen in der vorliegenden Arbeit bestätigt (Abbildung 3.1.4.2). Weiterhin ist eine spezifische Akkumulation der Transkripte in seneszierenden Primärblättern von Gerstenpflanzen nachweisbar, die unter standardisierten Bedingungen in der Klimakammer angezogen wurden (Abbildung 3.1.4.3).

Die cDNA HvSF6 besitzt über zwei homologe EST-Sequenzen (3.1.4.2) große Ähnlichkeiten mit einer mRNA aus Weizen, die für das „Geminivirus RepA-binding protein 2“ (GRAB2-Protein) aus Weizen kodiert (XIE *et al.* 1999). Auf Aminosäureebene liegt die Homologie im weniger stark konservierten C-terminalen Bereich des GRAB-Proteins. Der homologe Be-

reich findet sich allerdings nur in den EST-Sequenzen, die in einem anderen Bereich homolog zum HvSF6 sind, und nicht direkt in der HvSF6-Sequenz.

Das GRAB2-Protein aus Weizen bindet spezifisch RepA-Proteine aus Geminiviren, die in befallenen Pflanzen mit dem Retinoblastom (Rb)-Protein interagieren und so den Zellzyklus beeinflussen (XIE *et al.* 1999). Durch eine starke Transkription des Genes für das GRAB2-Protein wird der Einfluß des viralen RepA-Proteins auf den Zellzyklus und damit die DNA-Replikation des „Wheat Dwarf Geminivirus“ unterdrückt. Das Protein besitzt einen hochkonservierten N-Terminus, die sogenannte NAC-Domäne, die für die Komplexbildung mit dem RepA-Protein notwendig ist. Die NAC-Domäne konnte in weiteren Proteinen, die eine Rolle bei Entwicklungsprozessen in der Pflanze spielen, gefunden werden (XIE *et al.* 1999), so unter anderem im „senescence-upregulated“ Gen 5 (SenU5) aus der Tomate (JOHN *et al.* 1997). Ob das Gen, das von der cDNA HvSF6 repräsentiert wird, tatsächlich für ein GRAB2-ähnliches Protein kodiert, kann ohne eine Verlängerung der cDNA-Sequenz nicht festgestellt werden. Die Expression eines GRAB2-ähnlichen Proteins während der Seneszenz könnte präventiv gegen einen Befall durch Geminiviren gerichtet sein. Eine schnelle Bindung der viralen RepA-Proteine könnte ein Überschreiten des Restriktionspunktes der seneszierenden Zelle und einen Übergang des Zellzyklus in die Synthesephase verhindern, wodurch eine in der Seneszenzphase sinnlose und Ressourcen verschlingende DNA-Synthese und dadurch eine Verbreitung des Virus verhindert werden könnte.

Das Gen, das für das GRAB2-Protein kodiert, gehört somit zu der Gruppe von Genen, die sowohl bei Pathogenabwehr als auch bei der Seneszenz exprimiert werden. Gemeinsamkeiten in der Genexpression während der Seneszenz und der Pathogenabwehr der Pflanzen sind in der Literatur mehrfach beschrieben (SMART *et al.* 1995, JOHN *et al.* 1997, QUIRINO *et al.* 1999, 2000, PONTIER *et al.* 1999, OBREGÓN *et al.* 2001). Ein Teil dieser Gene kodiert für sogenannte „pathogenesis-related“ Proteine (PR-Proteine), die mit der Hypersensitiven Reaktion (HR) assoziiert sind (JACKSON & TAYLOR 1996, QUIRINO *et al.* 2000). Die HR ist eine Antwort der Pflanze auf das Eindringen eines Pathogen und die Folge einer inkompatiblen Wirt- / Pathogen-Reaktion. Weiterhin sind die PR-Proteine mit dem Abwehrmechanismus der systemisch erworbenen Resistenz (SAR für „systemic acquired resistance“) verbunden (RYALS *et al.* 1996).

Es werden verschiedene Ursachen für die Gemeinsamkeiten in der Genexpression während der Seneszenz und der Pathogenabwehr diskutiert. Erstens wird angenommen, daß die Expression von PR-Proteinen während der Seneszenz das Abwehrpotential der Blätter in der Remobilisierungsphase und beim Transport der remobilisierten Stoffe in die sich entwickeln-

den Samen gegen opportunistische Pathogene erhöht. Neben der dadurch erzielten Sicherung der Remobilisierung kann PR-Proteinen mit Hydrolyseaktivität aber auch direkt eine Rolle bei der Verteilung der remobilisierten Verbindungen in der Pflanze zukommen (OBREGÓN *et al.* 2001). Zweitens laufen im Randbereich von nekrotischen Läsionen, die durch die HR als Folge eines Pathogenbefalls entstehen, seneszenzverwandte Prozesse ab (PONTIER *et al.* 1999). Diese dienen vermutlich einer Remobilisierung von Nährstoffen in der Nähe des infizierten Gewebes, um die Entwicklung des Pathogens und seine Vorbereitung in der Pflanze zu limitieren (BUTT *et al.* 1998, OBREGÓN *et al.* 2001). Als dritte Möglichkeit wird das Auftreten von oxidativem Streß bei beiden Prozessen als ein verbindendes Element zwischen der Seneszenz und der Pathogenabwehr diskutiert (NAM 1997, OBREGÓN *et al.* 2001). Da nicht alle Gene, die für PR-Proteine kodieren und während der Seneszenz exprimiert werden, direkt in der Ausbildung einer HR beteiligt sind, wird für diese Gene die Bezeichnung „defense-related genes“ oder DR-Gene vorgeschlagen (QUIRINO *et al.* 2000).

Auf der Grundlage dieser Überlegungen ist eine Funktion des HvSF6-Gens als DR-Gen aus der Gerste während der Seneszenz gut vorstellbar, zumal es mit dem SenU5 aus der Tomate (JOHN *et al.* 1997) ein weiteres Seneszenzgen gibt, daß homolog zum GRAB2-Protein ist. Dieses besitzt jedoch Homologie zum hochkonservierten N-terminalen Bereich des GRAB2-Proteins, der nicht durch die vorhandene Teilsequenz der HvSF6-cDNA abgedeckt wird.

Das **HvSF11**-Gen, das für eine α -Galaktosidase II kodiert (CHROST & KRUPINSKA 2000), besitzt während der dunkelinduzierten Seneszenz eine signifikant um 230 % gesteigerte Transkriptionsrate. Das zeigen indirekt auch die Ergebnisse von „Northern-Blot“-Analysen, bei denen die Expression des HvSF11-Gens in Primärblättern anfänglich kaum meßbar ist und im Verlauf der dunkelinduzierten Seneszenz deutlich ansteigt. In Fahrenblättern wurde dagegen nur ein sehr geringer Transkriptgehalt gemessen, der während der Seneszenz unter Freilandbedingungen sogar abnimmt (CHROST & KRUPINSKA 2000). In „Run-on“-Analysen konnte keine Veränderung der Transkriptionsrate des HvSF11-Genes während der Seneszenz des Fahrenblattes festgestellt werden. Das HvSF11-Proteins könnte während der dunkelinduzierten Seneszenz an der Degradation von Galaktolipiden aus der Plastidenmembran für eine Nutzung als Kohlenstoff- oder Energiequelle beteiligt sein (CHROST & KRUPINSKA 2000).

Das **HvS40**-Gen (BECKER & APEL 1993, HAUSSÜHL 1999) kodiert für ein Protein mit unbekannter Funktion. Die Transkriptionsrate dieses Gens ist während der dunkelinduzierten Seneszenz gegenüber der Kontrolle um 147 % erhöht. Der relative Transkriptgehalt ist ebenfalls

deutlich erhöht. Klassische „Northern-Blot“-Analysen haben ergeben, daß die Transkripte des HvS40-Gens während der Seneszenz der Fahnenblätter der Gerste unter Freilandbedingungen (BECKER & APEL 1993, QUAST 1995, HAUSSÜHL 1999) und während der dunkelinduzierten Seneszenz von abgeschnittenen (BECKER & APEL 1993, HAUSSÜHL 1999) bzw. an der Pflanze belassenen Primärblättern (KLEBER-JANKE 1996, HAUSSÜHL 1999) akkumulieren. Die Akkumulation der Transkripte während der Seneszenz von Fahnenblättern und während der Dunkelinkubation von an der Pflanze belassenen Primärblättern der Gerste konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Weitergehende Arbeiten mit diesem Klon zeigten, daß die Transkription des HvS40-Gens durch Befall des Blattes mit dem Pilz *Pyrenophora teres* aktiviert wird, dieses Gen also zu der Gruppe der DR-Gene gezählt werden kann. Das von diesem Gen kodierte Protein besitzt eine Kernlokalisationssequenz, die auf eine Funktion des Proteins im Kern hindeuten könnte (KRUPINSKA *et al.* 2002). Durch Homologiestudien wurde ein Protein aus Mais identifiziert, daß eine identische Kernlokalisationssequenz trägt. In anderen homologen Proteinen aus *Arabidopsis* ist dieser Sequenzbereich allerdings verändert. Ob diese homologen Proteine aus *Arabidopsis* trotz der veränderten Kernlokalisationssequenz im Kern lokalisiert sind, ist noch zu testen.

Das **HvSD1**-Gen kodiert ebenfalls für ein Protein mit unbekannter Funktion. Während der dunkelinduzierten Seneszenz ist die Transkriptionsrate dieses Gens gegenüber der Kontrolle um 690 % erhöht. Während der Seneszenz des Fahnenblattes unter Freilandbedingungen bleibt die Expression des HvSD1-Gens unverändert. Eine Akkumulation der HvSD1-spezifischen Transkripte wurde von KLEBER-JANKE (1996) in dunkelinkubierten Primärblättern der Gerste festgestellt. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

Die Transkriptionsrate der cDNA **HvSD36**, die das *hpd*-Gen für die 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (HPPD) repräsentiert (KLEBER-JANKE 1996, KLEBER-JANKE & KRUPINSKA 1997, FALK *et al.* 2002), ist während der dunkelinduzierten Seneszenz gegenüber der Kontrolle um + 482 % erhöht. Parallel dazu nimmt der relative Transkriptgehalt zu. Dies wurde sowohl mit den in dieser Arbeit durchgeführten Hybridisierungen mit komplexen cDNA-Sonden als auch mit klassischen „Northern-Blot“-Analysen mit RNA aus im Freiland seneszierenden Fahnenblättern und aus Primärblättern während der dunkelinduzierten Seneszenz gezeigt (KLEBER-JANKE 1996, KLEBER-JANKE & KRUPINSKA 1997, FALK *et al.* 2002). Die 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (HPPD) ist das Schlüsselenzym der Tocopherolbiosynthese (FIEDLER *et al.* 1985, FALK *et al.* 2002). Tocopherole gehören zu den Antioxidantien,

durch deren Bildung sich die Pflanze vor Schädigungen durch Radikale schützt (CHROST *et al.* 1999, FALK *et al.* 2002). In Fahnenblättern der Gerste geht die erhöhte Akkumulation des *hpd*-Transkripts mit einer erhöhten Menge an Tocopherolen einher (CHROST *et al.* 1999).

Die **SAM-Decarboxylase** (SAMDC, DRESSELHAUS *et al.* 1996) ist das einzige von den in dieser Arbeit untersuchten Genen, das bisher nicht als SAG eingestuft war, und bei dem während der dunkelinduzierten Seneszenz die Transkriptionsrate signifikant (+ 100 %) und der relative Transkriptgehalt erhöht ist (Abbildung 3.4.3.2). Eine Erhöhung der Transkriptionsrate und des Transkriptgehalts konnte auch während der Seneszenz des Fahnenblattes unter Freilandbedingungen nachgewiesen werden (Abbildung 3.5.3.4.2). Aufgrund dieser Ergebnisse ist das Gen für die SAMDC als SAG einzustufen.

