

**Untersuchungen zur Regulation der
seneszenzabhängig exprimierten Gene *hpd*
und *HvS40* der Gerste (*Hordeum vulgare* L.)
und subzelluläre Lokalisierung
des *HvS40* Proteins**

Dissertation

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



vorgelegt von
Dorothee Dähnhardt

Kiel
2003

Referent:

Koreferent:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt: Kiel, den

Der Dekan

Meinem Vater

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Phänomen der Seneszenz	1
1.2 Physiologische Charakterisierung der Blattseneszenz	2
1.3 Ultrastrukturelle Veränderungen während der Blattseneszenz	3
1.4 Seneszenzspezifische Genexpression	4
1.4.1 Die SAGs <i>hpd</i> und <i>HvS40</i> der Gerste	5
1.4.2 Interne und externe Faktoren der Seneszenz	6
1.4.2.1 Phytohormone	6
1.4.2.2 Oxidativer Stress	7
1.4.2.3 Pathogenbefall	8
1.4.2.4 Umwelteinflüsse	9
1.4.2.5 Weitere Faktoren, die einen Einfluss auf die Seneszenz haben	9
1.5 Regulation der Seneszenz	11
1.5.1 Analyse von Mutanten	11
1.5.2 Promotoranalyse	12
1.6 Zielsetzung	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Chemikalien und Enzyme	15
2.2 Pflanzenmaterial	15
2.2.1 Anzucht von Gerste in der Klimakammer	15
2.3 Physiologische Parameter	17
2.3.1 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes	17
2.3.2 Bestimmung der chlorophyllspezifischen Fluoreszenz (F_v/F_m)	17
2.4 Genomklone und Oligonukleotide	18
2.5 Allgemeine molekularbiologische Methoden	20
2.5.1 Klonierung und Transformation von Bakterien	20

2.5.1.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	21
2.5.1.2	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	22
2.5.2	Anzucht, Lagerung von Bakterien und Plasmidisolierung	22
2.5.3	Sequenzanalyse	22
2.5.4	Extraktion von RNA aus Pflanzenmaterial	23
2.5.4.1	Isolierung von Gesamt-RNA nach Chirgwin <i>et al.</i> (1979)	23
2.5.4.2	Isolierung von Gesamt-RNA mit dem TRIzol™-Reagenz	23
2.5.4.3	Isolierung von Poly(A) ⁺ RNA	24
2.5.5	Fällung von Makromolekülen	24
2.5.6	Radioaktive Markierung von Sonden	24
2.5.7	Datenbankrecherchen	25
2.6	Gelelektrophorese von Proteinen und Nukleinsäuren	25
2.6.1	Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	25
2.6.2	Native Gelelektrophorese von Protein-DNA-Komplexen	26
2.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen	26
2.6.4	Färbung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen im SDS-Gel	27
2.6.5	Trocknen von Proteingelen	27
2.6.6	Molekulargewichtsmarker für die Elektrophorese	27
2.7	Kapillartransfer von RNA auf Nylonmembranen (<i>Northern Blot</i>) und Hybridisierung mit spezifischen DNA-Sonden	28
2.8	Biolistische Transformation	29
2.9	<i>Primer-Extension-Analyse</i>	30
2.10	Gelretardierungsexperimente	30
2.10.1	Isolierung von Kernproteinen	30
2.10.2	DNA-Protein-Bindereaktion	33
2.11	Isolierung und Identifikation von DNA-Bindeproteinen	33
2.11.1	Isolierung von DNA-Bindeproteinen	33
2.11.2	Identifikation	35
2.12	Mikroskopische Methoden	36
2.12.1	Lichtmikroskopie	36
2.12.2	Elektronenmikroskopie	37
2.12.2.1	Hochdruckgefrieren	37
2.12.2.2	Gefriersubstitution	37
2.12.2.3	Ultradünnschnitte	38

2.12.2.4. Immunmarkierung	38
2.12.2.4.1 Reinigung des Antiserums	38
2.12.2.4.2 Einfach- und Doppelmarkierung	39
2.12.2.5 Transmissions Elektronen Mikroskopie (TEM)	40
3. Ergebnisse	41
3.1 Untersuchungen zur Expression der Gene <i>hpd</i> und <i>HvS40</i>	41
3.1.1 Die Wirkung von Phytohormonen auf die Expression der Gene <i>hpd</i> und <i>HvS40</i>	41
3.1.1.1 <i>hpd</i> Gen	42
3.1.1.2 <i>HvS40</i> Gen	44
3.1.2 Die Wirkung von oxidativem Stress auf die Expression der Gene <i>HvS40</i> und <i>hpd</i>	45
3.1.2.1 <i>hpd</i> Gen	45
3.1.2.2 <i>HvS40</i> Gen	47
3.1.3 Lokalisation des <i>hpd</i> Transkripts in verschiedenen Geweben	48
3.1.4 Untersuchungen zur natürlichen Seneszenz von Primärblättern	50
3.1.4.1 Seneszenzabhängige Veränderungen im Chlorophyllgehalt und in der Effizienz des Photosystems II im Primärblatt der Gerste	50
3.1.4.2 Die Expression des <i>hpd</i> Gens während der Seneszenz von Primärblättern	51
3.1.4.3 Die Expression des <i>HvS40</i> Gens während der Seneszenz von Primärblättern	52
3.2 Analyse der Promotoren der seneszenzassoziierten Gene <i>hpd</i> und <i>HvS40</i>	54
3.2.1 Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte der Gene <i>hpd</i> und <i>HvS40</i>	54
3.2.1.1 <i>hpd</i> Gen	54
3.2.1.2 <i>HvS40</i> Gen	56
3.2.2 Sequenzanalyse der Promotoren der Gene <i>hpd</i> und <i>HvS40</i>	57
3.2.2.1 Der Promotor des <i>hpd</i> Gens	57
3.2.2.2 <i>HvS40</i> Promotor	59
3.2.3 Bestimmung der Promotoraktivität des <i>hpd</i> Gens	61

3.2.4	<i>In vitro</i> Bindungsstudien zur Identifizierung potentieller DNA-Erkennungssequenzen von seneszenzabhängig regulierten Transkriptionsfaktoren	66
3.2.4.1	Gelretardierungsexperimente mit dem <i>hpd</i> Promotor	67
3.2.4.2	Gelretardierungsexperimente mit dem <i>HvS40</i> Promotor	70
3.3	Isolierung und Identifikation von Transkriptionsfaktoren	78
3.3.1	Isolierung	78
3.3.2	Identifikation	81
3.3.3	Analyse der Aminosäuresequenz des identifizierten Transkriptionsfaktor	83
3.4	Untersuchungen zur Lokalisierung des HvS40 Proteins	86
3.4.1	Beschreibung von ultrastrukturellen Veränderungen in Primärblättern während der Seneszenz	86
3.4.2	Immunlokalisierung des HvS40 Proteins während der Senesezenz	90
4.	Diskussion	93
4.1	Regulation der Expression der Gene <i>hpd</i> und <i>HvS40</i> während der Blattseneszenz	93
4.1.1	Die Funktion der HPPD im Stoffwechsel der Pflanzen	94
4.1.2	Expression des <i>hpd</i> Gens während der Blattseneszenz	96
4.1.3	Analyse des <i>hpd</i> Promotors	99
4.2	Regulation der Expression des <i>HvS40</i> Gens während der Blattseneszenz	103
4.2.1	Expression des <i>HvS40</i> Gens während der Seneszenz	103
4.2.2	Analyse des <i>HvS40</i> Promotors	104
4.2.3	Isolierung und Identifikation eines Transkriptionsfaktors des <i>HvS40</i> Promotors	106
4.3	Subzelluläre Lokalisierung des HvS40 Proteins	114
4.3.1	Ultrastrukturelle Veränderungen in Primärblätter der Gerste während der Seneszenz	114
4.3.2	Immunlokalisierung des HvS40 Proteins während der Seneszenz	117
4.4	Ausblick	119

5. Zusammenfassung **121**

6. Literatur **125**

Abkürzungsverzeichnis

NH ₄ HCO ₃	Ammoniumhydrogencarbonat
³² P	Phosphorisotop mit der Massenzahl 32
A	Alanin
ABA	Abscisinsäure
A-Box	Motiv verantwortlich für die Repression durch Zucker
ABRE	Abscisinsäure <i>response element</i>
ACC	Aminocyclopropancarboxylat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre DNA
CLSM	konfokales Laser Raster Mikroskop
cpm	Zerfälle pro Minute („counts per minute“)
D	Asparaginsäure
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DCMU	3-(3',4'-dichlorphenyl)-1,1-dimethylurea
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanidin-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
E	Glutaminsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERE	Ethylen <i>response element</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>
F	Phenylalanin
Fv/Fm	maximale Effizienz des Photosystems II

G	Glycin
<i>g</i>	Zentrifugalbeschleunigung
<i>gfp</i>	Gen für das <i>green fluorescent protein</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GA ₃	Gibberellinsäure
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
<i>hpd</i>	Gen für die 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase
HPPD	4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase
HR	hypersensitive Reaktion
I	Isoleucin
IES	Indolessigsäure
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IR2-Box	zweite <i>inverted repeat</i> Sequenz des ERE-Elementes des <i>PR-10a</i> Promotors der Kartoffel
K	Lysin
kBp	Kilobasenpaare (1000 Basenpaare)
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
L	Leucin
M	Methionin
MeJa	Methyljasmonat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
mRNA	Boten-RNA
min	Minute
N	Asparagin
NaCl	Natriumchlorid
P	Prolin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pFCC	<i>primary fluorescent chlorophyll catabolite</i>

PIPES	Piperazin,-N,N`-bis-(2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PR	Pathogen assoziiert (<i>pathogenesis-related</i>)
PS II	Photosystem II
Q	Glutamin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoff Species
rRNA	ribosomale RNA
RubisCo	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
S	Serin
SA	Salicylsäure
SAG	seneszenzassoziiertes Gen (<i>senescence associated gene</i>)
SAR	systemisch erworbene Resistenz (<i>systemic acquired resistance</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
T	Threonin
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
u	Enzymeinheit („unit“)
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Valin
v/v	Volumen/Volumen
Vol	Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
W-Box	Bindemotiv für WRKY-Transkriptionsfaktoren
Y	Tyrosin

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 kursiv geschrieben.

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

1. Einleitung

1.1 Das Phänomen der Seneszenz

Erstaunlicherweise ist der Tod einzelner Zellen, Zellverbände oder ganzer Organe ein wichtiger Bestandteil vieler Wachstums- und Entwicklungsprozesse von Pflanze und Tier. Bei diesem Vorgang handelt es sich nicht um ein unkontrolliertes und unkoordiniertes Absterben von Zellen, sondern vielmehr um einen aktiv gesteuerten und genetisch determinierten Prozess, der auch als programmierter Zelltod beschrieben wird. Ein Beispiel für einen solchen programmierten Zelltod im Lebenszyklus einer Pflanze kann in dem letzten, terminalen Entwicklungsprozess der ganzen Pflanze oder einzelner Organe, der Seneszenz, gesehen werden (Quirino *et al.* 2000, Dangl *et al.* 2000).

Der Entwicklungsprozess der Seneszenz kann dabei in drei Phasen unterteilt werden. Die erste Phase der Seneszenz (Initiationsphase) geht mit einer Reduzierung des Wachstums einher (Hensel *et al.* 1993). In der zweiten Phase erfolgt ein Abbau des Chlorophylls und des Photosyntheseapparates (Reorganisationsphase). Dieser Abbauvorgang ist keineswegs ein passiver Zerfallsprozess, sondern ein aktiv gesteuerter Entwicklungsabschnitt der Pflanze, in dem Zellinhaltsstoffe remobilisiert und abtransportiert werden. Diese zweite, die Seneszenz charakterisierende Phase, bringt im Gegensatz zum degenerativen, passiven Zerfallsprozess der Zellalterung noch eine weitere Besonderheit mit sich. Sie ist bis zu einem bestimmten Zeitpunkt (*point of no return*) reversibel (Kleber-Janke & Krupinska 1997, Thomas & Donnison 2000). Die dritte Phase der Seneszenz (Endphase) ist durch den Zelltod charakterisiert (Pennell & Lamb 1997, Dangl *et al.* 2000) .

Im Pflanzenreich werden prinzipiell zwei Formen der Seneszenz unterschieden. Die polykarpische Seneszenz der überdauernden Stauden, Sträucher und Bäume führt zum Absterben von Teilen der Pflanzen. Diese Form der Seneszenz tritt beispielsweise bei der herbstlichen Laubfärbung sehr eindrucksvoll in Erscheinung. Eine andere Form der Seneszenz, bei der es zum Absterben der ganzen Pflanze mit Ausnahme der Samen kommt, ist die monokarpische Seneszenz. Diese Seneszenzform, bei der die einzige Reproduktionsphase mit dem Sterben der Pflanze verbunden ist, zeigen alle ein- und zweijährigen Pflanzen (Noodén 1988 a, 1988 b). Die Seneszenz trifft, neben anderen

Organen der Pflanze, vor allem das Blatt. Die durch die Seneszenz induzierten Remobilisierungsprozesse der Blätter führen in Pflanzen mit polykarpischer Seneszenz zur Speicherung der wertvollen Zellinhaltsstoffe in überdauernden Organen. In Pflanzen mit monokarpischer Seneszenz werden die remobilisierten Assimilate für den Aufbau des Samens verwendet. In Getreidepflanzen wie der Gerste, liefert die Remobilisierung aus seneszierenden Blättern den größten Teil der Nährstoffe für die Kornfüllung (Feller & Kleist 1986). Für die Ertragsbildung dieser Pflanzen ist daher besonders wichtig, dass der Seneszenz eine Phase mit effizienter Photosyntheseleistung der Blätter vorausgeht (Stoy 1973).

1.2 Physiologische Charakterisierung der Blattseneszenz

Das augenscheinlichste Kriterium der Blattseneszenz, das den Beginn dieser Entwicklungsphase anzeigt, ist der Verlust an Chlorophyll (Hensel *et al.* 1993). Eng mit diesem Vorgang verbunden, ist die Abnahme der Photosyntheseleistung. Während Chlorophyllgehalt und Photosyntheseleistung sinken, bleibt die Effizienz, mit der das Photosystem II arbeitet, gleich. Erst zu einem viel späteren Zeitpunkt der Seneszenz, wenn der Chlorophyllgehalt deutlich abgesunken ist, sinkt auch die Effizienz des Photosystems II, die über den Chlorophyll-Fluoreszenzparameter F_v/F_m gemessen werden kann (Krupinska & Humbeck 2003).

Der Abbau des Chlorophylls kann als Konsequenz der Remobilisierungsprozesse, die mit Einsetzen der Seneszenz im Chloroplasten stattfinden und schließlich zu seiner Auflösung führen, gesehen werden. Chlorophyll liegt in den Chloroplasten an Proteine gebunden vor. Als freies nicht an Proteine gebundenes Chromophor ist es extrem reaktiv und kann zu starken photooxidativen Schäden in der Zelle führen (Matile *et al.* 1999). Werden im Zuge der Remobilisierungsprozesse die Chlorophyll bindenden Proteine abgebaut, so muss zum Schutz der Zelle das freigesetzte Chlorophyll sofort unschädlich gemacht werden (Matile *et al.* 1999). Dies erfolgt über verschiedene enzymatische Prozesse, bei denen der Phytolrest des Chlorophylls und das Magnesium als Zentralatom des Blattgrüns entfernt werden. Das nach diesen Reaktionen verbleibende primäre fluoreszierende Stoffwechselprodukt (pFCC) wird durch weitere Modifikationen umgewandelt und letztendlich in die Vakuole eingelagert (Hörtensteiner 1999, Takamiya *et al.* 2000).

Die Rückgewinnung von wichtigen Verbindungen wie Stickstoff und Magnesium spielt in bezug auf den Abbau des Chlorophylls in den Chloroplasten, in denen sich 80% des Gesamtstickstoffs einer pflanzlichen Zelle befinden (Mae *et al.* 1993), nur eine untergeordnete Rolle. 90 % des während der Seneszenz mobilisierten Stickstoffs der Chloroplasten stammt aus Enzymen des Calvin-Cyclus (Morita 1980). Hier ist vor allem die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCo) zu nennen, deren freigesetzter Stickstoff allein die Hälfte des gesamten im Chloroplasten freigesetzten Stickstoffs der Chloroplasten ausmacht. Nicht ohne Grund wird dem Abbau der RubisCo während der Seneszenz deshalb auch eine große Bedeutung zugeschrieben (Friedrich & Huffaker 1980, Ono *et al.* 1995).

Während der Seneszenz erfolgt nicht nur ein aktiv regulierter Abbauprozess von Pigmenten und Proteinen, sondern auch Nukleinsäuren unterliegen katabolischen Prozessen. Der abnehmende Gehalt an DNA und RNA (Lohman *et al.* 1994, Krause *et al.* 1998) während der Seneszenz ist auf eine gesteigerte Aktivität von Nukleasen und RNAsen zurückzuführen (Lers *et al.* 1998, Pérez-Amador *et al.* 2000). Vor allem ribosomale RNAs sowie Transkripte für Photosynthesepoteine und andere Proteine des katabolen Stoffwechsels unterliegen diesen Abbauprozessen (Crafts-Brandner *et al.* 1996, Humbeck & Krupinska 1996).

1.3 Ultrastrukturelle Veränderungen während der Blattseneszenz

Parallel zu den beschriebenen physiologischen Veränderungen, die mit Beginn der Seneszenz auftreten, können auch drastische Veränderungen in der Ultrastruktur im Licht- und Elektronenmikroskop beobachtet werden.

Ultrastrukturelle Veränderungen können mit Beginn der Seneszenz als erstes in den Chloroplasten wahrgenommen werden. Diese Veränderungen, die letztendlich zur Auflösung ganzer Plastiden führen, sind mit einer Abnahme der Anzahl dieser Zellorganellen in Mesophyllzellen im Verlauf der Seneszenz verbunden (Kura-Hotta *et al.* 1990, Yamasaki *et al.* 1996). Auch wird die Anzahl der Ribosomen mit Einsetzen der Seneszenz drastisch verringert (Thomson & Platt-Aloia 1987). Im Gegensatz dazu kann während der Seneszenz auch eine Zunahme an Mitochondrien und Peroxisomen beobachtet werden kann (Pastori & del Rio. 1994, del Rio 1998).

Bevor es aber zur Zerstörung der Plastiden kommt, die möglicherweise von der Vakuole phagozytiert werden (Noodén *et al.* 1997, Minamikawa *et al.* 2001), unterliegen die Chloroplasten einer spezifischen Strukturänderung, die parallel mit einer reduzierten Photosyntheseleistung einhergeht. Es kommt in den Chloroplasten zur Degradierung der DNA, einer Reduzierung des Thylakoidmembransystems, zum Anschwellen des Intrathylakoidraumes und zum Abbau der Grana-Stapel (Inada *et al.* 1998). All diese Prozesse sind mit dem Auftreten von Plastoglobuli in den Chloroplasten verbunden, in denen Lipidmetabolite, die aus dem Abbau der Thylakoidmembranen stammen, eingelagert werden (Tevini & Steinmüller 1985). Bei diesen Umstrukturierungsprozessen gehen die Chloroplasten von einer ellipsoiden Form in eine kugelförmige über.

Ähnlich wie die Chloroplasten werden auch das ER und der Golgi-Apparat mit Beginn der Seneszenz abgebaut (Thomson & Platt-Aloia 1987).

Der Zellkern ist neben den Mitochondrien das Zellkompartiment mit der längsten Lebensdauer (Thomson & Platt-Aloia 1987). Die ersten ultrastrukturellen Veränderungen zeigt der Zellkern zu dem Zeitpunkt, wenn in den Chloroplasten bereits die ersten Thylakoidmembranen abgebaut werden (Noodén *et al.* 1997). Zu diesen Veränderungen gehört ein erhöhter Kondensationsgrad des Chromatins sowie die vereinzelt beobachtete Fragmentierung der Kern-DNA (Inada *et al.* 1998, 1999). Im Zuge dieser Auflösungsprozesse des Zellkerns bildet die Kernmembran blasenförmige Abschnürungen, in denen verschiedene Abbauprodukte wie beispielsweise DNA-Fragmente eingeschlossen werden (Thomson & Platt-Aloia 1987). Es kommt zu einem immer stärker werdenden Schrumpfen des Zellkerns, der sich letztendlich auflöst.

1.4 Seneszenzspezifische Genexpression

Obwohl die Nukleinsäuremenge und Transkriptionsrate im Zellkern während der Seneszenz drastisch vermindert ist, findet eine *de novo*-Synthese von Proteinen statt (Scharrenberg 2001). Martin & Thimann konnten bereits 1972 zeigen, dass für das Fortschreiten der Seneszenz eine seneszenzspezifische Transkription und damit Neusynthese von Proteinen notwendig ist. Ein besonderes Interesse der Seneszenzforschung lag seitdem auf der Identifikation der während der Seneszenz neusynthetisierten Proteine. Erst in den achtziger Jahren konnten zum ersten Mal mit

der Entwicklung verschiedenster molekularbiologischer Techniken Gene identifiziert werden, deren Transkriptgehalt während der Seneszenz zunimmt. Zu diesen Methoden gehören das differentielle (Lohman *et al.* 1994) und substraktive Durchmusterung von cDNA Bibliotheken (Buchanan-Wollaston & Ainsworth 1997, Quirino *et al.* 1999), *differential display reverse transcription PCR* (Kleber-Janke & Krupinska 1997, Yoshida *et al.* 2001) und *suppression subtractive hybridization* (Hinderhofer & Zentgraf 2001). Die angewendeten Techniken beruhten dabei alle auf dem Vergleich der RNA Populationen aus seneszierendem und jungem Pflanzenmaterial. Die isolierten Gene wurden, soweit für sie ein Anstieg im Transkriptgehalt gezeigt werden konnte, im folgenden als *senescence associated genes* (SAGs) bezeichnet. Mittlerweile sind von verschiedensten dikotylen Arten, wie z.B. Arabidopsis (Hensel *et al.* 1993, Oh *et al.* 1996, Park *et al.* 1998) und Raps (Buchanan-Wollaston & Ainsworth 1997), aber auch aus monokotylen Arten wie Mais (Smart *et al.* 1995), Reis (Lee *et al.* 2001) und Gerste (Kleber-Janke & Krupinska 1997, Scharrenberg *et al.* 2003) weit über 100 verschiedene SAGs bekannt.

Ganz allgemein zeigte die Zuordnung der Genprodukte zu den identifizierten SAGs bei den verschiedenen Pflanzenarten ein sehr breites Spektrum unterschiedlicher Proteine. Vor allem Proteine mit katabolischen Funktionen, wie z.B. Proteinasen (Smart *et al.* 1995, Drake *et al.* 1996, Delorme *et al.* 2000, Lee *et al.* 2001), Ribonukleasen (Pérez-Amador *et al.* 2000), Lipasen (Hong *et al.* 2000), Galaktosidasen (Chrost & Krupinska 2000) und Glukosidasen (Yoshida *et al.* 2001) konnten identifiziert werden. Darüber hinaus konnten auch Proteine der Gluconeogenese sowie Proteine der ubiquitinabhängigen Proteolyse charakterisiert werden (Smart *et al.* 1995, Garbarino *et al.* 1995, Woo *et al.* 2001). Auch fanden sich unter den isolierten SAGs einige, die in verschiedene Stressreaktionen der Zelle involviert zu sein scheinen (Buchanan-Wollaston & Ainsworth 1997, Quirino *et al.* 1999).

1.4.1 Die SAGs *hpd* und *HvS40* der Gerste

Zwei der aus Gerste isolierten SAGs werden durch die Gene *hpd* und *HvS40* repräsentiert. Das *hpd* Gen kodiert für die 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (Kleber-Janke & Krupinska 1997). Dieses Enzym besitzt im Stoffwechsel der Pflanze eine zentrale Rolle. Es katalysiert die Umsetzung von 4-Hydroxyphenylpyruvat zu

Homogentisat (Fiedler *et al.* 1982, Schultz 1990). Homogentisat dient in Höheren Pflanzen einerseits als Ausgangsverbindung für die Bildung von Plastochinon und Vitamin E (Soll *et al.* 1980, Fiedler *et al.* 1982), andererseits kann es aber auch zu Fumarat und Acetoacetat abgebaut werden. Da gezeigt werden konnte, dass der Gehalt an Vitamin E in den Fahnenblätter der Gerste während der Seneszenz zunimmt, könnte der erhöhte Transkriptgehalt des *hpd* Gens im Zusammenhang mit der größeren Menge des Vitamin E stehen (Chrost *et al.* 1999).

Das zweite im Rahmen dieser Arbeit untersuchte SAG der Gerste ist das bereits 1993 von Becker & Apel isolierte *HvS40* Gen (*H*ordeum *v*ulgare *S*eneszenz) der Gerste. Diesem Gen konnte bisher keine Funktion zugeordnet werden. Es konnte aber gezeigt werden, dass es nicht nur durch Seneszenz, sondern auch durch Pathogenbefall aktiviert werden kann (Krupinska *et al.* 2002). Auch die Phytohormone Methyljasmonat und Salicylsäure können den Transkriptgehalt des *HvS40* Gens steigern. Darüber hinaus besitzt das Protein das Potential, in den Kern zu wandern (Krupinska *et al.* 2002).

1.4.2 Interne und externe Faktoren der Seneszenz

Die nähere Charakterisierung der isolierten SAGs aus verschiedenen Pflanzen ergab, dass diese unterschiedliche Expressionsmuster besitzen. Auf der Grundlage der zeitlichen Expressionsmuster im Verlauf der Seneszenz wurden die SAGs in verschiedene Klassen eingeteilt (Smart 1994, Buchanan-Wollaston 1997). Unabhängig von den zeitlichen Expressionsmustern zeigte sich, dass die Expression der verschiedenen SAGs auch durch verschiedene externe und interne Faktoren, die Seneszenzprozesse auslösen, beschleunigen oder verzögern können, induziert werden kann.

1.4.2.1 Phytohormone

Einen maßgeblichen Einfluss auf die Seneszenz und die Expression verschiedener SAGs haben Phytohormone (Weaver *et al.* 1998). Cytokine haben neben Auxinen und Gibberellinen einen verzögernden Einfluss auf das Einsetzen der Seneszenz (Smart 1994). So hat man in seneszierenden Blättern der Sojabohne eine Verringerung der Cytokininkonzentration nachgewiesen (Noodén *et al.* 1990). Gan & Amasino (1995) und

Mengliang (2001) haben zeigen können, dass transgene Tabakpflanzen und Reispflanzen einen deutlich verzögerten Seneszenzbeginn nach Transformation mit einem Gen der Cytokininbiosynthese unter Kontrolle eines seneszenzabhängig regulierten Promotors zeigen. Jordi *et al.* (2000) haben in diesen transgenen Tabakpflanzen einen 15 fach erhöhten Cytokiningehalt nachgewiesen. Einen späteren Seneszenzbeginn zeigen auch Pflanzen, die unempfindlich gegenüber Ethylen sind oder dieses nicht synthetisieren können (John *et al.* 1995, Grbic & Bleecker 1995). Der seneszenzfördernde Charakter der Phytohormone Salicylsäure und Jasmonsäure konnte durch Analyse entsprechender Mutanten gezeigt werden (Parthier 1990, Chen & Kao 1998, Morris *et al.* 2000, He *et al.* 2002). Insbesondere der Salicylsäure wird eine wichtige Rolle bei der Induzierung der Seneszenz zugeschrieben. Neben diesen Phytohormonen gilt auch Abscisinsäure als seneszenzfördernd. Yang *et al.* (2002) konnten zeigen, dass Abscisinsäure während der Seneszenz an der Remobilisierung von Kohlenstoffverbindungen beteiligt ist. Zudem induziert Abscisinsäure die Bildung von Sauerstoffradikalen und führt damit zu einer Form von Stress, die auch bei der natürlichen Seneszenz eine große Rolle spielt (Jiang & Zhang 2001).

1.4.2.2 Oxidativer Stress

Neben Phytohormonen und anderen Faktoren kann die seneszenzinduzierte Expression einiger SAGs auch durch oxidativen Stress erfolgen (Miller *et al.* 1999). Oxidativer Stress, der sich durch Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) auszeichnet, ist eine der häufigsten Stressformen, die während der Seneszenz beobachtet werden können. Es wird diskutiert, dass ein kurzzeitiger, transienter Anstieg der Wasserstoffperoxidmenge in der Zelle den Seneszenzprozess auslösen kann (Krupinska *et al.* 2003) und dass reaktive Sauerstoffspezies Gene und Signaltransduktionswege regulieren können (Allen & Tresini 1999, Mittler 2002). Reaktive Sauerstoffspezies, wie z.B. Singulett-Sauerstoff, Superoxidanionen oder Wasserstoffperoxid entstehen während der Seneszenz durch zahlreiche katabole Prozesse. Als Folge des Abbaus der Thylakoidmembranen, der Photosysteme und des Chlorophylls kann der Photosyntheseapparat nicht mehr so effektiv arbeiten, wodurch immer mehr Elektronen aus der Elektronentransportkette auf Sauerstoff übertragen werden. Die entstehenden Sauerstoffradikale können, soweit sie nicht sofort

unschädlich gemacht werden, im weiteren zur Lipidperoxidation und damit zur Zerstörung von Membranen führen (Thompson *et al.* 1987). Es konnte gezeigt werden, dass das verstärkte Auftreten der reaktiven Sauerstoffspezies sowohl mit einem Abfall als auch mit einem Anstieg bestimmter antioxidativer Schutzsysteme in der Zelle korreliert. So nimmt die Aktivität bestimmter Katalasen, Peroxidasen und Superoxiddismutasen während der Seneszenz ab (Santos *et al.* 2001), während die Aktivität einer mitochondrialen Superoxiddismutase andererseits ansteigt (Srivalli *et al.* 2001).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Gehalt des lipophilen Antioxidans Vitamin E in seneszierenden Fahnenblättern der Gerste ansteigt (Chrost *et al.* 1999).

1.4.2.3 Pathogenbefall

Eine andere Form von oxidativem Stress tritt in der Pflanze als Folge des Pathogenbefalls auf. Bei der sogenannten hypersensitiven Reaktion (HR), die ähnlich wie die Endphase der Seneszenz als programmierter Zelltod angesehen wird (Pontier *et al.* 1999), stirbt das befallene Gewebe ab. Die entstehenden „Gewebelesionen“ werden von den umgebenden Zellen „versiegelt“, indem die Zellwände der noch lebenden Zellen lignifiziert, verkorkt und mit Polyphenolen imprägniert werden (Malamy & Klessig 1992). Das Pathogen wird von der Pflanze im Zuge dieser HR-Reaktion durch die Bildung von Phytoalexinen, Hydrolasen und Chitinasen und verschiedener reaktiver Sauerstoffspezies bekämpft (Sutherland 1991, Wojtaszek 1997). Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies erfolgt hier also anders als bei der Seneszenz als Schutzmechanismus der Pflanze vor dem Pathogen. Für diese induzierte Abwehrreaktion der Pflanze gegenüber dem Pathogen ist ähnlich wie bei der Seneszenz eine *de novo*-Synthese von Proteinen, sogenannter PR Proteine (*pathogenesis related*), nötig (Li *et al.* 1999, Petersen *et al.* 2000).

Neben der hypersensitiven Reaktion kann eine Pflanze auf Pathogenbefall auch mit einer systemisch erworbenen Resistenz reagieren (Ward *et al.* 1991). Darunter versteht man, dass eine Pflanze nach Befall mit einem Pathogen eine Resistenz gegenüber diesem erwirbt, indem sie bestimmte PR Gene und Proteine exprimiert (Herbers *et al.* 1996).

Der Vergleich zwischen dem Phänomen der Seneszenz und der Pathogenabwehr hat gezeigt, dass es viele Gemeinsamkeiten zwischen beiden Prozessen gibt (Quirino *et al.*

2000, Obregón *et al.* 2001). Zu diesen Gemeinsamkeiten gehören u.a. die Bildung von Chlorosen und Wasserstoffperoxid, ein Anstieg in der Konzentration der Phytohormone Ethylen und Salicylsäure, eine Verminderung der Cytokininmenge sowie die spezifische Expression bestimmter Gene (Rao *et al.* 2000, Jing *et al.* 2002). So zeigen einige PR Gene, wie z.B. WRKY 6 (Robatzek & Somssich 2001) nicht nur bei Pathogenbefall, sondern auch während der Seneszenz einen höheren Transkriptgehalt. Umgekehrt gibt es auch einige SAGs, deren Transkripte sowohl während der Seneszenz als auch bei Pathogenbefall akkumulieren. Hierzu gehören die Cystein Protease SAG12 aus *Arabidopsis*, das Metallothionein Protein LSC54 aus Raps und das im Rahmen dieser Arbeit bearbeitete HvS40 Protein der Gerste (Butt *et al.* 1998, Pontier *et al.* 1999, Krupinska *et al.* 2002).

Da es bei Pathogenbefall zu einer reduzierten Photosyntheseleistung und einer Vergilbung der Blätter kommt, wird angenommen, dass die Expression einiger SAGs Teil dieser seneszenzähnlichen Vorgänge ist. Andererseits kann die Abwehr von Pathogenen ein immanenter Teil des Seneszenzprogramms sein (Quirino *et al.* 2000).

1.4.2.4 Umwelteinflüsse

Neben den genannten Faktoren können auch umweltbedingte Parameter wie z.B. Kühle (Berberich *et al.* 1999), Trockenheit (He *et al.* 2001), UV-B- Strahlung (John *et al.* 2001), Ozon (Miller *et al.* 1999) und Lichtmangel Seneszenzprozesse auslösen, verzögern oder beschleunigen. Besonders Lichtmangel durch Dunkelheit führt häufig zur Auslösung der Seneszenz (Kleber-Janke & Krupinska 1997, Park *et al.* 1998, Weaver *et al.* 1998). Allerdings gibt es auch Hinweise darauf, dass diese artifiziell erzeugte Seneszenz nur partiell mit der natürlichen Situation verglichen werden kann (Becker & Apel 1993, Weaver & Amasino 2001).

1.4.2.5 Weitere Faktoren, die einen Einfluss auf die Seneszenz haben

Eine weitere wichtige Rolle bei der Seneszenz spielen Stickoxide (Leshem & Harmaty 1996). So konnte gezeigt werden, dass während der Seneszenz die endogene Konzentration an Stickoxiden abnimmt. Zudem wurde der Nachweis erbracht, dass eine exogene Gabe von Stickoxiden die Seneszenz verzögern kann (Leshem *et al.* 1998).

Ähnlich wie die Stickoxide haben auch Polyamine eine seneszenzverzögernde Eigenschaft (Pandey *et al.* 2000). Sinkt die endogene Konzentration an Polyaminen, können Seneszenzsymptome, wie z.B. der Verlust an Chlorophyll, beobachtet werden (Evans & Malmberg 1989).

In Abbildung 1 sind in einem vereinfachten Schema die beschriebenen verschiedenen externen und internen Faktoren, die den Seneszenzprozess beschleunigen, verlangsamen oder verzögern können, dargestellt.

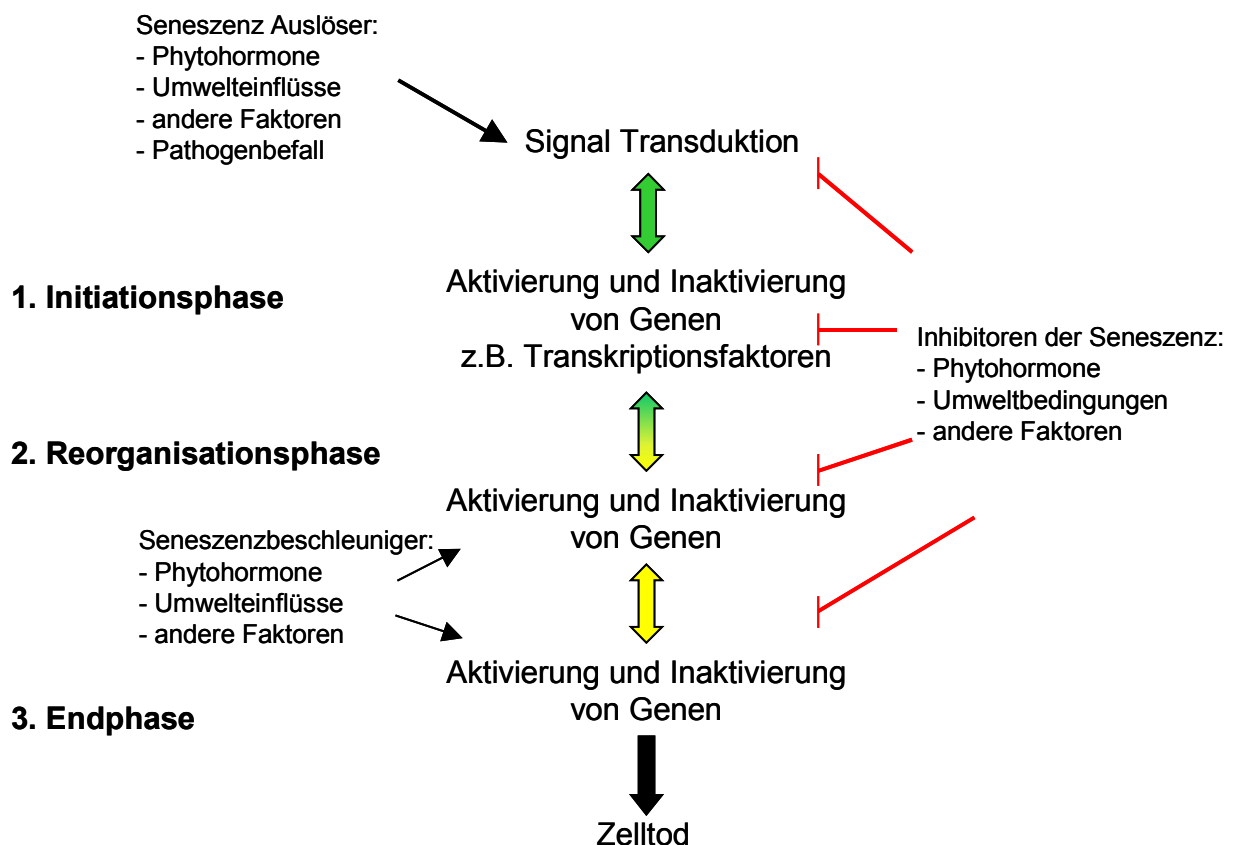


Abb.1: Modell zur Wirkung von verschiedenen externen und internen Faktoren, die den Seneszenzprozess beschleunigen, verlangsamen oder verzögern können. Die Faktoren können die Signaltransduktion und oder die Aktivität von Genen in verschiedenen Phasen der Seneszenz (Initiationsphase, Reorganisationsphase, Endphase) beeinflussen. Der Seneszenzprozess ist dabei bis zu einem gewissen Punkt (*point of no return*) reversibel, was durch die doppelten Pfeilspitzen angedeutet ist. Ist dieser Punkt überschritten, folgt der Zelltod (Pfeil mit einfacher Spitze). Verändert nach Noodén *et al.* 1997.

Durch RNA-Analysen konnte gezeigt werden, dass die SAGs sehr verschiedene Expressionsmuster während der Seneszenz aufweisen. Beispielsweise reagieren einige SAGs auf Phytohormone wie Ethylen und Salicylsäure, andere dagegen sind von

diesen Substanzen unbeeinflusst und zeigen einen verstärkten Transkriptgehalt unter oxidativen Stressbedingungen. Eine Zuordnung der isolierten SAGs in ein einfaches Modell zur Regulation der Genexpression während der Seneszenz ist daher nicht möglich. Ein zentrales Interesse gegenwärtiger Seneszenzforschung besteht daher in der Aufklärung der Regulation der Seneszenz.

1.5 Regulation der Seneszenz

In der gegenwärtigen Forschung werden im wesentlichen zwei Methoden, allein oder in Kombination, angewandt, mit Hilfe derer Hinweise auf die Regulation der Seneszenz gewonnen werden sollen. Ein Ansatz besteht in der Charakterisierung von Mutanten, deren Seneszenzverhalten vom charakteristischen Seneszenzverlauf abweicht. Ein weiterer experimenteller Ansatz beschäftigt sich mit der Analyse der SAG Promotoren. Das Ziel dieser Untersuchungen ist, die für die Seneszenz wichtigen regulatorischen Sequenzmotive aufzudecken, sowie die für die Transkription erforderlichen DNA-Bindeproteine zu identifizieren.

1.5.1 Analyse von Mutanten

Es sind verschiedene Mutanten bekannt, deren Seneszenzverhalten vom charakteristischen Seneszenzverlauf abweicht. Zu den prominentesten Mutanten mit einer verlängerten Lebensdauer gehören die aus verschiedenen Pflanzenarten bekannten *stay green* Mutanten (Thomas & Howarth 2000). Bei allen analysierten *stay green* Mutanten ist bisher unbekannt, welche Gene aufgrund der Mutation ein verändertes Expressionsprofil zeigen, so dass Regulatoren in diesen Mutanten noch nicht identifiziert wurden.

Eine verlängerte Lebensdauer zeigen auch die *ore9* und *dls1* Mutanten aus *Arabidopsis*. Während die *ore9* Mutante eine Störung in einem F-Box Protein besitzt, zeigt das *dls1* Protein eine Störung in der Arginin-tRNA Arginyltransferase. Beiden Proteinen wird eine den Seneszenzprozess maßgebliche regulierende Funktion beim ubiquitinabhängigen Abbau von Proteinen zugeschrieben (Woo *et al.* 2001, Yoshida *et al.* 2002 a).

Neben Mutanten mit einer verlängerten Lebensdauer, gibt es auch einige Mutanten mit verkürzter Lebensdauer. So zeigen die von Jing *et al.* (2002) isolierten Mutanten *old1*, *old 2* und *old 3* eine verfrühte Seneszenz. Analysen mit diesen Mutanten deuten darauf hin, dass die veränderten Gene eine zentrale Rolle bei der Steuerung der Expression einiger SAGs einnehmen. Zudem zeigt die *hys1* Mutante aus Arabidopsis eine verfrühte Seneszenz und ein schwächeres Abwehrverhalten gegenüber Pathogenen als Folge einer Mutation eines offensichtlich in beide Prozessen involvierten Repressorproteins (Yoshida *et al.* 2000 b). Ein weiterer gemeinsamer Regulator der Seneszenz und der Pathogenabwehr wurde von Greenberg & Ausubel (1993) beschrieben.

Eine immer stärker werdende Bedeutung bei der Regulation der Seneszenz erlangen WRKY-Transkriptionsfaktoren. Diese große Familie von für Pflanzen spezifischen Transkriptionsfaktoren, die eine WRKYGQK-Domäne am N-Terminus besitzen, spielen eine zentrale Rolle bei verschiedensten Stresssituationen in der Pflanze (Eulgem *et al.* 2000). So ist beispielsweise das WRKY-Protein 6 dafür bekannt, eine wichtige Rolle bei der Pathogenabwehr und Seneszenz zu spielen (Robatzek & Somssich 2001, 2002). Auch konnte für das WRKY-Protein 53 gezeigt werden, dass es während der Seneszenz von Bedeutung ist (Hinderhofer & Zentgraf 2001).

Die durchgeführten Analysen an Mutanten zeigen, dass Seneszenz und Pathogenabwehr nicht nur im Spektrum aktivierter Gene, sondern auch in der Regulation beider Prozesse Gemeinsamkeiten aufweisen.

1.5.2 Promotoranalyse

Neben der Charakterisierung von Mutanten, kann auch die Analyse von Promotoren seneszenzassoziierter Gene wichtige Hinweise auf mögliche Regulatoren des Seneszenzprogramms geben.

Ein Promotor befindet sich immer im Bereich vor dem kodierenden Genabschnitt. Er besitzt mehrere sogenannte *cis*-Elemente, die spezifische Erkennungssequenzen für Proteine darstellen über die die Aktivität des Promotors und damit die Transkription eines Gens reguliert werden kann.

Durch Analyse der Promotoraktivität verschiedener SAGs konnten einzelne *cis*-Elemente, die die Transkription in Abhängigkeit der Seneszenz regulieren, identifiziert werden. Zu diesen *cis*-Elementen gehören beispielsweise JASE1 und JASE2, die für die durch Jasmonsäure und Seneszenz induzierte Transkription des Gens für die 12-

Oxo-Phytodiensäure-10,11-Reduktase von Arabidopsis (He & Gan 2001) verantwortlich sind. Ein anderes *cis*-Element, das die bei Seneszenz induzierte Transkription des SAG12 Gens in Arabidopsis und Raps reguliert, konnte ebenfalls identifiziert werden (Noh & Amasino 1999 a). Es konnte zudem gezeigt werden, dass der identifizierte Bereich zwischen Arabidopsis und Raps hoch konserviert ist (Noh & Amasino 1999 b). Hinweise darauf, dass diese Elemente auch in anderen SAGs vorkommen und damit auch für die Regulation weiterer SAGs in Frage kommen, gibt es bisher nicht. Zu den bekannten *cis*-Elementen, die in den Promotoren verschiedener SAGs zu finden sind, gehören W-Boxen. Robatzek & Somssich (2002) konnten durch Analyse der Zielgene des Transkriptionsfaktors WRKY6 zeigen, dass viele seneszenzabhängig exprimierte Gene im Promotorbereich eine bzw. mehrere Bindestellen für WRKY-Transkriptionsfaktoren (W-Boxen) besitzen. Zu den seneszenzabhängig exprimierten Genen mit W-Boxen gehört auch eine Rezeptorproteinkinase (SIRK), sowie die als SAG eingestuftene Gene SEN1 und SEN2 (Robatzek & Somssich 2002).

Eine wichtige Voraussetzung für die Identifizierung von seneszenzabhängig regulierten *cis*-Elementen und Transkriptionsfaktoren ist, dass das untersuchte Gen zumindest teilweise einer transkriptionellen Regulation unterliegt. Dies ist vermutlich nicht bei allen SAGs der Fall. Da die identifizierten SAGs alle durch den Vergleich von RNA Populationen aus seneszierenden und nicht seneszierenden Pflanzen identifiziert wurden, können auch Gene als SAGs eingestuft werden, wenn ihre Transkripte im Vergleich zu den anderen Ribonukleinsäuren stabiler sind. Da der mRNA Gehalt während der Seneszenz abnimmt, ist der Transkriptgehalt eines solchen Gens in seneszierenden Pflanzen dann höher als in jungen, obwohl keine Transkription stattgefunden hat. Im Hinblick auf die Promotoranalyse eines SAGs ist die Untersuchung der *de novo* Synthese von RNA während der Seneszenz eine wichtige Voraussetzung.

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurde die Transkription verschiedener SAGs der Gerste durch *run on* Analysen, bei denen die Synthese zum Zeitpunkt der Probennahme von bereits initiierten Transkripten gemessen wird, untersucht (Scharrenberg 2001). Für die im Rahmen dieser Arbeit bearbeiteten Gene *HvS40* und *hpd* konnte gezeigt werden, dass diese in seneszierenden Fahnenblättern der Gerste einer transkriptionellen Kontrolle unterliegen (Scharrenberg 2001). Die Voraussetzung für die Analyse von

seneszenzabhängig regulierten *cis*-Elementen und Transkriptionsfaktoren der Promotoren der Gene *HvS40* und *hpd* ist somit gegeben (siehe 1.6).

1.6 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit soll unter anderem klären, welche internen und externen Faktoren die während der Blattseneszenz induzierte Transkription der Gene *HvS40* und *hpd* steuern. Einen Schwerpunkt dieser Untersuchungen sollen die Auswirkungen von Phytohormonen und oxidativen Stressbedingungen auf den Transkriptgehalt der Gene *HvS40* und *hpd* bilden. Von den Ergebnissen zur Expression sind erste Hinweise auf eine mögliche Funktion beider Gene während der Seneszenz zu erwarten. Ein Vergleich der Expressionsprofile kann zeigen, inwiefern beide Gene ähnlichen oder verschiedenen Regulationsmechanismen unterliegen.

Wie aus den vorangegangenen Kapiteln hervorgeht, gibt es bisher nur wenig Erkenntnisse über seneszenzabhängig induzierte Transkriptionsfaktoren. Im Mittelpunkt der Arbeit steht daher die Analyse der Promotoren der transkriptionell regulierten Gene *hpd* und *HvS40*. Der Vergleich der Promotorsequenzen beider analysierter Gene soll erste Hinweise darauf geben, welche gemeinsamen und unterschiedlichen *cis*-Elemente die Promotoren beider Gene aufweisen. In anschließenden Experimenten soll dann getestet werden, ob die identifizierten *cis*-Elemente an der seneszenzinduzierten Transkription der untersuchten Gene beteiligt sind. Ziel der durchgeführten Promotoranalysen ist, ein während der Seneszenz aktiviertes *cis*-Element sowie einen an diesen Promotorbereich bindenden Transkriptionsfaktor zu isolieren, und zu identifizieren.

Ein weiteres Ziel der Arbeit besteht darin, das *HvS40* Proteins zu lokalisieren. In Vorarbeiten zu dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieses Protein das Potential besitzt, in den Zellkern zu wandern (Krupinska *et al.* 2002). Durch immunhistochemische Untersuchungen soll gezeigt werden, ob es eine entwicklungsabhängige Lokalisierung des Proteins im Zellkern gibt. Falls dies der Fall ist, soll überprüft werden, ob das *HvS40* Protein mit der DNA des Zellkerns kolokalisiert. Diese Immunmarkierungen sollen erste Hinweise auf eine mögliche Funktion des *HvS40* Proteins geben.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders vermerkt, waren die verwendeten Laborchemikalien von reiner Qualität und wurden von den Firmen Fisher Scientific (Düsseldorf), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma (München) bezogen. Die Radionukleotide γ -³²P-ATP und α -³²P-dCTP wurden mit einer spezifischen Aktivität von jeweils 3000 Ci/mmol von der Firma NEN (Dreieich) oder der Firma Hartmann Analytik (Hamburg) verwendet.

RNase A (DNase frei) wurde von Boehringer (Mannheim) und Superscript IITM Reverse Transcriptase von Life Technologies (Karlsruhe) bezogen. Alle weiteren verwendeten Enzyme stammten von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot).

2.2 Pflanzenmaterial

2.2.1 Anzucht von Gerste in der Klimakammer

Für die Anzucht von Gerstenpflanzen wurde Sommergerste *Hordeum vulgare* L. cv. Carina (Ackermann Saatzucht, Irlbach) oder *Hordeum vulgare* L. cv. Steffi (Ackermann Saatzucht, Irlbach) verwendet.

Für Untersuchungen zum Einfluss von Phytohormonen, oxidativem Stress oder Dunkelheit auf das Seneszenzverhalten der Gerste wurde das Saatgut auf Vermiculit von der Firma Rieck (Rendsburg) ausgelegt, befeuchtet und in einer Klimakammer für 7 Tage in einem Licht- (16h/21°C, 130 $\mu\text{mol} \times \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) Dunkelrhythmus (8 h/16 °C) angezogen (Krupinska 1992). Unter den gewählten Versuchsbedingungen haben die Pflanzen nach 7 Tagen ein Primärblatt entwickelt, das kein Wachstum mehr zeigt. Die Pflanzen wurden dann für zusätzliche 2 oder 4 Tage ins Dunkle gestellt. Als entsprechende Kontrollen für diese im Dunkeln weiterwachsenden Pflanzen wurden parallel Gerstenpflanzen entsprechend 9 oder 11 Tage im Licht-/Dunkelrhythmus angezogen. Primärblätter anderer Pflanzen wurden nach 7 Tagen Wachstum 2 cm

oberhalb ihres Blattgrunds und unterhalb ihrer Blattspitze abgeschnitten und im Dauerlicht für weitere 48h auf Leitungswasser oder einer entsprechenden Inkubationslösung gelegt. In Tabelle 1 sind die verwendeten Lösungen gezeigt. Die Blattsegmente wurden entweder unter Schwach- ($130 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) oder unter Starklicht ($430 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) inkubiert.

Tab. 1: Phytohormone und Chemikalien, die zur Untersuchung des Seneszenzverhaltens der Gerste verwendet wurden.

Phytohormon/Chemikalie	gelöst in	verwendete Konzentration
Abscisinsäure	(w/v) in 1% Ethanol (v/v)/ 99% Leitungswasser	100 $\mu\text{mol/l}$
Methyljasmonat	(v/v) in Leitungswasser	100 $\mu\text{mol/l}$
Indolessigsäure	(w/v) in Leitungswasser	100 $\mu\text{mol/l}$
Gibberellinsäure	(w/v) in Leitungswasser	100 $\mu\text{mol/l}$
Salicylsäure	(w/v) in Leitungswasser	100 $\mu\text{mol/l}$
Aminocyclopropancarboxylat	(w/v) in Leitungswasser	50 $\mu\text{mol/l}$
Kinetin	(w/v) in Leitungswasser	100 $\mu\text{mol/l}$
Wasserstoffperoxid	(v/v) in Leitungswasser	5, 10 und 50 mM/l
DCMU	(w/v) in 1% Ethanol (v/v)/ 99% Leitungswasser	100 $\mu\text{mol/l}$

Nach 48 h Inkubation mit einer entsprechenden Lösung wurden die Blattstücke an ihren Enden 0,5 cm gekürzt, dann entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder sofort weiterverarbeitet. Auch die Primärblätter der im Dauerdunkel oder Licht-/Dunkelrhythmus angezogenen Pflanzen wurden 2 cm oberhalb des Blattgrunds abgeschnitten und danach entweder in Stickstoff schockgefroren oder sofort für die Isolierung von Kernproteinen (2.10.1) verwendet.

Für Untersuchungen zur natürlichen Primärblattseneszenz wurde Saatgut der Gerste für 48 h bei 4°C und anschließend für weitere 24 h bei 21°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^{-1} Plantacote der Firma AGLUKON, Düsseldorf) beigemischt

wurde, ausgelegt und mit 1 bis 2 cm des Substrats überschichtet (Miersch *et al.* 2000). Die Keimlinge wurden in der Klimakammer im Licht- und Dunkelrhythmus wie oben beschrieben kultiviert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Primärblätter in Stickstoff eingefroren oder sofort zur Isolierung von Kernproteinen eingesetzt.

2.3 Physiologische Parameter

2.3.1 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes

Chlorophyll wurde aus einzelnen Blattsegmenten mit heißem Methanol in Anwesenheit von Magnesiumhydrogencarbonat extrahiert. Die Messung und Berechnung des Chlorophyllgehaltes erfolgte nach den Angaben von Lichtenthaler (1987). Jede Chlorophyllbestimmung erfolgte durch mindestens drei unabhängige Messungen.

2.3.2 Bestimmung der chlorophyllspezifischen Fluoreszenz (F_v/F_m)

Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz erfolgte bei Raumtemperatur 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. 30 min vor jeder Messung wurden die Blätter in Dunkelheit überführt. F_0 und F_m wurden nach den Angaben von Humbeck *et al.* (1996) bestimmt. Der F_v/F_m Wert wurde aus mindestens 5 unabhängigen Messungen berechnet.

2.4 Genomklone und Oligonukleotide

DNA-Klone des Gerstengenoms, die im Rahmen dieser Arbeit für verschiedene Klonierungsarbeiten verwendet wurden, sind im Fall des *HvS40* Gens bei Haußühl (1999) beschrieben. Für das *hpd* Gen wurde ein 5,5 kba großer genomischer Klon, der von Papp (unveröffentlicht) isoliert wurde, zur Verfügung gestellt.

Zur Herstellung verschiedener Promotorkonstrukte des *hpd* Gens wurden verschiedene Bereiche des Promotors mittels PCR amplifiziert und für weitere Klonierungsarbeiten verwendet. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die hierfür verwendeten Oligonukleotide.

Tab. 2: Oligonukleotide für die Amplifikation von Promotorbereichen des *hpd* Gens. Die in den Oligonukleotiden vorhandene Restriktionsschnittstelle Xba ist unterstrichen.

Bezeichnung des Oligonukleotids	Sequenz 5' → 3'
HPDP-469	CCCG <u>TCTAGAG</u> CACCTTTTCAATGA
HPDP-877	CCC <u>TCTAGA</u> AATCCGTCAGCTCGC
HPDP-1669	CCC <u>TCTAG</u> ATTCATTATGCTAGT
Hv-prom1-low	CGCCAGTGGGCTCGGGGTTTAG

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *Primer-Extension*-Analysen wurden verschiedene Oligonukleotide verwendet, die in der Nähe des Translationsstartpunktes der Gene *HvS40* und *hpd* binden. Einen Überblick über die verwendeten Oligonukleotide gibt Tabelle 3.

Tab. 3: Oligonukleotide für *Primer-Extension*-Analysen der Gene *hpd* und *HvS40*.

Name	Sequenz 5' → 3'
<i>hpd</i> 1	GGGTTGAAGCGGACCATTTCG
<i>hpd</i> 2	CATGGTGTGCGTTCGCTTC
<i>S40 pex</i>	ATGTCTCCGTCGACGTTGCTG

Die in Tabelle 4 aufgelisteten Oligonukleotide wurden für die Gelretardierungsexperimente verwendet.

Tab. 4: Oligonukleotide, die für Gelretardierungsexperimente verwendet wurden.

Name	Sequenz 5' → 3'
<i>hpd</i> Promotor 1 a	TTGTAGTTTTTCTGCAACTACGGTTTTGTTGCAGATTT TTTTGCAACAAA
<i>hpd</i> Promotor 1 b	TTTGTTGCAAAAAAATCTCGAACAAAACCGTAGTTGCA GAAAAACTACAA
<i>hpd</i> Promotor 2 a	CTTCTTCACTTTTGCAACTTAGGCCAG
<i>hpd</i> Promotor 2 b	CTGGGCCTAAGTTGCAAAAGTGAAGAAG
<i>hpd</i> Promotor 3 a	TCTTTTTGCAACTGAAGTTCCGTTGCAATT
<i>hpd</i> Promotor 3 b	AATTGCAACGGAACCTCAGTTGCAAAAAGA
<i>hpd</i> ABA II b kodi.	GCCCACGTGGCGCCATGTCCGCCCTTT
<i>hpd</i> ABA II b kodo.	AAAGGGCGGACATGGCGCCACGTGGGC
<i>HvS40</i> WRKY 1 a kodi.	TGTCAGAAAATGGTCAAATGAGTTTGAACC
<i>HvS40</i> WRKY 1 a kodo.	GGTTCAAACCTCATTGACCATTTTCTGACA
<i>HvS40</i> WRKY 2 kodi. (= W II kodierend)	CTCTGTCAAATATTGGTCAAACG
<i>HvS40</i> WRKY 2 kodo. (= W II kodogen)	CGTTTTACCAATATTTGACAGAG`
M 1 kodi.	CTCTTTCAAATATTGTTCAAACG
M 1 kodo.	CGTTTGAACAATATTTGAAAGAG
M 2 kodi.	CTCTTTCAAATATTGGTCAAACG
M 2 kodo.	CGTTTGAACAATATTTGAAAGAG
M 3 kodi.	CTCTGTCAAATATTGTTCAAACG
M 3 kodo.	CGTTTGAACAATATTTGACAGAG

2.5 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.5.1 Klonierung und Transformation von Bakterien

LB-Medium:

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

TCM-Puffer:

Tris/HCl pH 7,5	10 mM
CaCl ₂	10mM
MgCl ₂	10mM

Für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen wurden die Vektoren pBluescript SK + (Stratagene, La Jolla, Ca, USA), pHGFP-S65T (Clontech, Heidelberg) oder pAct1-D (Mc Elroy *et al.* 1990, 1991) verwendet.

Genspezifische DNA-Fragmente wurden durch Restriktionsverdau gewonnen. Dieses konnten entweder bereits klonierte Fragmente oder PCR-Produkte (2.5.1.1) sein. Die erhaltenen Restriktionsfragmente und der durch entsprechenden Restriktionsverdau präparierte Vektor wurden anschließend in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt (Sambrook *et al.* 1989) und mit dem *ConcertTM Matrix Gel Extraction System* (Invitrogen, Karlsruhe) aus dem Gel extrahiert.

Die Ligation erfolgte mit einer T4 Ligase (MBI Fermentas, St Leon-Rot) in einem molaren Verhältnis von 3:1 von PCR-Produkt oder Restriktionsfragment zu Vektor. Die Ligation erfolgte in einem Primus 96 Plus PCR-Gerät (MWG Biotech, Ebersberg) nach der Methode von Lund *et al.* (1996).

Rekombinante Plasmide wurden in dem Bakterienstamm DH5 α , vermehrt. Diese Bakterienzellen wurden zuvor nach der Methode von Mandel & Higa (1970) kompetent gemacht und bei -80°C gelagert. Zur Transformation wurden 5-10 μ l eines Ligationsansatzes oder 50 ng Plasmid DNA zusammen mit 50 μ l TCM-Puffer zu 100 μ l kompetenten *E. coli* Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein einminütiger Hitzeschock bei 43°C. Anschließend wurden 250 μ l LB-Medium zur Bakteriensuspension gegeben und der Ansatz bei starkem Schütteln 60 min inkubiert. 50-200 μ l der Zellen wurden auf LB-Platten (LB-Medium mit 1,5 % Agar), die 0,1 mg/ml Ampicillin enthielten, ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.5.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion ermöglicht die gezielte Amplifikation eines gewünschten DNA-Fragments ausgehend von einem Plasmid oder der gesamten DNA eines Organismus. Die Synthese der eingesetzten DNA erfolgt durch 30 –35 malige zyklische Wiederholungen folgender Abläufe. Eine PCR beginnt in der Regel mit der Denaturierung der DNA, an die dann die eingesetzten Oligonukleotide bei einer bestimmten Temperatur binden. Die Temperatur ist dabei abhängig vom eingesetzten Oligonukleotid. Die Amplifikation des komplementären DNA-Stranges erfolgt bei 72°C mit der hitzestabilen Taq-Polymerase. Nach der Amplifikation schließt sich ein erneuter Denaturierungsschritt an, mit dem ein neuer Zyklus beginnt.

Die im Rahmen dieser Arbeit ausgeführten PCR-Reaktionen erfolgten mit Plasmid-DNA. Ein typischer PCR-Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 50 µl, 20 ng Plasmid-DNA, 10 pmol jedes der beiden Oligonukleotide, jeweils 10 pmol dATP, dCTP, dGTP und dTTP und 1 u Taq-Polymerase im vom Hersteller mitgelieferten Puffer, zu dem Magnesiumchlorid in verschiedenen Konzentrationen (2-6 mM) zugesetzt wurde. Die eingesetzten Oligonukleotide stammten entweder von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe) oder Sigma (München). Die PCR-Reaktion erfolgte in einem Primus 96 Plus PCR-Gerät (MWG Biotech, Ebersberg). Mit folgendem allgemeinem Temperaturprogramm wurden die PCR-Reaktionen ausgeführt:

Tab. 5: Temperaturprogramm zur Amplifikation verschiedener verwendeter PCR-Produkte.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94°C	30s	1
Denaturierung	94°C	30s	35
<i>Primer Annealing</i>	40-65°C	45s	
Polymerisation	72°C	45-120s je nach Länge des zu amplifizierenden Fragments	
	72°C	5 min	1

2.5.1.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Verwendung von Restriktionsendonukleasen zur sequenzspezifischen Spaltung von DNA erfolgte jeweils nach Angaben des Herstellers mit niedrig konzentrierten Enzymen (10u/µl).

2.5.2 Anzucht, Lagerung von Bakterien und Plasmidisolierung

E. coli Bakterienstämme wurden nach Animpfen aus einer Bakterienkolonie oder Stammkultur in 5 ml oder 200 ml LB-Medium mit Ampicillin (0,1 mg/ml) über Nacht bei 37°C und 180 UpM in einem Schüttelinkubator angezogen. Die Lagerung der Bakterien erfolgte bei –80°C nach Zugabe von 20% Glycerin zu 1 ml einer Übernachtskultur. Aus den 5 ml Bakterienkulturen wurden die Plasmide mit Hilfe der Methode von Birnboim & Doly (1979) isoliert. 200 ml Bakterienkulturen wurden mit dem *ConcertTM Rapid Plasmid Midiprep System* (Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.5.3 Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse erfolgte mit Hilfe von den für pBluescript vektorspezifischen Oligonukleotiden M13 *reverse* oder M13 *forward* (Stratagene, La Jolla, Ca, USA), die mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD800 (MWG Biotech, Ebersberg) markiert waren. Zur Überprüfung von Klonierungen mit dem Reporter gen *gfp* wurde folgendes Oligonukleotid als interner Sequenzierprimer verwendet: 5`-TGAAGTTGTGGCCGTTACG-3`. Die Sequenzreaktion, ein PCR-gekoppeltes Verfahren (*cycle sequencing*), wurde entweder mit dem *SequiTherm ExcelTM II Long-ReadTM DNA Sequencing Kit* (Biozym Diagnostics GmbH, Hess. Oldendorf) oder mit dem *Cycle ReaderTM Auto DNA Sequencing Kit* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers in einem Primus 96 Plus PCR-Gerät (MWG Biotech, Ebersberg) durchgeführt.

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte über ein denaturierendes Polyacrylamidgel (7,5 % Rapid Gel™ XL der Firma Amersham Pharmacia, Freiburg) in einem Licor DNA Sequenzierer (Model 4000 L, MWG Biotech AG, Ebersberg).

2.5.4 Extraktion von RNA aus Pflanzenmaterial

2.5.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA nach Chirgwin *et al.* (1979)

Große Mengen an hochreiner RNA (bis zu 1 g) wurden nach der Methode von Chirgwin *et al.* (1979), die von Humbeck *et al.* (1994) modifiziert wurde, isoliert.

2.5.4.2 Isolierung von Gesamt-RNA mit dem TRIZOL™-Reagenz

Eine schnelle RNA-Extraktion von kleinen Mengen Pflanzenmaterial (100 mg) erfolgte mit dem TRIZOL™-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe).

Hierfür wurde das Blattmaterial (100 mg) in einem Mörser unter Verwendung von flüssigem Stickstoff zerkleinert. Nachdem das zerkleinerte Blattmaterial in 2 ml Reaktionsgefäße überführt war, wird 500 µl TRIZOL™-Reagenz dazu gegeben. Nach gründlicher Durchmischung des Ansatzes erfolgt die Zugabe von weiteren 500 µl TRIZOL™-Reagenz, ein weiteres Mischen und 5 min Inkubation bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (99:1) wird die Suspension ca. 15 s geschüttelt und 2 bis 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation (7500 UpM, 30 min, 4°C, Eppendorf Zentrifuge 5804 R, Rotor FA 45-30-11) wird die wässrige von der organischen Phase getrennt. Nach Abnahme der wässrigen Phase werden die Nukleinsäuren aus dieser mit 1 Vol. Isopropanol während einer zehninütigen Inkubation gefällt. Nach einer Zentrifugation (7500 UpM, 15 min, 4°C, Eppendorf Zentrifuge 5804 R, Rotor FA 45-30-11) werden die sedimentierten Nukleinsäuren mit 1 ml 70% (v/v) eiskaltem Ethanol gewaschen. Das Sediment wird 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.

2.5.4.3 Isolierung von Poly(A)⁺RNA

Die Isolierung von Poly(A)⁺RNA erfolgte mit dem *PolyATtract mRNA Isolation System IV* der Firma Promega (Heidelberg) nach Angaben des Herstellers. Das System enthält biotinylierte oligo(dT)-*Primer*, die an die 3'-Poly(A)-Region der mRNA binden. Dieser Komplex wird an Streptavidin gekoppelte Magnetpartikel gebunden und unter Verwendung eines Magneten spezifisch aus der Menge an gesamter RNA herausgezogen. Die angereicherte mRNA wird durch Zugabe von Wasser von dem Komplex gelöst.

2.5.5 Fällung von Makromolekülen

In wässriger Lösung vorliegende Nukleinsäuren wie DNA oder RNA werden mit 0,1 Vol. 4 M NaCl und 2,5 Vol. eiskaltem absolutem 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, Eppendorf Zentrifuge 5804 R, Rotor FA 45-30-11) werden die Nukleinsäuren sedimentiert und anschließend ein- bis zweimal mit 70 % (v/v) eiskaltem Ethanol gewaschen. Abschließend wird das Sediment 10 min an der Luft getrocknet und in einem kleinen Volumen an Puffer oder an mit DEPC behandeltem Wasser aufgenommen.

Die Fällung von Proteinen erfolgte durch Zugabe von kaltem auf -20°C vorgekühltem Aceton bis zu einer Endkonzentration von 70% des Lösungsmittels. Die Fällung der Proteine erfolgte über Nacht bei 4°C. Durch eine Zentrifugation (10000 UpM, 4°C, 10 min) werden die Proteine sedimentiert. Anschließend werden sie in Wasser oder Puffer aufgenommen.

2.5.6 Radioaktive Markierung von Sonden

DNA-Fragmente für die Hybridisierung von Membranen wurden mit dem *HexaLabel™ DNA Labeling Kit* (MBI Fermentas) nach Angaben des Herstellers mit 100 ng DNA durchgeführt.

Die Markierung von Oligonukleotiden für Gelretardierungsexperimente erfolgte dabei unter Verwendung einer T4 Polynukleotid Kinase (MBI Fermentas, St.Leon-Rot) und γ -³²P-ATP unter den vom Hersteller vorgeschlagenen Reaktionsbedingungen. Nicht

eingebaute freie Nukleotide wurden nach jeder Markierung durch Gelfiltration über *MicroSpin™ G-25 Columns* (Amersham Pharmacia, Freiburg) abgetrennt.

Um die Effizienz der radioaktiven Markierung sowie die verfügbare Menge an markierter Sonde zu bestimmen, wurde je 1 µl des gereinigten Markierungsansatzes in Scintillationsröhrchen, die mit 2,5 ml Scintillationscocktail (Rotiscint®, Roth, Karlsruhe) gefüllt waren, pipettiert. Die Radioaktivität wurde in einem Scintillationszähler (WinSpetal™ 1414 Liquid Scintillation Counter der Firma Wallac) bestimmt.

2.5.7 Datenbankrecherchen

Für den Sequenzvergleich von Promotoren mit bekannten *cis*-Elementen aus Pflanzen wurde die im Internet freizugängliche PLACE Datenbank (www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/) verwendet. Für weitere Sequenzvergleiche wurde entweder die Datenbank BLAST, TBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) oder die Gersten EST Datenbank (http://pgrc.ipk-gatersleben.de/blast/blast_server.php) genutzt. Sequenzvergleiche wurden entweder mit der Software Dnasis for Windows v 2,5 (Hitachi Software Engineering) oder dem *BCM Search Launcher* (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/Options/clustalw.html>) durchgeführt.

2.6 Gelelektrophorese von Proteinen und Nukleinsäuren

2.6.1 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Desoxyribonukleinsäuren (DNA) und Ribonukleinsäuren (RNA) wurden zu analytischen oder präparativen Zwecken gelelektrophoretisch in Agarose- (DNA), bzw. Formaldehyd-enthaltenden Agarosegelen (RNA) nach den von Sambrook *et al.* (1989) beschriebenen Methoden aufgetrennt.

2.6.2 Native Gelelektrophorese von Protein-DNA-Komplexen

10 x Elektrophoresepuffer:

Tris/HCl	70 mM, pH 7,5
Natriumacetat	30 mM
EDTA	10 mM

5% natives Polyacrylamid-Gel:

<i>Aqua bidest</i>	36,5 ml
Polyacrylamid Lösung (30,8%)	8,1 ml
10x Elektrophoresepuffer	5 ml
APS	300 µl
TEMED	100 µl

10 x Beladungspuffer:

Tris/HCl	250 mM, pH 7,5
Bromphenolblau	0,2% (w/v)
Glycerin	40% (v/v)

Für die native Elektrophorese von Proteinen, DNA und Protein-DNA-Komplexen wurden 5% (w/v) Acrylamidgele mit den oben genannten Chemikalien hergestellt. Es wurden Gele der Größe 160x190x1 mm (Biometra, Göttingen) verwendet. Die Proben wurden mit 0,1 Vol. 10 x Beladungspuffer versehen und in die Geltaschen pipettiert. Die Gelelektrophorese erfolgte mit einfach konzentriertem Elektrophoresepuffer bei 4°C und 180 V für 2 h.

2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte in einem 12% (w/v) igen SDS-Polyacrylamidgel nach der Methode von Laemmli (1970). Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 0,2 Vol. fünffach konzentriertem Auftragspuffer Proteinprobenpuffer (250 mM Tris/HCl pH 6,8, 50% Glycerin, 10% SDS, 50 mM DTT, 0,1% Bromphenolblau) versetzt. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 95°C erhitzt. Standardmäßig fanden Gele der Größe 160x190 mm mit einer Schichtdicke von 1 mm

(Biometra, Göttingen) Anwendung. Davon abweichend wurden aber auch Minigelte (Biometra, Göttingen) gleicher Schichtdicke und einer Größe von 80x80 mm verwendet. Je nach Gelgröße erfolgte die Auftrennung der Proteine bei 25 mA oder bei 50 mA.

2.6.4 Färbung von geelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen im SDS-Gel

Die Färbung von SDS-haltigen Acrylamidgelen erfolgte entweder mit dem Farbstoff Coomassie oder mit einer viel empfindlicheren Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987). Für die Coomassie Färbung werden die Acrylamidgele nach der Elektrophorese in eine Lösung, die 0,0025% (w/v) Coomassie Brillant Blue R250, 10 % (v/v) Essigsäure und 40% (v/v) Methanol enthielt, über Nacht gelegt. Die Entfärbung erfolgte durch eine Lösung, die 10% Essigsäure und 40% Methanol enthielt.

2.6.5 Trocknen von Proteingelen

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

Native Proteingele wurden auf Whatman Papier (Biometra, Göttingen) überführt und in einer Geltrocknungsapparatur für 1h und 75°C getrocknet.

2.6.6 Molekulargewichtsmarker für die Elektrophorese

Als Längengewichtsmarker für DNA-Fragmente wurde der 1kb DNA *Gene Ruler* der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Fragmenten erfolgte mit dem Smart Ladder der Firma Eurogentec (Köln).

Für die Größenbestimmung von Proteinen wurde der 10-160 kDa *prestained* Protein Marker der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) eingesetzt.

2.7 Kapillartransfer von RNA auf Nylonmembranen (*Northern Blot*) und Hybridisierung mit spezifischen DNA-Sonden

20 x SSC Puffer:

1,5 M NaCl

150 mM Natriumcitrat

Dextransulfatpuffer

Dextransulfat 5 % (w/v)

NaCl 0,75 mM

SDS 1 % (v/v)

40 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA

RNA wurde aus Agarosegelen mit Hilfe von Standardprotokollen durch Kapillartransfer (Southern 1975) in Gegenwart von 20 x SSC Puffer auf positiv geladene Nylonmembranen (Hybond N⁺, Amersham Pharmacia) übertragen. Die Fixierung der RNA auf der Membran erfolgte durch „Backen“ der Membran für 30 min bei 80°C. Die auf der Nylonmembran immobilisierten Ribonukleinsäuren wurden zur Prüfung des Kapillartransfers der RNA durch Färbung mit Methyleneblau (0,04% (w/v) in 0,5 M Natriumacetat pH 5,2) sichtbar gemacht. Die angefärbten Membranen wurden mit einer Videodokumentationsanlage (Multimage™ Light Cabinet, Alpha Innotech Corporation über Biozym, Hess. Oldendorf) abgebildet.

Die Hybridisierung von Membranen, auf die verschiedene RNA Proben immobilisiert wurden, erfolgte nach Kleber-Janke & Krupinska (1997) in Dextransulfatpuffer bei 65 - 68°C über Nacht. Im allgemeinen werden 500.000 cpm der Sonden pro ml Hybridisierungslösung eingesetzt. Nach der Hybridisierung werden die Membranen zweimal je 10 min in 2 × SSC, 0.1 % (v/v) SDS, einmal 15 min in 1 × SSC, 0.1 % (v/v) SDS und einmal 10 min in 0,1 × SSC, 0.1 % (v/v) SDS gewaschen. Der dritte Waschschrift erfolgt bei Raumtemperatur, alle anderen bei der jeweiligen Hybridisierungstemperatur. Nach dem Waschen werden die Membranen in Frischhaltefolie eingeschlagen und in einer Autoradiographiekassette mit ein bis zwei Verstärkerfolien (Trimax Regular 16, Imation, Rochester, NY, USA) bei -80°C auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm MP, Amersham Pharmacia, Braunschweig) für 3-14 Tage exponiert.

2.8 Biolistische Transformation

MS-Platten:

MS Medium (Duchefa, Haarlem, Niederlande)	4,4 g/l
Saccharose	30 g/l pH 5,8
Agar	0,8% (w/v)

Zur transienten Transformation von Primärblättern fand eine *particle gun* (PDS-1000 *He biolistic particle delivery system*) der Firma BioRad (München) Verwendung. Hierfür wurden die Proben im allgemeinen folgendermaßen vorbereitet: 2 mg 0,3-3 µm kolloidales Gold der Firma Chempur (Karlsruhe), das zuvor dreimal in reinem Ethanol gewaschen wird, wird in 50 µl *Aqua bidest* aufgenommen, resuspendiert und auf Eis gestellt. Zu 50 µl dieses Goldes werden 50 µl eisgekühltes 2,5 M Calcimchlorid, 20 µl 0,1 M Spermidin, sowie 5 µg der zu transformierenden Plasmid DNA gegeben. Dieser Ansatz wird im weiteren für mindestens 30 s unter Zuhilfenahme eines „Vortex“ Gerätes gemischt. Es folgt die Zentrifugation von 30 s bei 3000 UpM (Eppendorf Zentrifuge 5804 R mit Rotor FA 45-30-11). Der Überstand wird abgenommen und verworfen, das Goldpellet wird in 50 µl eisgekühltem Ethanol aufgenommen und resuspendiert. Es folgt eine erneute Zentrifugation von 30 s bei 3000 UpM. Der Überstand wird erneut verworfen und das Pellet wird wieder in 50 µl eisgekühltem Ethanol aufgenommen. Jeweils 8 µl der Goldsuspension werden dann auf Folien der Makrocarrierhalter der Firma BioRad (München) pipettiert. Nachdem das Ethanol verdunstet ist, wird ein Makrocarrierhalter zusammen mit einem Stoppnetz in die oberste Schiene der PDS-1000 Anlage eingesetzt. Die zu transformierenden Primärblätter werden in die Mitte auf MS-Platten gelegt und diese auf die zweite Schiene der PDS-1000 Anlage überführt. Zum Beschuss der Primärblätter wird ein Vakuum von 27 Quecksilber-Einheiten der Kammer der PDS-1000 Anlage angelegt. Die Transformation erfolgt mit einem Druck von 1550 psi. Die beschossenen Primärblätter werden für weitere 1 bis 2 Tage auf den MS-Platten unter den Bedingungen, unter denen die Pflanzen in der Klimakammer angezogen wurden, inkubiert.

2.9 *Primer-Extension-Analyse*

Primer-Extension-Analysen wurden mit 10 µg mRNA, die aus mit Abscisinsäure behandelten Primärblättern der Gerste stammte, durchgeführt. In den Reaktionsansatz wurde neben 10 µg mRNA, in einem Volumen von 10 µl, 2 pmol des jeweiligen Oligonukleotids (siehe 2.4) und der entsprechende Puffer der Superscript IITM Reverse Transcriptase gegeben.