DRESSELHAUS *et al.* (1996) berichten von einer Zunahme des Transkriptgehalts der SAMDC in 64 h in Dunkelheit auf einem auxinhaltigen Medium kultivierten Fahnenblattsegmenten von Tritordeum, einer Hybride aus Gerste und Weizen. Da in unverletzten und dunkelinkubierten Blättern jedoch keine Akkumulation nachweisbar war, wurde von DRESSELHAUS *et al.* (1996) angenommen, daß die Transkriptakkumulation auf die Verwundung der Blätter zurückgeht. Diese Interpretation steht allerdings im Widerspruch zu der in dieser Arbeit gemessenen Zunahme der Transkriptionsrate und des Transkriptgehalts bei einer Dunkelinkubation unverwundeter Blätter. Wahrscheinlicher ist eine direkte Akkumulation der Transkripte der SAMDC als Folge der Blattseneszenz (PANDEY *et al.* 2000).

Die SAM-Decarboxylase ist das geschwindigkeitsbestimmende Schlüsselenzym der Polyaminbiosynthese (SLOCUM 1991) und katalysiert die Bildung von decarboxyliertem S-Adenosylmethionin, das mit Putrescin zum Spermidin und mit Spermidin zum Spermin kondensiert (BAGNI & TASSONI 2001). Polyamine werden von der Pflanze als Reaktion auf Streß gebildet (BOUCHEREAU *et al.* 1999) und fungieren z.B. als Radikalfänger, als pH-Wert-Stabilisator, als Membranstabilisator durch ionische Interaktionen oder zur Entgiftung von freiwerdendem Ammonium (TURANO *et al.* 1997). Auf dieser Grundlage ist die verstärkte Transkription der SAMDC im seneszierenden Blatt als Antwort auf das Vorkommen eines Stresses während der Seneszenz interpretierbar.

Messungen des Polyamingehalts in seneszierenden Pflanzen zeigen allerdings, daß während der dunkelinduzierten Seneszenz nur der Gehalt an Putrescin ansteigt (LEGOCKA & ZAJCHERT 1999) und sich mit Seneszenzbeginn das Verhältnis von Putrescin zu den Polyaminen Spermidin und Spermin erhöht (BOUCHEREAU *et al.* 1999, HUMBECK unveröffentlicht). Während das Diamin Putrescin keine seneszenzverzögernde Wirkung hat, wird durch das Tetraamin Sper-

min der seneszenzbedingte Abfall im Chlorophyllgehalt stark und durch das Triamin Spermidin schwach verzögert (BORRELL *et al.* 1997).

Das Substrat der SAMDC, das S-Adenosylmethionin (SAM) ist gleichzeitig eine Vorstufe für die Ethylenbiosynthese. Beide Synthesewege konkurrieren somit um die gleiche Vorstufe (LEE *et al.* 1997, TURANO *et al.* 1997). Bei der Biosynthese des Ethylen wird das S-Adenosylmethionin in 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC) und dieses in Ethylen umgewandelt, welches eine seneszenzfördernde Wirkung besitzt.

4.3.2 Beschreibung der Sequenzen der cDNAs HvSF2, HvSF27 und HvSF42

Zu den Genen, die keine signifikante Erhöhung der Transkription während der dunkelinduzierten Seneszenz zeigen, gehören u.a. die von QUASt (1995) aus einer cDNA-Bank von seneszenten Fahnenblättern isolierten und nach „Northern-Blot“-Analysen mit RNA aus Fahnenblättern als SAG klassifizierten cDNAs HvSF2, HvSF27 und HvSF42. Diese wurden in dieser Arbeit in Hinblick auf ihre Sequenz genauer charakterisiert.

Aufgrund eindeutiger Homologien zu Sequenzen aus den Datenbanken wurde von QUASt (1995) angenommen, daß das von der cDNA **HvSF2** repräsentierte Gen für eine Glykosyltransferase kodiert. Deren Transkript ist bei „Northern-Blot“-Analysen mit RNA natürlich seneszierender Primärblätter von Klimakammer-Pflanzen mit fortschreitender Seneszenz in zunehmender Menge nachweisbar (Abbildung 3.1.4.3), während es in der RNA aus Primärblättern der ins Dunkel transferierten Gerste nicht nachgewiesen werden kann (Abbildung 3.1.4.2). Die Abnahme der relativen Transkription des HvSF2 während der dunkelinduzierten Seneszenz, die mit „Run-on“-Transkriptionsanalysen nachgewiesen wurde (Abbildung 3.4.3.3), ist mit den Ergebnissen der „Northern-Blot“-Analyse vereinbar, konnte allerdings nicht über MMA nachgewiesen werden (Kapitel 4.3.3). In Fahnenblättern ist während der Seneszenz unter Freilandbedingungen sowohl eine Zunahme der Transkription als auch eine Akkumulation der Transkripte meßbar (Abbildung 3.5.3.1). „Southern-Blot“-Analysen mit genomischer Gersten-DNA legen die Vermutung nahe, daß das von der cDNA HvSF2 repräsentierte Transkript von einem Vertreter einer Multigenfamilie kodiert wird (Abbildung 3.1.4.1). Dies ist mit der sehr großen Anzahl homologer EST-Sequenzen aus der Datenbank vereinbar, die für zahlreiche Glykosyltransferasen aus verschiedenen Organismen kodieren.

Glykosyltransferasen sind lösliche Proteine mit einem Molekulargewicht von 45 bis 60 kD (VOGT & JONES 2000), die mit dem Endoplasmatischen Reticulum assoziiert sein können (HUGHES & HUGHES 1994). Sie übertragen nukleotiddiphosphataktivierte Zucker auf Substrate mit niedrigem Molekulargewicht und sind an vielen Biosynthesereaktionen beteiligt, z.B. an der Synthese von Zellwandpolysacchariden und Glycoproteinen oder der Übertragung von Zuckern auf kleine Moleküle wie z.B. Phytohormone, Flavonoide, Phenylpropanoide und Nitrile (KEEGSTRA & RAIKHEL 2001). Die große Anzahl von Glykosyltransferasen in multi-zellulären Organismen ist durch das Vorkommen von mehr als 100 verschiedenen glykosidischen Bindungen begründet, die vermutlich alle durch eine jeweils spezifische Glykosyltransferase vermittelt werden (KEEGSTRA & RAIKHEL 2001). Trotz dieser Vielzahl an verschiedenen Glykosyltransferasen konnten allerdings einige Sequenzmerkmale gefunden werden, deren Vorkommen für eine Einordnung des Proteins als Glykosyltransferase ausreichend ist. Dazu gehört eine Aminosäureabfolge, die seit der Einführung von PROSITE zur Vorhersage der Funktion von bestimmten Sequenzbereichen in Proteinen durch BAIROCH (1991) als „UDP-glucosyltransferase signature sequence“ bekannt ist. Aus dieser Sequenz wurde die „Proposed PROSITE UDP-glucosyltransferase signature for secondary plant product metabolism“ (PSPG) abgeleitet (HUGHES & HUGHES 1994), die von VOGT & JONES (2000) auf zwei kurze und spezifische Signaturpeptide reduziert wurde, die in 95 % aller Glykosyltransferasen, die der β -Gruppe angehören, vorkommen sollen. Glykosyltransferasen der β -Gruppe überführen anisomere Zucker aus einer α -Bindung in der UDP-Glukose in die β -Konfiguration des resultierenden Glukosids.

Die große Übereinstimmung zwischen der von der cDNA HvSF2 abgeleiteten Aminosäuresequenz im Bereich der Glykosyltransferasesignatur mit den verschiedenen Konsensussequenzen (Abbildung 3.1.4.1.2), die besonders signifikant bei den beiden Signaturpeptiden ist, legt nahe, daß das vom HvSF2 repräsentierte Gen für eine Glykosyltransferase kodiert, die während der natürlichen Seneszenz verstärkt transkribiert wird. Auch die geringe Sequenzhomologie außerhalb dieses Bereichs spricht nicht gegen diese Annahme, da die Sequenzhomologie außerhalb des Signaturbereichs mit Ausnahme einiger hochkonservierter Aminosäuren mit knapp 10% sehr gering sein kann (VOGT & JONES 2000).

Durch Verwendung der cDNA **HvSF27** als Sonde konnte QUAIST (1995) eine spezifische Akkumulation von Transkripten während der Fahnenblattseneszenz unter Freilandbedingungen nachweisen. Die Ergebnisse zur Akkumulation der HvSF27-Transkripte während der Seneszenz der Fahnenblätter der Gerste sind inkonsistent, da mit der RNA aus Fahnenblättern von

zwei Standorten in Kiel im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Messung eines Anstiegs des spezifischen Transkriptgehalts mit der klassischen „Northern-Blot“-Analyse nicht reproduziert werden konnte. Offensichtlich kommt es nicht jedes Jahr und nicht auf allen Standorten zu einer Expression des HvSF27-Gens. Auch bei der Anwendung von „Run-on“-Transkriptionsanalysen ist lediglich in einem von drei Experimenten mit Kernen aus frühseneszenten Fahnenblättern eine Transkription meßbar, eine Hybridisierung der DNA-„Dot Blot“-Membranen mit markierter cDNA zeigt keine Akkumulation der Transkripte (Abbildung 3.5.3.1). Bei einer „Southern-Blot“-Analyse mit genomischer DNA der Gerste von einem Standort in Kiel konnten mit der cDNA HvSF27 als Sonde keine Restriktionsfragmente hybridisiert werden. Im Gegensatz dazu konnte HAUSSÜHL (1999) mit genomischer DNA aus Fahnenblättern von in Köln angebaute Gerste spezifische Fragmente und zusätzlich auch eine Transkriptakkumulation in Blattsegmenten von Primärblättern nachweisen.

Dem Teillängen-cDNA-Klon HvSF27 fehlt der poly(A)-Schwanz und ein offener Leserahmen mit einleitendem Startcodon. Mit Hilfe einer PCR wurde die wahrscheinliche 5'-3'-Orientierung ermittelt (Abbildung 3.1.4.6), doch die Suche nach homologen Sequenzen in den Datenbanken auf Nukleinsäure- und auf Aminosäureebene blieb ohne relevante Ergebnisse. Auch nachdem das Durchmustern einer cDNA-Bank 92 Bp zusätzliche Sequenzinformation am 5'-Ende der cDNA erbracht hatte, konnte kein eindeutiger Leserahmen mit einem einleitendem Startcodon bestimmt werden und auch erneute Datenbankabgleiche erbrachten trotz der zusätzlichen Sequenzinformation keine neuen Erkenntnisse. Es kann bislang weder ein homologer Gersten-EST noch eine homologe Sequenz aus *Arabidopsis* identifiziert werden. Bei der abschließenden Durchmusterung einer genomischen Bank wurde ein Phage mit einem Insert, das Homologie zu der HvSF27-Sonde aufweist, identifiziert. Das Insert enthält jedoch nur einen Teil der HvSF27-cDNA (Abbildung 3.1.4.9). Durch die vollständige Sequenzierung des Genoms von *Arabidopsis thaliana* und die ständig wachsende Zahl von Gerstensequenzen in der Datenbank in Gatersleben liegt inzwischen eine umfangreiche Sammlung genetischer Information vor, die es eigentlich ermöglichen sollte, das zugehörige Gen zu identifizieren. In Anbetracht der erfolglosen Versuche, die entsprechenden Sequenz im Genom der Gerste nachzuweisen und der inkonsistenten Daten zur Expression, muß von einer Einordnung der cDNA HvSF27 als SAG der Gerste abgesehen werden.