Der Reaktionsansatz wurde für 2 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf 50°C abgekühlt. Die Synthese der komplementären cDNA erfolgte bei 50°C für eine Stunde nach Zugabe von 200 units der Superscript IITM Reverse Transcriptase, 5 mM dNTP sowie weiterem Enzympuffer in einem Endvolumen von 50 µl in einem Primus 96 Plus PCR-Gerät (MWG Biotech, Ebersberg). Die Reaktion wurde beendet, indem die Proben 3 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt wurden. Die im Reaktionsansatz noch vorhandene RNA wurde durch Zugabe von 10 ng Rnase A verdaut. Es folgte wie in 2.5.5 beschrieben die Fällung der *Primer Extension* Produkte. Das Präzipitat wurde in 5 µl Puffer (95% Formamid, 0,5 mM EDTA, 0,025% SDS, 0,025% Xylencyanol, 0,025% Bromphenolblau) aufgenommen. Im weiteren wurden Sequenzreaktionen mit den in der *Primer-Extension*-Reaktion eingesetzten Oligonukleotiden durchgeführt (2.5.3). Die Sequenzreaktion und jeweils 1,5 µl der *Primer Extension* Reaktion wurden auf ein Sequenzgel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht auf einem Licor DNA Sequenzierer (Model 4000 L, MWG Biotech AG, Ebersberg).

2.10 Gelretardierungsexperimente

2.10.1 Isolierung von Kernproteinen

Kernisolierungspuffer:

Hexylenglycol	1 M
PIPES/KOH	10 mM, pH 7,0
MgCl ₂	10 mM
Triton X-100	0,2% (v/v)
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	0,8 mM

Kernwaschpuffer:

Hexylenglycol	0,5 M
PIPES/KOH	10 mM, pH 7,0
MgCl ₂	10 mM
Triton X-100	0,2% (v/v)
Mercaptoethanol	5 mM
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	0,8 mM

Kernlysispuffer:

KCl	110 mM
Hepes/KOH	15 mM pH 7,5
MgCl ₂	5 mM
DTT (Dithiothreitol)	1 mM
Antipain	5 µg/ml
Leupeptin	5 µg/ml

Kernextraktionspuffer:

KCl	70 mM
Hepes/KOH	25 mM, pH 7,5
EDTA	0,1 mM
Glycerol	20 % (v/v)
DTT	1 mM
Antipain	5 µg/ml
Leupeptin	5 µg/ml

Dialysepuffer:

KCl	70 mM
Hepes/KOH	25 mM, pH 7,5
EDTA	0,1 mM
Glycerol	20 % (v/v)
Mercaptoethanol	1 mM

Kernproteine wurden aus Primärblättern der Gerste, die in der Klimakammer angezogen wurden (2.2.1), nach einer leicht modifizierten Methode nach Foster *et al.*

(1992) isoliert. Sämtliche Schritte wurden dabei im Kühllabor bei 4°C oder auf Eis durchgeführt.

In der Regel nimmt man dazu 150 g Primärblätter der Gerste, die mit 700 ml Kernisolierungspuffer in einem *Waring Industrial Blendor* durch zwei Impulse von ca. 10 s auf der höchsten und zwei Impulsen auf der niedrigsten Leistungsstufe homogenisiert werden. Grobe Zellbestandteile werden durch Filtration durch Nylonnetze mit einer Maschenweite von 250 µm abgetrennt. Anschließend folgt eine weitere Filtration durch kleinmaschigere (41 µm) Nylonnetze. Das Filtrat wird auf 250 ml Zentrifugenbecher der Firma Nalgene (Rochester, NY, USA) verteilt und in einer Zentrifuge (Kontron Centrikon T-124 mit Rotor A6.14) bei 2000 UpM und 4°C 10 min sedimentiert. Der Überstand wird verworfen, das vorwiegend aus Zellkernen bestehende Präzipitat ist vorsichtig in 25 ml Kernwaschpuffer aufzunehmen. Es folgt eine weitere Zentrifugation der Zellkerne bei 3000 UpM und 4°C 5 min in einer Eppendorf Zentrifuge 5804R (Rotor F34-6-38). Der Überstand wird erneut verworfen, das Präzipitat wird 5 min auf der Laborbank getrocknet, bevor es vorsichtig in 1-2 ml Kernlysispuffer aufgenommen wird. Es folgt eine Proteinbestimmung nach Lowry *et al.* (1951) (BioRad, München) mit den lysierten Zellkernen. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wird die Lösung mit Kernlysispuffer soweit verdünnt, dass eine Endkonzentration von 5 mg/ml vorliegt. Über einen Zeitraum von 30 min werden dann tropfenweise 4 M Ammoniumsulfatlösung zu der Proteinlösung gegeben. Das Volumen der zugegebenen Ammoniumsulfatlösung soll dabei ein Zehntel Volumen der Proteinlösung betragen. Die durch die Zugabe von Ammoniumsulfat präzipitierten Proteine werden durch 90-minütige Zentrifugation bei 24000 UpM in einer Ultrazentrifuge sedimentiert (Kontron Centrikon T-1065, Rotor TST 28.38). Nach der Zentrifugation erfolgt eine erneute Bestimmung des Proteingehalts des Überstandes. Durch Zugabe von Kernlysispuffer soll eine Proteinkonzentration von 0,5 bis 1 mg/ml eingestellt werden. Festes, im Mörser fein pulverisiertes Ammoniumsulfat wird unter ständigem Rühren bis zu einer Endkonzentration von 0,25 mg/ml zum Überstand gegeben. Diese Lösung wird in einer Eppendorf Zentrifuge 5804R (Rotor F34-6-38) bei 10000 UpM 15min und 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet mit den Kernproteinen wird durch Zugabe von 500 µl Extraktionspuffer vorsichtig resuspendiert. Die Kernproteine werden zur Entsalzung 4 h bei 4°C in einem Liter Dialysepuffer entsalzt, wobei jede Stunde der Puffer erneuert wird. Nach der Dialyse können die Kernproteine sofort in einen Bindeassay (2.10.2) eingesetzt werden oder bei -80°C eingefroren werden.

2.10.2 DNA-Protein-Binderaktion

Um doppelsträngige DNA für die Bindereaktion mit Kernproteinen herzustellen, wurden äquimolare Mengen (20 pmol) an Oligonukleotiden miteinander hybridisiert. Dies erfolgte durch eine 5 min Denaturierung bei 95°C und ein anschließendes Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur. Die hierfür verwendeten Oligonukleotide sind in Kapitel 2.4 in Tabelle 4 aufgeführt.

Der Bindereaktionsansatz enthielt 60 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 10 % Glycerin (v/v), 0,2% Nonidet-40 (v/v), 1 µg poly (dI-dC), 100 mM EDTA, 50 mM DTT, 15 µg Kernproteine und 3 ng der mit γ -³²P-ATP markierten DNA. Der Reaktionsansatz wurde zwei Stunden auf Eis gestellt. Anschließend wurde eine native Gelelektrophorese durchgeführt (siehe 2.6.2).

2.11 Isolierung und Identifikation von DNA-Bindeproteinen

2.11.1 Isolierung von DNA-Bindeproteinen

Bindungspuffer:

Tris/HCl	10 mM, pH 7.5
NaCl	50 mM
DTT	0,5 mM

PBS-Puffer:

Tris/HCl	50 mM, pH 6,8
DTT	10 mM
Glycerin	10% (v/v)
SDS	2% (v/v)
Bromphenolblau	0,02 % (w/v)

Die Isolierung von DNA-Bindeproteinen erfolgte mit Hilfe einer in der Literatur in dieser Form bisher noch nicht beschriebenen Form der Affinitätschromatographie. Die Versuchsdurchführung ist im folgenden beschrieben.

Zur Identifikation von Transkriptionsfaktoren wurden Oligonukleotide (W II kodierend und M1 kodierend, siehe 2.4, Tab 4.), die den Bereich der untersuchten Promotor-DNA repräsentieren, an ihrem 5' Enden biotinyliert. Die biotinylierten Oligonukleotide wurden dann jeweils mit dem entsprechenden Gegenstrang hybridisiert (2.10.2).

Der Doppelstrang aus Oligonukleotiden wurde im weiteren an mit Streptavidin markierten Magnetkugeln (Promega, Heidelberg) gekoppelt. Pro Kopplungsreaktion wurden 10^7 Magnetkugeln in einem Volumen von 50 μ l eingesetzt. Hierfür wurden die Magnetkugeln dreimal mit Bindungspuffer gewaschen. Der Bindungspuffer wurde jeweils unter Verwendung eines Magnetständers entfernt. Während die Magnetkugeln magnetisch angezogen wurden, konnte der Puffer abpipettiert werden. Um eine optimale Kopplung zwischen Magnetkugeln und biotinylierten Oligonukleotiden zu erhalten, wurden in Vorversuchen die Oligonukleotide mit γ - 32 P-ATP radioaktiv markiert und der Einbau bestimmt (siehe 2.5.6). Unter der Annahme, dass die Markierungseffizienz bei 50-70% lag, wurden in einer Konzentrationsreihe von etwa 0,2-20 pmol radioaktiv markierte Oligonukleotide zu 50 μ l Magnetkugeln gegeben. Die Bindung der Magnetkugelsuspension und der Oligonukleotide erfolgte über Nacht auf einem Überkopfschüttler REAX2 der Firma Heidolph (Schwabach). Am nächsten Tag wurden der Bindeansatz auf einen Magnetständer gestellt und der Überstand abpipettiert. Die verbliebenden Magnetkugeln, an die ein Teil der Oligonukleotide gebunden hatte, wurde in 50 μ l Bindungspuffer resuspendiert. Sowohl vom Überstand, als auch von den resuspendierten Magnetkugeln, wurde die Radioaktivität bestimmt. Es zeigte sich, dass die Menge der an die Magnetkugeln gebundenen Oligonukleotide bei einer Konzentration von 2 pmol am größten und deutlich höher als im Überstand war. Daher wurde in allen weiteren Kopplungsansätzen eine Konzentration von 2 pmol Oligonukleotiden und 10^7 Magnetkugeln eingesetzt. Die durch die Kopplung der Oligonukleotide an die Magnetkugeln entstandene DNA-Matrix wurde nach der Kopplungsreaktion mit Bindungspuffer erneut dreimal gewaschen und in 50 μ l Bindungspuffer aufgenommen. Zu dieser Matrix wurden nun 450 μ g Kernproteine sowie Salze und Detergenzien, die denen des Bindeassays entsprechen (vgl. 2.10.2), gegeben. Das Endvolumen betrug nun 400 μ l. Analog zum Bindeassay der Gelretardierungsexperimente erfolgte die Bindereaktion auch hier innerhalb von 2 h bei 4°C. Anschließend wurden die Magnetkugeln dreimal für jeweils 15 min mit Bindungspuffer auf einem Überkopfschüttler REAX2 der Firma Heidolph (Schwabach) gewaschen. Die Elution der an die DNA-Matrix gebundenen Proteine erfolgte durch

Zugabe von 10 µl PBS-Puffer und 5 minütiges Erwärmen auf 65°C. Die eluierten Proteine wurden auf einem 12% igen (w/v) denaturierenden SDS-haltigen Acrylamidgel aufgetrennt (2.6.3).

Um größere Mengen von Proteinen für die spätere Identifikation der gebundenen Proteine zu erhalten, wurde dieser Reaktionsansatz 30 mal wiederholt. Die eluierten Proteine wurden dann gefällt (2.5.5), auf einem 12% igen (w/v) SDS-haltigen Acrylamidgel aufgetrennt (2.6.3) und mit Coomassie (2.6.4) angefärbt.

2.11.2 Identifikation

Zur Identifikation eines an die DNA-bindenden Proteins wurde die entsprechende Coomassie anfärbbare Bande mit Hilfe eines Skapells aus dem SDS-haltigen Acrylamidgel ausgeschnitten. Die Aufbereitung und Identifizierung des Proteins erfolgte nach einer von Shevchenko *et al.* (1996) modifizierten Methode.

Das ausgeschnittene Gelstück wurde mit 10 mM DTT (w/v), das in 100 mM NH_4HCO_3 (w/v) gelöst wurde, gegeben. Das Protein wurde in der zugegebenen Lösung für eine Stunde bei 56°C reduziert. Nachdem die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde die DTT-Lösung gegen das gleiche Volumen einer 55 mM Jodacetamidlösung (Lösungsmittel 100 mM NH_4HCO_3) (w/v), ausgetauscht. Nach 45 min Inkubation im Dunklen erfolgte ein Trypsinverdau des Proteins. Hierfür wurde das Protein in 5 ng/µl Trypsin (Promega, Heidelberg), das in einer 50 mM NH_4HCO_3 Lösung suspendiert wurde, 7 h bei 37°C verdaut. Nach dem Verdau wurden die Peptide durch zweimaliges Waschen mit 50% Acetonitril (v/v)/5% Ameisensäure (v/v) aus dem Gelstück extrahiert. Das Lösungsmittel aus dem Überstand wurde anschließend in einem Vakuumtrockner verdampft. Der Rückstand wurde in 5% Ameisensäure (v/v) resuspendiert und in einer C18µ Zip Tip Säule der Firma Millipore (Eschborn) entsalzt. Aus dieser Säule wurden die Peptide mit 1 µl eines Gemisches aus 60% Methanol (v/v) und 5% Ameisensäure (v/v) in Wasser eluiert. Die Identifizierung der Peptide erfolgte durch eine Nano-Elektrospray-Massenspektroskopie (Nano-ESI-MS/MS). Dabei können im wesentlichen vier Schritte unterschieden werden: 1. Nano-Elektrospray-Ionisierung, 2. erste Massenspektroskopie, 3. Fragmentierung, 4. zweite Massenspektroskopie. Für die Nano-Elektrospray-Ionisierung werden die zu analysierenden Peptide mittels einer Kapillarströmung, die aus Stickstoff und der Peptidlösung besteht, in einem elektrischen Feld desolvatisiert und ionisiert. Die sich daran anschließende

Massenanalyse der Ionen mit einem Quadrupolmassenspektrometer (QTOF II Instruments der Firma Micromass, Manchester, England) erfolgt durch Ausschluss von Ionen, die nicht stabil oszillieren können. Damit werden alle Ionen zurückgehalten, die nicht in dem Massenbereich der zu identifizierenden Probe liegen. Bei der dann folgenden Fragmentierung werden die Ionen in einer Kollisionskammer durch Zusammenstoß mit Gasmolekülen gespalten. In der zweiten Massenspektroskopie erfolgt die Detektion der ionisierten Peptidfragmente mittels einer Faradayplatte und einem Elektronenvervielfacher. Das dabei gewonnene Massenspektrum wird in einer ersten Datenbankanalyse auf Übereinstimmung mit bekannten Aminosäuresequenzmustern überprüft. Durch diese Datenbankanalyse können sowohl die Anzahl der Aminosäuren als auch eine mögliche Abfolge des Peptids bestimmt werden. Mit einer Teilsequenz aus 5-6 Aminosäuren des identifizierten Peptids wird dann in einer zweiten Datenbankanalyse nach Homologien zu bereits bekannten Proteinen gesucht. Findet sich ein Protein in der Datenbank mit guter Übereinstimmung zu dieser Teilsequenz (siehe 2.5.7) werden dann weitere Peptide des tryptischen Verdaus mittels der oben beschriebenen Nano-Elektrospray-Massenspektroskopie analysiert. Können dann auch in anderen Teilsequenzen dieser Proben Homologien zu dem bekannten Protein gefunden werden, kann davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um dieses Protein handelt.

2.12 Mikroskopische Methoden

2.12.1 Lichtmikroskopie

Die Lichtmikroskopie wurde entweder mit einem Axiophot Mikroskop der Firma Zeiss (Göttingen) oder einem konfokalen-Laser-Raster-Mikroskop (CLSM) TCS SP1 der Firma Leica (Bensheim) durchgeführt.

Zur Visualisierung der Fluoreszenz des GFP und des Chlorophylls mit Hilfe des Axiophot Mikroskopes wurde die UV-Lampe des Gerätes und der Originalfilterblock 487909 der Firma Zeiss (Göttingen) verwendet. Bei dem verwendeten Filter wird die Probe mit Licht der Wellenlängen 450-490 nm angeregt, die emittierte Fluoreszenz der Probe wird in einem Spektralbereich größer als 515 nm detektiert. Die Bildaufnahme

erfolgte mit einer Sony 3 CCD Iris Kamera. Die Bildakquisition erfolgte mit der Image Access Software.

Im konfokalen-Laser-Raster-Mikroskop (CLSM) erfolgte die Anregung des GFP mit Licht der Wellenlänge von 488 nm (Argonlaser), die Detektion wurde im Spektralbereich von 520-590 nm durchgeführt. Das Chlorophyll wurde mit Licht der Wellenlänge von 633 nm angeregt und die Fluoreszenz in einem Wellenlängenbereich von 640-670 nm detektiert. Die Bildaufnahme wurde mit der Leica TCS Software durchgeführt.

2.12.2 Elektronenmikroskopie

2.12.2.1 Hochdruckgefrieren

Von Primärblättern der Gerste wurden mit einer Einwegstanze 2 cm unterhalb der Blattspitze 2 mm Stanzlinge mit Hilfe einer *Punch Biopsie* (Stiefel, Offenbach) gestanzt. Die Stanzlinge wurden vorsichtig mit einer Pinzette aus der Stanze herausgezogen und in ein Gemisch aus 8% Methanol/Leitungswasser (v/v) überführt. Es folgte eine 10 minütige Evakuierung der Stanzlinge bei 80 mbar, um die Interzellularräume mit Flüssigkeit zu füllen. Der Austausch von Luft gegen diese Flüssigkeit ist eine essentielle Voraussetzung für das Hochdruckgefrieren der Proben. Die Stanzlinge wurden im folgenden in einen mit 1-Hexadecen gefüllten Aluminiumträger überführt und dieser mit einem zweiten Aluminiumträger verschlossen. Die Aluminiumträger mit den Stanzlingen wurden nun in den Probenhalter der Hochdruckgefriermaschine (HPM 010, Bal-Tec, Balzers Liechtenstein) eingesetzt und eingefroren (Tiedemann *et al.* 1998).

2.12.2.2 Gefriersubstitution

Die anschließende Tieftemperaturentwässerung erfolgte in der Gefriersubstitutionsanlage EM AFS der Firma Leica (Bensheim). Die gefrorenen Proben wurden von überschüssigem 1-Hexadecen befreit und anschließend in bis auf -90°C vorgekühltes Aceton in 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Das verwendete Aceton wurde zuvor bei Raumtemperatur mit Uranylacetat gesättigt. Die eingefrorenen Stanzlinge wurden nun in der Gefriersubstitutionsanlage 24 h bei -90°C , 6 h bei -70°C und 6 h bei -50°C entwässert (Pfeiffer *et al.* 2000).

Anschließend erfolgte die Infiltration des Gewebes mit dem Lowicryl HM20. Der Austausch des Acetons gegen das HM20 erfolgte stufenweise nach den Angaben in der folgenden Tabelle:

Tab. 6: Einbettung der Proben in HM20; nach den angegebenen Inkubationszeiten wurde jeweils das HM20 in den Proben gewechselt. Alle Schritten wurden bei -50°C ausgeführt.

Inkubationszeiten	Verdünnungen
2 h	30% HM 20 in 70% Aceton
2 h	70% HM 20 in 30% Aceton
Über Nacht	Reines HM 20
1 h	Reines HM 20
1 h	Reines HM 20
1 h	Reines HM 20

Die Polymerisation der Proben erfolgte anschließend mit UV-Licht (265 nm) für 36 h bei -50°C und für 48 h bei Raumtemperatur (265 nm).

2.12.2.3 Ultradünnschnitte

Von den auspolymerisierten Proben wurden mit Hilfe des Ultramikrotomes UCT der Firma Leica (Bensheim) 50 nm Ultradünnschnitte angefertigt und mit Uranylacetat und Bleicitrat nach der Methode von Reynolds (1963) nachkontrastiert.

2.12.2.4 Immunmarkierung

2.12.2.4.1 Reinigung des Antiserums

Für die Affinitätsreinigung des HvS40-Antikörpers wurde das SulfoLink[®] Kit der Firma PIERCE (Rockford, USA) verwendet. Die Reinigung des Antikörpers beruht darauf, dass das Antigen über freie Sulfhydrylgruppen an Iodacetylgruppen der verwendeten Säule gebunden wird. Die entstandene Affinitätssäule wird mit dem Antikörper inkubiert. Durch die hohe Bindungsaffinität zwischen Antikörper und Antigen erfolgt die Bindung des Antigens an den Antikörper. Die neben dem Antikörper enthaltenen Proteine des

Serums werden von der Säule nicht gebunden und passieren diese somit. Durch Zugabe eines sauren Puffers wird die Antigen/Antikörper Bindung zerstört und der Antikörper von der Säule eluiert. Nach der Elution wird der Antikörper durch Zugabe eines Puffers wieder neutralisiert.

Für die durchgeführte Reinigung des Antikörpers wurden ca. 1 mg aufgereinigtes HvS40 Protein und 1,5 ml des Kaninchenserums eingesetzt. Die Reinigung des HvS40-Antikörpers erfolgte nach Angaben des Herstellers (PIERCE, Rockford, USA).

2.12.2.4.2 Einfach- und Doppelmarkierung

Blockierungspuffer:

Rinderserumalbumin	5% (w/v)
Tris/HCl	0,2 M pH 7,4

Waschpuffer:

Tris/HCl	0,2 M pH 7,4
Triton X100	0,1% (v/v)

Primärer Antikörper 1:

Kaninchen, Anti-HvS40, gereinigt (2.12.2.4.1), 1:2 verdünnt mit Waschpuffer

Primärer Antikörper 2:

Maus Anti-DNA (Boehringer, Ingelheim), 1:50 verdünnt mit Waschpuffer

Sekundärer Antikörper 1:

Ziege Anti-Kaninchen IgG gekoppelt mit 10 nm kolloidalem Gold (British Bio Cell, Plano, Marburg)

Sekundärer Antikörper 2:

Ziege Anti-Maus IgG und IgM gekoppelt mit 15 nm kolloidalem Gold (British Bio Cell, Plano, Marburg)

Für die Immunmarkierung wurden nicht kontrastierte 50 nm Ultradünnschnitte verwendet. Die Immunmarkierung (Einfachmarkierung) des HvS40 Proteins erfolgte mit

dem primären Antikörper 1 und dem sekundären Antikörper 1. Entsprechend wurden für die Immunmarkierungen der DNA (Einfachmarkierung) mit dem primären Antikörper 2 und dem sekundären Antikörper 2 durchgeführt. Die Immunmarkierung der Ultradünnschnitte erfolgte nach folgendem tabellarischen Protokoll:

- 60 min Inkubation in Blockierungspuffer
- 6 x Waschen mit Waschpuffer
- 60 min Inkubation mit primären Antikörper 1 oder 2
- 6 x Waschen mit Waschpuffer
- 60 min Inkubation mit sekundärer Antikörper 1 oder 2
- 6 x Waschen mit Waschpuffer
- 10 mal spülen mit *Aqua bidest*

Für die Doppelmarkierung wurde anstelle des primären Antikörpers 1 bzw. 2 ein Gemisch aus beiden Antikörpern, mit einer Verdünnung von 1:2 für den Anti-HvS40- und von 1:50 für den Anti-DNA-Antikörper, verwendet. Ebenso wurden die beiden sekundären Antikörper, der Anti-Kaninchen und der Anti-Maus Antikörper gemischt. Im weiteren erfolgte die Doppelmarkierung des HvS40 Proteins und der DNA nach den oben beschriebenen Angaben.

2.12.2.5 Transmissions Elektronen Mikroskopie (TEM)

Die Untersuchung der Ultradünnschnitte erfolgte in einem Transmissions Elektronen Mikroskop (TEM) 208 S der Firma Philipps (Kassel) mit einer Beschleunigungsspannung von 80 kV. Die Bildakquisition und -dokumentation erfolgte mit einer *Mega View* CCD Kamera der Firma SIS (Soft Imaging System, Münster).

3. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit verfolgt das Ziel, einen Transkriptionsfaktor zu isolieren, der eine Funktion bei der Regulation der Blattseneszenz der Gerste hat. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden für die durchzuführenden Untersuchungen zwei Seneszenzgene der Gerste, das *hpd* und *HvS40* Gen, ausgewählt.

Das erste Kapitel zeigt verschiedene Untersuchungen zur Expression des *hpd* und *HvS40* Gens. Von diesen Analysen werden wichtige Hinweise auf die im Anschluss an diese Arbeiten durchgeführten Promotoranalysen erwartet. Die Ergebnisse der Promotoranalysen, die das Ziel verfolgen, ein in Abhängigkeit der Seneszenz reguliertes *cis*-Element zu isolieren, sind im zweiten Kapitel dargestellt. Diese Untersuchungen sollen die Voraussetzungen schaffen, einen Transkriptionsfaktor zu isolieren, der spezifisch während der Seneszenz an das identifizierte *cis*-Element bindet oder sich davon löst. Ergebnisse zu diesen Analysen sind im dritten Kapitel gezeigt. Um Hinweise auf die mögliche Funktion des *HvS40* Proteins zu erhalten, werden im abschließenden vierten Kapitel Ergebnisse zur subzellulären Lokalisierung des *HvS40* Proteins in jungen und seneszierenden Primärblättern dargestellt.

3.1 Untersuchungen zur Expression der Gene *hpd* und *HvS40*

3.1.1 Die Wirkung von Phytohormonen auf die Expression der Gene *hpd* und *HvS40*

Erste Hinweise auf eine mögliche Regulation der Gene *hpd* und *HvS40* während der Blattseneszenz in Abhängigkeit von internen und externen Faktoren, werden von verschiedenen *Northern Blot* Analysen erwartet. Einen Schwerpunkt bilden dabei Untersuchungen zum Einfluss von Phytohormonen auf die Expression der Gene *hpd* und *HvS40*.

Die zur Klärung dieser Fragestellung durchgeführten Experimente sind alle auf einen im folgenden beschriebenen Versuchsaufbau zurückzuführen. In der Klimakammer wurde in einem standardisierten Tag-/Nachtrhythmus von 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit Saatgut der Gerste 7 Tage angezogen. Die Primärblätter dieser Pflanzen

wurden 2 cm oberhalb ihres Blattgrunds und der Blattspitze abgeschnitten und für 48 h im Dauerlicht auf Lösungen mit entsprechenden Phytohormonen gelegt. Als Kontrollen dienten Primärblätter, die für 48 h im Dauerlicht auf Leitungswasser gelegt wurden. Um zu klären, ob das Abschneiden der Primärblätter von den 7 Tage alten Keimlingen bereits einen Einfluss auf die Genexpression hat, wurden zusätzlich Primärblätter von Pflanzen untersucht, die ohne Abschneiden für weitere 48 h in einem Licht-/Dunkelrhythmus angezogen wurden.

3.1.1.1 *hpd* Gen

Es ist bekannt, dass die Phytohormone Abscisinsäure, Jasmonsäure und Ethylen sowie der Signalstoff Salicylsäure, der von manchen Autoren auch als Phytohormon verstanden wird, während der Seneszenz von Bedeutung sind, und dass sie bei Applikation Seneszenzsymptome, wie z.B. Chlorophyllabbau, induzieren können. Als Antagonisten zu diesen Hormonen wirken Kinetin, Indolelessigsäure und Gibberellinsäure, die einen verzögernden Charakter auf den Seneszenzbeginn haben. Abbildung 2 zeigt die Expressionsmuster des *hpd* Gens nach verschiedenen Phytohormonbehandlungen.

Die Phytohormone Methyljasmonat (MeJa) und Abscisinsäure (ABA) bewirken eine deutliche Erhöhung des Gehalts an *hpd* mRNA. Im weiteren ist auch zu erkennen, dass nach Behandlung mit Abscisinsäure der Transkriptgehalt mit fortschreitender Inkubationszeit zunimmt (Abb. 2). Das gasförmige Phytohormon Ethylen sollte durch Gabe seiner Vorstufe im Biosyntheseweg, Aminocyclopropancarboxylat (ACC), gebildet werden. Verglichen mit dem mRNA Gehalt von Primärblättern, die auf Leitungswasser lagen (Kontrolle 1), scheint sich die Transkriptmenge unter den gewählten Versuchsbedingungen kaum verändert zu haben. Auch Salicylsäure (SA) beeinflusst die mRNA Menge des *hpd* Gens nicht.

Die seneszenzverzögernden Phytohormone Kinetin und Indolelessigsäure (IES) erhöhen den Transkriptgehalt dagegen etwas. Nach Zugabe von Gibberellinsäure (GA₃) kann keine Veränderung des *hpd* Transkriptgehalts festgestellt werden. Eine leichte Zunahme der *hpd* Transkriptmenge kann auch beobachtet werden, wenn die Primärblätter abgeschnitten und zusätzlich durch vorsichtiges Reiben mit

Schmirgelpapier verwundet werden. Auch zeigt sich ein erhöhter mRNA Gehalt in den Primärblättern nach 48-stündiger Dunkelinkubation der untersuchten Pflanzen.

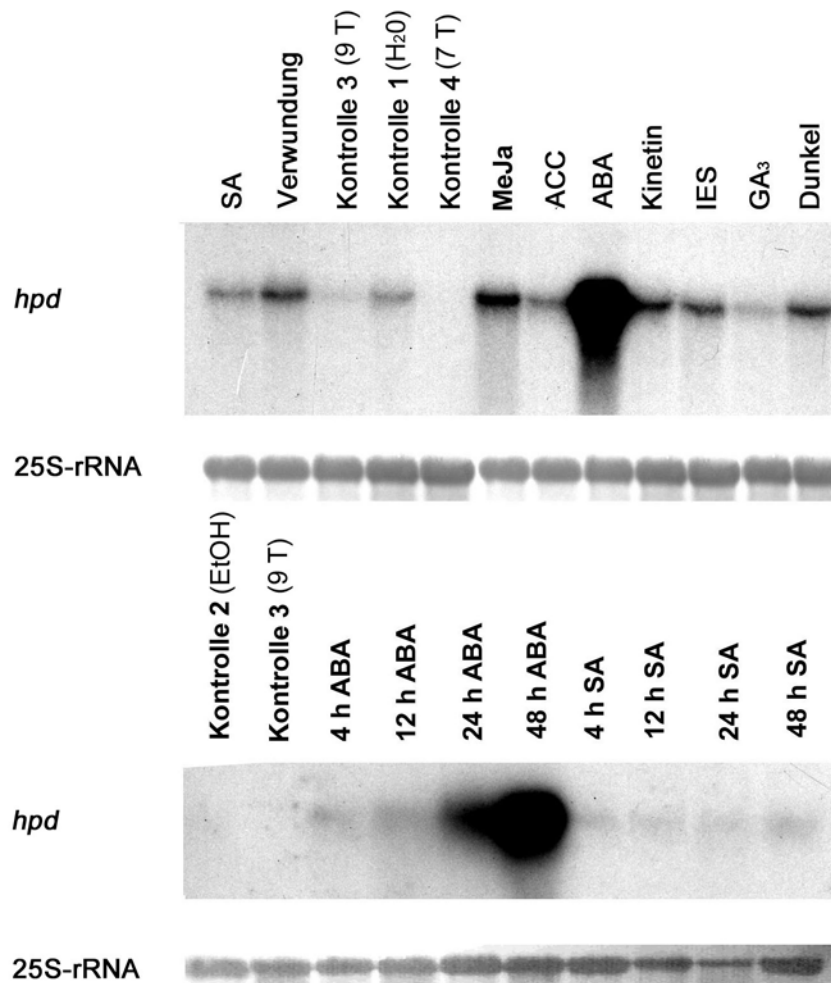


Abb. 2: Autoradiogramme von *Northern Blots* nach Hybridisierung der mit α -³²P-dCTP markierten *hpd* Sonde. Der Transkriptgehalt des *hpd* Gens wurde in Primärblättern der Gerste nach Inkubation mit seneszenzinduzierenden und –verzögernden Phytohormonen untersucht. Als Kontrollen diente RNA von Primärblättern, die auf Leitungswasser (Kontrolle 1) oder einer Ethanollösung (Kontrolle 2) lagen. Zudem wurde RNA aus Primärblättern 7 und 9 Tage alter Pflanzen (Kontrolle 4 und Kontrolle 3) untersucht. Alle analysierten Proben wurden nach einer Anzuchtperiode der Pflanzen für 7 Tage in einem Licht-/Dunkelrhythmus ins Dauerlicht gestellt. Zum Nachweis der RNA-Beladung ist die 25S-rRNA-Bande der aufgetrennten und auf eine Nylonmembran immobilisierten RNA nach Methylenblaufärbung abgebildet. Verwendete Abkürzungen: ABA: Abscisinsäure, MeJa: Methyljasmonat, SA: Salicylsäure, ACC: Aminocyclopropancarboxylat, IES: Indolessigsäure, GA₃ Gibberellinsäure.

3.1.1.2 *HvS40* Gen

Vor Beginn der hier dargestellten Analysen war bereits bekannt, dass der mRNA Gehalt des *HvS40* Gens in Primärblättern der Gerste nach Zugabe von Ethylen und Salicylsäure gesteigert werden kann (Haußühl 1999, Krupinska *et al.* 2002). In Ergänzung zu diesen Untersuchungen wurde deshalb hier nur die Veränderung des Transkriptgehalts des *HvS40* Gens nach Zugabe von Abscisinsäure und Methyljasmonat analysiert. Abbildung 3 zeigt, dass nach Behandlung mit Abscisinsäure und Methyljasmonat die Transkriptmenge des *HvS40* Gens gegenüber Primärblättern, die auf Leitungswasser und einer Ethanollösung lagen, erhöht ist. Im Vergleich zu Primärblättern, die mit Abscisinsäure oder Methyljasmonat behandelt wurden, enthalten Primärblätter, die nicht abgeschnitten wurden (9 Tage alte Pflanzen), deutlich weniger *HvS40* mRNA.

Im Gegensatz zu Methyljasmonat hat Abscisinsäure einen stärkeren Einfluss auf den mRNA Gehalt des *HvS40* Gens.

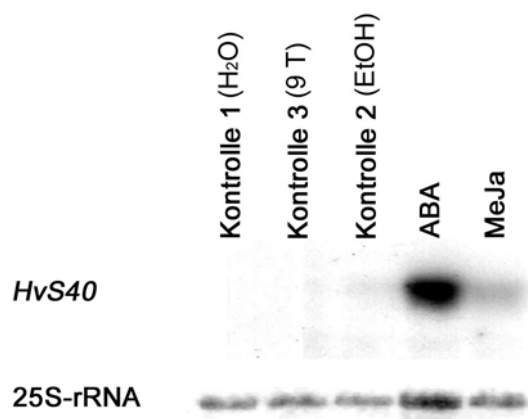


Abb. 3: Autoradiogramm eines *Northern Blots* nach Hybridisierung mit der durch α -³²P-dCTP markierten *HvS40* Sonde. Der Transkriptgehalt des *HvS40* Gens wurde in Primärblättern der Gerste nach Inkubation mit den Phytohormonen Abscisinsäure (ABA) und Methyljasmonat (MeJa) bestimmt. Als Referenz diente RNA aus Primärblättern, die auf Leitungswasser (Kontrolle 1) oder einer Ethanollösung (Kontrolle 2) lagen. Zudem wurde RNA aus Primärblättern 9 Tage alter Pflanzen untersucht (Kontrolle 3). Zum Nachweis der RNA-Beladung ist die 25S-rRNA-Bande der aufgetrennten und auf eine Nylonmembran immobilisierten RNA nach Methylenblaufärbung abgebildet.

Insgesamt zeigen die durchgeführten Hormonbehandlungen, dass es nach Gabe von Abscisinsäure und Methyljasmonat sowohl im Fall des *hpd* als auch des *HvS40* Gens zu einer verstärkten Transkriptakkumulation kommt, wobei Abscisinsäure bei beiden Genen einen größeren Einfluss auf den Transkriptgehalt hat.

3.1.2 Die Wirkung von oxidativem Stress auf die Expression der Gene *HvS40* und *hpd*

Zusätzlich zu den durchgeführten *Northern Blot* Analysen, mit denen die Expression der Gene *hpd* und *HvS40* nach verschiedenen Phytohormonbehandlungen untersucht wurden, sollte in weiteren Experimenten analysiert werden, ob oxidativer Stress einen Einfluss auf den Transkriptgehalt beider Gene haben könnte.

Oxidativer Stress tritt während der Seneszenz u.a. beim Abbau des photosynthetischen Apparates auf (Thompson *et al.* 1987, Dangl *et al.* 2000). Entsprechend sind einige während der Seneszenz auftretende Symptome der Pflanze auf das Vorhandensein reaktiver Sauerstoff Spezies (ROS) zurückzuführen. Es überrascht daher nicht, dass einige während der Seneszenz induzierten Gene durch ROS stimuliert werden können (Buchanan-Wollaston 1997).

Durch Induktion von oxidativen Stressbedingungen in Primärblättern 7 Tage alter Pflanzen der Gerste sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob die Gene *hpd* und *HvS40* auf diese Stressform reagieren. Die hierfür gewählten Bedingungen bei der Anzucht der Pflanzen und der Inkubation der Primärblätter mit verschiedenen Substanzen, die oxidativen Stress erzeugen, waren dabei mit den oben beschriebenen Bedingungen vergleichbar.

3.1.2.1 *hpd* Gen

Die 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD), die durch das *hpd* Gen kodiert wird, ist eines der Schlüsselenzyme in der Biosynthese von Vitamin E und Plastochinon. Da Vitamin E als lipophiles Antioxidans Biomembranen vor oxidativem Stress schützen kann, liegt die Vermutung nahe, dass ein erhöhter Transkriptgehalt des *hpd* Gens während der Seneszenz durch oxidativen Stress induziert werden könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Primärblätter der Gerste mit verschiedenen Substanzen, die oxidativen Stress erzeugen, behandelt. Eine dieser getesteten Substanzen ist 3-(3',4'-dichlorphenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU). DCMU blockiert die Q_B - Bindestelle des Photosystems II, so dass es bei Belichtung des Blattes zu einem Elektronenstau und zur Bildung von Singulett-Sauerstoff kommen kann.

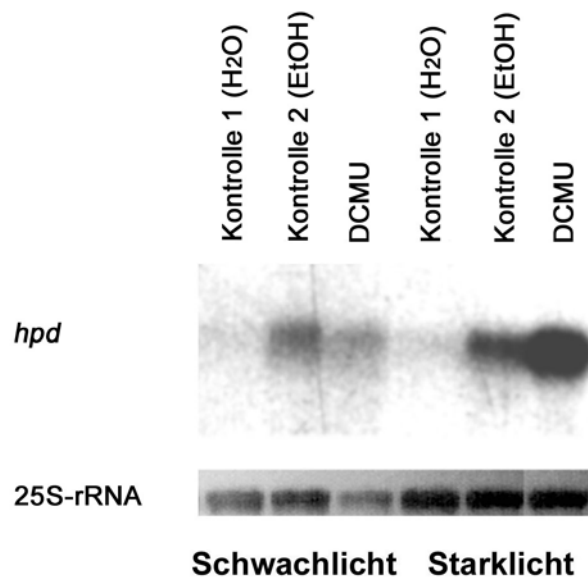


Abb. 4: Autoradiogramm eines *Northern Blots* nach Hybridisierung mit der durch α - 32 P-dCTP markierten *hpd* Sonde. Der Transkriptgehalt des *hpd* Gens wurde in Primärblättern der Gerste nach Inkubation mit DCMU unter Stark- und Schwachlichtbedingungen bestimmt. Als Referenz diente RNA aus Primärblättern, die anstelle des Herbizids auf Leitungswasser (Kontrolle 1) oder einer Ethanollösung (Kontrolle 2) inkubiert wurden. Zur Kontrolle zur Beladung des Gels ist die 25S-rRNA-Bande der aufgetrennten und auf eine Nylonmembran immobilisierten RNA nach Methylenblaufärbung abgebildet.

Bei Schwachlicht ($120 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) hat DCMU keinen Einfluss auf den *hpd* Transkriptgehalt (siehe Abb. 4). Zwar ist eine höhere Transkriptmenge im Vergleich zum Gehalt an *hpd* mRNA aus Primärblättern, die sich auf Leitungswasser befanden (Kontrolle 1) erkennbar, doch induziert die einprozentige Ethanollösung, die zur Lösung des DCMU verwendet wird, auch ohne Zugabe von DCMU eine Erhöhung des *hpd* Transkriptgehalts. Ein anderes Bild zeigt sich, wenn der gleiche Versuch im Starklicht durchgeführt wird. Hier ist eine deutliche Erhöhung des Transkriptgehalts durch DCMU zu erkennen (siehe Abb. 4).

Eine andere Form von oxidativem Stress kann im Primärblatt durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid erzeugt werden. Beim Zerfall von Wasserstoffperoxid werden verschiedene Sauerstoffradikale gebildet, die für die Zelle toxisch sind. Durch antioxidative Schutzsysteme der Zelle, zu denen auch Vitamin E gehört, können diese Sauerstoffradikale unschädlich gemacht werden (Mittler 2002). Abbildung 5 zeigt, dass

der Gehalt des *hpd* Transkripts nach zweitägiger Inkubation mit zunehmender Konzentration an Wasserstoffperoxid ansteigt. Der Transkriptgehalt ist am höchsten nach Inkubation mit 50 mM Wasserstoffperoxid.

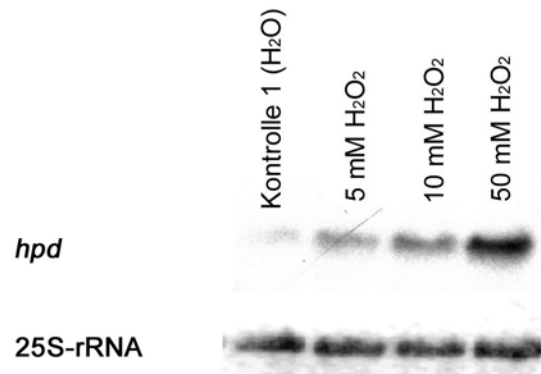


Abb. 5: Autoradiogramm eines *Northern Blots* nach Hybridisierung mit der durch α - 32 P-dCTP markierten *hpd* Sonde. Der Transkriptgehalt des *hpd* Gens wurde in Primärblättern der Gerste nach Inkubation mit verschiedenen Wasserstoffperoxidkonzentrationen bestimmt. Als Referenz diente RNA aus Primärblättern, die statt auf einer Wasserstoffperoxidlösung auf Leitungswasser inkubiert wurden (Kontrolle 1). Zur Kontrolle der Beladung des Gels ist die 25S-rRNA-Bande der aufgetrennten und auf eine Nylonmembran immobilisierten RNA nach Methylenblaufärbung abgebildet.

3.1.2.2 *HvS40* Gen

Transkripte des *HvS40* Gens akkumulieren nicht nur während der Seneszenz, sondern auch bei Pathogenbefall von Gerstenblättern (Krupinska *et al.* 2002). Beiden Prozessen gemeinsam ist u.a. die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob die durch Seneszenz und Pathogenbefall induzierte Expression des *HvS40* Gens durch oxidativen Stress induziert werden könnte, wurde der Transkriptgehalt des *HvS40* Gens nach Zugabe von Wasserstoffperoxid zu Primärblättern der Gerste untersucht. Abbildung 6 zeigt eine Zunahme des *HvS40* Transkriptes mit steigender Wasserstoffperoxidkonzentration. Der Transkriptgehalt des *HvS40* Gens ist am höchsten nach Inkubation der Primärblätter der Gerste für zwei Tage auf einer 50 mM Wasserstoffperoxidlösung.

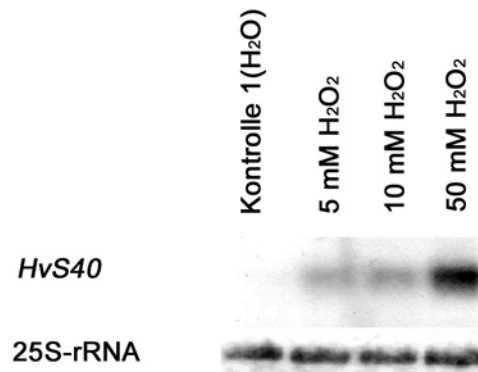


Abb. 6: Autoradiogramm eines *Northern Blots* nach Hybridisierung mit der durch α -³²P-dCTP markierten *HvS40* Sonde. Der Transkriptgehalt des *HvS40* Gens wurde in Primärblättern der Gerste nach Inkubation mit verschiedenen Wasserstoffperoxidkonzentrationen bestimmt. Als Referenz diente RNA aus Primärblättern, die statt auf einer Wasserstoffperoxidlösung auf Leitungswasser inkubiert wurden (Kontrolle 1). Zum Nachweis der RNA-Beladung ist die 25S-rRNA-Bande der aufgetrennten und auf eine Nylonmembran immobilisierten RNA nach Methylenblaufärbung abgebildet.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass sowohl der Transkriptgehalt des *hpd* als auch des *HvS40* Gens mit zunehmender Wasserstoffperoxidkonzentration ansteigt. Darüber hinaus kann im Fall des *hpd* Gens auch eine Transkriptakkumulation nach Inkubation mit DCMU im Starklicht festgestellt werden.

3.1.3 Lokalisation des *hpd* Transkripts in verschiedenen Geweben

Im Hinblick auf Promotoranalysen, die einen Schwerpunkt dieser Arbeit bilden, kann es hilfreich sein, die Lokalisation der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten SAGs *hpd* und *HvS40* zu kennen.

Da die Blattsenesenz im Mesophyllgewebe abläuft, kann man annehmen, dass die Gene, die einen erhöhten Transkriptgehalt während der Blattsenesenz zeigen (SAGs), in diesem Gewebe lokalisiert sind. Zudem ist aber auch denkbar, dass diese Gene auch in anderen Geweben der Pflanze exprimiert werden können. Dies ist besonders für solche Gene vorstellbar, die nicht nur während der Seneszenz transkribiert werden. In Vorarbeiten zu dieser Arbeit konnte durch *in situ*-Hybridisierungen gezeigt werden, dass das *HvS40* Gen der Gerste ausschließlich im Mesophyllgewebe des Gerstenprimärblattes lokalisiert ist (Krupinska *et al.* 2002).

Über das Vorkommen der *hpd* mRNA war hingegen nichts bekannt. Zur Lokalisation der *hpd* mRNA in verschiedenen Geweben der Gerste wurde nicht wie im Fall des *HvS40* Gens eine *in situ*-Hybridisierung durchgeführt, sondern eine *Northern Blot* Analyse. Hierfür wurde von Primärblättern 9 Tage alter Pflanzen die Epidermis abgezogen. Aus der Epidermis und dem verbleibenden Restgewebe, das zum größten Teil aus Mesophyllzellen bestand, wurde RNA isoliert. Zusätzlich wurde aus den Wurzeln dieser Pflanzen sowie aus Körnern und aus Primärblättern von etiolierten Keimlingen, die 9 Tage im Dunkeln angezogen waren, RNA extrahiert. Mit diesen verschiedenen RNA-Proben wurde eine *Northern Blot* Analyse durchgeführt. Das Ergebnis dieser *Northern Blot* Analyse ist in Abbildung 7 dargestellt.

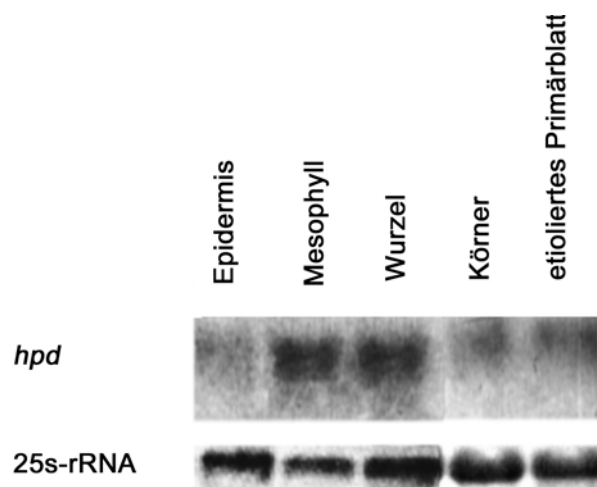


Abb. 7: Autoradiogramm eines *Northern Blots* nach Hybridisierung mit der durch α -³²P-dCTP markierten *hpd* Sonde. Der Transkriptgehalt des *hpd* Gens wurde in RNA aus Epidermiszellen, Mesophyllgewebe, Wurzeln, Körnern sowie aus Primärblättern etiolierter Keimlinge, die ausschließlich im Dunkeln angezogen wurden, untersucht. Zum Nachweis der RNA-Beladung ist die 25S-rRNA-Bande der aufgetrennten und auf eine Nylonmembran immobilisierten RNA nach Methylenblaufärbung gezeigt.

Das *hpd* Transkript kann in allen RNA Proben nachgewiesen werden. Im Mesophyll- und Wurzelgewebe ist signifikant mehr *hpd* mRNA nachweisbar als in der Epidermis, den Körnern und den Primärblättern von etiolierten Pflanzen. Da in allen untersuchten Proben das *hpd* Transkript nachgewiesen werden kann, ist davon auszugehen, dass der *hpd* Promotor in allen verschiedenen Gewebetypen aktiv ist.

3.1.4 Untersuchungen zur natürlichen Seneszenz von Primärblättern

Um die natürliche Blattseneszenz der Gerste unabhängig von der Vegetationsperiode zu jedem beliebigen Zeitpunkt untersuchen zu können, wurde ein Anzuchtverfahren von Gerste in der Klimakammer verwendet, mit dessen Hilfe es möglich ist, die natürliche Blattseneszenz zu untersuchen. Dies erfolgte dabei nach Miersch *et al.* (2000) (siehe auch 2.2.1). Der Verlauf der Seneszenz der Primärblätter der Gerstenpflanzen wurde ab dem siebten Tag nach Aussaat der Keimlinge durch Messung des Chlorophyllgehaltes und der Effizienz des Photosystems II (Fv/Fm) bestimmt. Die Messungen erfolgten jeden zweiten Tag.

3.1.4.1 Seneszenzabhängige Veränderungen im Chlorophyllgehalt und in der Effizienz des Photosystems II im Primärblatt der Gerste

Der Chlorophyllgehalt der Primärblätter steigt von Tag 7 bis Tag 11 nach Aussaat der Gerstenkeimlinge an (siehe Abb. 8). Er erreicht am Tag 11 nach Aussaat sein Maximum und fällt am Tag 13 ab. Diesen Tag kann man deshalb auch als Seneszenzbeginn ansehen. 23 Tage nach Aussaat ist der Chlorophyllgehalt auf die Hälfte gefallen und am Tag 27 ist nur noch ein Drittel des Blattgrüns vorhanden. Die Effizienz des Photosystems II bleibt in den untersuchten Primärblättern bis zum Tag 27 nach Aussaat nahezu konstant. Ab Tag 27 nach Aussaat sinkt die Effizienz, mit der das Photosystem II arbeitet, ab.

Zur Untersuchung der Expression der Gene *hpd* und *HvS40*, für die Durchführung von Gelretardierungsexperimenten sowie für die Immunlokalisation des HvS40 Proteins wurden Primärblättern von Pflanzen, die 11, 13, 23 oder 27 Tage unter den gewählten Bedingungen in der Klimakammer gewachsen sind, ausgewählt. Das Alter der zugehörigen Pflanzen wird entsprechend dem Zeitpunkt der Aussaat der Keimlinge als 11, 13, 23 und 27 Tage alte Gerste definiert.

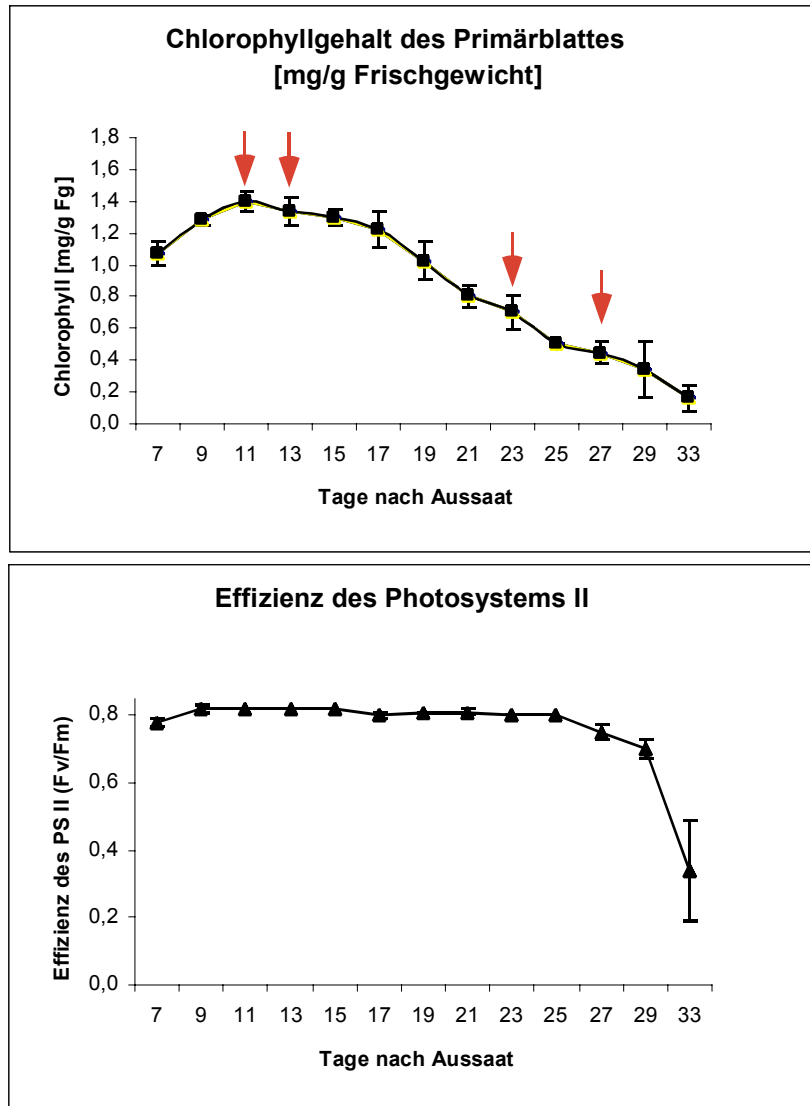


Abb. 8: Veränderungen im Chlorophyllgehalt und in der Effizienz des Photosystems II während der Seneszenz der Primärblätter der Gerste bei Anzucht in der Klimakammer. Die roten Pfeile markieren die für die späteren Untersuchungen gewählten Zeitpunkte (siehe 3.1.4.2, 3.1.4.3, 3.2.4, 3.4).

3.1.4.2 Die Expression des *hpd* Gens während der Seneszenz von Primärblättern

Der Transkriptgehalt des *hpd* Gens in Primärblättern der Gerste wurde an den Versuchstagen 11, 13, 23 und 27 durch *Northern Blot* Analysen bestimmt. Damit dieses System für weitere Untersuchungen zur seneszenzabhängigen Expression des *hpd* Gens verwendet werden kann, sollte sich ähnlich wie im Fahnenblatt der Gerste unter Freilandbedingungen eine Anreicherung des Transkripts zeigen. Durch *Northern Blot*

Analysen konnte gezeigt werden, dass die *hpd* Transkriptmenge mit zunehmendem Alter des Primärblattes zunimmt (siehe Abb. 9). Im Gegensatz dazu nimmt der Transkriptgehalt des Photosynthesegens *psaA* mit zunehmendem Alter des Primärblattes ab.



Abb. 9: Autoradiogramme von *Northern Blots* nach Hybridisierung mit den durch α -³²P-dCTP markierten *hpd* und *psaA* Sonden. Die RNA stammte aus Primärblättern 11, 13, 23 und 27 Tage alter Pflanzen. Zum Nachweis der Beladung des RNA-Gels ist die 25S-rRNA-Bande der aufgetrennten und auf eine Nylonmembran immobilisierten RNA nach Methylenblaufärbung gezeigt.

3.1.4.3 Die Expression des *HvS40* Gens während der Seneszenz von Primärblättern

In ähnlicher Weise wie für das *hpd* Gen wurde der Transkriptgehalt des *HvS40* Gens in Primärblättern der Gerste an den Versuchstagen 11, 13, 23 und 27 nach Aussaat der Gerstenkeimlinge bestimmt. Es zeigt sich eine deutliche Zunahme der *HvS40* mRNA in seneszierenden Primärblättern (siehe Abb. 10). Besonders stark steigt der Transkriptgehalt nach Abnahme des Chlorophyllgehalts auf ein Drittel des Ausgangswertes am Tag 27 nach Aussaat. Der Transkriptgehalt des Photosynthesegens *psaA* nimmt dagegen mit zunehmendem Alter der Primärblätter ab.

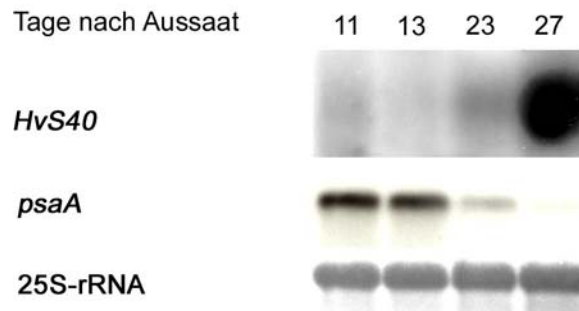


Abb. 10: Autoradiogramme von *Northern Blots* nach Hybridisierung mit den durch α -³²P-dCTP markierten *HvS40* und *psaA* Sonden. Die RNA stammte aus Primärblättern von 11, 13, 23 und 27 Tage alten Pflanzen. Als Beladungskontrolle des RNA-Gels ist die 25S-rRNA-Bande der aufgetrennten und auf eine Nylonmembran immobilisierten RNA nach Methylenblaufärbung gezeigt.

Eine Steigerung des Transkriptgehalts des *HvS40* Gens kann darüber hinaus auch induziert werden, wenn 7 Tage alte Pflanzen der Gerste für zwei oder vier Tage abgedunkelt werden. Dieser in der Literatur häufig als „dunkelinduzierte Seneszenz“ bezeichnete Prozess führt ähnlich wie unter natürlichen Seneszenzbedingungen zu einer Zunahme des relativen Transkriptgehalts des *HvS40* Gens.

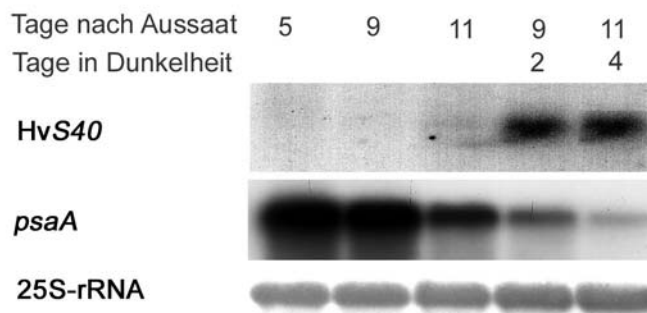


Abb. 11: Autoradiogramme von *Northern Blots* nach Hybridisierung mit den durch α -³²P-dCTP markierten *HvS40* und *psaA* Sonden. Die RNA stammte aus Primärblättern von 5, 9 und 11 Tage alten Pflanzen, die entweder in einem Licht-/Dunkelrhythmus angezogen wurden oder nach einem 7 tägigen Licht-/Dunkelrhythmus für zwei oder vier Tage ins Dunkle gestellt wurden. Zum Nachweis der Beladung des RNA-Gels ist die 25S-rRNA-Bande der aufgetrennten und auf eine Nylonmembran immobilisierten RNA nach Methylenblaufärbung gezeigt.

3.2 Analyse der Promotoren der seneszenzassoziierten Gene *hpd* und *HvS40*

Im zweiten Kapitel dieser Arbeit sind Ergebnisse der Promotoranalysen der Gene *hpd* und *HvS40* dargestellt. Besonderes Interesse galt der Identifizierung von Bereichen auf den untersuchten Promotoren, an die sich während der Seneszenz Transkriptionsfaktoren binden oder lösen.

3.2.1 Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte der Gene *hpd* und *HvS40*

Für die Untersuchung eines Promotors ist es zunächst wichtig, den Transkriptionsstartpunkt exakt zu kennen. Diesen kann man experimentell mit der *Primer-Extension*-Methode bestimmen. Bei dieser Methode wird ein Oligonukleotid, dessen Sequenz einem kleinem Abschnitt des transkribierten DNA-Strangs entspricht, mit der entsprechenden mRNA hybridisiert. Nach Hybridisierung an die passende mRNA dient dieses Oligonukleotid als *Primer* für die reverse Transkriptase. Die Länge der so synthetisierten cDNA entspricht dann dem Abstand von der Oligonukleotid-Sequenz bis zum Transkriptionsstartpunkt. Als Längenmaßstab kann eine Sequenzreaktion, die mit demselben Oligonukleotid durchgeführt wird, dienen.

3.2.1.1 *hpd* Gen

Bei der *Primer-Extension*-Reaktion des *hpd* Gens wurde ein Oligonukleotid verwendet, das 90 Bp vor dem Translationsstartpunkt an die entsprechende mRNA hybridisiert. Es zeigte sich, dass bei dieser Reaktion mehrere verschieden lange cDNAs gebildet werden (P1, siehe Abb. 12). Dieses Ergebnis könnte, bedingt durch den hohen Guanin- und Cytosin-Anteil der Sequenz, auf verschiedene Abbrüche bei der cDNA-Synthese zurückgeführt werden.

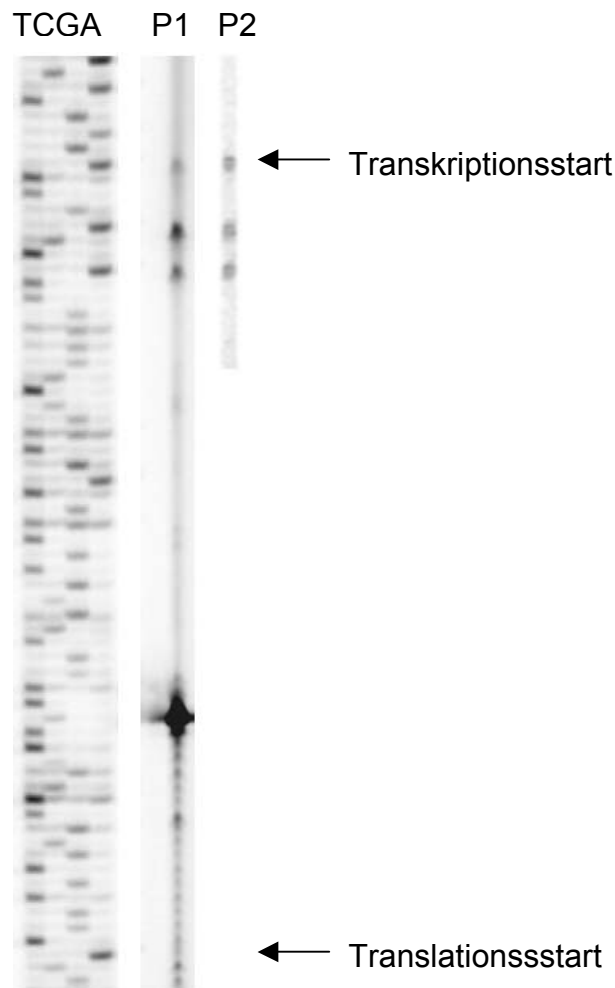


Abb. 12: Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des *hpd* Gens. Für die *Primer-Extension*-Reaktionen, P1 und P2, wurden zwei unterschiedliche Oligonukleotide (*hpd* 1 und 2, siehe 2.4, Tab. 3) eingesetzt. Die genaue Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes erfolgte durch eine Sequenzreaktion (Nukleotidreihenfolge TCGA). Hierfür wurden dieselben Primer wie in der *Primer-Extension*-Reaktion eingesetzt. Translations- und Transkriptionsstart sind jeweils durch Pfeile markiert.

Anhand dieses Ergebnisses war es schwierig, den Transkriptionsstartpunkt zu benennen. Deshalb wurde zusätzlich ein Oligonukleotid verwendet, das direkt am Translationsstartpunkt an die mRNA bindet. Auch dieses Oligonukleotid führt zur Synthese von cDNAs mit unterschiedlicher Länge (P2). Der Vergleich der mit beiden Oligonukleotiden erhaltenen *Primer-Extension*-Produkte zeigt aber, dass die jeweils längste cDNA in beiden Ansätze dasselbe Nukleotid (Adenin im kodogenen Strang, Thymin im kodierenden Strang) markiert. Es ist somit anzunehmen, dass der Transkriptionsstart des *hpd* Gens der Gerste in einer Entfernung von 54 Bp vor dem Translationsstart liegt.

3.2.1.2 *HvS40* Gen

Im Unterschied zur *Primer-Extension-Reaktion* für das *hpd* Gen ergab die cDNA-Synthese für das *HvS40* Gen nur ein Produkt (siehe Abb. 13). Der Transkriptionsstart ist entweder in einer Entfernung von 27 oder 28 Nukleotiden vom Translationsstart lokalisiert. Die Position des Transkriptionsstartpunktes kann nicht exakter angegeben werden, da das Signal der *Primer-Extension-Reaktion* sehr diffus ist.

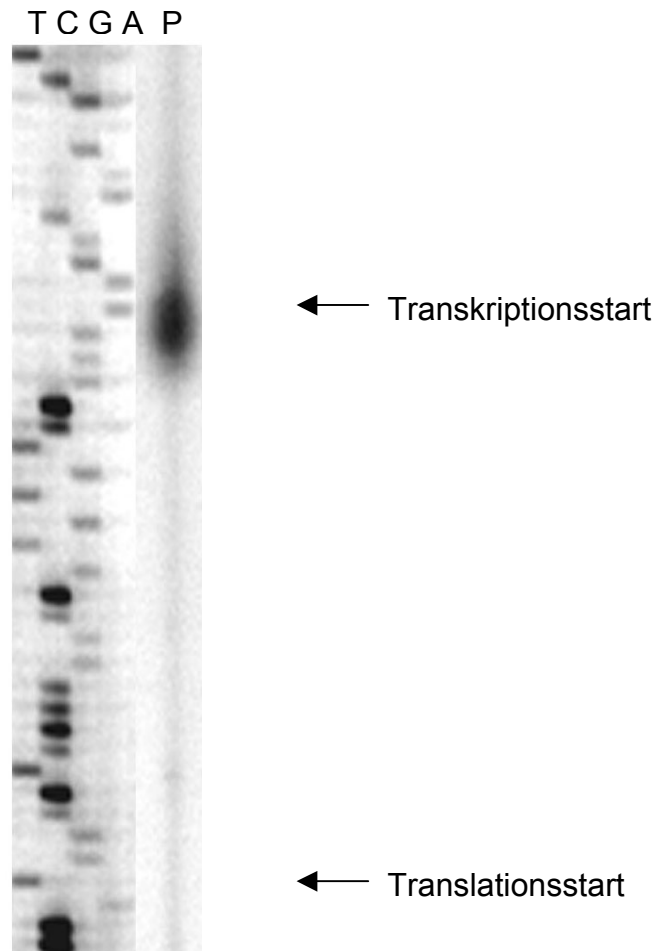


Abb. 13: Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des *HvS40* Gens. Die *Primer-Extension-Reaktion* (P) ist neben der Sequenzreaktion (Nukleotidreihenfolge TCGA) aufgetragen. Translations- und Transkriptionsstartpunkt sind jeweils durch Pfeile gekennzeichnet.

Durch die Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte der Gene *hpd* und *HvS40* ist es möglich, beiden Genen einen Promotor zuzuordnen und in weiteren Untersuchungen die Promotorsequenzen zu analysieren.

3.2.2 Sequenzanalyse der Promotoren der Gene *hpd* und *HvS40*

Neben den durchgeführten Expressionsanalysen kann ein Vergleich der *hpd* und *HvS40* Promotoren im Hinblick auf das Vorliegen von *cis*-Elementen Anhaltspunkte geben, welche Motive an der Transkription beider Gene während der Seneszenz beteiligt sein könnten. Für diesen Sequenzvergleich wurde die auf pflanzliche Promotoren spezialisierte Datenbank PLACE gewählt.

3.2.2.1 Der Promotor des *hpd* Gens

Die ersten 1000 Basenpaare des *hpd* Promotors zeigen einige interessante Bereiche, die im folgenden kurz beschrieben werden. Im Bereich von etwa –800 bis –480 Basenpaaren (entspricht der Base 79 bis 399, siehe Abb. 14) befinden sich insgesamt 11 Elemente, die alle TGCA als Kernmotiv besitzen (siehe Abb. 14). Diesem Motiv geht meistens entweder die Base Guanin oder Thymin voraus. Auf das Motiv folgt entweder ein Adenin oder Guanin, so dass man den Elementen die Basenabfolge G/T TGCA A/G zuordnen kann. Eine Funktion ist dieser Nukleotidabfolge bisher nicht zugewiesen worden.

Darüber hinaus zeigt der *hpd* Promotor zwei sogenannte Abscisinsäure responsive elements (ABRE) an den Positionen –46 bis –54 (entspricht der Base 887 bis 893, siehe Abb. 14) und –506 bis –518 (entspricht der Base 432 bis 444, siehe Abb. 14). Diese Elemente sind von Promotoren verschiedener durch Abscisinsäure induzierter Gene bekannt (Busk & Pages 1998). Zu diesen Genen gehören u.a. das *rab28* und *Cat1* Gen aus Mais (Pla *et al.* 1993, Guan *et al.* 2000) sowie das Gen für die Alkoholdehydrogenase (*Adh*) aus Arabidopsis (McKendree *et al.* 1990). Das Kernmotiv ACGTGGC dieser Elemente ist für die durch Licht induzierte Transkription des *rbcS* Gens und des für die Chalkonsynthese kodierenden Gens verantwortlich (Terzaghi & Cashmore 1995). Im weiteren befindet sich zwischen Transkriptions- und Translationsstart ein Bereich, an den durch Abscisinsäure aktivierte bZip-Transkriptions-faktoren binden können (Kim *et al.* 1997). Das gleiche Motiv befindet sich auch an der Position -118 bis -124 (entspricht der Base 815 bis 821, siehe Abb. 14).

3. Ergebnisse

```

1   GCTTAATTTA AAGGGGCGTG CTACGCGTCA GCCGACGGAT TTTATAAAAT
                                     LTRE
51  ATCCGTCAGC TCGCGAGCCG TCAGATCTGT TGCAGATCGA GCGACAGAAC
                                     TGCA-Motiv
151 AACTTCTTCA CTTTTGCAAC TTAGGCCAG TTGTAGTTTT TCTGCAACTA
                                     TGCA-Motiv
201 CGGTTTTGTT GCAGATTTTT TTGCAACAAA GATCGTATTG TAATTTCTTT
                                     TGCA-Motiv
251 TTGCAACTGA AGTTCCGTTG CAATTTTTTT TTGTAATTGA GATTATGCTG
TGCA-Motiv
301 CAGAAGGGTC GCGTTGTTGT ACTATCTAAT TTCAAGGATT CAGATCCTGC
TGCA-Motiv
351 AACAGAGCCG TTGTTGCGAT GAGAAATTGC AACAACATGC TAGTTGCAAA
                                     TGCA-Motiv
401 AACTTCTGAT GATGATCATG AGCCACGTGG CGTGTAAGA AGAGGACGGA
                                     ABRE II
451 TGCCAGCGTG CGATCCGCCG GATGATTTAT AACGTTTCCC TAATTTAAA
501 GGAAAAGAT GATGGCTTGC ACCTTTTCAA TGAATTTTTT TTACTTCATT
551 TTACAATTTG TTCTAAAATA TTTATATATA TACTTTTTT ATCGGACTGA
601 GGGAGTCCTC CCAGCTTATT TCTACCTGTA CTTATTTTTT GGACCACTAC
651 CAACGGAAAG AATATGGACC TCGCTATATT TGTAGCTGTA CTTACCTTTT
701 GAAATAAATA ATATTTCTAG CTGTATTTTT GTTTGTGAAA TACAGTAGTA
ERE
751 ACATTTCTAG CTGTGCTTGG CTGTACGTTA CCCTAGGCCA GTCAGCAAAC
801 CCATCCCCTC CATCACACTA GCTCGAGCCC CCACACCACC AAACGCCAAA
                                     bZipABA
851 AGACAAATCG CACCCGCCAC CACTAAACCC CGAGCCCCAG TGGCGCCATG
                                     ABRE I
901 TCCGCCCTTT ATTACCCCC ACTTCTCCTG TACTCTAACT GATAACCCCG
                                     TATA-Box
951 AGCCACTACC ACACGCGACC AAGAAGCGAA CGCACACCATG
                                     bZipABA

```

Abb. 14: Sequenz des *hpd* Promotors. *Cis*-Elemente, die für die Transkription während der Seneszenz von Bedeutung sein könnten, sind unterstrichen. Die Zuordnung der *cis*-Elemente erfolgte durch Datenbankvergleiche. Folgende Motive wurden hervorgehoben:

ABRE:	<i>ABA responsive element</i>
LTRE:	<i>low temperature responsive element</i>
TGCA-Motiv:	auffällige Sequenzwiederholung ohne bekannte Funktion
bZip-ABA:	Element, an das durch Abscisinsäure aktivierte bZip-Transkriptionsfaktoren binden
ERE:	Ethylen <i>responsive element</i>
TATA-Box:	mögliche TATA-Box

Zudem befindet sich ein Kältestress-Element an der Position –853 bis –858 (entspricht der Base 31 bis 36, siehe Abb. 14). Neben Abscisinsäure wird auch dem Phytohormon Ethylen eine Funktion bei der Seneszenz zugeschrieben. Eine Bindestelle für durch Ethylen aktivierte Transkriptionsfaktoren befindet sich auf dem *hpd* Promotor an der Position –237 bis –244 (entsprechend der Base 698 bis 705) auf dem kodogenen Strang (Itzhaki *et al.* 1994). Eukaryotische Promotoren besitzen, soweit sie nicht zu Haushaltsgenen gehören, in einem Bereich von –29 und –34 Basenpaaren vor dem Transkriptionsstartpunkt eine typisch AT-reiche Stelle mit der Basenabfolge TATA (Knippers 1997). Eine solche Sequenzabfolge befindet sich beim *hpd* Promotor an der Position –27 bis –34.

3.2.2.2 *HvS40* Promotor

Die Sequenz des *HvS40* Promotors besitzt wie die des *hpd* Promotors zwei Abscisinsäure *responsive elements* (ABRE). Das erste ABRE befindet sich an der Position –260 bis –275 (entspricht der Base 540 bis 555, siehe Abb. 15), das zweite ABRE bei –561 bis –569 (entspricht der Base 247 bis 255, siehe Abb. 15). Zwischen beiden ABRE befinden sich zwei Bereiche, an die durch Abscisinsäure aktivierte bZip-Transkriptionsfaktoren binden können (Kim *et al.* 1997). Eine dritte mögliche Bindestelle für einen durch Abscisinsäure aktivierten bZip-Transkriptionsfaktor liegt zwischen Translations- und Transkriptionsstartpunkt. Neben diesen Hinweisen auf eine mögliche Transkriptionskontrolle durch Abscisinsäure gibt es zwei Bereiche auf dem *HvS40* Promotor, die jeweils durch eine IR2-Box auf dem kodierenden Strang des Gens in Verbindung mit einer W-Box auf dem kodogenen Strang des Gens in gleicher Reihenfolge und im gleichen Abstand von 5 Basenpaaren zueinander enthalten sind. Während die IR2-Box die zweite *inverted repeat* Sequenz (IR2) neben der IR1-Box des Elicitor *responsive element* (ERE) des *PR-10a* Promotors der Kartoffel darstellt (Després *et al.* 1995, Desveaux *et al.* 2000), sind W-Boxen typische Bindestellen für WRKY-Transkriptionsfaktoren (Eulgem *et al.* 2000, Robatzek & Somssich 2002). Der erste Bereich auf dem *HvS40* Promotor mit einer IR2- und W-Box befindet sich an der Position –588 bis –605 (entspricht der Base 212 bis 229, siehe Abb. 15), der zweite Abschnitt auf dem Promotor bei –376 bis –393 (entspricht der Base 435 bis 452, siehe Abb. 15). Auffällig ist, dass der zweite Sequenzabschnitt mit IR2- und W-Box in einem Abstand von 4 Basenpaaren eine zur IR1-Box ähnliche Sequenz enthält.

3. Ergebnisse

```

1   CCGCGGGCCTA AC CAGAATAA G TCCCAATAA GC TCCTATTA AAGAGTCTTA
    Sac II
52  TTTGATAAGT  CCAAATAAC  CATAATAAGT  CCAATAAGT  CCTTGTGTT
102 TGA TTTAGGT  GGGACTTATA  GGAACTTTTT  TAAGTCTTAA  AACCAATAAG
152 TCCCTAGAAA  CAAACACCCT  CTAGGTCGTC  CTATGTTTGG  GGTACTATT
202 TC AATTTGTA  TGTCAGAAAA  TGGTCAAATG  AGTTTGAACC  GGTCCGTACG
                    IR2-Box      W-Box      ABRE
252 TGGCATCAAT  CTAGTGAGTT  GTACGTGCA  TGATTCCTTC  C TCCAAATTA
302 AGC TTACATG  TGC GTTATCA  ATGAATATGT  TACTGTATGA  AAGTGCCTAA
352 AAAA ACTTGT  TGCTATCAAT  GGGATTGGCT  AGCACTAAGT  TCCGAGCCAA
402 CCTATCTTGC  CGTGTGAGAA  C TCTGTCAAA  TATTGGTCAA  ACGAAGCAAG
                    ähnlich zur IR1-Box  IR2-Box      W-Box
452 TTT ACACAGG  ACAGAAATTC  CGCCATTGGT  AAGTAGGACG  ATACGCGTGC
                    bZip ABA
502 AAA TACGTAC  GTACATACGT  GCACACCTGT  ACCAGGCGCA  CGTCCACGTG
                    A-Box (2x)      bZip ABA      ABRE
552 GcAGCCGAGG  ATAGGGTGTA  CCGCACTCCA  CATCAACCCC  TTCCTTCCTT
602 CCA TCCCAGG  CGCAGGCAGA  GACACCCACA  GCTAGCAAAG  TTTGTCCAAA
652 CGCGCCACTA  CTCTCCTCC  AGTTGCCAAC  TCCCAAGGA  AGTCTGCTTG
702 CTCACCAAGA  CACGCCATCG  TCTCCTTCTC  CAATCTCCAT  CCCTTCCTT
                    CCAAT-Box
752 CCACAGCACA  CCTACCTTCG  CTCGCTATAT  ATGCCCTCG  CATGGCAGC
                    TATA-Box
802 CCCAGCTCTT  GCCTTCCCGG  ACACACGGCC  GGGGAGGCCA  TGGATCATCA
                    Transkriptionsstart  bZip ABA      Translationsstart
852 GGAGCTC
    SAC I

```

Abb. 15: Sequenz der ersten 840 Bp im 5'-Bereich des Startkodons des *HvS40* Gens. Folgende Motive sind hervorgehoben:

A-Box: Motiv verantwortlich für die Repression durch Zucker

ABRE: *ABA responsive element*

bZip-ABA: Element, an das durch Abscisinsäure aktivierte bZip-Transkriptionsfaktoren binden

IR1-Box: Teilsequenz des ERE-Elements aus dem *PR-10a* Promotor der Kartoffel

IR2-Box: Teilsequenz des ERE-Elements aus dem *PR-10a* Promotor der Kartoffel

W-Box: Bindestelle für WRKY-Transkriptionsfaktoren

TATA-Box: mögliche TATA-Box

Ein weiteres Element des *HvS40* Promotors, das möglicherweise für die Transkription während der Blattseneszenz von Bedeutung sein könnte, ist an der Position –303 bis –313 (entspricht der Base 505 bis 515, siehe Abb. 15) lokalisiert. Von diesem als A-Box bezeichneten Element ist bekannt, dass Repressoren sich bei veränderten Zuckerkonzentrationen ablösen können (Foster *et al.* 1994).