Das Transkript des von der cDNA **HvSF42** repräsentierten Gens akkumuliert während der Seneszenz des Fahnenblatts im Freiland (QUAST 1995, HAUSSÜHL 1999). In der vorliegenden Arbeit durchgeführte „Northern-Blot“-Analysen ergaben, daß Spuren der betreffenden mRNA auch in Primärblättern der Gerste nach Dunkelinkubation akkumulieren (Abbildung 3.1.4.2),

aber nicht in Primärblättern von Pflanzen, die unter standardisierten Bedingungen in der Klimakammer seneszierend. Dieser Befund steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von MIERSCH *et al.* (2000), die unter Einsatz einer DIG-markierten Sonde und Chemilumineszenz in natürlich seneszierenden Primärblättern ab dem 25. Tag nach der Aussaat ein Transkript nachgewiesen haben. Inwiefern eine unterschiedliche Behandlung der Pflanzen und der extrahierten RNA einen Einfluß auf diese abweichenden Hybridisierungsergebnisse hat, ist noch systematisch zu klären. „Run-on“-Transkriptionsanalysen ergaben, daß das vom HvSF42 repräsentierte Gen sowohl während der dunkelinduzierten Seneszenz (Abbildung 3.4.3.3) als auch während der Fahnenblattseneszenz im Freiland (Abbildung 3.5.3.1) transkribiert wird. Über eine MMA-Hybridisierung mit markierter cDNA ist keine Akkumulation des Transkripts während der dunkelinduzierten Seneszenz der Primärblätter nachzuweisen (Kapitel 4.3.3). Auf der Grundlage einer „Southern-Blot“-Analyse ist anzunehmen, daß für die cDNA HvSF42 mindestens zwei Gene (Abbildung 3.1.4.1) in Betracht kommen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die unvollständige Sequenz der cDNA HvSF42, der Sequenzbereiche am 5'- und am 3'-Ende fehlen, in zwei Schritten mit homologen EST-Sequenzen *in silico* auf 1274 Bp verlängert. Eine große Zahl von pflanzlichen Cysteinproteasen aus den Datenbanken zeigt Homologien zu der abgeleiteten Aminosäuresequenz der verlängerten cDNA. Dadurch wird die Annahme von QUAST (1995) gestärkt, daß das vom HvSF42 kodierte Protein eine Funktion als Cysteinprotease hat. Die in der vorliegenden Arbeit identifizierten homologen Cysteinproteasen und die cDNA des HvSF42 besitzen eine hochkonservierte Sequenzdomäne mit spezifischen Merkmalen, die in weiteren während der Seneszenz exprimierten Cysteinproteasen ebenfalls vorhanden ist (Abbildung 3.1.4.3), z.B. in den vom Gen SenU3 aus Tomate (DRAKE *et al.* 1996), vom Gen *See1* aus *Lolium multiflorum* (LI *et al.* 2000) und dem Gen NTCP-23 aus Tabak (UEDA *et al.* 2000) abgeleiteten Aminosäuresequenzen. Cysteinproteasen bzw. Cysteinendopeptidasen sind katalytische Enzyme, von denen es in Pflanzen vier Hauptklassen gibt. Von den Cystein-, Serin-, Aspartat- und Metalloproteasen sind die Serin- und die Cysteinproteasen in der Vakuole lokalisiert. Die Cysteinproteasen werden als Präproteine synthetisiert, autokatalytisch oder mit Hilfe eines Prozessierungsenzyms prozessiert, glykosiliert und entweder in der Vakuole eingelagert oder sekretiert (UEDA *et al.* 2000). So wird für das SenU3 ein Transport in die Vakuole, dort eine Lagerung als inaktive Vorstufe und dann eine Aktivierung durch Abspaltung des Propeptids postuliert (DRAKE *et al.* 1996). Es ist anzunehmen, daß das für Cysteinproteasen typische Vakuolensortiersignal im N-terminalen Bereich und weitere charakteristische Merkmale im C-terminalen Bereich in den noch fehlenden Sequenzbereichen des HvSF42 enthalten sind.

4.3.3 Vergleich der Ergebnisse der „Run-on“-Transkription mit den Ergebnissen der MMA-Analyse und der „Northern-Blot“-Analyse

Die Genexpression wird sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranskriptioneller Ebene reguliert (Kapitel 1.3). Der über „Northern-Blot“-Analysen gemessene Transkriptgehalt kann sich unabhängig von der Transkription durch posttranskriptionelle prä-mRNA-Prozessierung, das "splicing", und eine Stabilisierung bzw. Destabilisierung der Transkripte (FENNOY *et al.* 1998) verändern. Eine Erhöhung oder eine Abnahme der Transkription eines spezifischen Gens während der Seneszenz führt also nicht unbedingt zu einer Zunahme oder Abnahme des Transkriptgehalts, während umgekehrt eine Zu- oder Abnahme des Transkriptgehalts nicht zwangsläufig auf einer gleichförmigen Veränderung der Transkription beruhen muß. Daher kann über die Untersuchung des Transkriptgehalts durch klassische „Northern-Blot“-Analysen nicht auf die Transkription geschlossen werden.

Mit „Northern-Blot“-Analysen wurde bei einem Großteil der 22 in dieser Arbeit untersuchten seneszenzassoziierten Gene und ausgewählten Photosynthesegene der Gerste eine Zu- bzw. Abnahme des Transkriptgehalts bei beiden Seneszenzbedingungen untersucht (HUMBECK *et al.* 1996, QUAST 1995, KLEBER-JANKE & KRUPINSKA 1997, CHROST & KRUPINSKA 2000). In der vorliegenden Arbeit konnten die mit „Northern-Blot“-Analysen gemessenen Veränderungen im Transkriptgehalt bei Verwendung der MMA-Methode im Fall der dunkelinduzierten Seneszenz nur bei 6 von 12 (50 %) und im Fall der Seneszenz der Fahnenblätter nur bei 6 von 13 untersuchten Genen (46 %) reproduziert werden. Im Fall der dunkelinduzierten Seneszenz handelt es sich um die cDNAs HvSF11, HvSF23, HvS40, HvSD1, HvSD10 und HvSD27, im Fall der Seneszenz der Fahnenblätter um die cDNAs HvSF42, HvS40, HvSD26, und HvSD36 sowie die Gene *petC* und *cab*. Bei diesen Genen handelt es sich nicht ausschließlich um Gene mit einer starken Akkumulation ihrer Transkripte während der jeweiligen Seneszenzbedingung.

Die Ursache der Unterschiede zwischen den Ergebnissen des „multiplex messenger assays“ (MMA) und der klassischen „Northern-Blot“-Analyse können nicht abschließend geklärt werden. Möglicherweise liegt die Ursache in der Methode des MMA, bei der die Transkripte nicht wie beim „Northern-Blot“ durch Hexanukleotide, sondern von Oligo-(dT)-„Primern“ aus in cDNA umgeschrieben werden. BROSCHE (2001) konnte jedoch in seiner Arbeit zeigen, daß die Wahl der „Primer“ für die cDNA-Synthese und die Art der Markierung, entweder eine herkömmliche Markierung im Transkript oder eine Endmarkierung am 3'-OH-Ende, bei einer kleinen Auswahl von Genen keinen Einfluß auf das Hybridisierungsergebnis besitzt. Anderer-

seits kann auch die Zusammensetzung der Sonde einen Einfluß auf die Hybridisierungsergebnisse haben, da bei dem MMA im Gegensatz zur „Northern-Blot“-Analyse ein Sondengemisch eingesetzt wird, daß aus vielen verschiedenen cDNAs besteht. Inwieweit dies das Hybridisierungsvermögen einzelner cDNA-Sonden beeinflußt, ist unbekannt. Unter den Genen, bei denen die Ergebnisse des „Northern-Blots“ und des MMA übereinstimmen, befinden sich Gene mit starker und Gene mit schwächerer Transkriptakkumulation. Da bei anderen Genen mit einer starken Transkriptakkumulation keine Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden zu finden ist, steht das Problem wohl nicht mit der Transkriptmenge in der Hybridisierungslösung in Zusammenhang. Wegen der Unterschiede ist es aber ratsam, die für interessante Kandidatengene durch den MMA erhaltene Ergebnisse durch „Northern-Blot“-Analysen zu überprüfen.

Weiterhin zeigen die Ergebnisse der „Run-on“-Transkriptionsanalysen, daß während der dunkelinduzierten Seneszenz bei 9 von 18 untersuchten Genen (50 %) die durch „Northern-Blot“-Analysen bestimmten Veränderungen und bei 7 von 17 untersuchten Genen (41 %) die durch die MMA-Analysen bestimmten Veränderungen des Transkriptgehalts von gleichgerichteten Veränderungen in der Transkription begleitet werden (Tabelle 3.5.4.1). Unter diesen Genen befinden sich allerdings nur drei Gene (HvSF11, HvS40 und HvSD1), bei denen die Veränderungen in der Transkriptionsrate von gleichgerichteten, durch „Northern-Blot“- und MMA-Analysen bestimmten Veränderungen im Transkriptgehalt begleitet werden.

Bei der Untersuchung der Seneszenz des Fahnenblatts wird nur bei 9 von 13 Genen (69 %) bei „Northern-Blot“-Analysen und bei 15 von 22 Genen (68 %) bei MMA-Analysen die Veränderung der Transkription von einer gleichgerichteten Veränderung des Transkriptgehalts begleitet (Tabelle 3.5.4.1). Hier findet sich bei sechs Genen (HvSF2, HvSF42, HvS40, HvSD26, HvSD36 und *petC*) eine Veränderung in der Transkriptionsrate, die von gleichgerichteten Veränderungen im Transkriptgehalt begleitet wird und die sich durch „Northern-Blot“- und MMA-Analysen nachweisen läßt.

Durch die Kombination von Untersuchungen zur Transkription durch „Run-on“-Experimente und zum Transkriptgehalt durch klassische „Northern-Blot“-Analysen oder einen „multiplex messenger assay“ (MMA) war es in dieser Arbeit möglich, Aussagen darüber zu treffen, auf welcher Ebene der Expression bei einer Auswahl von Genen kontrolliert wird (Tabelle 3.5.4.3). Die Ergebnissen zeigen, daß bei 32 % bzw. 39 % der untersuchten Seneszenz- und Photosynthesegene der Gerste die Kontrolle der Genexpression während der dunkelinduzierten Seneszenz der Primärblätter bzw. der Seneszenz von Fahnenblättern vorwiegend auf posttranskriptioneller Ebene erfolgt. Bei diesen SAGs und Photosynthesegenen beruhen Verände-

rungen im Transkriptgehalt nicht direkt auf einer Veränderung in der Transkription und umgekehrt (Tabelle 3.5.4.3).

Aus den vorliegenden Daten können jedoch keine Aussagen in bezug auf die Akkumulation und die Aktivität der kodierten Proteine getroffen werden, da ausschließlich die RNA-Ebene untersucht wurde.

4.3.4 Eignung der Dunkelinkubation als Modellsystem für die Untersuchung der Blattseneszenz

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zur Transkription und zum Transkriptgehalt ausgewählter Gerstengene zeigen deutliche Unterschiede zwischen der artifiziell durch Dunkelinkubation induzierten Seneszenz der Primärblätter und der natürlichen Seneszenz der Fahnenblätter unter Freilandbedingungen (Tabelle 3.5.4.1).

Ein gleichförmiges Verhalten unter beiden Seneszenzbedingungen zeigen nur acht (22 %) von den 37 untersuchten Genen (HvSF6, HvS40, HvSD10, HvSD37, *petC*, 26S-rRNA, Cytokinin-oxidase, SAM-Decarboxylase, mit roten Rahmen in Tabelle 3.5.4.1 und 3.5.4.2 dargestellt), darunter vier Gene der SAG-Gruppe. Damit sind nur 20 % der untersuchten SAGs während der dunkelinduzierten Seneszenz exprimiert. Inwieweit diese Unterschiede durch die Verwendung von Primärblättern einerseits und Fahnenblättern andererseits verursacht werden, ist noch offen. Diese Befunde zeigen allerdings, daß es sich bei beiden Seneszenzbedingungen um zwei unabhängige Prozesse handelt, die einige gemeinsame Charakteristika haben. Unter den aktivierten Genen sind einige, die auch bei der natürlichen Seneszenz aktiviert werden.

Die Dunkelinkubation ist daher nur ein eingeschränkt nutzbares Modellsystem zur Untersuchung einiger Aspekte der Seneszenz. Es ist vorstellbar, daß durch den Lichtmangel in der Pflanze eine Stresssituation ausgelöst wird, der die Pflanze mit verschiedenen Stoffwechselreaktionen zu begegnen versucht, die Seneszenzcharakter besitzen und von seneszenztypischen Abbauprozessen begleitet werden, sich aber deutlich von der eigentlichen Seneszenz unterscheiden (AZUMI & WATANABE 1991, KLEBER-JANKE 1996, KLEBER-JANKE & KRUPINSKA 1997, WEAVER & AMASINO 2001). KLEBER-JANKE & KRUPINSKA (1997) nahmen an, daß durch die Dunkelinkubation das gesamte Seneszenzprogramm aktiviert wird. Wenn jedoch durch die Dunkelinkubation tatsächlich das gesamte Seneszenzprogramm aktiviert würde,

müßte eine größere Anzahl von SAGs der Gerste aktiviert werden, als es tatsächlich der Fall ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen eher für das Auftreten eines Lichtmangelstresses, dem die Pflanze mit der Aktivierung von Genen begegnet, von denen einige auch eine Rolle während der natürlichen Seneszenz spielen. Demnach wäre die Dunkelinkubation kein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der Seneszenz, zumal WEAVER & AMASINO (2001) berichten, daß in dunkelinkubierten Arabidopsispflanzen im Gegensatz zu isoliert verdunkelten Blättern die Seneszenz verzögert wird und nur fünf von zehn bekannten SAGs induziert werden.