Ähnlich wie beim *hpd* Promotor befindet sich in einer Entfernung von 32 bis 39 Basenpaaren vor dem Transkriptionsstart eine AT-reiche Region, die eine TATA-Box darstellen könnte. Eine CCAAT-Box ist an der Position –79 vorhanden. Mit den TATA- und CCAAT-Boxen zeigt der *HvS40* Promotor die typischen Elemente von eukaryotischen Promotoren.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Promotoren der Gene *hpd* und *HvS40* Sequenzelemente enthalten, die auf eine durch Abscisinsäure induzierte Transkription hindeuten. Dies zeigen sowohl die Sequenzanalysen beider Promotoren als auch *Northern Blot* Analysen, die mit Abscisinsäure behandelten Primärblättern durchgeführt wurden. Darüber hinaus weist der *hpd* Promotor einige interessante Sequenzwiederholungen mit der Basenabfolge TGCA und der *HvS40* Promotor zwei Bereiche, in denen eine IR2-Box gepaart mit einer W-Box vorkommen, auf. In weiteren Untersuchungen ist nun zu prüfen, ob die identifizierten Elemente der *hpd* und *HvS40* Promotoren einen Einfluss auf die Transkription beider Gene während der Seneszenz haben.

3.2.3 Bestimmung der Promotoraktivität des *hpd* Gens

Motive, die auf dem *hpd* Promotor für eine Transkription während der Seneszenz von Bedeutung sind, können durch transiente Expressionsversuche bestimmt werden. Dazu wird ein Gen, das die Ausprägung eines nachweisbaren Merkmals bewirkt (Reportergen), mit einer vorgeschalteten Promotorsequenz in ein Plasmid eingebaut und in die Zellen des zu untersuchenden Organismus eingebracht.

Für das Einschleusen der Fremd-DNA stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die transiente biolistische Transformation gewählt. Bei dieser Transformationsmethode wird die an feine Goldpartikel assoziierte DNA mit hohem Druck durch Beschuss von Primärblättern in die Zellen des Pflanzenmaterials eingebracht. Ein Teil der übertragenen DNA gelangt durch diese Transformations-

methode in den Zellkern, wo das eingebrachte Reporter-gen transkribiert werden kann (Sanford 1990, Klein & Fitzpatrick-McElligott 1993, Mäenpää *et al.* 1999).

Voraussetzung für eine Transkription des Reporter-gens ist, dass der Promotor in den Zellen des transformierten Gewebes erkannt wird und genügend Sequenzinformation zur Initiation der Transkription enthält. Die Eigenschaften des Promotors sind somit für die Expression des Reporter-gens entscheidend. Durch Bestimmung der Transkriptionsaktivität des Reporter-gens, die experimentell durch die Enzymaktivität oder Fluoreszenzstärke des verwendeten Reporter-proteins gemessen wird, kann deshalb untersucht werden, ob und wie stark ein Promotor in einem bestimmten Gewebe oder in bestimmten Zellen aktiv ist. Diese Methodik, die nicht nur für die gesamte Promotorsequenz, sondern auch für einzelne Teilbereiche von dieser angewendet wird, kann daher wichtige Hinweise zur Identifizierung von Elementen geben, die an der Transkription des untersuchten Gens beteiligt sind.

Um die Bereiche, die auf dem *hpd* Promotor für eine Transkription während der Seneszenz von Bedeutung sind zu identifizieren, wurden verschiedene Konstrukte mit einer unterschiedlich großen Anzahl von Basenpaaren des untersuchten Promotors hergestellt. Die hierfür verwendeten Promotorabschnitte wurden dabei so ausgewählt, dass das größte Konstrukt den gesamten 1000 Basenpaare umfassenden Bereich des *hpd* Promotors enthält, und der kürzeste Sequenzabschnitt 160 Basenpaare vor dem Startkodon umfasst (siehe Abb. 16).

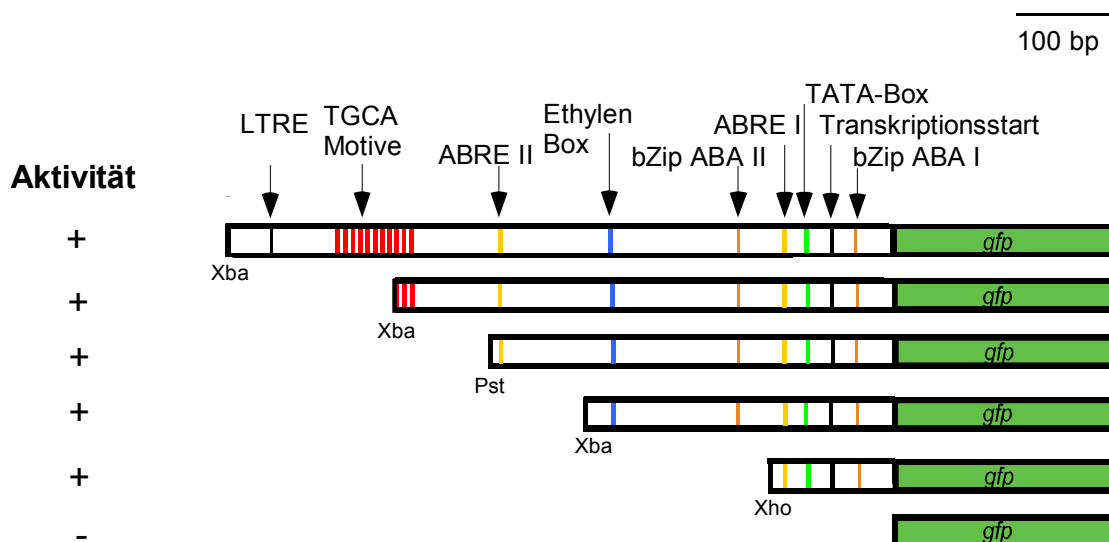


Abb. 16: Übersicht über die verschieden großen Promotorfragmente des *hpd* Gens, die über die eingezeichneten Schnittstellen vor das Reporter-gen *gfp* ligiert wurden. Die Promotoraktivität dieser Konstrukte wurde durch biolistische Transformation von Blattsegmenten 7 Tage alter Gerstenpflanzen transient getestet.

Das kleinste 160 Basenpaare umfassende Konstrukt enthält somit vom *hpd* Promotor nur den Transkriptionsstart, die TATA-Box, eine Bindestelle für ABA induzierte bZip-Transkriptionsfaktoren und ein ABRE.

Ausgehend vom größten Konstrukt wurden die nächstkleineren Fragmente so gewählt, dass ihnen einzelne Sequenzbereiche fehlen, die aufgrund der zuvor durchgeführten Sequenzanalyse des Promotors interessant erschienen (siehe 3.2.2.1). Im weiteren wurden die verschieden großen Abschnitte des *hpd* Promotors vor das Reportergen *gfp* (*green fluorescent protein*) kloniert und die Konstrukte zur transienten biolistischen Transformation von Primärblättern 7 Tage alter Pflanzen eingesetzt. Spätestens nach zwei Tagen zeigte sich, dass alle hergestellten Konstrukte ausreichend Sequenzinformation enthalten, um eine Expression des GFPs zu bewirken. Die Expression des GFP, die durch die verschiedenen Konstrukte bewirkt wird, ist dabei mit der Expression des *gfp* Gens in Fusion mit dem konstitutiven Aktinpromotor vergleichbar. Wird das *gfp* Gen ohne Promotorsequenzen übertragen, ist keine GFP Fluoreszenz feststellbar. Aus diesen Ergebnissen kann somit geschlossen werden, dass das kleinste 160 Basenpaare umfassende Konstrukt bereits ausreichend ist, die Transkription des *gfp* Gens zu aktivieren.

Zudem zeigten die Ergebnisse der biolistischen Transformation, dass der *hpd* Promotor sowohl in Epidermis- wie auch in Mesophyllzellen aktiv ist. In den Epidermiszellen kann die grüne GFP Fluoreszenz sowohl in den Spaltöffnungen (siehe Abb. 17) als auch in den angrenzenden Epidermiszellen beobachtet werden (siehe Abb. 18).

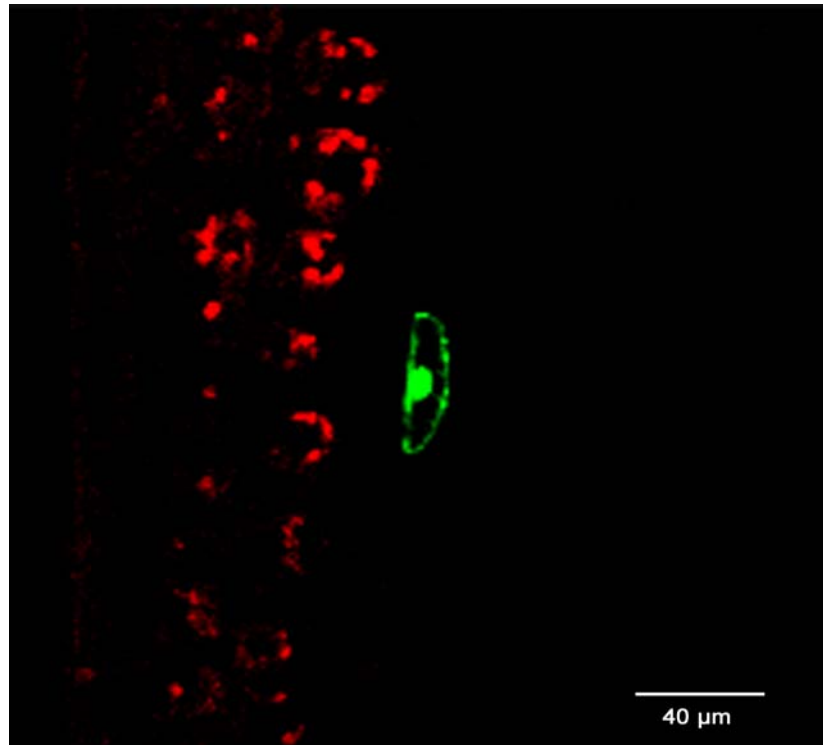


Abb. 17: CLSM Aufnahme einer transformierten Spaltöffnung im Primärblatt der Gerste. Während die Mesophyllzellen eine rote Chlorophyll-Fluoreszenz haben, ist die transformierte Spaltöffnung an der grünen Fluoreszenz des GFPs zu erkennen.

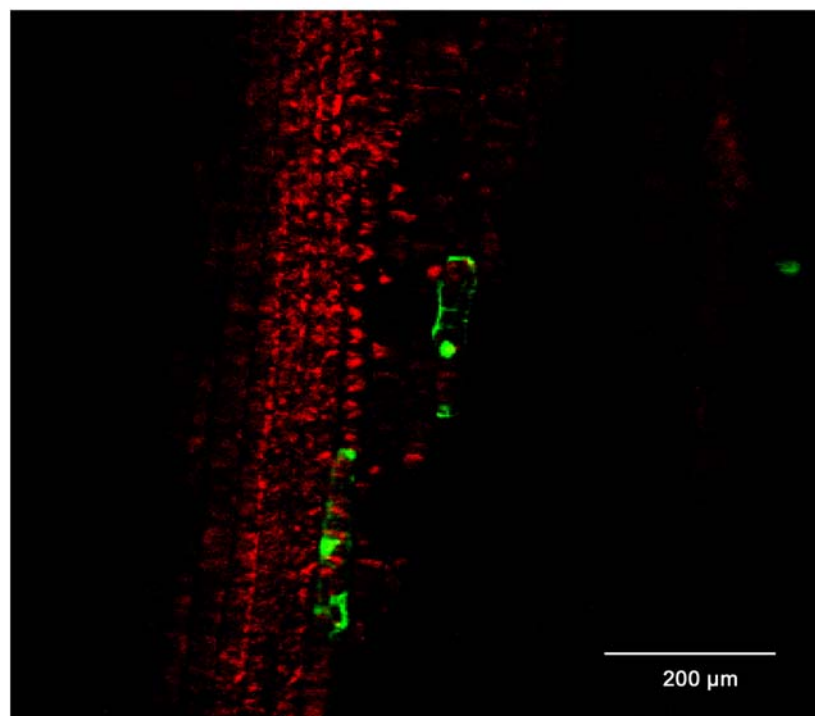


Abb. 18: CLSM Aufnahme der GFP-Fluoreszenz von transformierten Epidermiszellen des Primärblattes der Gerste. Die Mesophyllzellen zeigen die für sie typische rote Chlorophyllfluoreszenz.

In den Mesophyllzellen, die im Fall des Gerstenblattes aus einem einheitlichen Zelltyp und nicht wie in einer zweikeimblättrigen Pflanze aus Schwamm- und Palisadenparenchymzellen bestehen, ist die GFP Fluoreszenz zwar zu beobachten (siehe Abb. 19), doch ist der Anteil an transformierten Zellen äußerst gering (weniger als 1%).

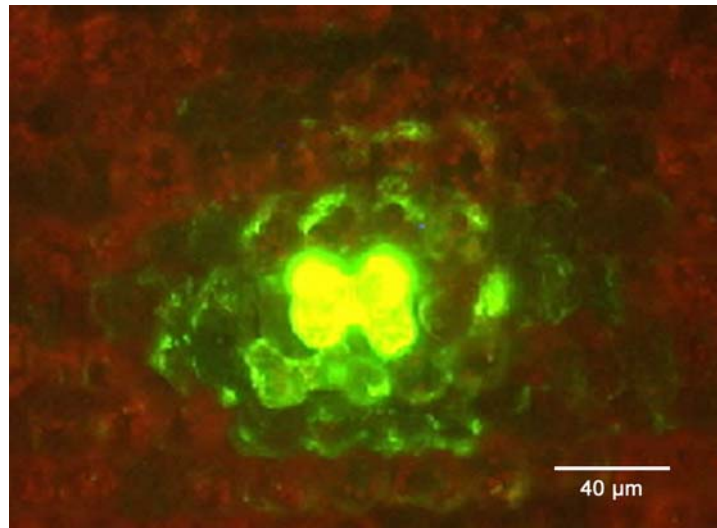


Abb. 19: Lichtmikroskopische Aufnahme der Fluoreszenz des GFPs und des Chlorophylls in einer transformierten Mesophyllzelle eines Primärblattes der Gerste.

Wie bereits erwähnt, stellt das Mesophyllgewebe im Fall der Blattseneszenz einer Pflanze den Ort der Seneszenz dar, in dem neben der Transkription der SAGs die diesen Prozess charakterisierenden Veränderungen, wie z.B. der Abbau des Chlorophylls, stattfinden (siehe auch 3.1.3). Da die Transformationseffizienz von Mesophyllzellen im Primärblatt der Gerste sehr gering ist, kann mit Hilfe der transienten biolistischen Transformationsmethode die Aktivität des *hpd* Promotors vor und während der Seneszenz nicht untersucht werden.

Auch nach vielen Versuchen zur Verbesserung der Transformationsrate ist es nicht gelungen, die Effizienz der Mesophyllzelltransformation so zu steigern, dass vergleichende Aussagen zur Expression der verschiedenen Promotorkonstrukte in Mesophyllzellen möglich wären. Ein quantitativer Vergleich der Promotorstärke der verschiedenen Konstrukte während der Seneszenz kann deshalb nicht gemacht werden. Damit können auch keine Hinweise auf Elemente des *hpd* Promotors, die während der Seneszenz an der Transkription des *hpd* Gens beteiligt sein können, gewonnen werden.

Zusammenfassend hat die Untersuchung von Konstrukten, die unterschiedlich große Bereiche des *hpd* Promotors repräsentieren, gezeigt, dass die ersten 160 Basenpaare im 5' Bereich des Startkodons des *hpd* Promotors für eine Expression des GFPs ausreichend sind. Da mit Hilfe der biolistischen Transformation in Primärblättern aus 7 Tage alten Gerstenpflanzen fast ausschließlich nur Epidermiszellen und nur vereinzelt Mesophyllzellen transformiert werden können, eignet sich dieser methodische Ansatz nicht, um Promotoraktivitäten im Mesophyll während der Seneszenz zu untersuchen. Aussagen über DNA-Elemente, die am Seneszenzprogramm des *hpd* Gens beteiligt sein könnten, können mit dieser Methode nicht getroffen werden.

Da das *HvS40* Gen nicht in Epidermiszellen exprimiert wird (Krupinska *et al.* 2002) und mit Hilfe der transienten biolistischen Transformation nur wenig Mesophyllzellen transformiert werden können, eignet sich dieser methodische Ansatz nicht für den *HvS40* Promotor. Auf eine entsprechende Analyse mit dem *HvS40* Promotor wurde daher verzichtet.

3.2.4 *In vitro* Bindungsstudien zur Identifizierung potentieller DNA-Erkennungssequenzen von seneszenzabhängig regulierten Transkriptionsfaktoren

Eine Methode zum Nachweis von Proteinen, die an interessante Promotorbereiche (Seneszenz-Elemente) binden oder sich lösen können und damit an der Transkription während der Seneszenz beteiligt sein können, bieten Gelretardierungsexperimente. In diesen Experimenten wird der zu untersuchende DNA-Bereich entweder radioaktiv oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und dann mit Gesamtproteinextrakten oder mit Kernproteinextrakten inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgt eine native elektrophoretische Auftrennung der Proteine und der DNA in einem Polyacrylamidgel. Hat sich ein Protein-DNA-Komplex gebildet, der aus einem oder mehreren Proteinen bestehen kann, wird dieser in der Elektrophorese langsamer aufgetrennt als die freie DNA. Es entstehen somit zwei Banden, die des Protein-DNA-Komplexes und die der ungebundenen DNA.

Unter der Annahme, dass ein Transkriptionsfaktor während der Seneszenz die Transkription eines SAGs steuert, indem er an die Promotor-DNA bindet oder sich davon löst, müssten an den Promotoren verschiedener SAGs in seneszierenden Primärblättern im Vergleich zu jungen Blättern andere Protein-DNA-Komplexe zu finden

sein. Diese Unterschiede, die mit Hilfe von Gelretardierungsexperimenten gezeigt werden können, können zum einen auf eine erhöhte (oder erniedrigte) Proteinmenge oder zum anderen auf eine veränderte Bindefähigkeit der Proteine an die DNA in seneszierenden Zellen zurückgeführt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gelretardierungsexperimente mit verschiedenen möglichen Seneszenz-Elementen der *hpd* und *HvS40* Promotoren durchgeführt. Die Ergebnisse werden in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben.

3.2.4.1 Gelretardierungsexperimente mit dem *hpd* Promotor

Aufgrund von Datenbankvergleichen wurden verschiedene mögliche *cis*-Elemente des *hpd* Promotors identifiziert (vgl. 3.2.2.1). In Gelretardierungsexperimenten wurden die identifizierten TGCA-Motive sowie ein ABRE näher analysiert. Hierfür wurden Kernproteinextrakte aus Primärblättern von Gerstenpflanzen, die für 5, 11, 13, 23 und 27 Tage in der Klimakammer angezogen wurden, hergestellt (siehe 3.1.4). Zudem wurden für die Untersuchungen auch Kernproteine aus Primärblättern 7 Tage alter Pflanzen verwendet, die für zusätzliche 48 h mit Abscisinsäure behandelt wurden. Da Abscisinsäure in einer 1% Ethanollösung (v/v) gelöst vorlag, wurden als Kontrolle auch Kernproteine aus Primärblättern verwendet, die für 48 h auf einer 1% Ethanollösung (v/v) oder auf Leitungswasser inkubiert wurden.

In Abbildung 20 ist ein Gelretardierungsexperiment mit einem Oligonukleotid gezeigt, das zwei TGCA-Motive beinhaltet. Dieses DNA-Fragment wurde mit allen oben beschriebenen Kernproteinextrakten inkubiert. Bei allen untersuchten Kernproteinfraktionen zeigten sich neben der freien DNA zwei Protein-DNA-Komplexe. Exemplarisch für die mit den verschiedenen Proteinextrakten durchgeführten Experimente sind in Abbildung 20 nur die Ergebnisse der Gelretardierungsexperimente gezeigt, die mit Kernproteinextrakten aus Primärblättern von Pflanzen, die 5, 13 oder 23 Tage in der Klimakammer angezogen wurden, durchgeführt wurden.

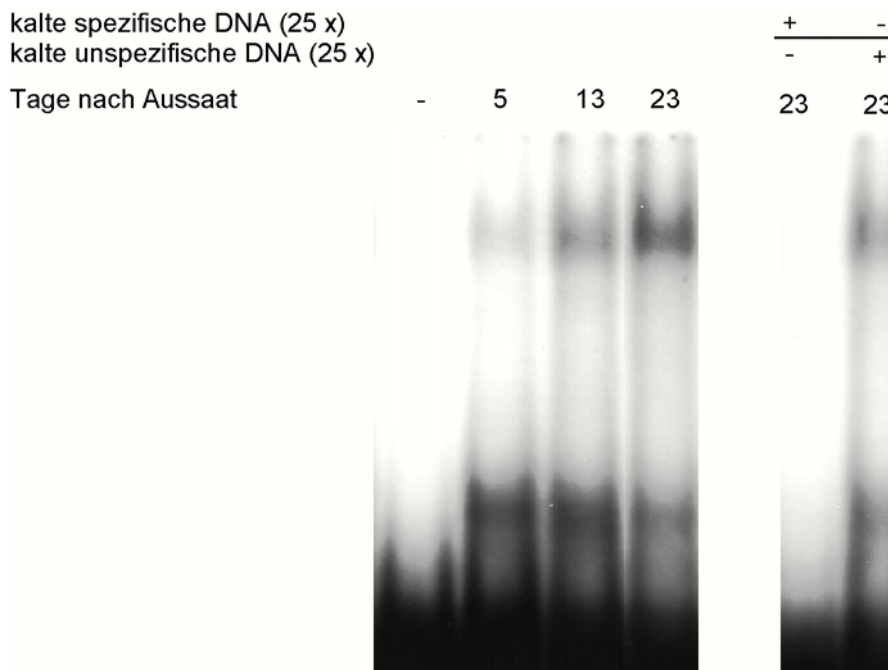


Abb. 20: Gelretardierungsexperimente mit einem zwei TGCA-Motive umfassenden Oligonukleotid aus dem *hpd* Promotor (*hpd* Promotor 1, siehe 2.4, Tab. 4) und Kernproteinextrakten aus Primärblättern von Gerstenpflanzen, die 5, 13 und 23 Tage in der Klimakammer angezogen wurden. Die Spezifität der gebildeten DNA-Protein-Komplexe ist exemplarisch durch Verdrängungsreaktionen mit nicht radioaktiv markierter spezifischer und unspezifischer DNA von Kernproteinen aus Primärblättern 23 Tage alter Pflanzen gezeigt.

Um zu überprüfen, ob die Bindung der eingesetzten Kernproteine an die Promotor-DNA spezifisch ist, wurde eine Verdrängungsreaktion mit einem 25 fachen Überschuss an nicht radioaktiv markierter spezifischer DNA durchgeführt. Zudem wurde eine Verdrängungsreaktion mit einem entsprechenden Überschuss an nicht radioaktiv markierter unspezifischer DNA ausgeführt. Zeigt sich, dass die nicht radioaktiv markierte spezifische DNA die radioaktiv markierte verdrängen kann, während die unspezifische DNA dies nicht kann, kann die Protein-DNA Interaktion als spezifisch angesehen werden. Eine solche Verdrängungsreaktion, die mit allen Proben durchgeführt wurde, ist exemplarisch für alle verwendeten Extrakte von Kernproteinen aus Primärblättern von Pflanzen der Gerste, die 23 Tage in der Klimakammer angezogen wurden, dargestellt.

Neben diesem Oligonukleotid wurden noch zwei weitere DNA-Elemente, die TGCA-Motive einschließen (*hpd* Promotor 2 und 3, siehe 2.4, Tab. 4), näher analysiert. In Gelretardierungsexperimenten mit verschiedenen Kernproteinextrakten aus Primärblättern unterschiedlich alter Pflanzen können Protein-DNA-Komplexe

nachgewiesen werden. Da im Hinblick auf die Ausbildung der Protein-DNA-Komplexe keine entwicklungsabhängigen Unterschiede feststellbar waren, wurde auf eine Abbildung an dieser Stelle verzichtet.

Im weiteren wurden die möglichen Proteinbindungen an die beiden ABA *responsive elements* des *hpd* Promotors in Gelretardierungsexperimenten untersucht. Setzt man ein Oligonukleotid der Größe von 27 Basenpaaren ein, das den Bereich von -32 bis -59 des *hpd* Promotors einschließt, findet man in Gelretardierungsexperimenten folgendes Ergebnis. Die Inkubation mit Kernproteinen aus Primärblättern 5 Tage alter Pflanzen führt zu zwei deutlich erkennbaren Protein-DNA-Komplexen. Diese Protein-DNA-Komplexe können als spezifische Anlagerung der Proteine an das untersuchte Oligonukleotid angesehen werden. Dies zeigen die Verdrängungsreaktionen mit nicht radioaktiv markierter unspezifischer und spezifischer DNA (siehe Abb. 21).

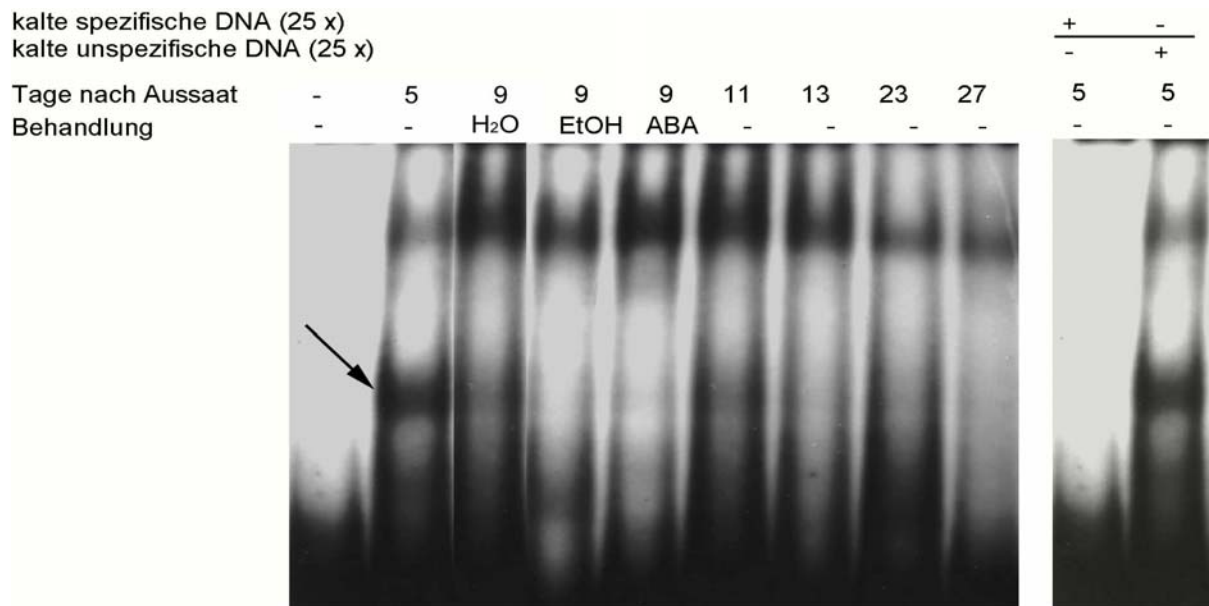


Abb. 21: Gelretardierungsexperimente mit einem Oligonukleotid (*hpd* ABA II b, siehe 2.4, Tab. 4), das das ABRE bei Position -32 bis -59 des *hpd* Promotors umfasst, und Kernproteinextrakten aus Primärblättern unterschiedlicher Pflanzen. Die eingesetzten Kernproteinextrakte stammten entweder aus Primärblättern, die für 48 h auf Abscisinsäure (ABA), Leitungswasser (H₂O) oder einer Ethanollösung (EtOH) lagen oder aus unbehandelten Primärblättern von verschiedenen alten Pflanzen. Die Spezifität der gebildeten DNA-Protein-Komplexe ist exemplarisch durch Verdrängungsreaktionen mit nicht radioaktiv markierter spezifischer und unspezifischer DNA von Kernproteinen aus Primärblättern 5 Tage alter Pflanzen gezeigt. Der Pfeil kennzeichnet den Protein-DNA-Komplex, der in Kernproteinen aus seneszierenden Primärblättern der Gerste fehlt.

Während beide Protein-DNA-Komplexe bei Verwendung spezifischer DNA verschwinden, bleiben diese nach Inkubation mit einem unspezifischen Oligonukleotid erhalten.

Wird ein entsprechender Ansatz mit Kernproteinen aus Primärblättern 9 Tage alter Pflanzen, die nach 7 Tagen abgeschnitten und für 2 Tage auf eine in Ethanol und Leitungswasser gelöste Abscisinsäurelösung gelegt wurden, durchgeführt, zeigt sich, dass der kleinere der beiden Protein-DNA-Komplexe kaum noch nachweisbar ist (siehe Abb. 21). Das gleiche Ergebnis kann auch beobachtet werden, wenn dieses Experiment mit Kernproteinen aus 9 Tage alten Pflanzen, die weder abgeschnitten noch mit Abscisinsäure behandelt wurden, durchgeführt wird (Daten nicht gezeigt). Die verminderte Signalstärke des zweiten Protein-DNA-Komplexes ist somit nicht auf die Wirkung der Abscisinsäure zurückzuführen.

Auch zeigen Gelretardierungsexperimente mit Kernproteinextrakten aus Primärblättern 11, 13 und 23 Tage alter Pflanzen ein schwächeres Signal des kleineren Protein-DNA-Komplexes. In Kernproteinextrakten aus Primärblättern 27 Tage alter Pflanzen, die bereits stark seneszierend sind, ist dieser Protein-DNA-Komplex nicht mehr zu erkennen.

Die Gelretardierungsexperimente mit verschiedenen TGCA-Motiven und den beiden *ABA responsive elements* (ABRE) haben gezeigt, dass Veränderungen zwischen den sich bildenden Protein-DNA-Komplexen aus jungen und seneszierenden Primärblättern nur im Fall des ersten untersuchten *ABA responsive elements* bestehen. Es wird daher die Beteiligung dieses Elements an der Transkription des *hpd* Gens während der Seneszenz postuliert.

3.2.4.2 Gelretardierungsexperimente mit dem *HvS40* Promotor

Bei der Analyse möglicher Seneszenz-Elemente des *HvS40* Promotors wurden die Kombination aus IR2- und W-Boxen, sowie die ABRE und die Elemente, an die durch Abscisinsäure induzierte Transkriptionsfaktoren (bZip-ABA) binden, getestet. In den durchgeführten Gelretardierungsexperimenten wurden Kernproteine aus Primärblättern verschiedener Seneszenzstadien verwendet (vgl. 3.1.4). Im weiteren wurden auch Kernproteinextrakte aus Primärblättern getestet, die sich entweder zwei oder vier Tage in Dunkelheit befanden.

Die ABRE und bZip-ABA-Elemente führten in allen Gelretardierungsexperimenten zur Bindung von Proteinen. Unterschiede in der Größe oder Menge der einzelnen Protein-DNA-Komplexe konnten nicht festgestellt werden. Auch die Verwendung von Kernproteinen aus mit Abscisinsäure behandelten Primärblättern führte in Gelretardierungsexperimenten zu Protein-DNA-Komplexen gleicher Größe und Menge, die mit denen, die nach Einsatz von Proteinen aus jungen und seneszierenden Primärblättern gefunden werden können, vergleichbar sind. Auf Abbildungen wurde an dieser Stelle deshalb verzichtet.

Ganz andere Ergebnisse zeigten sich, wenn ein Oligonukleotid, das die Kombination aus IR2- und W-Box an der Position -588 bis -618 (entspricht der Base 212 bis 229, siehe Abb. 15) des *HvS40* Promotors einschloss, in Gelretardierungsexperimenten mit Kernproteinen aus unterschiedlich alten Primärblättern eingesetzt wurde.

Kernproteinextrakte aus Primärblättern von 5 Tage alten Pflanzen weisen in Gelretardierungsexperimenten zwei Protein-DNA-Komplexe auf (siehe Abb. 22).

Hingegen kann beobachtet werden, dass sich bei Verwendung von Kernproteinen aus Primärblättern 13 Tage alter Pflanzen, die einen Abfall im Chlorophyllgehalt zeigen und damit den Beginn der Seneszenz repräsentieren, ein im Vergleich zu den Proteinen aus 5 Tage alten Pflanzen zusätzlicher Protein-DNA-Komplex bildet. Dieser zusätzliche Komplex tritt nicht in Primärblättern 11 Tage alter Pflanzen (Daten nicht gezeigt) auf, die den maximalen Chlorophyllgehalt haben. Dieser Komplex scheint über einen langen Zeitraum stabil zu bleiben. In bereits stark seneszierenden Primärblättern von Pflanzen, die 23 Tage alt sind, ist dieser Komplex auch noch zu finden. Verdrängungsreaktionen mit einem Überschuss an nicht radioaktiv markierter unspezifischer und spezifischer DNA zeigen, dass es sich hierbei um einen spezifischen Protein-DNA-Komplex handelt.

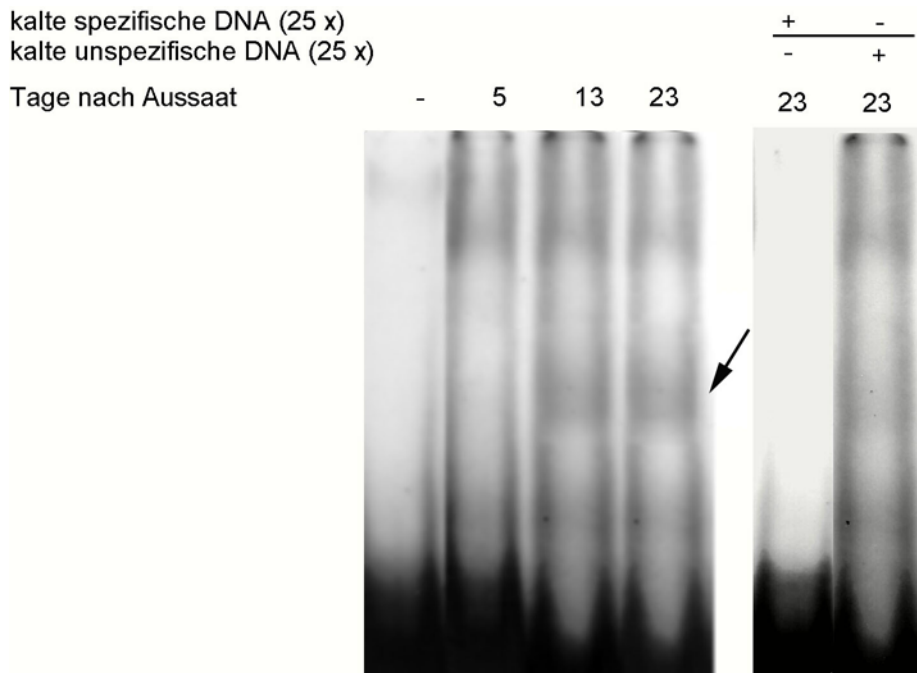


Abb. 22: Gelretardierungsexperimente mit einem Oligonukleotid (*HvS40* WRKY 1 a, siehe 2.4, Tab. 4), das die IR2- und W-Box des *HvS40* Promotors an der Position -588 bis -618 einschließt, und verschiedenen Kernproteinextrakten aus jungen und seneszierenden Primärblättern der Gerste. Die Spezifität der gebildeten DNA-Protein-Komplexe ist exemplarisch durch Verdrängungsreaktionen mit nicht radioaktiv markierter spezifischer und unspezifischer DNA von Kernproteinen aus Primärblättern 23 Tage alter Pflanzen gezeigt. Der Pfeil kennzeichnet den Protein-DNA-Komplex, der ausschließlich mit Kernproteinen aus seneszierenden Primärblättern der Gerste erhalten wird.

Wird ein entsprechender Ansatz mit Kernproteinextrakten aus Primärblättern von Pflanzen, die zwei bzw. vier Tage im Dunkeln standen, durchgeführt, tritt ebenfalls eine zusätzliche Bande auf (siehe Abb. 23).

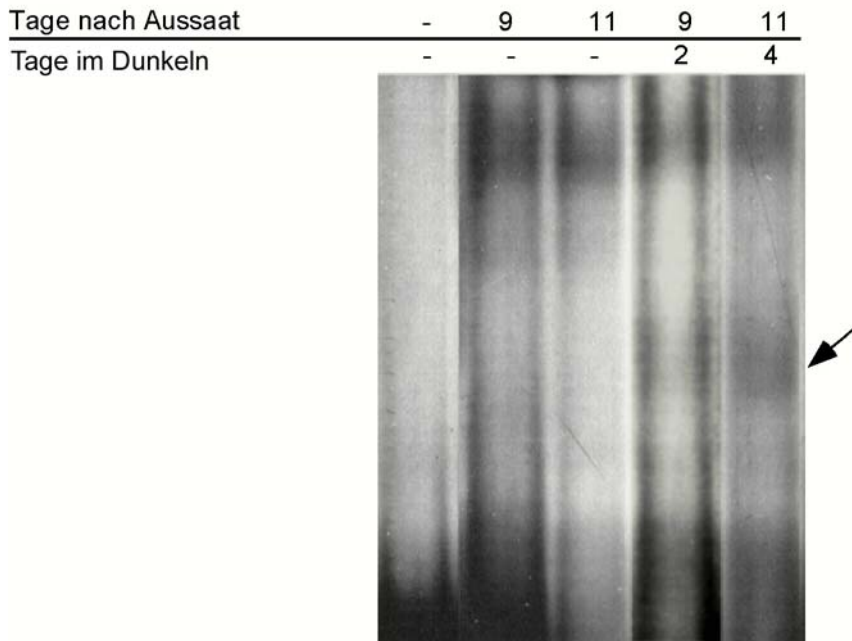


Abb. 23: Gelretardierungsexperimente mit einem Oligonukleotid (*HvS40* WRKY 1 a, siehe 2.4, Tab. 4), das die IR2- und W-Box des *HvS40* Promotors an der Position -588 bis -618 einschließt, und verschiedenen Kernproteinextrakten aus Primärblättern von 5, 9 und 11 Tage alten Pflanzen, die entweder in einem Licht-/Dunkelrhythmus angezogen wurden oder nach einem 7 tägigen Licht-/Dunkelrhythmus für zwei oder vier Tage ins Dunkle gestellt wurden. Der Pfeil kennzeichnet den Protein-DNA-Komplex, der ausschließlich mit Kernproteinen aus seneszierenden Primärblättern der Gerste auftritt.

Die Gelretardierungsexperimente mit dem Oligonukleotid, das die IR2- und W-Box an der Position -588 bis -618 des *HvS40* Promotors einschließt, haben gezeigt, dass es sich hierbei um ein Seneszenz-Element handelt, an das ein oder mehrere neue Proteine während der Seneszenz binden.

Ein ähnlicher Promotorabschnitt, mit der gleichen Reihenfolge und dem gleichen Abstand von 5 Basenpaaren zwischen einer IR2- und W-Box, findet sich im *HvS40* Promotor auch an der Position -376 bis -393 (entspricht der Base 435 bis 452, siehe Abb. 15). Mit diesem Promotorabschnitt, der durch ein 22 Basenpaar großes Oligonukleotid repräsentiert wird, wurden entsprechende Gelretardierungsexperimente wie für das oben beschriebene Oligonukleotid ausgeführt.