Bei der Gerste zeigte sich für die Gene HvSF6 und HvSD10 (HAUSSÜHL 1999), HvSF11 und HvSF23 (CHROST & KRUPINSKA 2000), sowie die Gene HvS40 (BECKER & APEL 1993, HAUSSÜHL 1999) und HvSD36 (KRAUß 1997) kein Unterschied in der Transkriptakkumulation zwischen abgeschnittenen und an der Pflanze belassenen dunkelinkubierten Primärblättern. Die in *Arabidopsis* beschriebene Verzögerung der Seneszenz bei Verdunkelung der gesamten Pflanze (WEAVER & AMASINO 2001) kann bei Gerste ebenfalls nicht beobachtet werden. Durch eine Dunkelinkubation werden bei der Gerste seneszenzverwandte Prozesse induziert und führen zu einer schnelleren Abnahme des Chlorophyll- und des Proteingehalts sowie einer Verringerung der Effizienz des Photosystems II (KLEBER-JANKE & KRUPINSKA 1997). Auf der Grundlage dieser Daten mag die Dunkelinkubation von Gerstenpflanzen zur Untersuchung einiger Aspekte der Seneszenz grundsätzlich geeigneter als die Dunkelinkubation von *Arabidopsis*-Pflanzen sein, als Modellsystem für die Untersuchung der Genexpression während der natürlichen Seneszenz von Gerstenblättern ist sie nicht geeignet.

Im Freiland sind Pflanzen verschiedenen äußeren Faktoren ausgesetzt, die einen Einfluß auf die Entwicklung der Pflanze und damit auch auf die Blattseneszenz ausüben. Zu diesen Faktoren gehört der Befall der Pflanze durch Pathogene. Da Gemeinsamkeiten in der Genexpression während der Seneszenz und bei der Pathogenabwehr der Pflanzen in der Literatur mehrfach beschrieben sind (Kapitel 4.3.1), kann bei der Expression eines SAGs während der Blattseneszenz unter Freilandbedingungen nicht unterschieden werden, ob der Genaktivierung die Seneszenz oder eine Pathogenabwehr zugrunde liegt. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, bietet sich die dunkelinduzierte Seneszenz in der Klimakammer an. Dort seneszierende Blätter durch Dunkelheit induziert unter standardisierten Bedingungen ohne äußere Einflüsse. Wird die Transkription der untersuchten SAGs auch durch die Dunkelinkubation induziert, erhält man einen deutlichen Hinweis darauf, daß die Expression dieser Gene vermutlich durch die Seneszenz ausgelöst wird. Umgekehrt kann die Expression von

Genen, deren Expression nicht durch Dunkelinkubation induzierbar ist, durch Pathogenbefall im Freiland ausgelöst worden sein. Zu diesen Genen könnte der HvSF27 gehören, dessen Expression möglicherweise mit einem Pathogenbefall der Pflanze in Zusammenhang steht. Andere Gene, deren Expression sowohl pathogen- als auch seneszenzinduziert ist, sind die Gene HvSF6 (Kapitel 4.3.1), HvS40 (KRUPINSKA *et al.* 2002) und HvSD10 (VAN DER KOOIJ *et al.* 2002). Diese Gene sind zusammen mit weiteren Genen, deren Expression ausschließlich bei Seneszenz induziert wird, als SAGs für die Untersuchung der Seneszenz interessant.

4.4 Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Veränderung der Transkription und des Transkriptgehalts ausgewählter Gene während der dunkelinduzierten Seneszenz von Primärblättern und der Fahnenblattseneszenz unter Freilandbedingungen untersucht. In Anbetracht der geringen Datenmenge für die Seneszenz der Fahnenblätter konnte nur die Transkription in dunkelinkubierten Primärblättern einer Varianzanalyse unterzogen werden. Für eine zeitlich besser aufgelöste Charakterisierung der Transkriptionsrate einzelner Gene während der Dunkelinkubation wäre zusätzlich eine Ausweitung der untersuchten Stadien auf mehrere Zeitpunkte während der Dunkelinkubation erstrebenswert. Dadurch könnte sicherer geklärt werden, ob die hier nicht als dunkelinduziert eingestuften SAGs der Gerste möglicherweise kurzzeitig zu anderen Zeitpunkten während der Dunkelinkubation aktiv sind. Dazu bieten sich Zeitpunkte direkt zu Beginn der Dunkelinkubation und in fortgeschrittenen Seneszenzstadien an, die zusätzlich eine Untersuchung erlauben würden, ob am „point of no return“ (SMART 1994), dessen Überschreitung keine Revertierung der Seneszenzprozesse mehr zuläßt, bestimmte Gene eingeschaltet sind.

Für weitergehende Transkriptionsanalysen wäre eine Überarbeitung des Beladungsmusters der Membranen anzuraten. Statt einer Verdünnungsreihe bietet sich die Immobilisierung von Duplikaten oder Triplikaten der Plasmide in geringerer Konzentration auf der Membran an. Zur Normalisierung könnte menschliche DNA auf der Membran und menschliche RNA in der Hybridisierungslösung eingesetzt werden.

Für die Markierung von „Run-on“-Transkripten sollte neben der radioaktiven Markierung auch das große Potential von nichtradioaktiven Markierungen weiter genutzt werden. Trotz verringerter Transkriptionsaktivitäten bieten sich Fluoreszenzfarbstoffe zur Markierung, sowie Biotin für eine Markierung und eine nachfolgende Extraktion an. Die Markierung mit

einem Fluoreszenzfarbstoff bzw. mit Biotin könnte über die Inkorporierung von Aminoallyl-UTP in die Transkripte erfolgen. Mit einer Fluoreszenzmarkierung der Transkripte wäre eine Hybridisierung von DNA-„Chips“ mit einer Vielzahl von auf einem Glasträger immobilisierten DNA-Sonden möglich.

Die Promotoren der Gene, deren Transkription in der Seneszenzphase deutlich erhöht ist, bieten sich zur Untersuchung von Faktoren der transkriptionellen Kontrolle der Genexpression während der Seneszenz an. Mit der Identifizierung von *cis*-aktiven Sequenzbereichen auf den Promotoren dieser Gene könnte die Voraussetzung für die Isolierung dieser Faktoren geschaffen werden. Interessante Kandidaten sind die Promotoren der Gene HvSF6, HvSF42, HvS40, HvSD26, HvSD36 sowie des Gens für die SAMDC.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Veränderungen in der Transkriptionsrate und im Transkriptgehalts von 37 Genen während der dunkelinduzierten Seneszenz von Primärblättern und der Seneszenz von Fahnenblättern der Gerste unter Freilandbedingungen analysiert.

Für die Analyse der Transkription der ausgewählten Gene wurde ein Protokoll zur Isolierung transkriptionsaktiver Kerne aus Gerstenblättern etabliert, das auf der Methode von COX & GOLDBERG (1988) basiert. Die Transkriptionsbedingungen für die isolierten Zellkerne wurden in Anlehnung an ein Protokoll für Plastiden-„Run-on“-Experimente (DENG *et al.* 1987, KRAUSE 1999) modifiziert. Mit den markierten Transkripten aus den Zellkernen wurden DNA-„Dot Blot“-Membranen hybridisiert. Für die vergleichende Analyse des Transkriptgehalts wurde Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben und für die Hybridisierung derselben DNA-„Dot Blot“-Membranen verwendet.

Die Auswertung der Hybridisierungssignale erfolgte mit der Hilfe eines „BioImagers“, der eine densitometrische Auswertung der Signale ermöglichte. Die Ergebnisse verschiedener Hybridisierungsexperimente wurden über die gebundene Gesamtaktivität auf einer Membran normalisiert und dann miteinander verglichen. Die Veränderungen in der Transkription während der dunkelinduzierten Seneszenz wurde zusätzlich einer ANOVA-Varianzanalyse unterzogen.

Während der dunkelinduzierten Seneszenz besitzen nur sechs der 37 untersuchten Gene eine signifikant veränderte Transkription. Weiterhin konnte bei der dunkelinduzierten Seneszenz nur bei 9 von 18 und bei der Fahnenblattseneszenz nur bei 9 von 13 der untersuchten SAGs und Photosynthesegene eine gleichförmige Veränderung der Transkription und des Transkriptgehalts festgestellt werden. Aus diesen Daten geht auch hervor, daß bei 32 % bzw. 39 % der untersuchten SAGs und Photosynthesegene der Gerste während der dunkelinduzierten Seneszenz der Primärblätter und der Seneszenz der Fahnenblätter die Regulation der Genexpression vorwiegend auf posttranskriptioneller Ebene erfolgt.

Ein Vergleich der Ergebnisse zur Transkription und zum Transkriptgehalt zwischen der artifiziell durch Dunkelinkubation der Primärblätter induzierten Seneszenz einerseits und der natürlichen Seneszenz der Fahnenblätter andererseits zeigte deutliche Unterschiede zwischen beiden Seneszenzbedingungen. Da sich nur bei 20 % der SAGs und nur bei 22 % aller unter-

suchten Gene die Transkription und der Transkriptgehalt bei der Dunkelinkubation und bei der natürlichen Seneszenz gleichermaßen verhalten, ist die Dunkelinkubation von Pflanzen kein geeignetes Modell für die Untersuchung der Genexpression während Seneszenz von Gerstenblättern. Sie stellt vielmehr eine Stressituation dar, dem die Pflanze damit begegnet, daß seneszenzähnliche Prozesse ablaufen und einige SAGs transkribiert werden.

5. Summary

In this paper changes in the transcription rate and in the transcription content of 37 genes were analysed during dark-induced senescence of primary leaves and senescence of flag leaves of barley under field conditions.

For the analysis of the transcription rates of these genes a protocol for the isolation of transcriptionally active nuclei was established based on the method by COX & GOLDBERG (1988). Transcription conditions of the isolated nuclei were modified according to a protocol for “run-on”-transcription experiments using plastids (DENG *et al.* 1987, KRAUSE 1999). The labelled nuclei-derived transcripts were used for hybridisation of DANN on “dot blot”-membranes. For comparison with the transcript content total RNA was transcribed reversely into cDNA and used for hybridisation of the same membranes.

Using a “BioImager” the hybridisation signals were analysed densitometrically. Data of different hybridisation experiments were normalised and compared. Changes in the transcription rates during dark-induced senescence of primary leaves were further analysed with a single class ANOVA (analysis of variance).

Only six out of the 37 analysed genes show a significantly changed transcription rate during dark-induced senescence. Additionally only in case of 9 out of 18 and in case of 9 out of 13 analysed SAG and photosynthesis-related genes during dark-induced senescence and senescence of the flag leaves, respectively, changes in the transcription rate were accompanied by similar changes in the transcription content. These results also show, that in 32 % and 39 % of the analysed SAG and photosynthesis-related genes during dark-induced senescence and senescence of the flag leaves, respectively, regulation of the gene expression during foliar senescence is carried out at the post-transcriptional level.

However, comparison of the results of the transcription rate and the transcription content shows striking differences between the dark-induced senescence and the senescence under field-conditions. Only 20 percent of the SAG and 22 % of all genes analysed show similar changes in transcription rate and transcript content under both conditions of senescence. Therefore, dark-induced senescence is no suitable model system for the study of gene expression during foliar senescence. It rather seems to be some kind of stress situation the plant responds to with senescence-like processes and transcription of several SAG.

6. Literaturverzeichnis

ALBAUM M. (1993). Vergleichende molekulargenetische Untersuchungen zur Struktur und Transkription mitochondrialer Genloci des Radieschen-Cytoplasmas Tokumasu. Dissertation, Fachbereich Biologie der Universität Hamburg.

ALTSCHUL S.F., MADDEN T.L., SCHÄFFER A.A., ZHANG J., ZHANG Z., MILLER W., LIPMAN D.J. (1997) Gapped BLAST und PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acid Res.* **25**, 3389-3402.

APEL K. GOLLMER I., BATSCHAUER A. (1983) The light-dependent control of chloroplast development in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Cell Biochem.* **23**, 181-189.

AZUMI Y., WATANABE A. (1991) Evidence for a senescence-associated gene induced by darkness. *Plant Physiol.* **95**, 577-583.

BAGNI N., TASSONI A. (2001) Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* **20**, 301-317.

BAIROCH A. (1991) PROSITE: a dictionary of sites and patterns in proteins. *Nucl. Acid Res.* **19**, 2241-2245.

BARIOLA P.A., HOWARD C.J., TAYLOR C.B., VERBURG M.T., JAGLAN V.D., GREEN P.J. (1994) The *Arabidopsis* ribonuclease gene *RNS1* is tightly controlled in response to phosphate limitation. *Plant J.* **6**, 673-685.

BARTELS D., ENGELHARDT K., RONCARTI R., SCHNEIDER K., ROTTER M., SALAMINI F. (1991) An ABA and GA modulated gene expressed in the barley embryo encodes an aldose reductase related protein. *EMBO J.* **10**, 1037-1043.

BATE N.J., ROTHSTEIN S.J., THOMPSON J.E. (1991) Expression of nuclear and chloroplast photosynthetic-specific genes during leaf senescence. *J. Exp. Bot.* **42**, 801-811.

BECKER W. (1991) Isolierung und Charakterisierung von cDNAs für mRNAs, die bei der künstlich induzierten Seneszenz von abgetrennten Gerstenblättern vermehrt auftreten. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

BECKER W., APEL K. (1992) Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a novel jasmonate-induced protein of barley (*Hordeum vulgare* L.). *PMB* **19**, 1065-1067.

BECKER W., APEL K. (1993) Differences in gene expression between natural and artificially induced leaf senescence. *Planta* **189**, 74-79.

BELTRANO J., RONCO M.G., MONTALDI E.R., CARBONE A. (1998) Senescence of flag leaves and ears of wheat hastened by methyl jasmonate. *J. Plant Growth Regul.* **17**, 53-57.

BERNARD K., AUPHAN N., GRANJEAUD S., VICTORERO G., SCHMITT-VERHULST A.-M., JORDAN B.R., NGUYEN C. (1996) Multiplex messenger assay: simultaneous, quantitative measurement of expression of many genes in the context of T cell activation. *Nucl. Acid Res.* **24**, 1435-1442.

- BERTUCCI F., BERNARD K., LORIOD B., CHANG Y.-C., GRANJEAUD S., BIRNBAUM D., NGUYEN C., PECK K., JORDAN B. (1999) Sensitivity issues in DNA array-based expression measurements and performance of nylon microarrays for small samples. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 1715-1722.
- BINYAMIN L., FALAH M., PORTNOY V., SOUDRY E., GEPSTEIN S. (2001) The early light-induced protein is also produced during leaf senescence of *Nicotiana tabacum*. *Planta* **212**, 591-597.
- BLEECKER A.B., PATTERSON S.E. (1997) Last exit: senescence, abscission, and meristem arrest in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **9**, 1169-1179.
- BORRELL A., CARBONELL L., FARRAS R., PUIG-PARELLADA P., TIBURCIO A.F. (1997) Polyamines inhibit lipid peroxydation in senescing oat leaves. *Physiol. Plant.* **99**, 385-390.
- BOUCHEREAU A., AZIZ A., LARHER F., MARTIN-TANGUY J. (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci.* **140**, 103-125.
- BROSCH M. (2001) Analysen zur Transkription von Seneszenzgenen der Gerste an isolierten Kernen. Diplomarbeit, Abteilung Zellbiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- BUCHANAN-WOLLASTON V. (1997) The molecular biology of leaf senescence. *J. Exp. Bot.* **48**, 181-199.
- BUCHANAN-WOLLASTON V., AINSWORTH C. (1997) Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridisation. *PMB* **33**, 821-834.
- BUTT A., MOUSLEY C., MORRIS K., BEYNON J., CAN C., HOLUB E., GREENBERG J.T., BUCHANAN-WOLLASTON V. (1998) Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein gene in *Arabidopsis* in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*. *Plant J.* **16**, 209-221.
- CHEN S.J., KAO C.H. (1998) Methyl jasmonate, ammonium, and leaf senescence in rice. *J. Plant Physiol.* **152**, 353-357.
- CHIRGWIN J.M., PRZYBULA R.J., MACDONALD R.J., RUTTER W.J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem.* **18**, 5294-5299.
- CHRISPEELS M.J., RAIKHEL N.V. (1992) Short peptide domains target proteins to plant vacuoles. *Cell* **68**, 613-616.
- CHROST B., FALK J., KERNEBECK B., MÖLLEKEN H., KRUPINSKA K. (1999) Tocopherol biosynthesis in senescing chloroplasts - A mechanism to protect envelope membranes against oxidative stress and a prerequisite for lipid remobilization? In: ARGYRAUDI-AKOYUNOGLU J.H., SENGER H. (Hrsg.), *The Chloroplast: From molecular biology to biotechnology*, 171-176.
- CHROST B. KRUPINSKA K. (2000) Genes with homologies to known α -galactosidases are expressed during senescence of barley leaves. *Physiol. Plant.* **110**, 111-119.

- CORPAS F.J., BARROSO J.B., SANDALIO L.M., PALMA J.M., LUPIÁNEZ J.A., DELRÍO L.A. (1999) Peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase. Characterization and activity regulation during natural senescence. *Plant Physiol.* **121**, 921-928.
- COX K., GOLDBERG R. (1988) Analysis in gene expression. In: SHAW C. (Hrsg.), *Plant Molecular Biology: A practical approach*, 1-35. IRL Press, Oxford.
- CRAFTS-BRANDNER S.J., KLEIN R.R., KLEIN P., HÖLZER R., FELLER U. (1996) Coordination of protein and mRNA abundances of stromal enzymes and mRNA abundances of the Clp protease subunits during senescence of *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves. *Planta* **200**, 312-318.
- CRAMER P., SREBOW A., KADENER S., WERBAJH S., DE LA MATA M., MELEN G., NOGUÉS G., KORNBLIHTT A.R. (2001) Coordination between transcription and pre-mRNA processing. *FEBS* **498**, 179-182.
- DANGL J.L., DIETRICH R.A., THOMAS H. (2000) Senescence and programmed cell death. In: BUCHANAN B., GRUISSEM W., JONES R. (Hrsg.), *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Kapitel 20. American Society of Plant Physiologists.
- DELORME V.G.R., MCCABE P.F., KIM D.-J., LEAVER C.J. (2000) A matrix metalloproteinase is expressed at the boundary of senescence and programmed cell death in cucumber. *Plant Physiol.* **123**, 917-927.
- DENG X.-W., STERN D.B. TONKYN J.C., GRUISSEM W. (1987) Plastid run-on transcription. Application to determine the transcriptional regulation of spinach plastid genes. *J. Biol. Chem.* **262**, 9641-9648.
- DERISI J., PENLAND L., BROWN P.O., BITTNER M.L. (1996) Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nature Genetics* **14**, 457-460.
- DEROCHER E.J., BOHNERT H.J. (1993) Development and environmental stress employ different mechanisms in the expression of a plant gene family. *Plant Cell* **5**, 1611-1625.
- DRAKE R., JOHN I., FARRELL A., COOPER W., SCHUCH W., GRIERSON D. (1996) Isolation and analysis of cDNAs encoding tomato cysteine proteases expressed during leaf senescence. *PMB* **30**, 755-767.
- DRESSELHAUS T., BARCELO P., HAGEL C., LÖRZ H., HUMBECK K. (1996) Isolation and characterization of a Tritordeum cDNA encoding S-adenosylmethionine decarboxylase that is circadian-clock-regulated. *PMB* **30**, 1021-1033.
- DUDOIT S., YANG Y.H., CALLOW M.J., SPEED T.P. (2000) Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments. Technical report #578 (<http://www.stat.berkeley.edu/tech-reports/index.html>).
- FALK J. (1994) Funktionelle und molekulare Charakterisierung eines plastidären Transkriptionskomplexes während der Chloroplasten-Biogenese im Primärblatt der Gerste. Dissertation, Fachbereich Biologie der Universität Hamburg.

- FALK J., KRAUB N., DÄHNHARDT D., KRUPINSKA K. (2002) The senescence associated gene of barley encoding 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is expressed during oxidative stress. *Physiol. Plant.* eingereicht.
- FEJES E., PAY A., KANEVSKY I., SZELL M., ADAM E., KAY S., NAGY F. (1990) A 268 bp upstream sequence mediates the circadian clock-regulated transcription of the wheat Cab-1 gene in transgenic plants. *PMB* **15**, 921-932.
- FELLER U., KLEIST M (1986) Senescence and nitrogen metabolism in annual plants. In: LAMBERS H., NEETERSON J.J., STULEN I. (Hrsg.), *Fundamental ecological and agricultural aspects of nitrogen metabolism in higher plants*, 219-234. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.
- FENNOY S.L., BAILEY-SERRES J. (1995) Post-transcriptional regulation of gene expression in oxygen-deprived roots of maize. *Plant J.* **7**, 287-295.
- FENNOY S.L., NONG T., BAILEY-SERRES J. (1998) Transcriptional and post-transcriptional processes regulate gene expression in oxygen-deprived roots of maize. *Plant J.* **15**, 727-735.
- FIEDLER E., SOLL J., SCHULTZ G. (1985) The formation of homogentisate in the biosynthesis of tocopherol and plastoquinone in spinach chloroplasts. *Planta* **155**, 511-515.
- FORDE B.G., KREIS M., BAHRAMIAN M.B., MATTHEWS J.A., MIFLIN B.J., THOMPSON R.D., BARTELS D., FLAVELL R.B. (1981) Molecular cloning and analysis of cDNA sequences derived from poly A⁺ RNA from barley endosperm: identification of B hordein related clones. *Nucl. Acid Res.* **9**, 6689-6707.
- FUJIKI Y., YOSHIKAWA Y., SATO T., INADA N., ITO M., NISHIDA I., WATANABE A. (2001) Dark-inducible genes in *Arabidopsis thaliana* are associated with leaf senescence and repressed by sugars. *Physiol. Plant.* **111**, 345-352.
- GALLIE D.R. (1991) The cap and poly(A)tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev.* **5**, 2108-2116.
- GAN S., AMASINO R.M. (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270**, 1986-1987.
- GAN S., AMASINO R.M. (1997) Making sense of senescence. Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiol.* **113**, 313-319.
- GARBARINO J.E., OOSUMI T., BELKNAP W.R. (1995) Isolation of a polyubiquitin promoter and its expression in transgenic potato plants. *Plant Physiol.* **109**, 1371-1378.
- GENSCHIK P., DURR A., FLECK J. (1994) Differential expression of several E2-type ubiquitin carrier protein genes at different developmental stages in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana sylvestris*. *Mol. Gen. Genet.* **244**, 548-556.
- GIEGÉ P., HOFFMANN M., BINDER S., BRENNICKE A. (2000) RNA degradation buffers asymmetries in *Arabidopsis* mitochondria. *EMBO Rep.* **1**, 164-170.