In den Gelretardierungsexperimenten mit Kernproteinextrakten aus Primärblättern 5 Tage alter Pflanzen ergaben sich im Unterschied zu den oben beschriebenen Ansätzen drei Protein-DNA-Komplexe (siehe Abb. 24). Konkurrenzexperimente mit nicht radioaktiv markierter spezifischer und unspezifischer DNA zeigten, dass es sich bei allen drei Komplexen um spezifische Interaktionen mit dem eingesetzten Oligonukleotid handelt. Werden hingegen Kernproteinextrakte aus Primärblättern 23 Tage alter

Pflanzen verwendet, die sich in einem fortgeschrittenen Seneszenzstadium befinden, sind nur noch zwei Protein-DNA-Komplexe erkennbar. Der mittlere Komplex, der mit Kernproteinextrakten aus Primärblättern 5 Tage alter Pflanzen in Gelretardierungsexperimenten erhalten wird, kann bei Verwendung von Proteinen aus 23 Tage alter Gerste nicht mehr nachgewiesen werden. Ein schwächeres Signal des mittleren Protein-DNA-Komplexes ist auch im Fall von Kernproteinen aus Primärblättern 13 Tage alter Pflanzen zu beobachten.

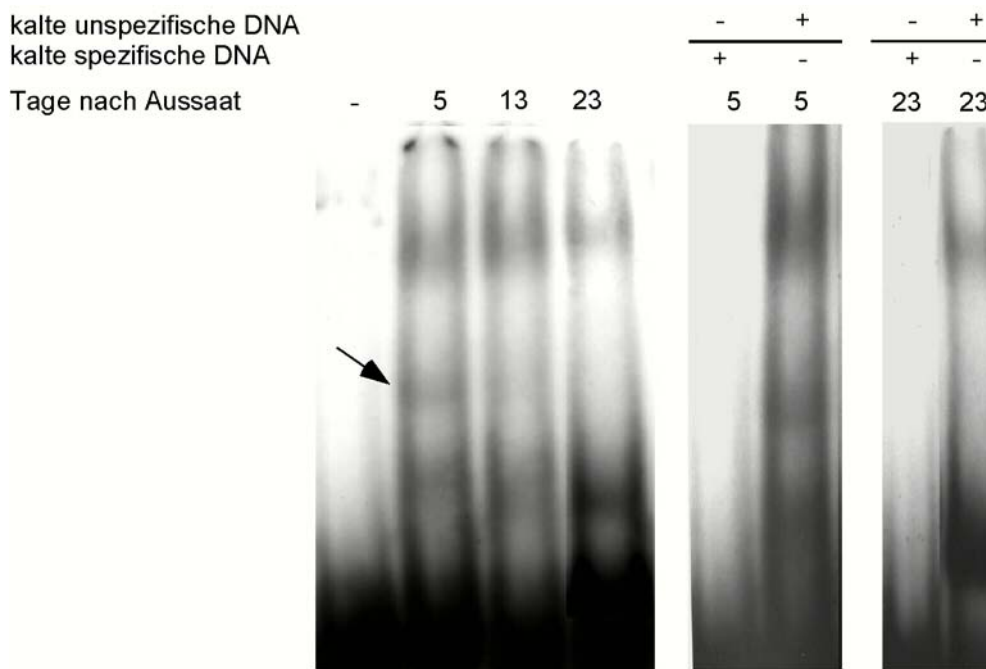


Abb. 24: Gelretardierungsexperimente mit einem Oligonukleotid (*HvS40* WRKY 2, siehe 2.4, Tab. 4), das die IR2- und W-Box des *HvS40* Promotors an der Position -376 bis -393 einschließt, und verschiedenen Kernproteinextrakten aus jungen und seneszierenden Primärblättern der Gerste. Die Spezifität der gebildeten DNA-Protein-Komplexe ist exemplarisch durch Verdrängungsreaktionen mit nicht radioaktiv markierter spezifischer und unspezifischer DNA von Kernproteinen aus Primärblättern 5 und 23 Tage alter Pflanzen gezeigt. Der Pfeil kennzeichnet den Protein-DNA-Komplex, der nur in Kernproteinen aus jungen Primärblättern der Gerste auftritt.

Ähnlich wie die erste Kombination aus IR2- und W-Box Elementen des *HvS40* Promotors zeigt auch der zweite untersuchte Bereich in Gelretardierungsexperimenten mit Kernproteinen aus Primärblättern von Pflanzen, die im Dunkeln standen, unterschiedliche Protein-DNA-Komplexe (Abb. 25). Es können nach zwei- oder viertägiger Dunkelphase von 9 bzw. 11 Tage alten Pflanzen in den Kernproteinen der Primärblätter nur zwei Protein-DNA-Komplexe nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Kernproteinen aus Primärblättern 5 Tage alter Pflanzen fehlt auch hier ein Protein-DNA-Komplex. Verwendet man Kernproteine aus Primärblättern von Gerste, die 9 oder

11 Tage in einem Licht-/Dunkelrhythmus ohne längere Dunkelphase gewachsen sind, zeigen sich aber auch hier nur zwei deutlich erkennbare Protein-DNA-Komplexe (siehe Abb. 25). Das Fehlen des einen Protein-DNA-Komplexes kann deshalb nicht unmittelbar auf die „dunkelinduzierte Seneszenz“ zurückgeführt werden.

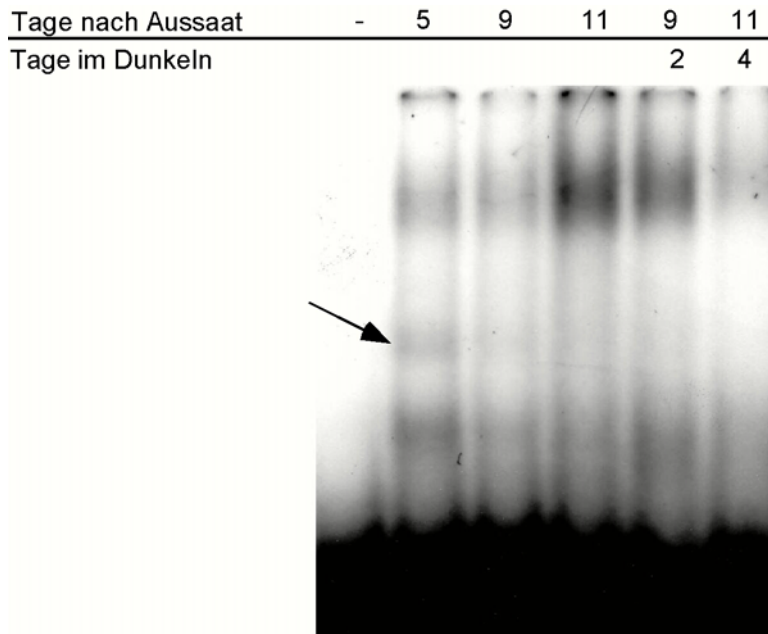


Abb. 25: Gelretardierungsexperimente mit einem Oligonukleotid (*HvS40* WRKY 2, siehe 2.4, Tab. 4), das die IR2- und W-Box des *HvS40* Promotors an der Position –376 bis –393 einschließt, und verschiedenen Kernproteinextrakten von 5, 9 und 11 Tage alten Pflanzen, die entweder in einem Licht-/Dunkelrhythmus angezogen wurden oder nach einem 7 tägigen Licht-/Dunkelrhythmus für zwei oder vier Tage ins Dunkle gestellt wurden. Der Pfeil kennzeichnet den Protein-DNA-Komplex, der deutlich nur in Kernproteinen aus Primärblättern 5 Tage alter Gerste auftritt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch die Untersuchungen mit dem zweiten IR2- und W-Box Motiv, das sich an der Position –376 bis –393 des *HvS40* Promotors befindet, ein weiteres Seneszenz-Element identifiziert wurde. Im Gegensatz zum ersten Motiv an der Position –588 bis –618 zeigte sich in Gelretardierungsexperimenten für das zweite Seneszenz-Element, dass sich ein oder mehrere Proteine vom Promotor des *HvS40* Gens mit Einsetzen der Seneszenz im untersuchten Primärblatt lösen.

Mit den weiteren Untersuchungen zum IR2- und W-Box Motiv an der Position –376 bis –393 des *HvS40* Promotors sollte geklärt werden, an welche Basenpaare des untersuchten Sequenzabschnittes der Protein-DNA-Komplex, der in seneszierenden

Primärblättern nicht nachgewiesen werden kann, bindet. Dafür wurden Oligonukleotide verwendet, die sowohl in der IR2- als auch der W-Box oder nur in einem von beiden Elementen Punktmutationen aufwiesen. Die veränderten Sequenzen sowie das Ergebnis der Gelretardierungsexperimente sind in Abbildung 26 dargestellt.

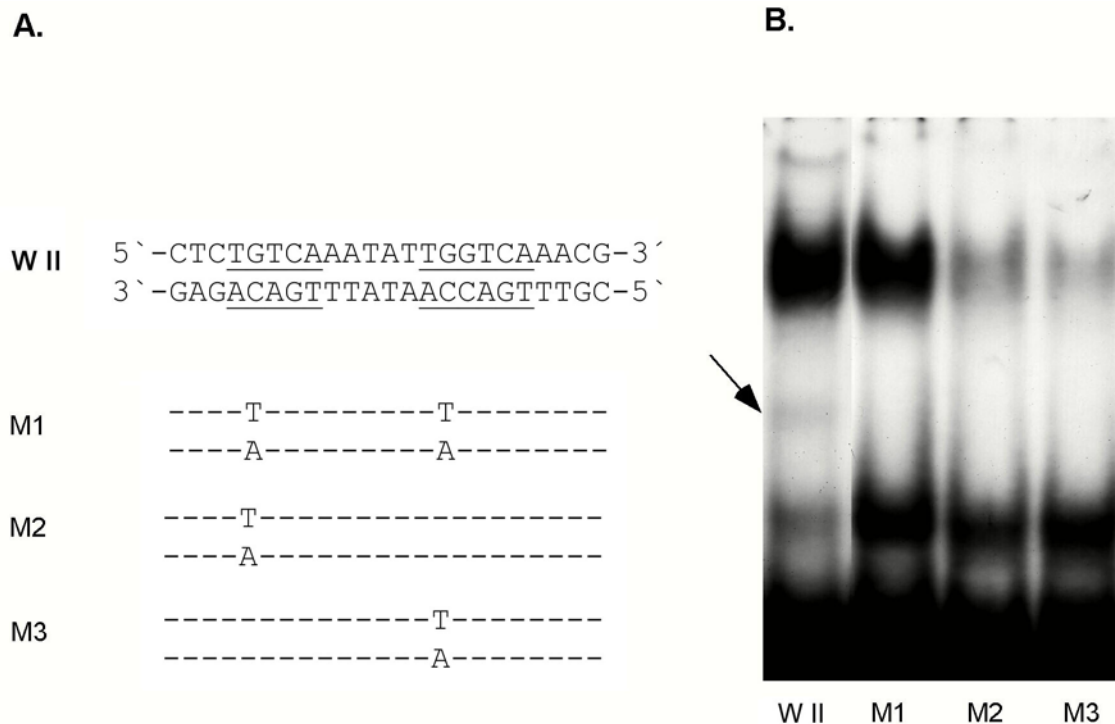


Abb. 26: (A) Sequenz der nicht modifizierten, doppelsträngigen Oligonukleotide des zweiten Seneszenz-Elements (W II) und den eingeführten Punktmutationen in den IR2- und W-Box Elementen. M2 und M3 stellen die doppelsträngige DNA dar, bei der nur eine Base im IR2- oder W-Box Element verändert wurde, während M3 ein Oligonukleotid mit Punktmutationen in beiden Motiven repräsentiert. (B) Gelretardierungsexperimente mit der unveränderten DNA (W II) und den mutierten doppelsträngigen Oligonukleotiden (M1, M2, M3) sowie Kernproteinextrakten von Primärblättern 5 Tage alter Pflanzen.

Es zeigte sich, dass sowohl die Mutationen in beiden Elementen als auch die Mutation in nur einer Box dazu führen, dass der in seneszierenden Primärblättern fehlende Protein-DNA-Komplex nicht mehr nachgewiesen werden kann.

Bisher wurde in den durchgeführten Gelretardierungsexperimenten immer doppelsträngige DNA verwendet. Im nächsten Ansatz wurde getestet, ob einzel- oder doppelsträngige DNA einen Einfluss auf die Ausbildung der Protein-DNA-Komplexe haben. Dazu wurde der kodierende und kodogene Strang jeweils einzeln in ein Gelretardierungsexperiment mit Kernproteinen aus Primärblättern 5 Tage alter Pflanzen eingesetzt (Abb. 27). Interessanterweise zeigen diese Experimente, dass der

kodierende Einzelstrang (W II kodierend) wie der Doppelstrang (W II kodierend + kodogen) alle 3 Protein-DNA-Komplexe ausbilden kann. Auffällig ist aber, dass die Bildung des größten Protein-DNA-Komplexes schwächer ausgeprägt ist als bei Verwendung von doppelsträngiger DNA. Mit dem kodogenen Strang (W II kodogen) werden im Gegensatz zum kodierenden Strang nur zwei Protein-Komplexe erhalten. Der zweite Komplex, der auch mit Kernproteinextrakten aus seneszierenden Primärblättern und bei Ansatz von mutierten Oligonukleotiden fehlt, kann auch bei Verwendung des kodogenen Stranges nicht ausgebildet werden.

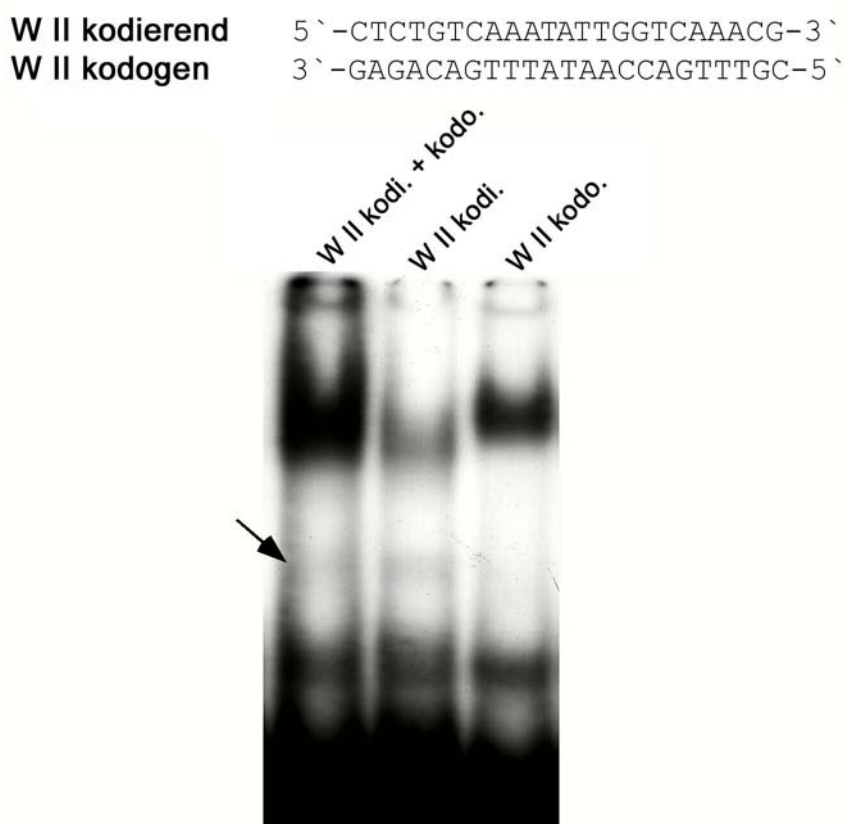


Abb. 27: Gelretardierungsexperimente mit der unveränderten doppelsträngigen DNA (W II kodierend + kodogen) und den jeweiligen Einzelsträngen (W II kodierend und W II kodogen) und Kernproteinen, aus Primärblättern 5 Tage alter Pflanzen.

Zusammenfassend haben die Gelretardierungsexperimente mit dem *HvS40* Promotor zwei Seneszenz-Elemente identifiziert, die beide in gleicher Reihenfolge und mit gleichem Abstand von 5 Basenpaaren eine IR2- und eine W-Box besitzen. Während im Fall des ersten Elements mit Einsetzen der Seneszenz ein zusätzlicher Protein-DNA-Komplex auftritt, ist im Fall des zweiten Elements eine Ablösung eines solchen Komplexes zu beobachten.

Im Fall des näher analysierten zweiten Seneszenz-Elements sind an der Bildung des Proteinkomplexes, der mit Einsetzen der Blattalterung nicht mehr nachweisbar ist, sowohl die IR2- als auch die W-Box beteiligt. Es kommt zur Ausbildung dieses Komplexes im zweiten Seneszenz-Element sowohl mit doppelsträngiger DNA als auch mit einzelsträngiger DNA des kodierenden Strangs.

3.3 Isolierung und Identifikation von Transkriptionsfaktoren

3.3.1 Isolierung

Um ein an ein Seneszenz-Element bindendes Protein zu identifizieren, wurde das zweite identifizierte Seneszenz-Element des *HvS40* Promotors ausgewählt. Die Isolierung eines DNA-bindenden Proteins erfolgte durch die Anwendung des bereits in den Gelretardierungsexperimenten verwendeten Oligonukleotids, das den nichtmodifizierten kodierenden Strang des zweiten Seneszenz-Elements repräsentiert (W II kodierend, siehe Abb. 27). Dieses Oligonukleotid wurde am 5' Ende biotinyliert und anschließend an den zugehörigen Gegenstrang (W II kodogen, siehe Abb. 27) hybridisiert. Die durch die Hybridisierung entstandene biotinylierte doppelsträngige DNA wurde zu Streptavidin gekoppelten paramagnetischen Kugeln gegeben (siehe Abb. 28 A), die durch die Reaktion des Biotins mit dem Streptavidin an die DNA binden. Die so entstandene DNA-Matrix, die aufgrund der paramagnetischen Kugeln von einem Magneten angezogen werden kann, wurde unter gleichen Bedingungen wie in den Gelretardierungsexperimenten mit Kernproteinen aus Primärblättern 5 Tage alter Pflanzen inkubiert. Nach Inkubation der DNA-Matrix mit den Kernproteinen wurde unter Einsatz eines Magneten aus den gesamten Kernproteinen nur die an die DNA-Matrix bindenden Proteine angezogen (siehe Abb. 28 B). Durch mehrmaliges Waschen der DNA-Matrix mit dem Bindungspuffer (siehe 2.11) wurden anschließend die unspezifisch bindenden Proteine von der DNA-Matrix abgetrennt. Die Elution der gebundenen Proteine von der DNA-Matrix erfolgte nach dem Waschen durch Zugabe eines SDS-haltigen Puffers und Erhitzen der DNA-Matrix für 10 min auf 65°C (siehe 2.11).

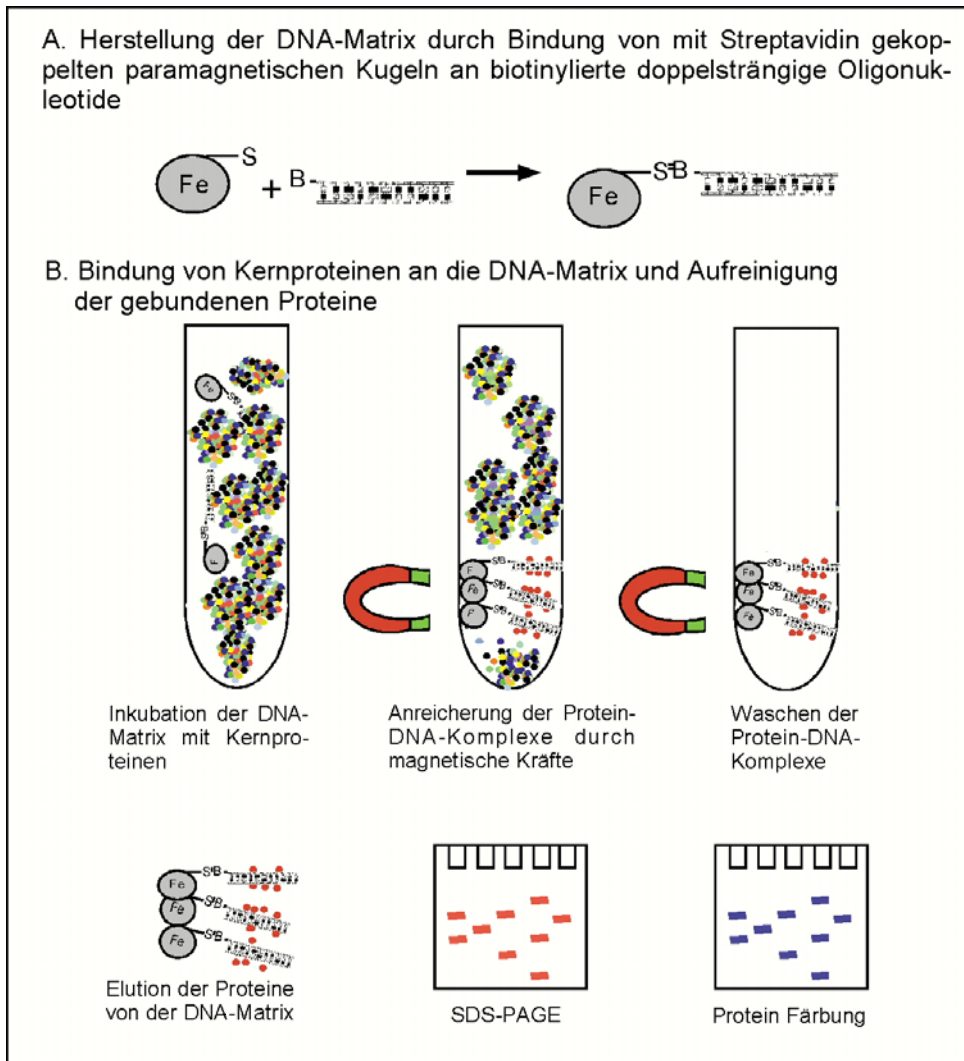


Abb. 28: Schematische Darstellung der Methode zur Reinigung von DNA-bindenden Proteinen.

(A) Kopplung von Streptavidin Magnetkugeln an ein biotinyliertes Oligonukleotid.

(B) Schema der Methode zur Anreicherung von DNA-bindender Proteine.

Besonders interessant bei der Isolierung der an das zweite Seneszenz-Element bindenden Proteine, ist das Protein (Proteine), das (die) sich in seneszierenden Primärblättern von der Promotor-DNA des *HvS40* Gens löst (lösen).

Um die oder dieses von den anderen DNA bindenden Proteinen unterscheiden zu können, wurde als Kontrolle zu der beschriebenen DNA-Affinitätschromatographie der gleiche experimentelle Ansatz mit der doppelsträngigen DNA, die sowohl im IR2- als auch im W-Box Element eine Mutation aufweist (M1 siehe Abb. 26), durchgeführt. Da diese DNA-Sequenz mit Kernproteinen aus Primärblättern 5 Tage alter Pflanzen genau den Proteinkomplex nicht ausbilden kann, der auch bei Verwendung der unmodifizierten DNA mit Kernproteinen aus seneszierenden Primärblättern nicht nachgewiesen werden

kann, eignet sich diese DNA zur Identifikation des oder der gesuchten Proteins (Proteine).

Als weitere Kontrollen für die DNA-Affinitätschromatographie wurden beide verwendeten DNA-Matrizen jeweils auch ohne Zugabe von Kernproteinen eingesetzt. Entsprechend den Ansätzen, in denen Kernproteine enthalten waren, wurden auch die Überstände dieser Proben nach Behandlung der DNA-Matrizen mit dem SDS-haltigen Puffer erhitzt (s.o.) und abgenommen.

Im weiteren wurden die Eluate aus allen vier Versuchsansätzen durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Das Ergebnis ist in Abbildung 29 dargestellt.

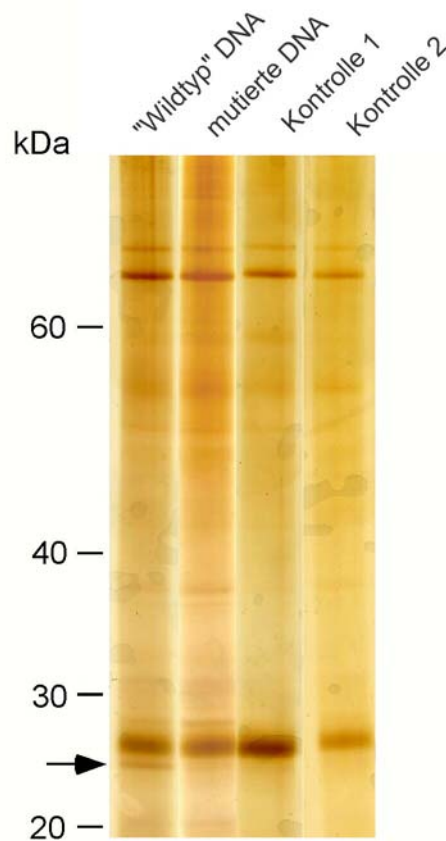


Abb. 29: SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung der an die unmodifizierte („Wildtyp“ DNA) und mutierte DNA bindenden Proteine. Als Kontrollen wurden sowohl die nicht modifizierte (Kontrolle 1) und die mutierte DNA-Matrix (Kontrolle 2) ohne Kernproteinextrakte eingesetzt. Der Pfeil kennzeichnet ein Protein, das ausschließlich in der „Wildtyp“ DNA-Matrix vorkommt.

Die Bandenmuster der eingesetzten Proben zeigen auf den ersten Blick ein weitgehend identisches Muster der „Wildtyp“ und der mutierten DNA-Matrix. Erstaunlicherweise haben auch die verwendeten Kontrollen, denen gar keine Kernproteinextrakte zugefügt

wurden, ein ähnliches Bandenmuster. Bei den meisten Banden kann es sich demnach nicht um Proteine handeln, sondern um Nukleinsäuren, Detergenzien und andere Stoffe, die auch mittels Silberfärbung angefärbt werden.

Vergleicht man die Bandenmuster, die sich nach der Elution von der „Wildtyp“ und der mutierten DNA-Matrix zeigen, etwas genauer, so fällt auf, dass es eine einzige Bande bei 25 kDa gibt, die ausschließlich in der Spur der unveränderten DNA vorkommt. Da diese Bande auch in den Kontrollen nicht zu finden ist, könnte sie den gesuchten Transkriptionsfaktor darstellen, der mit Einsetzen der Seneszenz vom zweiten Seneszenz-Element abfällt.

In weiteren Untersuchungen sollte nun versucht werden, dieses Protein so stark anzureichern, dass genügend Material für seine Identifikation mittels Massenspektroskopie zur Verfügung steht.

3.3.2 Identifikation

Für die Identifikation des möglichen Transkriptionsfaktors war es notwendig, die Affinitätschromatographie so oft zu wiederholen, dass eine Färbung der Proteine mit dem Farbstoff Coomassie, die im Vergleich zur Silberfärbung eine deutlich verminderte Sensitivität besitzt, möglich ist. Die Affinitätschromatographie wurde deshalb 30 mal mit der DNA-Matrix, die der Originalsequenz des zweiten Seneszenz-Elements entspricht, wiederholt. Für diese Ansätze wurden aus 5 kg Primärblättern von 5 Tage alten Gerstenpflanzen Kernproteinextrakte hergestellt. Diese Kernproteine wurden in 30 parallelen Ansätzen mit der DNA-Matrix inkubiert. Das weitere methodische Vorgehen erfolgte wie zuvor beschrieben. Nach Elution der Proteine von der Matrix wurden alle Proteinfraktionen vereint und über Nacht gefällt. Die gefällten Proteine wurden im weiteren auf einem denaturierendem SDS-haltigen Acrylamidgel aufgetrennt und mit dem Farbstoff Coomassie angefärbt. Da dieser Farbstoff im Vergleich zur Silberfärbung ausschließlich Proteine anfärbt, zeigte sich nach der Coomassiefärbung auch ein etwas anderes Bandenmuster. Einige Banden findet man mit beiden Färbungen, andere ausschließlich mit der Silberfärbung (siehe Abb. 30). Eine Bande, die mit beiden Färbemethoden färbbar ist und damit eindeutig als Protein angesprochen werden kann, ist genau die Bande bei 25 kDa, die mit der mehrfach ausgeführten DNA-Affinitätschromatographie angereichert werden konnte.

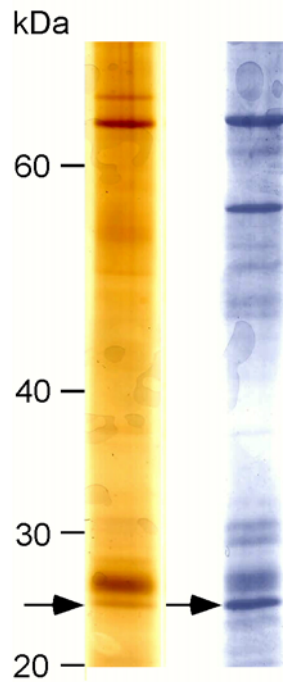


Abb. 30: Anreicherung von an die „Wildtyp“ DNA-Matrix bindenden Proteinen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch eine SDS-PAGE, der Nachweis durch die Färbung mit Coomassie.

Zum Vergleich der Elutionsprofile der Silber- und Coomassiefärbung sind beide Gele nebeneinander abgebildet. Links ist die Silberfärbung, rechts ist das mit Coomassie angefärbte Gel abgebildet, auf dem die 30-fach aufkonzentrierte Menge an DNA-Bindeproteinen zu sehen sind. Beide Gele zeigen ein mit einem Pfeil gekennzeichnetes Protein bei 25 kDa.

Diese Bande wurde aus dem mit Coomassie gefärbten Gel ausgeschnitten und im weiteren mit Trypsin verdaut. Durch die Trypsinbehandlung wurde das Protein in Peptide unterschiedlicher Größe gespalten, die dann mittels Nano-Elektrospray-Massenspektroskopie (Nano-ESI-MS/MS) analysiert wurden. Bei dieser Methode werden Peptide mit Hilfe einer Kapillarströmung, die aus Stickstoff und der Peptidlösung besteht, desolvatisiert und ionisiert. Die Auftrennung und Identifikation der Peptidfragmente erfolgte durch die Kombination von zwei Massenspektrometern (MS/MS). Das dabei gewonnene Massenspektrum wurde in der ersten Datenbankanalyse auf Übereinstimmung mit bekannten Aminosäuresequenzmustern überprüft. Dem ersten analysierten Peptidfragment konnte eine vorläufige Aminosäuresequenz von 21 Aminosäuren zugeordnet werden (siehe Tab. 7). Mit der Teilsequenz LESGAYK aus diesen 21 Aminosäuren des identifizierten Peptids wurde dann in einer zweiten Datenbankanalyse nach Homologien zu bereits bekannten Proteinen gesucht. Signifikante Homologien zu dieser Teilsequenz zeigte ein Bereich

des als p24 beschriebenen Transkriptionsfaktors der Kartoffel. Um weitere Hinweise zu erhalten, ob es sich bei dem identifizierten Protein um das p24 Protein handeln könnte, wurden zwei weitere Peptidfragmente mittels Nano-ESI-MS/MS analysiert. Die weiter analysierten Peptidfragmente enthielten 15 bzw. 14 Aminosäuren (siehe Tab. 7).

Tab. 7: Aminosäuresequenz der identifizierten Peptide.

Peptidfragmente	Aminosäuresequenz
I	AALAFDPILPLFVPLESGAYK
II	EGSVMLQFAPAVGPR
III	LLNVDENIYIPITK

Mit einer Teilsequenz von 6 Aminosäuren aus beiden Peptiden wurde nochmals überprüft, ob auch diese Bereiche Homologien zum p24 Protein der Kartoffel aufweisen. Ebenso wie die zuerst analysierte Teilsequenz zeigten auch diese beiden Bereiche große Homologien zum p24 Protein der Kartoffel. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass der identifizierte Transkriptionsfaktor ein zum p24 homologes Protein der Gerste darstellt.

3.3.3 Analyse der Aminosäuresequenz des identifizierten Transkriptionsfaktors

Um weitere Untersuchungen mit dem aus Gerste isolierten Transkriptionsfaktor machen zu können, ist es wichtig, die vollständige cDNA Sequenz zu ermitteln. Dieses kann durch verschiedene methodische Ansätze erfolgen. Eine Möglichkeit, die cDNA Sequenz des identifizierten Transkriptionsfaktors aus Gerste zu erhalten, ist der Vergleich der Kartoffel Sequenz mit der EST (*expressed sequence tag*) Datenbank der Gerste. Vergleicht man die Aminosäuresequenz des p24 der Kartoffel mit allen möglichen 6 Leserahmen der EST Sequenzen der Gerste, so findet man eine Sequenz (EST Name HvsMEb0004N22f, GenBank Acc. BF627441) mit hoher Homologie zum p24.

Der Vergleich der Aminosäuren des ESTs aus Gerste mit der Kartoffelsequenz und den bereits bekannten Sequenzen aus Mais und Arabidopsis ist in Abbildung 31 dargestellt. Es zeigt sich, dass die Sequenzen von Gerste und Mais mit wenigen Ausnahmen identisch sind. Da das isolierte Protein der Gerste eine vergleichbare Größe von 25 kDa

wie das Protein aus Mais zeigt, kann davon ausgegangen werden, dass der identifizierte EST die komplette cDNA Sequenz des p24 aus Gerste darstellt.

Der Sequenzvergleich zeigt darüber hinaus, dass nicht nur die Sequenzen der beiden monokotylen Arten, sondern auch die der beiden dikotylen Arten, Kartoffel und Arabidopsis, untereinander jeweils eine größere Homologie zeigen. Auffällig ist, dass die p24 Proteine aus Kartoffel und Arabidopsis gegenüber den monokotylen Arten eine Verlängerung am N-Terminus aufweisen.

Gerste	1	-----MLRLSR-----FLPSTSTSRGV
Mais	1	-----MLRLSR-----FLPSACRRG--
Arabidopsis	1	--MSQLLSTPLMAVNSNPRFLSSSSVILVTGG----FAVKRHG----FALKPTTKIVKL
Kartoffel	1	MSNFSLSPSPTSGFSLNLQNPTKTSYLSFSSSINTIFAPLSSNTTKSFSGLTHKAALPRN
Peptid 1		
Gerste	18	TGLKDALWGSGLTFKHALSTSAANVDENASAKKFASYTVFKGKAALSTSPILPLFTKLES
Mais	16	FDLKEESLWGSGLTFQQAVSTAATNLDGNLSGKKFASYTVFKGKAALSIHPILPSFSKLES
Arabidopsis	49	FSVKSQRQTDYFEKQRFQDSSSSPSPAEGLPARFYVGHSIYKGAALTVDPRAPEFVALDS
Kartoffel	61	LSLTCRHSDYFEPQQQ-QQQQQQPPQGASTPKVFEVGYSIYKGAALTVBPRSPPEFSPLDS
Peptid 2		
Gerste	78	GGSRVNRNGSVMLTFFPAVGQRKYDYTKKQLFALSPTFVGLISLGPAESCEFFHDPFSMK
Mais	76	GGSRVSKNGSVMLTFFPAVGQRKYDYTKKQLFALSPTFVGLISLGPAESCEFFHDPFSMK
Arabidopsis	109	GAFKLSKDGFLLLQFAPSAGVROYDWSKKQVFSLSVTEIGTLVSLGPRESCEFFHDPFKG
Kartoffel	120	GAFKLSREGMVMLQFAPAAGVROYDWSRKQVFSLSVTEIGSTIISLGAKDSCEFFHDPNKG
Peptid 3		
Gerste	138	SSHEGQVKKSL SITPLGSDNGYFVNITVLNNVQKTNERLSVPVTKAEFAVMRITLSFALP
Mais	136	SSNEGTVKKSL SITPLGSDSGYFVNITVVNSAERTNDRLSVPI TKAEFAVIRITLSFALP
Arabidopsis	169	KSDEGKVRKVLKVEEPLPDGSGHFFNLSVQNKLVNVDESIYIPITRAEFVILISAFNFVLP
Kartoffel	180	RSDEGRVRKVLKVEEPLPDGSGHFFNLSVQNKLINLDENIYIPVTKAEFAVILVSAFNFVMP
Gerste	198	HIMGWDQALSTHX-QSAPTSASKPRVERPNPDSEWDR
Mais	196	HIMGWDQALTNHHPAPAPPASSRPTVERPHPDSEWER
Arabidopsis	229	YLIGWHAFANSIK--PEETS RVNNASPNYGGDYEWNR
Kartoffel	240	YLLGWHTAVNSFK-PEDASRSNNANPRSGAELEWNR

Abb. 31: Vergleich der Aminosäuresequenzen des p24 Transkriptionsfaktors aus Kartoffel mit den homologen Proteinen aus Arabidopsis, Mais und dem EST der Gerste. Findet sich außer in Gerste noch in mindestens einem weiteren Protein an gleicher Position dieselbe Aminosäure, sind die identischen Aminosäuren schwarz unterlegt. Handelt es sich nur um ähnliche Aminosäuren an gleicher Position, sind diese grau unterlegt. Das Sequenzmotiv KGKAAL und SCEFFHPD, das in allen vier verglichenen Proteinen vorkommt, ist unterstrichen. Die für die Sequenzanalyse eingereichten Peptide sind angegeben.

Eine besonders gute Übereinstimmung zwischen dem Gerstenprotein und den anderen Proteinen zeigt sich im Bereich zwischen der 58. und 205. Aminosäure. Dort befindet

sich auch das Sequenzmotiv KGKAAL, das in allen vier Pflanzen vorkommt. Ein weiteres zwischen den Arten komplett konserviertes Motiv mit der Aminosäureabfolge SCEFFHPD findet sich weiter stromabwärts.

Einmalig und sehr auffällig an der Kartoffelsequenz ist eine Wiederholung der Aminosäure Glutamin (Q) am N-Terminus. Diese an Glutaminen reiche Region findet sich weder in Arabidopsis noch in Mais oder in Gerste.

3.4 Untersuchungen zur Lokalisierung des HvS40 Proteins

Um mögliche Hinweise auf die Lokalisierung des *HvS40* Proteins während der Seneszenz zu bekommen, wurden Primärblätter verschiedener Seneszenzstadien mittels Hochdruckgefrieretechnik cryoimmobilisiert und anschließend bei tiefen Temperaturen entwässert und eingebettet. Die ausgewählten Seneszenzstadien (Versuchstag 11, 13, 23 und 27) entsprechen dabei denen, die auch für die Durchführung von Gelretardierungsexperimenten (vgl. 3.2.4) und *Northern Blot* Analysen (vgl. 3.1.4.2, 3.1.4.3) verwendet wurden.

3.4.1 Beschreibung von ultrastrukturellen Veränderungen in Primärblättern während der Seneszenz

Die untersuchten Primärblätter zeigen die für die Seneszenz typischen ultrastrukturellen Veränderungen. Dabei fällt in den untersuchten seneszierenden Primärblättern auf, dass die Seneszenz in verschiedenen Blattregionen unterschiedlich weit fortgeschritten ist. So kann man beispielsweise in einem Primärblattquerschnitt einer 27 Tage alten Pflanze, die sich bereits in einem sehr weit fortgeschrittenen Seneszenzstadium befindet, Mesophyllzellen sehen, die im Gegensatz zu denen eines jungen Blattes, stark vergrößert sind und nur noch rudimentär Reste einer Zellkompartimentierung erkennen lassen (Abb. 32 c). Diese beschriebenen Mesophyllzellen befinden sich in den Bereichen zwischen den Leitgeweben. Unmittelbar in der Nähe des Leitgewebes kann man beobachten, dass die Mesophyllzellen noch eine klare Zellkompartimentierung zeigen (Abb. 32 a, b Zelle 2). Kompartimente, wie Chloroplasten und der Zellkern, sind in diesen Mesophyllzellen in ihrer bekannten Struktur vorhanden (Abb. 32 b, Chloroplast 1 und 2). In den benachbarten Mesophyllzellen (z. B. Zelle 3, Abb. 32 a) zeigt sich bereits eine deutlich veränderte Feinstruktur. Die Kompartimentierung der Zellen geht verloren, die Chloroplasten zeigen deutliche Auflösungserscheinungen (Abb. 32 a, Zelle 3, bzw. Abb. 32 b, Chloroplast 3). Im Zellkern kann eine stärkere Kondensierung des Chromatins, sowie ein starkes Schrumpfen und eine Wanderung von der Zellwand zur Zellmitte beobachtet werden (Abb. 32 a, Zelle 3).