- GRAHAM I.A., LEAVER C.J., SMITH S.M. (1992) Induction of malate synthase gene expression in senescent and detached organs of cucumber. *Plant Cell* **4**, 349-357.
- GRBÍČ V., BLEECKER A.B. (1995) Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.* **8**, 595-602.
- GUARENTE L., RUVKUN G., AMASINO R. (1998) Aging, life span and senescence. *PNAS* **95**, 11034-1106.
- GUTTIÉREZ R.A., MACINTOSH G.C., GREEN P.J. (1999) Current perspectives on mRNA stability in plants: multiple levels and mechanisms of control. *TIPS* **4**, 429-438.
- HAHN D., BENNOUN P., KÜCK U. (1996) Altered expression of nuclear genes encoding chloroplast polypeptides in non-photosynthetic mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*: evidence for post-transcriptional regulation. *Mol. Gen. Genet.* **252**, 362-370.
- HAJOUJ T., MICHELIS R., GEPSTEIN S. (2000) Cloning and characterization of a receptor-like protein kinase gene associated with senescence. *Plant Physiol.* **124**, 1305-1314.
- HALLICK R.B., LIPPER C., RICHARDS O.C. und RUTTER W.J. (1976) Isolation of a transcriptionally active chromosome from chloroplasts of *Euglena gracilis*. *Biochem.* **15**, 3039-3045.
- HAMILTON R.H., KUNSCH U., TEMPERLI A. (1972) Simple rapid procedures for isolation of tobacco leaf nuclei. *Anal. Biochem.* **49**, 48-57.
- HANFREY C., FIFE M., BUCHANAN-WOLLASTON V. (1996) Leaf senescence in *Brassica napus*: expression of genes encoding pathogenesis-related proteins. *PMB* **30**, 597-609.
- HAUSSÜHL K. (1999) Charakterisierung der Blattseneszenz von *Hordeum vulgare* L. unter besonderer Berücksichtigung des Gens HvS40. Dissertation, Universität zu Köln.
- HELD B.M., JOHN I., WANG H., MORAGODA L., TIRIMANNE T.S., WURTELE E.S., COLBERT J.T. (1997) *zrp2*: a novel maize gene whose mRNA accumulates in the root cortex and mature stems. *PMB* **35**, 367-375.
- HENSEL L.L., GRBÍČ V., BAUMGARTEN D.A., BLEECKER A.B. (1993) Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **5**, 553-564.
- HERWIG R., AANSTAD P., CLARK M., LEHRACH H. (2001) Statistical evaluation of differential expression on cDNA nylon arrays with replicated experiments. *Nucl. Acid Res.* **29**, NAR Methods online e117.
- HIESEL R., BRENNICKE A. (1983) Cytochrome oxidase subunit II gene in mitochondria of *Oenothera* has no intron. *EMBO J.* **2**, 2173-2178.
- HIESEL R., SCHOBEL W., SCHUSTER W., BRENNICKE A. (1987) The cytochrome oxidase subunit I and subunit III genes in *Oenothera* mitochondria are transcribed from identical promoter sequences. *EMBO J.* **6**, 29-34.

- HINDERHOFER K., ZENTGRAF U. (2001) Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence. *Planta* **213**, 469-473.
- HOLWERDA B.C., GALVIN N.J., BARANSKI T.J., ROGERS J.C. (1990) In vitro processing of aleurain, a barley vacuolar thiol protease. *Plant Cell* **2**, 1091-1106.
- HONDA S., HONGLADAROM T., LATIES G. (1966) A new isolation medium for plant organelles. *J. Exp. Biol.* **17**, 460-472.
- HONG Y., WANG T.-W., HUDAK K.A., SCHADE F., FROESE C.D., THOMPSON J.E. (2000) An ethylene-induced cDNA encoding a lipase expressed at the onset of senescence. *PNAS* **97**, 8717-8722.
- HUGHES J., HUGHES M.A. (1994) Multiple secondary plant product UDP-glucose glucosyl-transferase genes expressed in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cotyledons. *DNA Seq.* **5**, 41-49.
- HUMBECK K., KLOPPSTECH K., KRUPINSKA K. (1994) Expression of early light-inducible proteins in flag leaves of field-grown barley. *Plant Physiol.* **105**, 1217-1222.
- HUMBECK K., KRUPINSKA K. (1996) Does the Clp protease play a role during senescence-associated protein degradation in barley leaves? *J. Photochem. Photobiol.* **36**, 321-326.
- HUMBECK K., QUAST S., KRUPINSKA K. (1996) Functional and molecular changes in the photosynthetic apparatus during senescence of flag leaves from field-grown barley plants. *PCE* **19**, 337-344.
- JACKSON A.O., TAYLOR C.B. (1996) Plant-microbe interactions: life and death at the interface. *Plant Cell* **8**, 1651-1668.
- JOHN I., DRAKE R., FARRELL A., COOPER W., LEE P., HORTON P., GRIERSON D. (1995) Delayed leaf senescence in ethylene-deficient ACC-oxidase antisense tomato plants: molecular and physiological analysis. *Plant J.* **7**, 483-490.
- JOHN I., HACKETT R., COOPER W., DRAKE R., FARRELL A., GRIERSON D. (1997) Cloning and characterization of tomato leaf senescence-related cDNAs. *PMB* **33**, 641-651.
- JOHN C.F., MORRIS K., JORDAN B.R., THOMAS B., A.-H.-MACKERNESS S. (2001) Ultraviolet-B exposure leads to up-regulation of senescence-associated genes in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **52**, 1367-1373.
- JOHNSON M.A., PÉREZ-AMADOR M.A., LIDDER P., GREEN P.J. (2000) Mutants of *Arabidopsis* defective in a sequence-specific mRNA degradation pathway. *PNAS* **97**, 13991-13996.
- JORDÁ L., COEGO A., CONEJERO V., VERA P. (1999) A genomic cluster containing four differentially regulated subtilisin-like processing protease genes is in tomato plants. *J. Biol. Chem.* **274**, 2360-2365.
- JORDAN B.R. (1998) Large-scale expression measurements by hybridization methods: from high-density membranes to „DNA chips“. *J. Biochem.* **124**, 251-258.

- JORDI W., SCHAPENDONK A., DAVELAAR E., STOOPEN G.M., POT C.S., DEVISSER R., VAN RHIJN J.A., GAN S., AMASINO R.M. (2000) Increased cytokinin levels in transgenic P_{SAG12}-IPT tobacco plants have large direct and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning. *PCE* **23**, 279-289.
- KAMPHUIS I.G. KALK K.H., SWARTE M.B.A., DRENTH J. (1984) Structure of papain refined at 1,65 Angstrom resolution. *J. Mol. Biol.* **179**, 233-256.
- KANAZAWA A., DELL M.O., HELLENS R.P., HITCHIN E., METZLAFF M. (2000) Mini-scale method for nuclear run-on transcription assay in plants. *PMB Reporter* **18**, 377-383.
- KARRER K.M., PFEIFFER S.L., DITTHOMAS M.E. (1993) Two distinct subfamilies within the family of cysteine protease genes. *PNAS* **90**, 3063-3067.
- KEEGSTRA K., RAIKHEL N. (2001) Plant glycosyltransferases. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 219-224.
- KERR M.K., LEITER E.H., CHURCHILL G.A. (2001) Analysis of a designed microarray experiment. *Proceedings of the IEEE-Eurasip Nonlinear Signal and Image Processing Workshop*, June 3-6, 2001 (<http://www.jax.org/research/churchill/pubs/index.html>).
- KILIAN A., STIFF C., KLEINHOF A. (1995) Barley telomers shorten during differentiation but grow in callus culture. *PNAS* **92**, 9555-9559.
- KLEBER-JANKE T. (1996) Dunkelinduzierte Seneszenzprozesse in Primärblättern der Gerste (*Hordeum vulgare* L.): Ein Modellsystem zur Charakterisierung natürlicher Blattseneszenz. Dissertation, Fachbereich Biologie der Universität Hamburg.
- KLEBER-JANKE T. und KRUPINSKA K. (1997) Isolation of cDNA clones showing enhanced expression in barley leaves during dark-induced as well as during senescence under field conditions. *Planta* **203**, 332-340.
- KLEIN R.R., MULLET J.E. (1990) Light-induced transcription of chloroplast genes. *psbA* transcription is differentially enhanced in illuminated barley. *J. Biol. Chem.* **265**, 1895-1902.
- KRAUSE K. (1999) Untersuchungen zur Zusammensetzung und Funktion des plastidären Transkriptionsapparates unter besonderer Berücksichtigung des „Transkriptionsaktiven Chromosoms“ (TAC). Dissertation, Abteilung Zellbiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- KRAUSE K., FALK J., HUMBECK K., KRUPINSKA K. (1998) Responses of the transcriptional apparatus of barley chloroplasts to a prolonged dark period and subsequent reillumination. *Physiol. Plant.* **104**, 143-152.
- KRAUSE K., MAIER R.M., KOFER W., KRUPINSKA K., HERRMANN R.G. (2000) Disruption of plastid-encoded RNA polymerase genes in tobacco: expression of only a distinct set of genes is not based on selective transcription of the plastid chromosome. *Mol. Gen. Genet.* **263**, 1022-1030.
- KRAUB N. (1997) Charakterisierung eines Gens der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) mit Sequenzhomologien zu *hppd*-Genen und seiner Expression. Diplomarbeit, Universität zu Köln.

- KREBS J., KUO M., ALLIS C., PETERSON C. (1999) Cell-cycle regulated histone acetylation required for expression of the yeast HO gene. *Genes Dev.* **13**, 1412-1421.
- KRISTENSEN M., LOK F., PLANCHOT V., SVENDSEN I., LEAH R., SVENSSON B. (1999) Isolation and characterization of the gene encoding the starch debranching enzyme limit dextrinase from germinating barley. *Biochim. Biophys. Acta* **143**, 538-546.
- KRUPINSKA K. (1992) Transcriptional control of plastid gene expression during development of primary foliage leaves of barley grown under a daily light-dark regime. *Planta* **186**, 394-303.
- KRUPINSKA K., APEL K. (1989) Light-induced transformation of etioplasts to chloroplasts of barley without transcriptional control of plastid gene expression. *Mol. Gen. Genet.* **219**, 467-473.
- KRUPINSKA K., FALK J. (1994) Changes in polymerase activity during biogenesis, maturation and senescence of barley chloroplasts. Comparative analysis of transcripts synthesized either in run-on assays or by transcriptionally active chromosomes. *J. Plant Physiol.* **143**, 298-305.
- KRUPINSKA K., FALK J., HAUSSÜHL K., VAN DER KOOIJ T., LECKBAND G., SCHÄFER A. (2002) The barley gene S40 encoding a putative nuclear protein is expressed during leaf senescence and during leaf infection by *Pyrenophora teres*. Manuskript.
- LAEMMLI U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LEAH R., KIGEL J., SVENDSEN I., MUNDY J. (1995) Biochemical and molecular characterization of a barley seed β -glucosidase. *J. Biol. Chem.* **270**, 15789-15797.
- LEE M.M., LEE S.H., PARK K.Y. (1997) Effects of spermine on ethylene biosynthesis in cut carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers during senescence. *J. Plant Physiol.* **151**, 68-73.
- LEE M.-L. T., KUO F.C., WHITMORE G.A., SKLAR J. (2000) Importance of replication in microarray gene expression studies: statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations. *PNAS* **97**, 9834-9839.
- LEE R.-H., WANG C.-H., HUANG L.-T., GRACE CHEN S.-C. (2001) Leaf senescence in rice plants: cloning and characterization of senescence up-regulated genes. *J. Exp. Bot.* **52**, 1117-1121.
- LEGOCKA J., ZAJCHERT I. (1999) Role of spermidine in the stabilization of the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of photosystem II during senescence process. *Acta Physiol. Plant.* **21**, 127-132.
- LEOPOLD A. (1961) Senescence in plant development. The death in plants or plant parts may be of positive ecological or physiological value. *Science* **134**, 1727-1732.
- LEERS A., KHALCHITSKI A., LOMANIEC E., BURD S., GREEN P.J. (1998) Senescence-induced RNases in tomato. *PMB* **36**, 439-449.

- LESHEM Y.Y., WILLS R.B.H., KU V.V.-V. (1998) Evidence for the function of the free radical gas – nitric oxide (NO[•]) – as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* **36**, 825-833.
- LI Q., BETTANY A.J.E., DONNISON I., GRIFFITHS C.M., THOMAS H., SCOTT I.M. (2000) Characterization of a cysteine protease cDNA from *Lolium multiflorum* leaves and its expression during senescence and cytokinin treatment. *Biochim. Biophys. Acta* **1492**, 233-236.
- LOHMAN K.N., GAN S., JOHN M.C., AMASINO R.M. (1994) Molecular analysis of natural senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* **92**, 322-328.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951) Protein measurements with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- LU J.-L., ERTL J.R., CHEN C.-M. (1990) Cytokinin enhancement of the light induction of nitrate reductase transcript levels in etiolated barley leaves. *PMB* **14**, 585-594.
- LUTHE D.S., QUATRANO R.S. (1980a) Transcription in isolated wheat nuclei. I. Isolation of nuclei and elimination of endogenous ribonuclease activity. *Plant Physiol.* **65**, 305-308.
- LUTHE D.S., QUATRANO R.S. (1980b) Transcription in isolated wheat nuclei. II. Characterization of RNA synthesized *in vitro*. *Plant Physiol.* **65**, 309-313.
- MAKINO A., OSMOND B. (1991) Effects of nitrogen nutrition on nitrogen partition between chloroplasts and mitochondria in pea and wheat. *Plant Physiol.* **96**, 355-362.
- MALIK N.S.A. (1987) Senescence in oat leaves: changes in translatable mRNAs. *Physiol. Plant.* **70**, 438-446.
- MANSFIELD M.A., RAIKHEL N.V. (1990) Abscisic acid enhances the transcription of wheat-germ agglutinin mRNA without altering its tissue-specific expression. *Planta* **180**, 548-554.
- MARTIN C., THIMANN K.V. (1972) The role of protein synthesis in the senescence of leaves. I. The formation of protease. *Plant Physiol.* **49**, 64-71.
- MARTIN R.C., MOK M.C., MOK D.W.S. (1999) A gene encoding the cytokinin enzyme zeatin *O*-xylosyltransferase of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* **120**, 553-557.
- MATILE P., HÖRTENSTEINER S. (1999) Chlorophyll degradation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 67-95.
- MENGLIANG C. (2001) Performance of autoregulatory senescence-inhibition gene in rice. *Human Agricultural Science & Technology Newsletter* **2**, 17-23.
- MERSCHER S., HANSELMANN R., WELTER C., DOOLEY S. (1994) Nuclear runoff transcription analysis using chemiluminescent detection. *BioTechniques* **16**, 1024-1026.
- MIERSCH I., HEISE J., ZELMER I., HUMBECK K. (2000) Differential degradation of the photosynthetic apparatus during leaf senescence in barley (*Hordeum vulgare* L.) *Plant Biol.* **2**, 618-623.

- MILLER J.D., ARTECA R.N., PELL E.J. (1999) Senescence-associated gene expression during ozone-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **120**, 1015-1023.
- MÖGELSVANG S., SIMPSON D.J. (1998) Changes in the level of seven proteins involved in polypeptide folding and transport during endosperm development of two barley genotypes differing in storage protein localisation. *PMB* **36**, 541-552.
- MÖSINGER E., SCHÄFER E. (1984) In-vivo phytochrome control of in vitro transcription rates in isolated nuclei from oat seedlings. *Planta* **161**, 444-450.
- MORRIS K., A.-H.-MACKERNESS S., PAGE T., JOHN C.F., MURPHY A.M., CARR J.P., BUCHANAN-WOLLASTON V. (2000) Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant J.* **23**, 677-685.
- MULLET J.E., KLEIN R.R. (1987) Transcription and RNA stability are important determinants of higher plant chloroplast RNA levels. *EMBO J.* **6**, 1571-1579.
- NAKAMURA K., MATSOUKA K. (1993) Protein targeting to the vacuole in plant cells. *Plant Physiol.* **101**, 1-5.
- NAKASHIMA K., KIYOSUE T., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SHINOZAKI K. (1997) A nuclear gene, *erd1*, encoding a chloroplast-targeted Clp protease regulatory subunit homolog is not only induced by water stress but also developmentally up-regulated during senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **12**, 851-861.
- NAM H.G. (1997) The molecular genetic analysis of leaf senescence. *Curr. Opin. Biotech.* **8**, 200-207.
- NEWMAN T., DEBRUIJN F.J., GREEN P., KEEGSTRA K., KENDE H., MCINTOSH L., OHLROGGE J., RAIKHEL N., SOMERVILLE S., THOMASHOW M., RETZEL E., SOMERVILLE C. (1994) Genes galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones. *Plant Physiol.* **106**, 1241-1255.
- NOODÉN L.D., GUAIMÉT J.J., JOHN I. (1997) Senescence mechanisms. *Physiol. Plant.* **101**, 746-753.
- OBREGÓN P., MARTÍN R., SANZ A., CASTRESANA C. (2001) Activation of defence-related genes during senescence: a correlation between gene expression and cellular damage. *PMB* **46**, 67-77.
- OGBOURNE S., ANTALIS T.M. (1998) Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem. J.* **331**, 1-14.
- OH S.A., LEE S.Y., CHUNG I.K., LEE C.-H., NAM H.G. (1996) A senescence-associated gene of *Arabidopsis thaliana* is distinctively regulated during natural and artificially induced leaf senescence. *PMB* **30**, 739-754.
- PAGE T., GRIFFITHS G., BUCHANAN-WOLLASTON V. (2001) Molecular and biochemical characterization of postharvest senescence in broccoli. *Plant Physiol.* **125**, 718-727.

- PANAVAS T., PIKULA A., REID P.D., RUBINSTEIN B., WALKER E.L. (1999) Identification of senescence-associated genes from daylily petals. *PMB* **40**, 237-248.
- PANDEY S., RANADE S.A., NAGAR P.K., KUMAR N. (2000) Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. *J. Biosci.* **25**, 291-299.
- PARK J.-H., OH S.A., KIM Y.H., WOO H.R., NAM H.G. (1998) Differential expression of senescence-associated mRNAs during leaf senescence by different senescence-inducing factors in *Arabidopsis*. *PMB* **37**, 445-454.
- PATRONE G., PUPPO F., CUSANO R., SCARANARI M., CECCHERINI I., PULITI A., RAVAZZOLO R. (2000) Nuclear run-on assay using biotin labeling, magnetic bead capture and analysis by fluorescence-based RT-PCR. *BioTechniques* **29**, 1012-1017.
- PELIZZARI C.A., KHODAREV N.N., GUPTA N., CALVIN D.P., WEICHELBAUM R.R. (2000) Quantitative analysis of DNA array autoradiographs. *Nucl. Acid Res.* **28**, 4577-4581.
- PÉREZ-AMADOR M.A., ABLER M.L., DEROCHE E.J., THOMPSON D.M., VANHOOF A., LEBRASSEUR N.D., LERS A., GREEN P.J. (2000) Identification of BFN1, a bifunctional nuclease induced during leaf and stem senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **122**, 169-179.
- PETRACEK M.E., DICKEY L.F., NGUYEN T.T., GATZ C., SOWINSKI D.A., ALLEN G.C., THOMPSON W.F. (1998) *Ferredoxin-1* mRNA is destabilized by changes in photosynthetic electron transport. *PNAS* **95**, 9009-9013.
- PHILIPPAR K., FUCHS I., LÜTHEN H., HOTH S., BAUER C.S., HAGA K., THIEL G., LJUNG K., SANDBERG G., BÖTTGER M., BECKER D., HEDRICH R. (1999) Auxin-induced K⁺ channel expression represents an essential step in coleoptile growth and gravitropism. *PNAS* **96**, 12186-12191.
- PONTIER D., GAN S., AMASINO R.M., ROBY D., LAM E. (1999) Markers for hypersensitive response and senescence show distinct patterns for expression. *PMB* **39**, 1243-1255.
- QUAST S. (1995) Physiologische und molekularbiologische Untersuchungen zur Seneszenz von Fahnenblättern der Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Dissertation, Universität Hamburg Fachbereich Biologie.
- QUIRINO B.F., NORMANLY J., AMASINO R.M. (1999) Diverse range of gene activity during *Arabidopsis thaliana* leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. *PMB* **40**, 267-278.
- QUIRINO B.F., NOH Y.-S., HIMELBLAU E., AMASINO R.M. (2000) Molecular aspects of leaf senescence. *TIPS* **5**, 278-282.
- ROYO J., DIAZ I., RODRIGUEZ-PALENZUELA P., CARBONERO P. (1996) Isolation and characterization of barley *ltr1* encoding trypsin inhibitor BTI-CMe: differential activity in wild-type and mutant *lys3a* endosperm. *PMB* **31**, 1051-1059.
- RUAN Y., GILMORE J., CONNER T. (1998) Towards *Arabidopsis* genome analysis: monitoring expression profiles of 1400 genes using cDNA microarrays. *Plant J.* **15**, 821-833.

- RYALS J.A., NEUENSCHWANDNER U.H., WILLITS M.G., MOLINA A., STEINER H.Y., HUNT M.D. (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**, 1809-1819.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Spress, New York.
- SASAKI T., SONG J., KOGA-BAN Y., MATSUI E., FANG F., HIGO H., NAGASAKI H., HORI M., MIYA M., MURAYAMA-KAYANO E., TAKIGUCHI T., TAKASUGA A., NIKI T., ISHIMURA K., IKEDA H., YAMAMOTO Y., MUKAI Y., OHTA I., MIYADERA N., HAVUKKALA I., MINOBE Y. (1994) Toward cataloguing all rice genes: large-scale sequencing of randomly chosen rice cDNAs from a callus cDNA library. *Plant J.* **6**, 615-624.
- SASAKI Y., ASAMIZU E., SHIBATA D., NAKAMURA Y., KANEKO T., AWAI K., AMAGAI M., KUWATA C., TSUGANE T., MASUDA T., SHIMADA H., TAKAMIYA K.-I., OHTA H., TABATA S. (2001) Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in Arabidopsis by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. *DNA Res.* **8**, 153-161.
- SCHARRENBERG C., BROSCHE M., FALK J., KRUPINSKA K. (2001) Nonradioactive „run-on“-transcription assays based on incorporation of aminoallyl-UTP. *EJB* **268** (suppl. 1), 209.
- SCHARRENBERG C., QUAST S., HUMBECK K., KRUPINSKA K. (2002) Leaf senescence in flag leaves of field-grown barley plants: cloning and characterization of three senescence-related cDNAs. Manuskript.
- SCHADT E.E., CHENG L., ELLIS B., WONG W.H. (2001) Feature extraction and normalization algorithms for high-density oligonucleotide gene expression array data. *UCLA Statistics Electronic Publications* #303 (<http://www.stat.ucla.edu>).
- SCHENA M., SHALON D., DAVIS R.W., BROWN P.O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-470.
- SCHREIBER U., SCHLIWA U., BILGER W. (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.* **10**, 51-62.
- SCHUCHHARDT J., BEULE D., MALIK A., WOLSKI E., EICKHOFF H., LEHRACH H., HERZEL H. (2000) Normalization strategies for cDNA microarrays. *Nucl. Acid Res.* **28**, NAR Methods Online e47.
- SEKI M., NARUSAKA M., ABE H., KASUGA M., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., CARNINCI P., HAYASHIZAKI Y., SHINOZAKI K. (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell* **13**, 61-72.
- SHEU J.-J., JAN S.-P., LEE H.-T., YU S.-M. (1994) Control of transcription and mRNA turnover as mechanisms of metabolic repression of α -amylase gene expression. *Plant J.* **5**, 655-664.