Aufgrund der geschilderten strukturellen Variabilität der Proben wurde für die Beschreibung der ultrastrukturellen Veränderungen der Mesophyllzellen in

Primärblättern 11, 13, 23 und 27 Tage alter Pflanzen diejenigen Zellen ausgewählt, die sich in der Nähe des Leitgewebes befanden (wie z.B. Zelle 1 und 2 in Abb. 32 a).

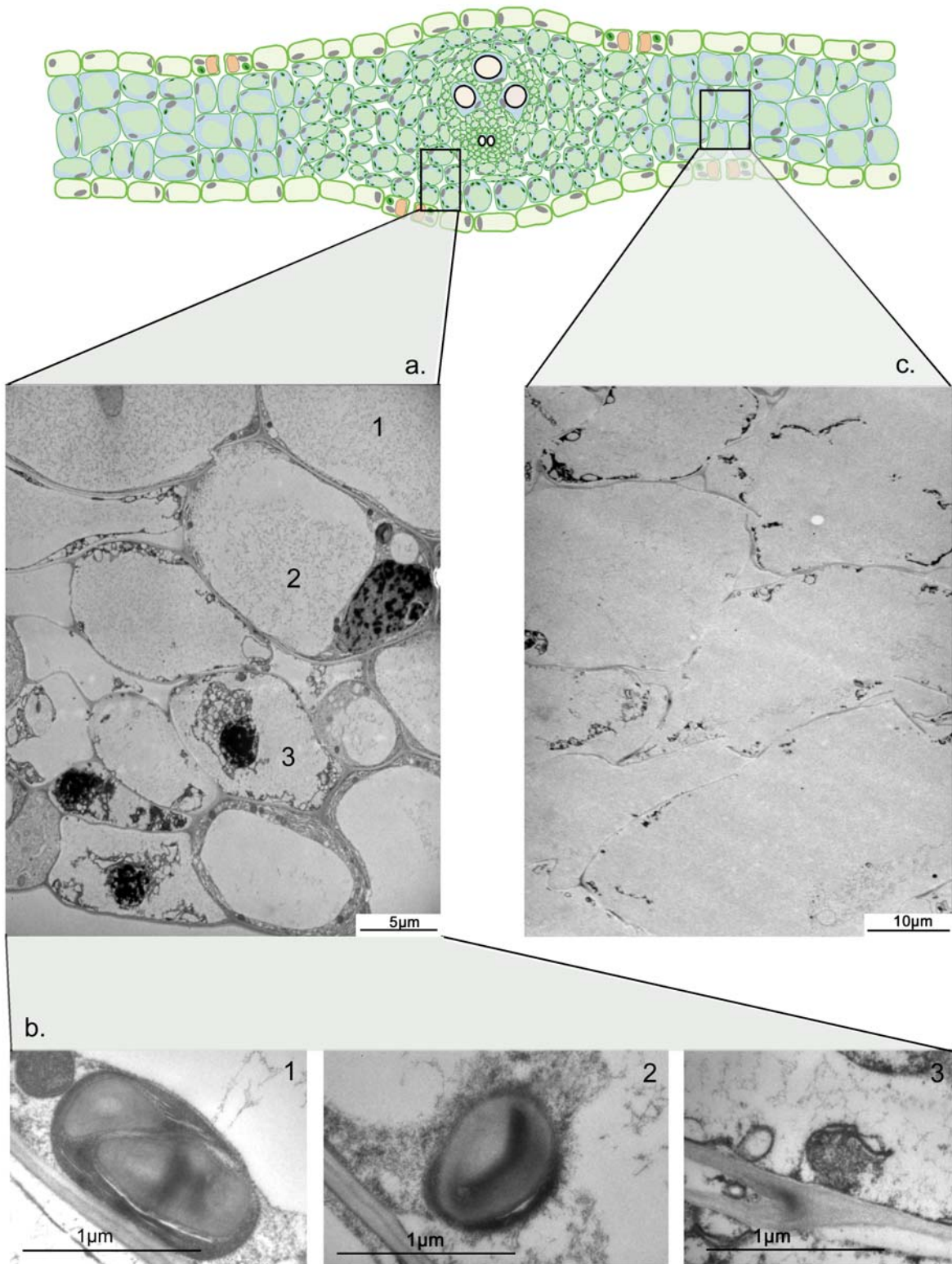


Abb. 32: Übersicht über einen Blattquerschnitt eines Gerstenprimärblattes einer 27 Tage alten Pflanze. In a. ist eine Ausschnittvergrößerung des Mesophyllgewebes in der Nähe des Leitgewebes gezeigt. Die Zahlen 1-3 markieren drei verschiedene Zellen aus dieser Region. In b. ist jeweils ein Chloroplast aus den Zellen 1-3 gezeigt. In c. ist ein Überblick über distal zum Leitgewebe gelegenes Mesophyllgewebe gegeben.

Auch wenn bekannt ist, dass diese Mesophyllzellen eine verzögerte Seneszenz zeigen (Inada *et al.* 1999), so war es nur in dieser Region möglich, die ultrastrukturellen Veränderungen der Mesophyllzellen reproduzierbar in den verschiedenen Entwicklungsstadien zu beschreiben.

Schon der makroskopische Vergleich der Mesophyllzellen nicht seneszierender Primärblätter (11 Tage alte Pflanzen) mit denen, die sich am Anfang (13 Tage alte Pflanzen) und in der vollen Seneszenz (23 Tage alte Pflanzen) befinden, zeigt, dass das Zellvolumen zunimmt. Im Gegensatz dazu kann in Primärblättern, die nur noch ein Drittel des Ausgangschlorophyllgehaltes enthalten (27 Tage alte Pflanzen), beobachtet werden, dass sich das Zellvolumen wieder verkleinert und vergleichbar mit dem Ausgangsstadium ist. Zudem kann in allen seneszierenden Primärblättern eine deutliche Reduktion der Chloroplastenanzahl beobachtet werden. Während Primärblätter 11 Tage alter Pflanzen viele Chloroplasten zeigen, sind diese Zellorganellen in Blättern aus 27 Tage alten Pflanzen kaum noch zu sehen (Abb. 33, a-d). Nicht nur die Plastidenanzahl verringert sich, sondern auch die Größe und Struktur der Chloroplasten (siehe Abb. 33, e-h). Dabei kann eine deutliche Veränderung der Chloroplastenzahl von Primärblättern 13 Tage zu 27 Tage alten Pflanzen festgestellt werden. Während Chloroplasten aus Primärblättern 11 und 13 Tage alter Gerste eine typische ellipsoide Form besitzen, haben die Plastiden aus Primärblättern 23 und 27 Tage alter Pflanzen eine kugelförmigere Gestalt. Das Volumen der Chloroplasten nimmt von 13 bis zu 23 Tage alten Pflanzen um die Hälfte ab. Während Chloroplasten aus Primärblättern 11 und 13 Tage alter Gerste eine Länge von ca. 2,6 μm besitzen, haben die Chloroplasten in Primärblättern aus 23 und 27 Tage alten Pflanzen nur noch einen Durchmesser von 1,3 μm . Eine deutliche Veränderung zeigen auch die Stroma- und Granathylakoide der Chloroplasten. Chloroplasten aus Primärblättern 11 und 13 Tage alter Pflanzen weisen die bekannte Struktur von Grana- und Stromathylakoidmembranen auf (Abb. 33, e-f). In Chloroplasten aus Primärblättern 23 Tage alter Gerste ist bereits der Abbau der Membransysteme deutlich zu erkennen (Abb. 33, g). In Primärblättern aus 27 Tage alten Pflanzen sind die Membransysteme von Grana- und Stromathylakoidmembranen kaum noch erkennbar (Abb. 33, h). Neben den Chloroplasten zeigt auch der Zellkern eine Veränderung bei Einsetzen der Seneszenz. Während er in Primärblättern aus 11 und 13 Tage alten Pflanzen stets wandständig zu finden ist, kann in 23 und 27 Tage alten Pflanzen beobachtet werden, dass dieser in einigen Mesophyllzellen in die Zellmitte wandert.

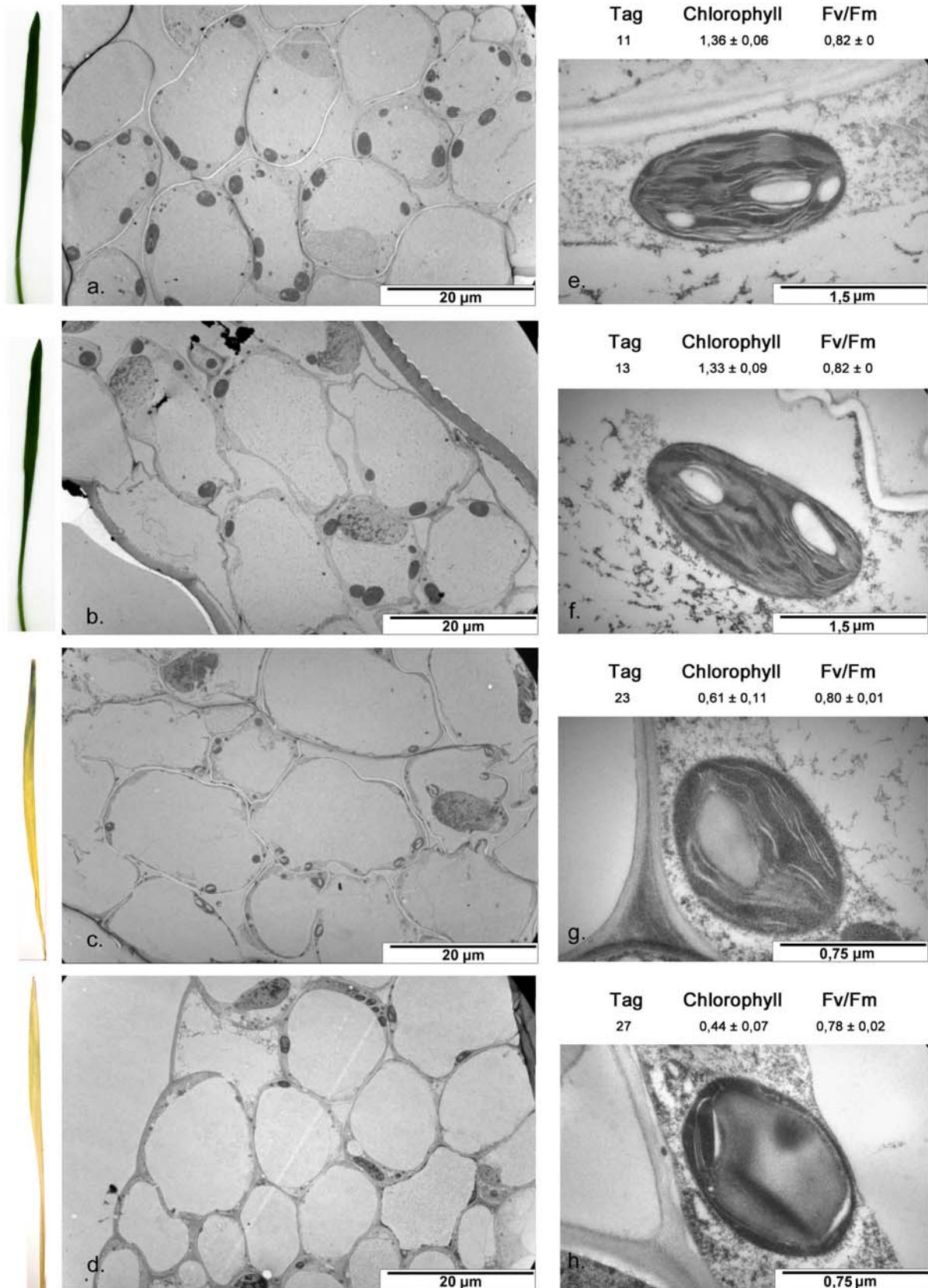


Abb. 33: TEM Untersuchung von Ultradünnschnitten aus Primärblättern 11, 13, 23 und 27 Tage alter Pflanzen der Gerste. In a-d sind jeweils Übersichten des Mesophyllgewebes der untersuchten Entwicklungsstadien gezeigt, während in e-h ein Chloroplast des entsprechenden Stadiums abgebildet ist.

3.4.2 Immunlokalisierung des HvS40 Proteins während der Seneszenz

Für die Immunlokalisation des HvS40 Proteins während der Seneszenz wurden ebenfalls Ultradünnschnitte, deren Ultrastruktur im vorangegangenen Kapitel beschrieben wurde, verwendet.

Für die Immunlokalisation des HvS40 Proteins wurde der gereinigte HvS40-Antikörper zur Markierung an Ultradünnschnitten von Primärblättern 11, 13, 23 und 27 Tage alter Pflanzen verwendet. Die Visualisierung der HvS40 Antigen/Antikörper-Bindung erfolgte durch Verwendung eines zweiten Antikörpers, der mit kolloidalem Gold (10 nm) konjugiert ist. Mit Hilfe des Goldes kann im TEM der HvS40 Antigen/Antikörper-Komplex sichtbar gemacht werden.

Nur in den Primärblättern der 27 Tage alten Gerste konnte das HvS40 Proteins durch Immunmarkierung nachgewiesen werden, während in den Primärblättern 11, 13 und 23 Tage alter Pflanzen keine signifikante Markierung nachweisbar war (Daten nicht gezeigt).

Die meisten Markierungen des HvS40 Proteins befinden sich im Zellkern. Dort sind häufig Cluster von Goldpartikeln zu finden, die an die elektronendichteren Strukturen im Kern angelagert sind (Pfeile in Abb. 34 b). Das HvS40 Protein konnte zudem im Cytoplasma der Mesophyllzellen lokalisiert werden (Abb. 34 a). Auch im intranukleären Spalt sowie an den Kernporen kann das Protein mittels der Immunmarkierung nachgewiesen werden (Pfeil in Abb. 34 a). In den Chloroplasten wurde keine Markierung des HvS40 Proteins erhalten.

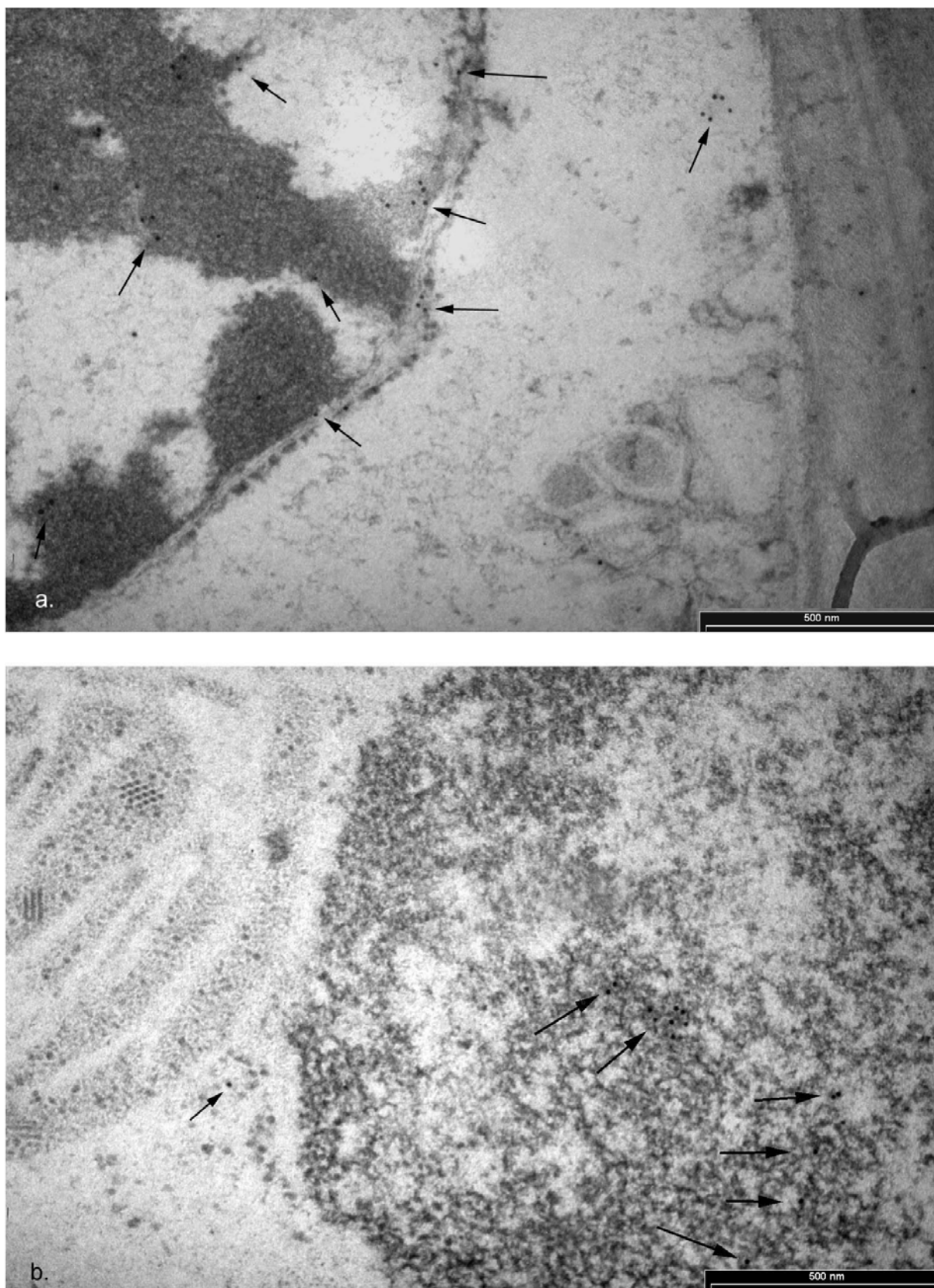


Abb. 34: Immunmarkierung des HvS40 Proteins in Ultradünnschnitten eines Primärblattes einer 27 Tage alten Gerstenpflanze. In a. sind Teile des Zellkerns und des Cytoplasmas zu sehen, während in b. ein Chloroplast in unmittelbarer Nachbarschaft zum Zellkern gezeigt ist. Die eingezeichneten Pfeile lokalisieren das markierte HvS40 Protein.

Da gezeigt werden konnte, dass das HvS40 Protein im Kern lokalisiert ist, sollte durch Doppelmarkierungen mit dem HvS40-Antikörper und einem DNA-Antikörper überprüft werden, ob das HvS40 Protein im Zellkern mit DNA kolokalisiert. Zur Unterscheidung beider Antikörper im TEM wurden unterschiedliche Goldgrößen verwendet. Während der HvS40-Antikörper mit einem sekundären Gold-Antikörper mit einer Goldgröße von 10 nm (schwarze Pfeile, siehe Abb. 35) gekoppelt ist, wird der DNA-Antikörper mit einem sekundären Antikörper mit einer Goldgröße von 15 nm (weiße Pfeile, siehe Abb. 35) detektiert. Das Ergebnis der Doppelmarkierung ist in Abbildung 35 zu sehen. Eine Kolokalisation zwischen dem DNA-Antikörper und dem HvS40 Protein kann nicht gezeigt werden. Die verschiedenen Goldpartikel liegen nie direkt nebeneinander vor. Markierungen des DNA-Antikörpers können sowohl im Heterochromatin, dem elektronendichteren Material des Zellkerns als auch im Euchromatin beobachtet werden. Hingegen zeigen die Markierungen des HvS40-Antikörpers eine Lokalisation des HvS40 Proteins fast ausschließlich im Heterochromatin des Zellkerns.

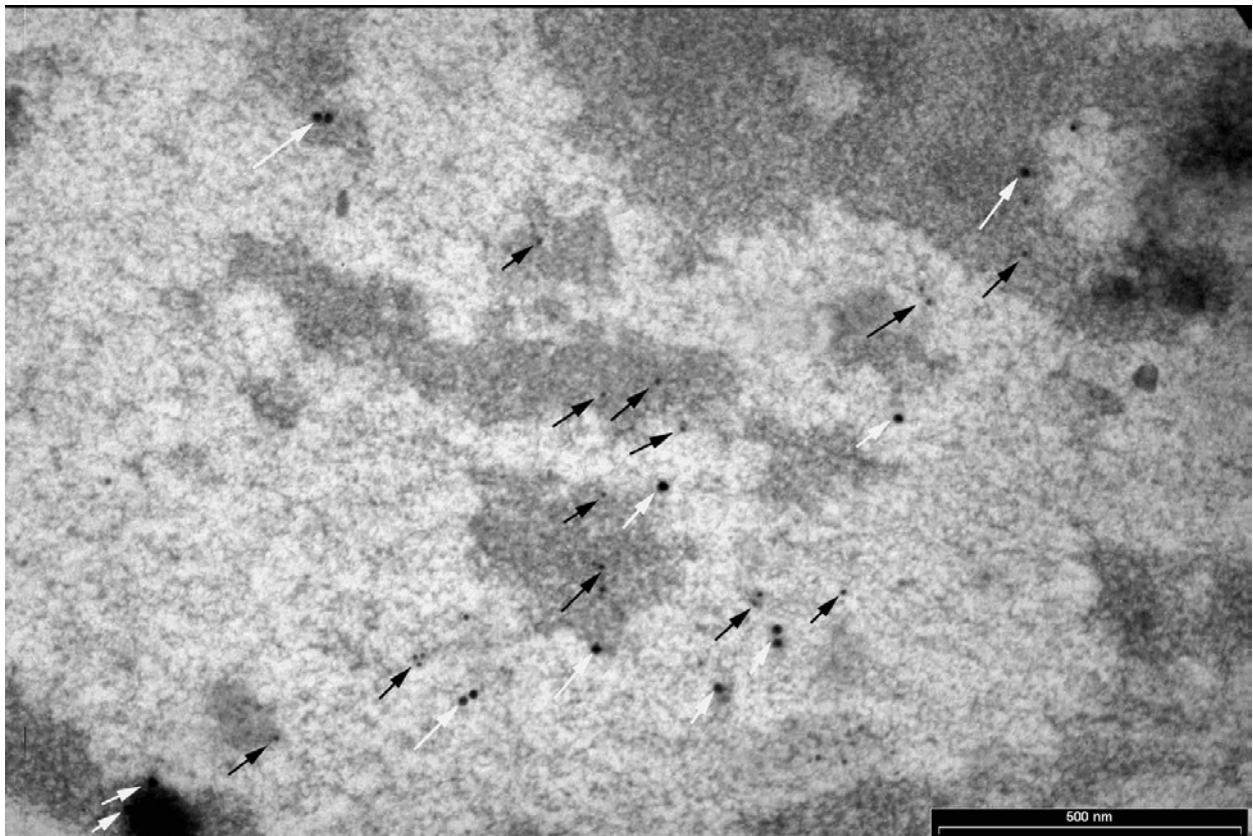


Abb. 35: Immunmarkierung des HvS40 Proteins und der DNA in einem Zellkern eines Ultradünnschnittes eines Primärblattes einer 27 Tage alten Gerstenpflanze. Die Lokalisation der DNA ist jeweils durch weiße Pfeile gekennzeichnet, während die des HvS40 Proteins durch schwarze Pfeile gezeigt ist.

4. Diskussion

4.1 Regulation der Expression des *hpd* Gens während der Blattseneszenz

Das Gen der 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (*hpd*) wurde 1997 von Kleber-Janke und Krupinska durch den Vergleich von RNA Populationen aus seneszierenden und nicht seneszierenden Primärblättern isoliert. Kleber-Janke und Krupinska (1997) haben sich bei der Isolierung der von ihnen isolierten Gene zu eigen gemacht, dass bei vielen in Abhängigkeit von der Seneszenz exprimierten Gene auch nach einer mehrtägigen Dunkelphase in der Pflanze erhöhte Transkriptmengen auftreten. Dieser auch als „dunkelinduzierte Seneszenz“ bezeichnete Vorgang stellt allerdings nur in manchen Aspekten ein zur natürlichen Seneszenz vergleichbares System dar (Becker & Apel 1993, Weaver & Amasino 2001). Für das isolierte *hpd* Gen konnten Kleber-Janke und Krupinska (1997) allerdings in *Northern Blot* Analysen zeigen, dass der Transkriptgehalt des *hpd* Gens unter natürlichen Bedingungen in seneszierenden Fahnenblättern in ähnlicher Weise zunimmt wie in Primärblättern der Gerste, die sich in einer Dunkelphase befinden. Aufgrund dieser Ergebnisse definierten Kleber-Janke und Krupinska (1997) das isolierte *hpd* Gen als Seneszenz assoziiertes Gen (SAG). Bei der Identifizierung eines Gens als SAG, die in den meisten Fällen durch *Northern Blot* Analysen erfolgt, muss berücksichtigt werden, dass der Gesamt-RNA Gehalt einer seneszierenden Zelle abnimmt. Während vor allem ribosomale RNAs im Laufe der Seneszenz sehr schnell abgebaut werden (Hensel *et al.* 1993), scheinen spezifische mRNAs unterschiedlich schnell abgebaut zu werden (Crafts-Brandner *et al.* 1996, Scharrenberg 2001). Zeigt ein Gen im Vergleich zu anderen während der Seneszenz einen verlangsamten Abbau seiner entsprechenden RNA, nimmt der relative Transkriptgehalt des entsprechenden Gens zu, obwohl keine Transkription stattgefunden hat. Die Akkumulation der RNA dieses SAGs beruht somit auf einer erhöhten Stabilität des Transkriptes. Ein erhöhter mRNA Gehalt des SAGs, der sich in *Northern Blot* Analysen zeigt, muss somit nicht auf einer erhöhten Transkriptionsrate beruhen, sondern kann auch durch eine erhöhte Stabilität des Transkriptes während der Seneszenz verursacht werden.

Um einen Transkriptionsfaktor zu isolieren, der zur Transkription eines SAGs während der Seneszenz beiträgt, ist es daher notwendig die entwicklungsabhängige Transkriptionsaktivität des betreffenden Gens zu untersuchen. Nur wenn gezeigt werden kann, dass die RNA des zu untersuchenden SAGs während der Seneszenz neu synthetisiert wird und damit dieses Gen zumindestens teilweise einer transkriptionellen Kontrolle unterliegt, eignet es sich für die Isolierung eines entwicklungsabhängig regulierten Transkriptionsfaktors.

Für das in der vorliegenden Arbeit untersuchte *hpd* Gen konnte von Scharrenberg (2001) gezeigt werden, dass der erhöhte Transkriptgehalt der *hpd* während der Seneszenz mit einer Neusynthese der *hpd* mRNA verbunden ist. Die *hpd* bietet somit die Voraussetzung, die transkriptionelle Regulation dieses Gens während der Seneszenz zu untersuchen und einen entwicklungsabhängig regulierten Transkriptionsfaktor zu isolieren.

4.1.1 Die Funktion der HPPD im Stoffwechsel der Pflanze

Das *hpd* Gen kodiert für die 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD), die ein zentrales Enzym im Sekundärstoffwechsel der Pflanze darstellt. Sie katalysiert die Umsetzung von 4-Hydroxyphenylpyruvat, das aus dem Abbau der Aminosäure Tyrosin entstehen kann, zu Homogentisat (Schultz *et al.* 1985, siehe Abb. 36). Homogentisat ist in Höheren Pflanzen einerseits die Ausgangsverbindung für die Synthese von Plastochinon und Vitamin E, andererseits kann diese Substanz auch im weiteren zu Fumarat und Acetoacetat abgebaut werden (siehe Abb. 36).

Die Mutation des *hpd* Gens führt in Höheren Pflanzen aufgrund des fehlenden Plastochinons zu einem weißem Phänotyp (Norris *et al.* 1995, 1998). Da Plastochinon ein Cofaktor der Carotinoidbiosynthese darstellt, ist als weitere Folge der Mutation des *hpd* Gens auch dieser Biosyntheseweg blockiert (Norris *et al.* 1995). Fehlen Carotinoide als wichtige Schutzpigmente des Chlorophylls in den Photosystemen kommt es zur photooxidativen Zerstörung des Blattgrüns und in Folge dessen zu einem weißen Phänotyp.

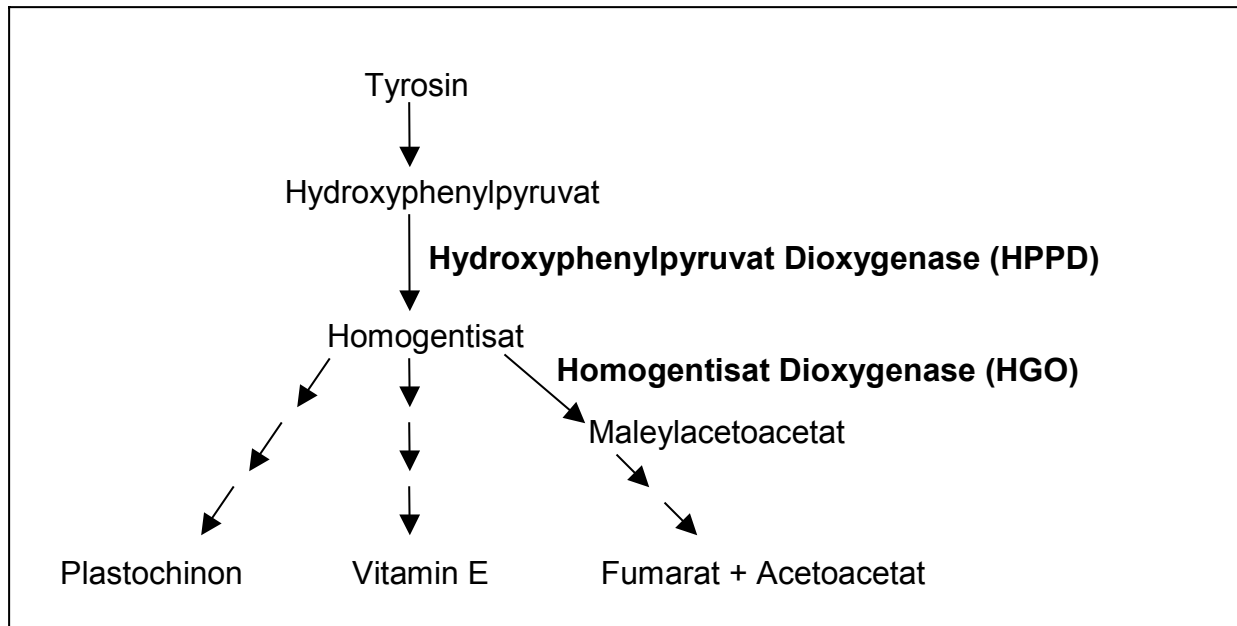


Abb. 36: Schematische Darstellung der zentralen Rolle des Homogentisats im Stoffwechsel Höherer Pflanzen. Homogentisat kann einerseits als Ausgangssubstrat für die Biosynthese von Plastochinon und Vitamin E dienen, andererseits kann es auch zu Fumarat und Acetoacetat abgebaut werden.

Die zentrale Rolle, die die HPPD im Stoffwechsel der Höheren Pflanzen einnimmt, zeigen die durchgeführten Untersuchungen zur Lokalisation des *hpd* Transkripts. So lässt sich das Transkript außer im Mesophyllgewebe auch in der Wurzel, in Körnern und in der Epidermis von Primärblättern der Gerste nachweisen (siehe 3.1.3). Da Plastochinon als Elektronenüberträger in der Elektronentransportkette der Photosynthese dient und da angenommen wird, dass Vitamin E vornehmlich eine Funktion als lipophiles Antioxidans in photosynthetisch aktivem Gewebe hat, scheint es zunächst nicht erklärbar, dass man eine Expression in nicht photosynthetisch aktivem Gewebe wie der Wurzeln oder den Körnern findet. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Plastochinon und/oder Vitamin E eine bisher nicht beschriebene Funktion haben könnten. Es gibt Ergebnisse, die zeigen, dass reduziertes Plastochinon auch als Antioxidans wirken (Hundal *et al.* 1995) und Vitamin E an der Ausbildung von Plasmodesmata beteiligt sein kann (Porfirova *et al.* 2002, Hofius & Sonnewald 2003). Inwieweit diese möglichen Funktionen eine Erklärung für die nachgewiesenen *hpd* Transkripte in verschiedenen Geweben geben, ist in weiteren Untersuchungen zu klären.

Alternativ wäre auch vorstellbar, dass der Nachweis des *hpd* Transkripts in nicht photosynthetisch aktiven Geweben nicht mit der Biosynthese von Vitamin E und

Plastochinon in Zusammenhang steht, sondern mit dem Abbau der Aminosäure Tyrosin über Homogentisat zu Fumarat und Acetoacetat. Ein erhöhter Transkriptgehalt der Homogentisat Dioxygenase, dem nachfolgenden Enzym der HPPD im Abbauweg der Aminosäure Tyrosin (siehe Abb. 36), konnte im reifenden Samen von *Arabidopsis thaliana* gezeigt werden (White *et al.* 2000).

Der erhöhte Transkriptgehalt des *hpd* Gens während der Blattseneszenz bringt die Frage mit sich, welche Rolle dieses Gen bei der Seneszenz spielen könnte. Da der Chlorophyllgehalt und die Photosyntheseleistung während der Seneszenz sinken, ist es fraglich, ob eine erhöhte Expression des *hpd* Gens mit einer vermehrten Synthese von Plastochinon verbunden ist.

Die Seneszenz ist charakterisiert durch zahlreiche katabole Prozesse. So wäre es denkbar, dass eine erhöhte Expression des *hpd* Gens während der Seneszenz mit dem Abbau der aromatischen Aminosäure Tyrosin zu Fumarat und Acetoacetat in Verbindung steht.

Zudem ist auch denkbar, dass die erhöhte Expression des *hpd* Gens mit einer verstärkten Biosynthese von Vitamin E-Verbindungen verbunden ist. Da Vitamin E als lipophiles Antioxidans Biomembranen vor oxidativer Schädigung schützen kann (Fryer 1992, Munné-Bosch & Alegre 2002), könnte ein erhöhter Spiegel dieser Substanz während der Seneszenz einen wichtigen Beitrag zur Bekämpfung der verstärkt auftretenden Sauerstoffradikale geben. Eine positive Korrelation zwischen *hpd* Transkript und dem Gehalt an α -Tocopherol, eines der acht Verbindungen mit Vitamin E-Aktivität, konnte in seneszierenden Fahnenblättern der Gerste gezeigt werden (Chrost *et al.* 1999). Zudem konnte auch Rise *et al.* (1989) in seneszierenden Blättern des Immergrüns (*Vinca minor* L.) eine erhöhte Konzentration an α -Tocopherol nachweisen.

4.1.2 Expression des *hpd* Gens während der Blattseneszenz

Mit Eintreten der Seneszenz verändern sich in der Pflanze die Konzentrationen der Phytohormone. Der Gehalt an Hormonen, die einen seneszenzverzögernden Charakter haben, wie z.B. Cytokinine, verringert sich (Noodén *et al.* 1990), während die Menge an seneszenzfördernden Substanzen, wie z.B. Salicylsäure oder Methyljasmonat, ansteigt (Morris *et al.* 2000, He *et al.* 2002). Die Analyse des Expressionsprofils des *hpd* Gens

nach Behandlung mit verschiedenen Phytohormonen sollte daher erste wichtige Hinweise geben, durch welche Faktoren die seneszenzabhängige Transkription des *hpd* Gens gesteuert wird.

Erstaunlicherweise zeigte sich in den durchgeführten *Northern Blot* Analysen, dass der Transkriptgehalt des *hpd* Gens nach zweitägiger Inkubation mit den seneszenzverzögernden Cytokinin Kinetin und dem Auxin Indolelessigsäure erhöht ist (siehe 3.1.1.1). Im Gegensatz dazu zeigt Gibberellinsäure, die ebenfalls als seneszenzverzögernd gilt (Dhindsa *et al.* 1982), keinen Einfluss auf den *hpd* Transkriptgehalt. Wie aus dem vorangegangenen Kapitel hervorgeht, ist die HPPD ein essentielles Enzym der Plastochinonbiosynthese (siehe Abb. 36). Da Plastochinon als wichtiger Bestandteil der Elektronentransportkette bei der Photosynthese benötigt wird, ist es vorstellbar, dass ein erhöhter *hpd* Transkriptgehalt nach Gabe von Substanzen, die den Zellzyklus stimulieren, wie z.B. Cytokinin oder Indolelessigsäure, wichtig ist. Alternativ ist aber auch denkbar, dass die Phytohormone Kinetin und Indolelessigsäure nicht auf die Transkription des Gens wirken, sondern einen Einfluss auf die Transkriptstabilität haben könnten.

Der Signalstoff Salicylsäure spielt bei der Regulierung der seneszenzabhängigen Genexpression eine wichtige Rolle (Morris *et al.* 2000). Neben einer Beteiligung am Seneszenzprogramm, hat Salicylsäure eine wichtige Funktion bei der Antwort einer Pflanze auf verschiedene Stressformen. Hierzu gehört zum einen die Pathogenabwehr (Malamy & Klessig 1992, Durner *et al.* 1997), aber auch die Antwort auf oxidativen Stress, der durch Ozon (Rao & Davis 1999, 2001) oder UV-B Strahlung (Surplus *et al.* 1998) verursacht werden kann. Die verschiedenen Stressformen können in der Pflanze die Seneszenz stimulieren und damit die Expression verschiedener SAGs fördern. Da das *hpd* Gen nach Gabe von Salicylsäure keine Veränderung im Transkriptgehalt zeigt, scheint Salicylsäure unter den gewählten Versuchsbedingungen keinen Einfluss auf die Expression des *hpd* Gens zu haben (siehe 3.1.1.1).

Ähnlich wie Salicylsäure gehört auch Jasmonsäure zu den Signalstoffen, die sowohl in die Pathogenabwehr als auch in die Seneszenz involviert sind (He *et al.* 2002). Anders als nach Applikation von Salicylsäure kann auch nach Zusatz von Methyljasmonat eine verstärkte *hpd* Transkriptakkumulation beobachtet werden (siehe 3.1.1.1).

Methyljasmonat wird aus Linolensäure gebildet (Schaller 2001). Verschiedenste

Formen von Stress können zur vermehrten Freisetzung von Linolensäure aus den Thylakoidmembranen und damit zum Anstieg von Jasmonsäure in den Mesophyllzellen führen (Wasternack & Hause 2000). Das bekannteste Beispiel für die Erhöhung des Jasmonsäurespiegels ist die Wundreaktion. Da das *hpd* Gen auch nach Oberflächenverwundung von Primärblättern der Gerste einen erhöhten Transkriptgehalt zeigt, könnte die Akkumulation der *hpd* mRNA nach Applikation von Methyljasmonat mit der Wundreaktion in Verbindung stehen.

Eine Beteiligung an der Wundreaktion konnte auch für die Phytohormone Ethylen und Abscisinsäure gezeigt werden, die bei der Wundreaktion einer Pflanze zusammen mit Jasmonaten eine synergistische Wirkung haben (Léon *et al.* 2001, Munnik 2001). Daher verwundert es nicht, dass Abscisinsäure zu einer Transkriptakkumulation des *hpd* Gens führt.