- SHIRASU K., SCHULMAN A.H., LAHAYE T., SCHULZE-LEFERT P. (2000) A contiguous 66-kb barley DNA sequence provides evidence for reversible genome expansion. *Genome Res.* **10**, 908-915.
- SLOCUM R.D. (1991) Polyamine biosynthesis in plants. In: SLOCUM R.D., FLORES H.E. (Hrsg.), *The biochemistry and physiology of polyamines in plants*, 24-40. CRC Press, Boca Raton, FL.
- SMART C. (1994) Tansley Review No. 64: Gene expression during leaf senescence. *New Phytol.* **126**, 419-448.
- SMART C.M., HOSKEN S.E., THOMAS H., GREAVES J.A., BLAIR B.G., SCHUCH W. (1995) The timing of maize leaf senescence and characterization of senescence-related cDNAs. *Physiol. Plant.* **93**, 673-682.
- SOKAL R.R., ROHLF F.J. (1995) Single-classification analysis of variance. In: SOKAL R.R., ROHLF F.J. (Hrsg.), *Biometry – The principles and practice of statistics in biological research* (3. Auflage), 207 – 271. W.H. Freeman and Company, New York.
- SOUTHERN E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA-fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- STADE K., RINKE-APPEL J., BRIMACOMBE R. (1989) Site-directed cross-linking of mRNA analogues to the *Escherichia coli* ribosome; identification of 30S ribosomal components that can be cross-linked to the mRNA at various points 5' with respect to the decoding site. *Nucl. Acid Res.* **17**, 9889-9908.
- SZERSZEN J.B., SZCZYGLOWSKI K., BANDURSKI R.S. (1994) *iaglu*, a gene from *Zea mays* involved in conjugation of growth hormone indole-3-acetic acid. *Science* **265**, 1699-1701.
- TAYLOR W.C. (1989) Transcriptional regulation by a circadian rhythm. *Plant Cell* **1**, 259-264.
- TAYLOR C.B., BARIOLA P.A., DELCARDAYRÉ S.B., RAINES R.T., GREEN P.J. (1993) RNS2: A senescence-associated RNase of *Arabidopsis* that diverged from the S-RNases before speciation. *PNAS* **90**, 5118-5122.
- TAYLOR C.B., GREEN P.J. (1995) Identification and characterization of genes with unstable transcripts (GUTs) in tobacco. *PMB* **28**, 27-38.
- THOMPSON W.F., BEVEN A.F., SHAW P.J. (1997) Sites of rDNA transcription are widely dispersed through the nucleolus in *Pisum sativum* and can comprise single genes. *Plant J.* **12**, 571-581.
- TORNERO P., CONEJERO V., VERA P. (1997) Identification of a new pathogen-induced member of the subtilisin-like processing protease family from plants. *J. Biol. Chem.* **272**, 14412-14419.
- TURANO F.J., KRAMER G.F., WANG C.Y. (1997) The effect of methionine, ethylene and polyamine catabolic intermediates on polyamine accumulation in detached soybean leaves. *Physiol. Plant.* **101**, 510-518.

- UEDA T., SEO S., OHASHI Y., HASHIMOTO J. (2000) Circadian and senescence-enhanced expression of a tobacco cysteine protease gene. *PMB* **44**, 649-657.
- VAN DER KOOIJ T.A.W., KLEBER-JANKE T., LECKBAND G., KRUPINSKA K. (2002) A barley proteinase inhibitor gene is expressed in leaves during dark induced senescence and in response to biotic and abiotic stress. *Plant Cell Physiol.* eingereicht.
- VOGT T., JONES P. (2000) Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *TIPS* **5**, 380-386.
- WANG X., GHOSH S., GUO S.-W. (2001) Quantitative quality control in microarray image processing and data acquisition. *Nucl. Acid Res.* **29**, NAR Methods online e75.
- WEAVER L.M., GAN S., QUIRINO B., AMASINO R.M. (1998) A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *PMB* **37**, 455-469.
- WEAVER L.M., FROELICH J.E., AMASINO R.M. (2001) Chloroplast-targeted ERD1 protein declines but its mRNA increases during senescence in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **119**, 1209-1216.
- WEAVER L.M., AMASINO R.M. (2001) Senescence is induced in individually darkened Arabidopsis leaves, but inhibited in whole darkened plants. *Plant Physiol.* **127**, 876-886.
- WEBER J., JELINEK W., DARNELL J.E. (1977) The definition of a large viral transcription unit late in Ad2 infection of HeLa cells: Mapping of nascent RNA molecules labeled in isolated nuclei. *Cell* **10**, 611
- WERR W., FROMMER W.-B., MAAS C., STARLINGER P. (1985) Structure of the sucrose synthase gene on chromosome 9 of *Zea mays* L.. *EMBO J.* **4**, 1373-1380.
- WILLMITZER L., WAGNER K.G. (1981) The isolation of nuclei from tissue-cultured plant cells. *Exp. Cell Res.* **135**, 69-77.
- WINICOV I., KRISHNAN M. (1996) Transcriptional and post-transcriptional activation of genes in salt-tolerant alfalfa genes. *Planta* **200**, 397-404.
- WINTERS R. (1996) Untersuchung von circadian regulierten Transkripten in Blättern von Senf (*Sinapis alba* L.). Dissertation, Abteilung Botanik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- WISE R.P., ROHDE W., SALAMINI F. (1990) Nucleotide sequence of the *Bronze-1* homologous gene from *Hordeum vulgare*. *PMB* **14**, 227-279.
- WOO H.R., CHUNG K.M., PARK J.-H., OH S.A., AHN T., HONG S.H., JANG S.K., NAM H.G. (2001) ORE9, an F-box protein that regulates leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**, 1779-1790.
- XIE Q., SANZ-BURGOS A.P., GUO H., GARCÍA J.A., GUTIÉRREZ C. (1999) GRAB proteins, novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with a geminivirus protein. *PMB* **39**, 647-656.

- YI H.C., JOO S., NAM K.H., LEE J.S., KANG B.G., KIM W.T. (1999) Auxin and brassinosteroid differentially regulate the expression of three members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family in mung bean (*Vigna radiata* L.). *PMB* **41**, 443-454.
- YOSHIDA S., ITO M., NISHIDA I., WATANABE A. (2001) Isolation and RNA gel blot analysis of genes that could serve as potential molecular markers for leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **42**, 170-178.
- ZAVALETA-MANCERA H.A., FRANKLIN K.A., OUGHAM H.J., THOMAS H., SCOTT I.M. (1999) Regreening of senescent *Nicotiana* leaves. I. Reappearance of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase and light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein. *J. Exp. Bot.* **50**, 1677-1682.
- ZACARIAS L., REID M.S. (1990) Role of growth regulators in the senescence of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Physiol. Plant.* **80**, 549-554.
- ZENTGRAF U., HINDERHOFER K., KOLB D. (2000) Specific association of a small protein with the telomeric DNA-protein complex during the onset of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *PMB* **42**, 429-438.
- ZHANG S., SHENG J., LIU Y., MEHDY Y.M.C. (1993) Fungal elicitor-induced bean proline-rich protein mRNA down-regulation is due to destabilization that is transcription and translation dependent. *Plant Cell* **5**, 1089-1099.

Liste eigener Veröffentlichungen:

SCHARRENBERG C., QUAST S., HUMBECK K., KRUPINSKA K. (2002) Leaf senescence in flag leaves of field-grown barley plants: cloning and characterization of three senescence-related cDNAs. Manuskript.

Beiträge in Mitteilungsbänden von Tagungen:

SCHARRENBERG C., FALK J., KRUPINSKA K. (2001) Old vine in new skins or nuclear “run-on”-transcription and foliar senescence. *EJB* **268** (suppl. 1), 106.

SCHARRENBERG C., BROSCH M., FALK J., KRUPINSKA K. (2001) Nonradioactive „run-on“-transcription assays based on incorporation of aminoallyl-UTP. *EJB* **268** (suppl. 1), 209.

A. Anhang

Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA)

Es wird eine Nullhypothese aufgestellt, deren Wahrheitsgehalt während der Varianzanalyse untersucht wird. Die Nullhypothese sagt aus, daß zwei oder mehr Grundgesamtheiten hinsichtlich eines Parameters übereinstimmen und somit einer Grundgesamtheit entstammen. Für diese Arbeit wurde folgende Nullhypothese aufgestellt:

„Im vorliegenden Fall der Transkription während der dunkelinduzierten Seneszenz gilt, daß die Varianz der Einzelwerte der relativen Transkription in einem Stadium gleich der Varianz der Werte zwischen den untersuchten Stadien ist.“

Das Signifikanzniveau wird auf 5 % (0,05) festgelegt und stellt die Grenzen des Zufalls dar, ab der entschieden wird, daß ein Unterschied nicht nur zufällig sondern wesentlich ist. Das bedeutet in anderen Worten, wenn die Prüfung der Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% einen Unterschied feststellt, gilt die Gültigkeit der Nullhypothese als unwahrscheinlich und es wird eine Alternativhypothese angenommen.

Die Alternativhypothese für diese Untersuchung besagt, „daß ein signifikanter Unterschied beider Varianzen oder eine signifikant veränderte relative Transkription während der dunkelinduzierten Seneszenz vorliegt.“

Durchführung:

1. Die Meßwerte werden pro untersuchtem Gen- oder Genfragment den Stadien zugeordnet und bilden pro Stadium eine Gruppe mit i Mitgliedern. Der Gruppenumfang i kann in den einzelnen Stadien unterschiedlich sein.

	Stadium 1	Stadium 2	...	Stadium n
einzelne Meßwerte	a_1 a_2 a_3 a_i	b_1 b_2 b_3 b_i		n_1 n_2 n_3 n_i

2. Für jedes Stadium werden die Gruppenmittelwerte ermittelt:

$$\bar{x}_i = \frac{1}{n_i} \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij}$$

3. Aus den Gruppenmittelwerten wird das Gesamtmittel \bar{x} gebildet:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^k n_i \bar{x}_i$$

4. Die Summe der mittleren Quadrate (MQ) wird als Quotient aus der Summe der Abweichungsquadrate der Meßwerte um das Gesamtmittel und den zugehörigen Freiheitsquadraten ermittelt. Man unterscheidet die mittleren Quadrate der Einzelwerte um die Gruppenmittelwerte

$$s_{innerhalb}^2 = MQ_{innerhalb} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2$$

und die mittleren Quadrate der Gruppenmittelwerte um das Gesamtmittel

$$s_{zwischen}^2 = MQ_{zwischen} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2$$

5. Die Prüfgröße F wird als Quotient aus $\frac{s_{zwischen}^2}{s_{innerhalb}^2}$ gebildet und die kritische Prüfgröße $F_{0,05}$ aus Datentabellen für das entsprechende Signifikanzniveau entnommen.
6. Vergleich der Prüfgröße F und der kritischen Prüfgröße $F_{0,05}$:
- Prüfgröße $F <$ kritische Prüfgröße $F_{0,05}$: Die Nullhypothese ist auf dem 5 %-Niveau nicht ablehnbar
 - Prüfgröße $F >$ kritische Prüfgröße $F_{0,05}$: Die Nullhypothese ist auf dem 5 %-Niveau abzulehnen und die Alternativhypothese anzunehmen.
7. Bei einer Ablehnung der Nullhypothese wird die Irrtumswahrscheinlichkeit auf 1 % ($F_{0,01}$) und schließlich auf 0,1 % ($F_{0,001}$) verringert. Bei einer Ablehnung der Nullhypothese auf dem 1 %-Niveau ist der Unterschied hochsignifikant, auf dem 0,1 %-Niveau höchstsignifikant.

Die Berechnungen wurden in Microsoft EXCEL mit der Analysefunktion „Einfaktorielle Varianzanalyse“ automatisiert durchgeführt.

Die Theorie zur Einfaktoriellen Varianzanalyse wurde den Lehrbüchern „Angewandte Statistik“ von SACHS L. (7. Auflage, Springer Verlag) und *Biometry – The principles and practice of statistics in biological research* von SOKAL R.R., ROHLF F.J. (1995, 3. Auflage, W.H. Freeman and Company, New York) entnommen.

Lebenslauf

Christian Scharrenberg

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 27.03.1971
Geburtsort: Kiel
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung:

1977 - 1981 Reuterschule, Gemeinschaftsgrundschule der Stadt Bonn
1981 - 1986 Gottfried-Kinkel-Realschule Bonn
1986 - 1990 Max-Planck-Schule Kiel (Gymnasium)
Sept. 1991 - Jan. 1998 Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. (Diplomprüfung nach dem 11. Studiensemester)
Hauptfach: Botanik; Nebenfächer: Zoologie, Organische Chemie
Dez. 1996 - Jan. 1998 Diplomarbeit am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Labor Prof. Dr. Jung) unter der Betreuung von Prof. Dr. Binding (Botanisches Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel)
seit Feb. 1998 Experimentelle Arbeiten zur Dissertation unter der Betreuung von Prof. Dr. Krupinska am Botanischen Institut der Universität zu Köln und der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Arbeit - abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer - nach Inhalt und Form meine Arbeit ist. Diese Arbeit wurde bis jetzt weder ganz noch teilweise einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, daß ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Teile der Arbeit sind in der folgenden Publikation enthalten:

SCHARRENBERG C., QUAST S., HUMBECK K., KRUPINSKA K. Leaf senescence in flag leaves of field-grown barley plants: cloning and characterization of three senescence-related cDNAs. Manuskript.

Für die mündliche Prüfung wird die Form der Disputation gewählt. Der Zulassung von Zuhörern/Zuhörerinnen bei der mündlichen Prüfung wird nicht widersprochen.

Kiel, den 17.12.2001

(Christian Scharrenberg)