Die Wirkung von Ethylen auf den Transkriptgehalt des *hpd* Gens sollte untersucht werden, indem Primärblätter der Gerste mit der Verbindung Aminocyclopropan-carboxylat (ACC) inkubiert wurden. ACC ist eine Vorstufe der Ethylenbiosynthese. Nach Aufnahme dieser Substanz von der Pflanze ist die Bildung von Ethylen zu erwarten. Die *Northern Blot* Analyse (siehe 3.1.1.1) zeigte nach Applikation von ACC keine Veränderung des *hpd* Transkriptgehalts. Da in anderen Experimenten, in denen Ethephon benutzt wurde, das zu Ethylen zerfällt, gezeigt werden konnte, dass der Transkriptgehalt des *hpd* Gens ansteigt (Haußühl 1999), ist es wahrscheinlich, dass ACC vermutlich nicht von der Pflanze aufgenommen wird. Ethylen führt also genauso wie Methyljasmonat und Abscisinsäure zur Stimulierung der Expression des *hpd* Gens.

Die in den Plastiden und im Cytosol gebildete Abscisinsäure kann in der Zelle als protoniertes Molekül passiv diffundieren oder aktiv in nicht protonierter Form über Bindeproteine transportiert werden (Cutler & Krochko 1999). Eine wichtige Wirkung der Abscisinsäure ist die Stimulation der in Biomembranen vorkommenden Phospholipase D, die die Umsetzung von Phospholipiden zu Phosphatidsäuren katalysiert. Diese Reaktion, die beim Abbau von Biomembranen abläuft, tritt verstärkt während der Seneszenz auf (Ryu & Wang 1995). Es wird angenommen, dass die vermehrte Aktivität der Phospholipase D während der Seneszenz durch Abscisinsäure gesteuert wird (Fan *et al.* 1997, Munnik 2001). Dies zeigen Untersuchungen mit transgenen antisense Arabidopsis Pflanzen, die eine reduzierte Aktivität der Phospholipase D haben. Die Applikation von Abscisinsäure auf die transgenen antisense Linien führt in diesen

Pflanzen zu einem im Vergleich zum Wildtyp deutlich verzögerten Seneszenzbeginn (Fan *et al.* 1997).

Die durch Behandlung mit Abscisinsäure beschriebenen Seneszenzsymptome beruhen dabei auf der Entstehung von oxidativem Stress. So konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Bildung von Wasserstoffperoxid in der Zelle nach Applikation von Abscisinsäure stark zunimmt (Guan *et al.* 2000), sondern auch die Aktivität verschiedenster antioxidativer Schutzsysteme der Zelle, wie z.B. der Superoxid Dismutasen, Katalasen und Peroxidasen (Jiang & Zhang 2001). Zudem hat man auch nachweisen können, dass der Gehalt an α -Tocopherol nach Gabe von Abscisinsäure erhöht ist (Jiang & Zhang 2001). Die Zunahme des *hpd* Transkriptgehalts nach Inkubation mit Abscisinsäure kann also auf die Stimulierbarkeit der *hpd* durch oxidativen Stress zurückgeführt werden.

Einen weiteren Hinweis darauf, dass die verstärkte Expression des *hpd* Gens während der Seneszenz in Zusammenhang mit erhöhtem oxidativen Stress steht, zeigten Untersuchungen mit verschiedenen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (siehe 3.1.2.1). Primärblätter von 7 Tage alten Gerstenpflanzen wurden dafür zum einen mit Wasserstoffperoxid inkubiert und zum anderen mit dem Herbizid DCMU behandelt. Dieses Herbizid bindet an die Q_B-Bindestelle der Elektronentransportkette. Durch den bewirkten Elektronenstau kann eine verstärkte Bildung von Singulett-Sauerstoff induziert werden. Beide Substanzen zeigten, dass sie den Transkriptgehalt des *hpd* Gens erhöhen können. Da Wasserstoffperoxid zu verschiedenen Sauerstoffradikalen zerfallen kann (z.B. Hydroxylradikalen) und bei Verwendung von DCMU Singulett-Sauerstoff gebildet wird, kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass verschiedene Formen von oxidativem Stress den Transkriptgehalt des *hpd* Gens steigern können.

4.1.3 Analyse des *hpd* Promotors

Die Expression des *hpd* Gens unterliegt während der Seneszenz einer transkriptionellen Kontrolle (Scharrenberg 2001). Die Neusynthese von RNA kann dabei durch Bindung oder Lösung von Transkriptionsfaktoren an *cis*-Elemente des *hpd* Promotors gesteuert werden. Ziel der nachfolgenden Untersuchungen war es, ein seneszenzabhängig reguliertes *cis*-Element (Seneszenz-Element) zu identifizieren. Hierfür wurde die Promotorsequenz auf das Vorliegen von bereits bekannten *cis*-

Elementen analysiert. Diese Analysen zeigten einige interessante Ergebnisse, die im Einklang mit den Resultaten der *Northern Blot* Analysen stehen. Insgesamt konnten auf dem *hpd* Promotor zwei ABRE und zwei bZip-ABA-Motive identifiziert werden, für die eine Beteiligung an einer durch Abscisinsäure induzierten Transkription gezeigt werden konnte (Kim *et al.* 1997, Busk & Pages 1998, siehe auch 3.2.2.1). Zudem konnte noch ein Ethylen-Element (Itzhaki *et al.* 1994) sowie eine Sequenz mit der Nukleotidabfolge TGCA analysiert werden, die sich insgesamt 11 mal im Promotorbereich wiederholt. Ob eines oder mehrere dieser Motive als Seneszenz-Elemente fungieren, sollte durch transiente Expressionsstudien überprüft werden. Dafür wurden verschieden große Sequenzabschnitte des *hpd* Promotors in Fusion mit dem Reporter gen *gfp* (*green fluorescent protein*) gebracht. Diese Fragmente, die 160 bis 1000 Basenpaare Sequenzinformation des *hpd* Promotors tragen, wurden dann mittels biolistischer Transformation von Gerstenprimärblättern auf ihre Aktivität getestet. Die transienten Expressionstudien ergaben, dass die Sequenzinformation von 160 Basenpaaren ausreichend ist, um das GFP zu bilden. In diesem kurzen Promotorsequenzabschnitt sind neben einer möglichen TATA-Box und dem Transkriptionsstart auch ein ABRE und ein bZip-ABA-Element vorhanden. Unter der Voraussetzung, dass eines oder beide Elemente die Transkription während der Seneszenz steuern könnten, wären alle notwendigen Elemente zur transkriptionellen Regulation des *hpd* Gens in diesem kurzen Promotorabschnitt vorhanden. Ob diese beiden Elemente die Transkription während der Seneszenz vermitteln können, konnte allerdings durch die transiente biolistische Transformation von Gerstenblättern nicht getestet werden.

Da die epicuticulären Wachse der Poaceae eine besondere Festigkeit und Widerstandsfähigkeit zeigen, bleiben die meisten der in der biolistischen Transformation verwendeten Goldpartikel in der Epidermis stecken. Nur äußerst selten durchdringen die Goldpartikel die Epidermis und führen zur Transformation einer Mesophyllzelle. Da im Mesophyllgewebe die Transkription der SAGs abläuft, kann mit Hilfe der transienten biolistischen Transformationsmethode die Aktivität des *hpd* Promotors vor und während der Seneszenz nicht untersucht werden. Damit kann nicht entschieden werden, ob eines oder beide ABRE und bZip-ABA-Elemente an der Transkription des *hpd* Gens beteiligt sind.

Eine Methode zum Nachweis von Proteinen, die an interessante Promotorbereiche binden oder sich davon lösen können und damit an der Transkription während der Seneszenz beteiligt sein können, bieten Gelretardierungsexperimente. Um diese

Methode anwenden zu können, wurden Kernproteine aus Primärblättern verschiedener Entwicklungsstadien sowie aus mit Abscisinsäure behandelten Primärblättern isoliert und mit verschiedenen Sequenz-Motiven des *hpd* Promotors inkubiert. Unter der Annahme, dass ein Transkriptionsfaktor während der Seneszenz die Transkription eines SAGs steuert, indem er an die Promotor-DNA bindet oder sich davon löst, müssten am *hpd* Promotor in seneszierenden Primärblättern im Vergleich zu jungen Blättern andere Protein-DNA-Komplexe zu finden sein. Entsprechend müssten sich diese Veränderungen auch in mit Abscisinsäure behandelten Blättern im Vergleich zu unbehandelten Blättern zeigen.

Bis auf eine Ausnahme konnten bei Verwendung der oben beschriebenen Kernproteinextrakte und unterschiedlicher DNA-Bereiche des *hpd* Promotors, die die TGCA Sequenzwiederholung, das Ethylen Motiv, die ABRE und bZip-ABA-Elemente einschlossen, keine Unterschiede zwischen den sich bildenden Protein-DNA-Komplexen festgestellt werden. Die einzige Veränderung konnte bei dem ABRE des *hpd* Promotors, das sich an der Position –46 bis –54 befindet, beobachtet werden. Während in Gelretardierungsexperimenten mit Kernproteinen aus 5 Tage alten Pflanzen zwei deutlich erkennbare Protein-DNA-Komplexe zu finden sind, zeigen entsprechende Ansätze mit Kernproteinen aus 9 Tage alten Pflanzen, dass der kleinere der beiden Protein-DNA-Komplexe kaum noch nachgewiesen werden kann. Dabei macht es keinen Unterschied, ob die verwendeten Kernproteine aus Primärblättern 9 Tage alter Pflanzen, die mit Abscisinsäure behandelt wurden, oder aus unbehandelten Primärblättern gleichen Alters stammen. Die verminderte Signalstärke des zweiten Protein-DNA-Komplexes ist somit nicht auf die Wirkung der Abscisinsäure zurückzuführen. Vielmehr kann die verminderte Signalstärke des zweiten Protein-DNA-Komplexes mit einer altersbedingten Veränderung der Primärblätter erklärt werden. Während in Kernproteinextrakten aus 13 und 23 Tage alten Pflanzen das schwächere Signal des kleineren Protein-DNA-Komplexes in ähnlicher Weise wie in Primärblättern 9 Tage alter Gerste zu beobachten ist, kann dieser Komplex in Primärblättern 27 Tage alter Gerste nicht mehr nachgewiesen werden.

Ob das ABRE an der Position –46 bis –54 des *hpd* Promotors als einziges an der während der Seneszenz induzierten Transkription des *hpd* Gens beteiligt ist, ist nicht geklärt.

Obwohl der *hpd* Promotor vier Bereiche besitzt, die eine durch Abscisinsäure induzierte Transkription steuern können (Choi *et al.* 1999) und gezeigt werden konnte, dass die

Behandlung von Gerstenprimärblättern mit Abscisinsäure die Transkription des *hpd* Gens ansteigen lässt (Brosch 2001), konnte in den durchgeführten Gelretardierungsexperimenten kein unmittelbarer Zusammenhang zu einer durch Abscisinsäure induzierten Transkription nachgewiesen werden.

Da für viele durch Abscisinsäure regulierte Transkriptionsfaktoren gezeigt werden konnte, dass sie konstitutiv an einen Promotor binden und durch eine Dephosphorylierung oder Phosphorylierung aktiviert oder deaktiviert werden können (Shen *et al.* 1996, Knetsch *et al.* 1996), ist anzunehmen, dass die veränderte Transkriptionsaktivität eines Gens nicht allein durch die Ausbildung oder Auflösung eines oder mehrerer Protein-Komplexe, die in Gelretardierungsexperimenten nachgewiesen werden können, erfasst werden kann.

Grundsätzlich ist es denkbar, dass neben einem ABRE oder bZip-ABA-Element auch noch weitere sogenannte *coupling elements* (CE) für eine durch Abscisinsäure induzierte Transkription notwendig sein könnten. Shen *et al.* (1995, 1996) konnte für die Aktivierung der Gerstengene *HvA22* und *HvA1* durch Abscisinsäure zeigen, dass zusätzlich zum ABRE die Elemente CE1 (*coupling element* 1) und CE2 (*coupling element* 2) notwendig sind. Diese sogenannten *coupling elements* bestehen aus cytosin- und guaninhaltigen Nukleotiden, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem ABRE befinden. Im *hpd* Promotor befinden sich zwar nicht genau die identischen Sequenzmotive der CE1 und CE2, doch sind beide ABRE von ähnlichen cytosin- und guaninhaltigen Sequenzen flankiert. Es ist vorstellbar, dass sich in diesen Bereichen ein solches *coupling element* befindet. In Gelretardierungsexperimenten mit dem ABRE an der Position -46 bis -54 und den flankierenden Sequenzen wurden diese potentiellen *coupling elements* untersucht. Dabei konnten allerdings keine Unterschiede zwischen den sich bildenden Protein-DNA-Komplexen aus Kernproteinen junger, seneszierender sowie mit Abscisinsäure behandelter Primärblätter festgestellt werden. Für das zweite ABRE an der Position -505 bis -518 wurden entsprechende Gelretardierungsexperimente bisher nicht ausgeführt.

Ein weiterer Aspekt, der bei der Diskussion möglicher Regulationsstellen der Transkription während der Seneszenz des *hpd* Gens beachtet werden sollte, ist, dass die Aktivität einiger Gene durch Sequenzen reguliert werden können, die sich außerhalb des Promotors befinden. So konnte beispielsweise für das *hpd* Gen des Menschen gezeigt werden, dass ein wichtiges Element zur Steuerung der *hpd* Aktivität auf dem ersten Intron liegt (Aarenstrup *et al.* 2002).

4.2 Regulation der Expression des *HvS40* Gens während der Blattseneszenz

4.2.1 Expression des *HvS40* Gens während der Seneszenz

Ähnlich wie das *hpd* Gen unterliegt auch das *HvS40* Gen während der Blattseneszenz einer transkriptionellen Kontrolle (Scharrenberg 2001). Dies wurde sowohl an Fahnenblättern unter natürlichen Seneszenzbedingungen als auch für Primärblätter nach zweitägiger Dunkelphase gezeigt (Scharrenberg 2001).

In ähnlicher Weise wie für das *hpd* Gen wurden auch für das *HvS40* Gen verschiedene *Northern Blot* Analysen durchgeführt. Entsprechend den Ergebnissen, die sich nach Phytohormonbehandlung für das *hpd* Gen gezeigt haben, kann auch nach Inkubation von Primärblättern der Gerste mit Methyljasmonat und Abscisinsäure eine Steigerung des *HvS40* Transkriptgehalts beobachtet werden (siehe 3.1.1.2). Im Gegensatz zum Expressionsprofil des *hpd* Gens konnte in Vorarbeiten zu dieser Arbeit aber auch ein steigender Transkriptgehalt des *HvS40* Gens nach Behandlung mit Salicylsäure festgestellt werden (Krupinska *et al.* 2002). Wie bereits beschrieben, können sowohl Salicylsäure als auch Methyljasmonat die Transkription von Genen regulieren, die bei der Pathogenabwehr und der Seneszenz exprimiert werden. Da ein erhöhter Transkriptgehalt des *HvS40* Gens auch nach Befall von Gerstenblättern mit dem Pilz *Pyrenophora teres* gezeigt werden konnte, könnte die veränderte Expression des *HvS40* Gens nach Applikation dieser Phytohormone einen Hinweis darauf geben, dass das *HvS40* Gen durch einen der Pathogenabwehr und der Seneszenz gemeinsamen Signalweg reguliert wird (Krupinska *et al.* 2002).

Als weiterer Hinweis für die Regulation des *HvS40* Gens durch Pathogenbefall und Seneszenz kann auch der erhöhte Transkriptgehalt des *HvS40* Gens nach Erzeugung von oxidativem Stress, der beiden Prozessen gemeinsam ist, gesehen werden. Sowohl nach Applikation von Abscisinsäure als auch von Wasserstoffperoxid lässt sich in Primärblättern der Gerste ein erhöhter Transkriptgehalt feststellen.

4.2.2 Analyse des *HvS40* Promotors

Den beiden Genen *hpd* und *HvS40* ist nicht nur gemeinsam, dass sie eine durch Abscisinsäure gesteigerte Transkription zeigen (Brosch 2001), sondern auch, dass sie verschiedene ABRE und bZip-ABA-Elemente aufweisen. In ähnlicher Weise wie für das *hpd* Gen wurden deshalb mit den Elementen des *HvS40* Promotors, die eine durch Abscisinsäure induzierte Transkription während der Seneszenz bewirken könnten, Gelretardierungsexperimente durchgeführt (siehe 3.2.4.2).

Das Ergebnis der Gelretardierungsexperimente zeigte auch mit den verschiedenen ABRE und bZip-ABA-Elementen des *HvS40* Promotors bei Verwendung von Kernproteinen aus jungen, seneszierenden und mit Abscisinsäure behandelten Primärblättern keine Unterschiede zwischen den sich bildenden Protein-DNA-Komplexen. Mögliche Gründe für das Ausbleiben eines veränderten Bandenmusters in den Gelretardierungsexperimenten sind mit dem *hpd* Promotor bereits diskutiert worden (siehe 4.1.3).

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Bindungsstudien zeigten zwei andere Bereiche des *HvS40* Promotors in Gelretardierungsexperimenten sehr interessante Ergebnisse. Beide an der Position -588 bis -618 und -376 bis -393 untersuchten Sequenzbereiche des *HvS40* Promotors zeichnen sich durch die Kombination einer IR2- und einer W-Box in einem Abstand von 5 Basenpaaren zueinander aus. Während die IR2-Box das zweite *inverted repeat* des Elicitor *responsive element* (ERE) des *PR-10a* Promotors darstellt (Després *et al.* 1995, Desveaux *et al.* 2000), ist die W-Box als typische Bindestelle für WRKY-Transkriptionsfaktoren bekannt (Eulgem *et al.* 2000).

Gelretardierungsexperimente mit einem Oligonukleotid, das die Kombination aus IR2- und W-Box an der Position -588 bis -618 des *HvS40* Promotors einschloss, und mit Kernproteinen aus verschiedenen alten Primärblättern haben gezeigt, dass während der Seneszenz ein oder mehrere neue Proteine an den Promotor binden. Während mit Kernproteinen aus jungen Blättern nur zwei Banden zu erkennen sind, kann in Bindungsstudien mit Kernproteinen aus seneszierenden Primärblättern ein drittes Signal beobachtet werden. Interessanterweise konnte diese zusätzliche Bande auch dann festgestellt werden, wenn in den Bindungsreaktionen Kernproteine aus Pflanzen, die nach einem normalen Licht-/Dunkelrhythmus für zwei oder vier Tage im Dunkeln standen, verwendet wurden. Die durch das Dunkelstellen induzierten

seneszenzähnlichen Vorgänge führen somit im Fall der IR2- und W-Box an der Position -588 bis -618 des *HvS40* Promotors zu einem mit der natürlichen Blattseneszenz vergleichbaren Ergebnis. Auch wenn in vielen Bereichen die „dunkelinduzierte Seneszenz“ nicht mit der natürlichen Blattseneszenz verglichen werden kann (Becker & Apel 1993, Weaver & Amasino 2001), so zeigt sich an dieser Stelle eine ähnliche Regulation beider Prozesse.

Im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Promotorbereich zeigten Gelretardierungsexperimente mit einem Oligonukleotid, das die Kombination aus IR2- und W-Box im Bereich -376 bis -393 des *HvS40* Promotors einschloss, dass ein oder mehrere Proteine sich mit Einsetzen der Seneszenz vom untersuchten Promotorbereich lösen und damit als Protein-DNA-Komplex nicht mehr nachgewiesen werden können. Während mit Kernproteinen aus jungen Blättern mindestens drei Banden zu erkennen sind, konnten in Bindungsstudien mit Kernproteinen aus seneszierenden Primärblättern nur zwei Protein-DNA-Komplexe beobachtet werden. Ebenso zeigen auch Bindungsstudien mit Kernproteinen aus Primärblättern 9 und 11 Tage alter Gerste, die sich für zwei oder vier Tagen in einer Dunkelphase befanden, dass nur zwei Protein-DNA-Komplexe nachweisbar sind. Auch nach Bindungsreaktion mit Kernproteinen aus Primärblättern 11 Tage alter Pflanzen, die in einem normalen Licht-/Dunkelrhythmus angezogen wurden, sind nur zwei Protein-DNA-Komplexe deutlich zu erkennen, so dass dieses Ergebnis nicht unmittelbar auf die „dunkelinduzierte Seneszenz“ zurückzuführen ist.

Da sowohl für den Promotorbereich an der Position -588 bis -618 als auch für den an der Position -376 bis -393 in Bindungsstudien mit Kernproteinen aus jungen und seneszierenden Primärblättern Unterschiede in den auftretenden Protein-DNA-Komplexen gezeigt werden konnten, wird eine Beteiligung dieser Promotorbereiche an der Transkription des *HvS40* Gens während der Seneszenz postuliert. Beide Bereiche werden daher auch als Seneszenz-Elemente bezeichnet.

4.2.3 Isolierung und Identifikation eines Transkriptionsfaktors des *HvS40* Promotors

Für die Isolierung eines DNA-Bindeproteins, das an der Transkription des *HvS40* Gens beteiligt ist, wurde das zweite identifizierte Seneszenz-Element (Position -376 bis -393) des *HvS40* Promotors ausgewählt. Bei diesem Seneszenz-Element interessiert besonders die Identifikation eines oder mehrerer Proteine, die mit Einsetzen der Seneszenz sich von diesem Promotorbereich lösen. Da nicht bekannt ist, ob in seneszierenden Blättern die Proteinmenge oder die Bindungsfähigkeit der Proteine, die in jungen Blättern an das zweite Seneszenz-Element binden, abnimmt oder verändert wird, eignen sich für die Isolierung und Identifikation eines DNA-Bindeproteins am besten Kernproteine aus Primärblättern 5 Tage alter Pflanzen. Die Isolierung eines Kernproteins aus Primärblättern 5 Tage alter Pflanzen bietet zudem den Vorteil, dass die Pflanzen eine relativ kurze Anzuchtperiode haben und die aus diesen Pflanzen isolierten Kernproteinmengen im Vergleich zu denen aus 23 Tage alter seneszierender Gerste deutlich höher sind. Im Hinblick auf die für die Isolierung und Identifikation eines DNA-Bindeproteins benötigten Proteinmengen ist der zeitliche Aufwand bei Verwendung von Kernproteinen aus 5 Tage alten Pflanzen damit deutlich geringer als bei Verwendung von Kernproteinen aus seneszierenden Blättern. Aus diesen genannten Gründen wurde für die Isolierung und Identifikation eines DNA-Bindeproteins, das an der Transkription des *HvS40* Gens beteiligt ist, das zweite Seneszenz-Element ausgewählt.

Die Isolierung der DNA-Bindeproteine, die in Primärblättern 5 Tage alter Pflanzen an das zweite Seneszenz-Element binden, erfolgte durch eine DNA-Affinitätschromatographie. Dabei zeigte sich, dass in Kernproteinextrakten aus jungen, 5 Tage alten Primärblättern im Vergleich zu den eingesetzten Kontrollen, nur ein zusätzliches Protein zu finden ist (siehe 3.3.1). Daher kann man davon ausgehen, dass der ausschließlich in jungen Blättern nachweisbare Protein-DNA-Komplex lediglich ein Protein enthält. Zur Identifikation dieses Proteins wurde eine Nano-Elektrospray-Massenspektroskopie durchgeführt. Die Analyse ergab, dass es sich bei dem isolierten Protein um ein zum p24 Transkriptionsfaktor der Kartoffel homologes Protein der Gerste handelt. Für den zum ersten Mal aus Kartoffel beschriebenen p24 Transkriptionsfaktor ist bekannt, dass er bei Pathogenbefall an das ERE-Element des *PR-10a* Promotors bindet und damit zur Aktivierung des Gens beiträgt (Desveaux *et al.* 2000, 2002 a).

Auch für das isolierte Gerstenprotein kann eine Bindung des identifizierten p24 Proteins an die IR2-Box, die eine Teilsequenz des ERE-Elements darstellt, im zweiten Seneszenz-Element angenommen werden, da bei Mutation der IR2-Box in Gelretardierungsexperimenten der Protein-DNA-Komplex, der das p24 enthält, nicht mehr nachgewiesen werden kann (siehe 3.2.4.2).

Das im Rahmen dieser Arbeit isolierte p24 Protein der Gerste stellt den ersten Transkriptionsfaktor dar, der an der während der Seneszenz induzierten Transkription einer monokotylen Pflanzen beteiligt sein kann. Im Gegensatz zum Pathogenbefall der Kartoffel, bei dem das p24 an den *PR-10a* Promotor bindet, löst sich das p24 während der Seneszenz vom zweiten Seneszenz-Element des *HvS40* Promotors. Mit der Identifikation des p24 Protein bei der Pathogenabwehr und der Seneszenz ist daher ein Hinweis dafür gegeben, dass in beiden Prozessen nicht nur ähnliche Gene verstärkt exprimiert werden, sondern dass an der Regulation der Transkription der betreffenden Gene offenbar auch gleiche Transkriptionsfaktoren beteiligt sein können. Für das p24 Protein wird daher angenommen, dass es sowohl die Transkription eines PR-Gens als auch die eines SAGs regulieren kann. Bisher waren nur WRKY-Transkriptionsfaktoren dafür bekannt, sowohl die Expression eines PR-Gens als auch die eines SAGs steuern zu können (Robatzek & Somssich 2001, 2002).

Im Gegensatz zu WRKY-Transkriptionsfaktoren, die zu der Klasse der Zinkfinger-Proteine (Eulgem *et al.* 2000) gehören, stellt der p24 Transkriptionsfaktor eine neue bisher nicht beschriebene Familie von pflanzlichen Transkriptionsfaktoren dar. Die Kristallstrukturanalyse des Proteins ergab, dass es aus 8 β -Faltblättern und 3 α -Helices besteht (Desveaux *et al.* 2002 a, b). Eine der Besonderheiten des p24 Transkriptionsfaktors ist, dass er bevorzugt an einzelsträngige DNA bindet.

So zeigten Experimente mit dem kodierenden und kodogenen Strang des ERE-Elements des *PR-10a* Promotors der Kartoffel, dass eine höhere Bindungsaffinität des p24 Proteins zu Einzelstrang- als zu Doppelstrang-DNA besteht (Desveaux *et al.* 2000). Auch die mit dem *HvS40* Promotor durchgeführten Gelretardierungsexperimente bestätigen das Vermögen des p24 Proteins, an Einzelstrang-DNA zu binden (siehe 3.2.4.2). Allerdings zeigen die Ergebnisse auch, dass das p24 aus Gerste nur an den kodierenden Strang des zweiten Seneszenz-Elements bindet, während kein p24 Protein-DNA-Komplex am kodogenen Strang nachgewiesen werden kann. Im weiteren kann man beobachten, dass die Signalstärke des p24 Protein-DNA-Komplexes mit

doppelsträngiger DNA des zweiten Seneszenz-Elements vergleichbar ist mit der des kodierenden Strangs.

Diese Unterschiede zwischen dem zweiten Seneszenz-Element der Gerste und dem ERE-Element der Kartoffel könnten auf die grundsätzlichen Unterschiede der miteinander verglichenen Promotorbereiche zurückgeführt werden. Während in der Kartoffel die IR1- und IR2-Box des ERE-Elements palindromisch mit einem Abstand von 4 Basenpaaren angeordnet ist, besitzt das zweite im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Seneszenz-Element des *HvS40* Promotors nur die IR2-Box und nach 5 Basenpaaren eine W-Box (siehe Abb. 37 A, B).

Allerdings befindet sich 4 Basenpaare stromaufwärts von der IR2-Box des zweiten Seneszenz-Elements eine zur IR1-Box ähnliche Sequenz, die bisher nicht in Kombination mit der IR2-Box des *HvS40* Promotors untersucht wurde (siehe Abb. 37 C).

A. Sequenz des ERE-Elements:

```

5`-ATAAAATGACACAAATGTCAAAAATG-3`
3`-TATTTTACTGTGTTTACAGTTTTTAC-5`-
          IR1-Box      IR2-Box

```

B. Sequenz des zweiten, im Rahmen dieser Arbeit getesteten Seneszenz-Elements des *HvS40* Promotors:

```

5`-CTCTGTCAAAATATTGGTCAAACG-3`
3`-GAGACAGTTTATAACCAGTTTGC-5`
          IR2-Box      W-Box

```

C. Erweiterte Sequenz des zweiten Seneszenz-Elements des *HvS40* Promotors, die im Rahmen dieser Arbeit nicht getestet wurden:

```

5`-TGTGAGAACTCTGTCAAAATATTGGTCAAACG-3`
3`-ACACTCTTGAGACAGTTTATAACCAGTTTGC-5`
ähnlich zur IR1-Box      IR2-Box      W-Box

```

Abb. 37: (A) Sequenz des ERE-Elements des *PR-10a* Promotors der Kartoffel mit den palindromisch angeordneten IR-Boxen (rot); (B) Sequenz des im Rahmen dieser Arbeit getesteten zweiten Seneszenz-Elements des *HvS40* Promotors mit einer IR2-Box (rot) und einer W-Box (blau). (C) Erweiterte Sequenz des zweiten Seneszenz-Elements, die neben der IR2- und W-Box noch eine zur IR1-Box ähnliche Motiv aufweist.

Diese zweite imperfekte IR1-Box könnte in Kombination mit der IR2-Box zu vergleichbaren Ergebnissen mit dem ERE-Element des *PR10-a* Promotors führen. Diese Hypothese ist in weiteren Untersuchungen zu klären.

Durch Mutationen verschiedener Aminosäuren des p24 Transkriptionsfaktors aus Kartoffel konnte gezeigt werden, dass die Aminosäureabfolge KGKAAL dem Protein die besondere Fähigkeit verleiht, an Einzelstrang-DNA zu binden (Desveaux *et al.* 2002 a). Da die bevorzugte Bindung von Einzelstrang-DNA eines der wichtigsten Charakteristika des p24 Transkriptionsfaktors darstellt, überrascht es nicht, dass das hierfür verantwortliche Sequenzmotiv im Gerstenprotein genauso zu finden ist wie in anderen Pflanzen. Im weiteren haben Kristallstrukturanalysen des p24 Transkriptionsfaktors aus Kartoffel gezeigt, dass die für die Struktur wichtigen Sequenzen zwischen der neunzigsten und zweihundertvierzigsten Aminosäure der analysierten Kartoffelsequenz liegen (Desveaux *et al.* 2002 a). Da das genau der Bereich mit der größten Homologie zwischen Kartoffel, Arabidopsis, Gerste und Mais ist, kann davon ausgegangen werden, dass die miteinander verglichenen Proteine eine sehr große strukturelle Verwandtschaft aufweisen (siehe 3.3.3).

Eine Besonderheit des p24 Proteins aus Kartoffel zeigt sich an der sehr auffälligen Sequenzwiederholung der Aminosäure Glutamin am N-Terminus. Dieser aus insgesamt 11 Glutaminen bestehenden Region wird eine Funktion als Aktivator-domäne zugesprochen (Desveaux *et al.* 2000, 2002 a). Da in verschiedenen tierischen Zellen gezeigt werden konnte (Gerber *et al.* 1994), dass eine an Glutamin reiche Region die Aktivator-domäne darstellt, wird diese Sequenzwiederholung im p24 Transkriptionsfaktor auch als ein solcher Bereich diskutiert (Desveaux *et al.* 2000, 2002 a). Experimentelle Ergebnisse, die diese Hypothese bestätigen, gibt es für das p24 Protein aus Kartoffel bisher nicht. Da sich in allen anderen bisher bekannten pflanzlichen p24 Proteinen diese Sequenzwiederholung nicht befindet und dieser Bereich auch zwischen den verglichenen Arten keine große Homologie zueinander zeigt, bleibt es weiteren Untersuchungen überlassen, die Funktion dieser Sequenzwiederholung zu ermitteln. Darüber hinaus konnte für das p24 Protein aus Kartoffel nachgewiesen werden, dass es nicht als Monomer von 26 kDa an den *PR-10a* Promotor bindet, sondern als Tetramer. Dieses Tetramer entsteht durch die Bindung der α -Helices 2 und 3 der einzelnen p24 Monomere miteinander. Durch Gelfiltrationsassays konnte im weiteren gezeigt werden, dass ein p24 Tetramer ein DNA-Molekül bindet (Desveaux *et al.* 2002 a). Die

modellhafte Vorstellung der Bindung des p24 Tetramers an die Einzelstrang-DNA des *PR-10a* Promotors in Kartoffel ist in Abbildung 38 dargestellt.

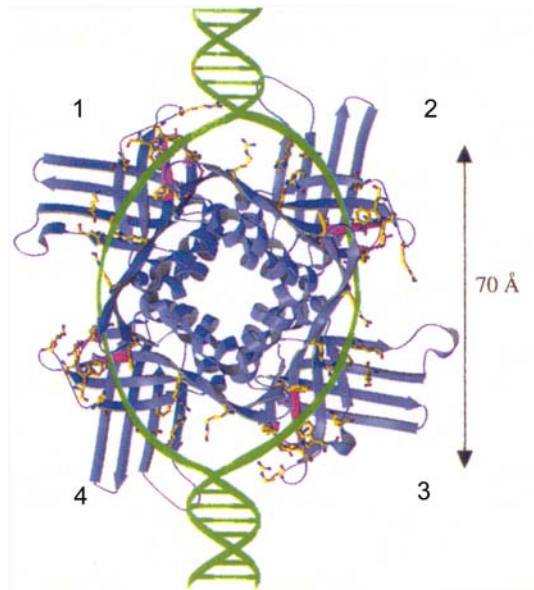


Abb. 38: Modellvorstellung zur Bindung des p24 Tetramers aus Kartoffel an den *PR-10a* Promotor. Die Zahlen 1-4 geben die einzelnen p24 Monomere an. Die DNA ist in grün dargestellt, die p24 Monomere in blau (verändert nach Desveaux *et al.* 2002 a).

Dieses kann auch dann der Fall sein, wenn nicht wie im *PR-10a* Promotor ein palindromisches Bindemotiv vorliegt (Desveaux *et al.* 2000). Daher ist auch für den *HvS40* Promotor denkbar, dass das p24 als Tetramer an das zweite Seneszenz-Element bindet. Experimentelle Belege für die Bindung des p24 als Tetramer an den *HvS40* Promotor gibt es bisher nicht.

Wie bereits beschrieben, können in Gelretardierungsexperimenten mit dem zweiten Seneszenz-Element des *HvS40* Promotors, bei Verwendung von Kernproteinen aus jungen Primärblättern, wenigstens drei Protein-DNA-Komplexe nachgewiesen werden. Während für den einen Protein-DNA-Komplex gezeigt werden konnte, dass er das p24 Protein enthält, ist unklar, um welche Proteine es sich bei den anderen Komplexen handelt. Da die DNA-Sequenz des zweiten Seneszenz-Elements auch eine Bindestelle für WRKY-Transkriptionsfaktoren aufweist (W-Box, siehe Abb. 37) wäre es denkbar, dass ein WRKY-Protein Bestandteil der auftretenden Protein-DNA-Komplexe ist. Um zu überprüfen, ob das zweite Seneszenz-Element ein WRKY-Protein binden kann, wurde das zweite Seneszenz-Element mit dem überexprimierten WRKY53 Protein aus *Arabidopsis* inkubiert und gelektrophoretisch aufgetrennt. Dabei konnte eine spezifische Bindung des WRKY53 Proteins aus *Arabidopsis* nachgewiesen werden (Zentgraf, persönliche Mitteilung). Es ist somit denkbar, dass ein zum WRKY53 homologes

Protein aus Gerste Bestandteil eines der drei Protein-DNA-Komplexe des zweiten Seneszenz-Elements ist.

Da WRKY-Transkriptionsfaktoren bevorzugt mit doppelsträngiger und nicht mit einzelsträngiger DNA interagieren (Rushton *et al.* 1996, Eulgem *et al.* 1999), müssten sich in Bindungsstudien mit einzelsträngiger DNA Unterschiede in der Signalstärke der Protein-DNA-Komplexe im Vergleich zu doppelsträngiger DNA zeigen, vorausgesetzt das ein WRKY-Protein Bestandteil eines der Protein-DNA-Komplexes ist. Tatsächlich konnte in den durchgeführten Gelretardierungsexperimenten mit einzelsträngiger DNA des zweiten Seneszenz-Elements und Kernproteinen aus Primärblättern 5 Tage alter Pflanzen beobachtet werden, dass die Signalstärke des Protein-DNA-Komplexes mit dem langsamsten Migrationsvermögen vermindert ist (3.2.4.2). Ein WRKY-Protein könnte somit Bestandteil des größten Protein-DNA-Komplexes, der sich in Bindungsstudien mit dem zweiten Seneszenz-Element und Kernproteinen aus verschieden alten Gerstenpflanzen bildet, sein.

In Ergänzung zu den beschriebenen Theorien über eine Beteiligung eines WRKY-Proteins an der Bindung an das zweite Seneszenz-Element findet man in der Literatur eine interessante Hypothese zur möglichen Interaktion des p24 Proteins mit einem WRKY-Protein aus Kartoffel. Da das Bindemotiv des p24 (TGACA) Teil der W-Box Sequenz ist [(T)TGAC(C)], an die WRKY-Transkriptionsfaktoren binden können (Rushton *et al.* 1996), nimmt man an, dass sich ein WRKY-Protein an das doppelsträngige ERE-Element des *PR-10a* Promotors anlagert, wenn keine Transkription stattfindet (Desveaux *et al.* 2000). Sobald die Transkription des *PR-10a* Gens initiiert wird, könnte das WRKY-Protein von der doppelsträngigen DNA durch das p24 Protein verdrängt werden, das nunmehr an die Einzelstrang-DNA des ERE-Elements bindet und die Transkription aktiviert.

Überträgt man diese Modellvorstellung auf das zweite Seneszenz-Element des *HvS40* Promotors, so müsste man annehmen, dass mit Einsetzen der Seneszenz, wenn der p24-DNA-Komplex nicht mehr nachgewiesen werden kann, ein WRKY-Protein anstelle des p24 an die DNA bindet. Da ein zusätzlicher Protein-DNA-Komplex in Gelretardierungsexperimenten mit Kernproteinen aus unterschiedlich stark seneszierenden Primärblättern nicht beobachtet werden kann, lässt sich diese Theorie nicht auf das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte zweite Seneszenz-Element des *HvS40* Promotors übertragen. Es wäre interessant in weiteren Untersuchungen mit der erweiterten Sequenz des zweiten Seneszenz-Elements (siehe Abb. 37 C), die die

imperfekte IR1-Box einschließt, zu testen, ob abweichend zum analysierten Seneszenz-Element ein solcher weiterer Protein-DNA-Komplex nachgewiesen werden kann. Das erste Seneszenz-Element besitzt genauso wie das zweite eine IR2- sowie eine W-Box. Für das erste Seneszenz-Element konnte in Gelretardierungsexperimenten gezeigt werden, dass sich nach Inkubation mit Kernproteinen aus Primärblättern 5 Tage alter Gerste zwei Protein-DNA-Komplexe bilden. Bei Inkubation mit Kernproteinen aus seneszierenden Primärblättern konnte ein zusätzlicher Protein-DNA-Komplex nachgewiesen werden.

Interessanterweise besitzen der sich bildende und der abfallende Protein-DNA-Komplex in beiden Seneszenz-Elementen nach der nativen Gelelektrophorese eine vergleichbare Größe, so dass das p24 Protein vom einen Element zum anderen „wandern“ könnte. Auch für das erste Seneszenz-Element konnte gezeigt werden, dass es mit dem WRKY53 Protein aus Arabidopsis interagieren kann (Zentgraf, persönliche Mitteilung). Eine Beteiligung des homologen Proteins aus Gerste an einem Protein-DNA-Komplex des ersten Seneszenz-Elements wird daher wie für das zweite Seneszenz-Element postuliert.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur transkriptionellen Regulation des *HvS40* Gens während der Seneszenz sind in dem in Abbildung 39 gezeigten Modell zusammengefasst.

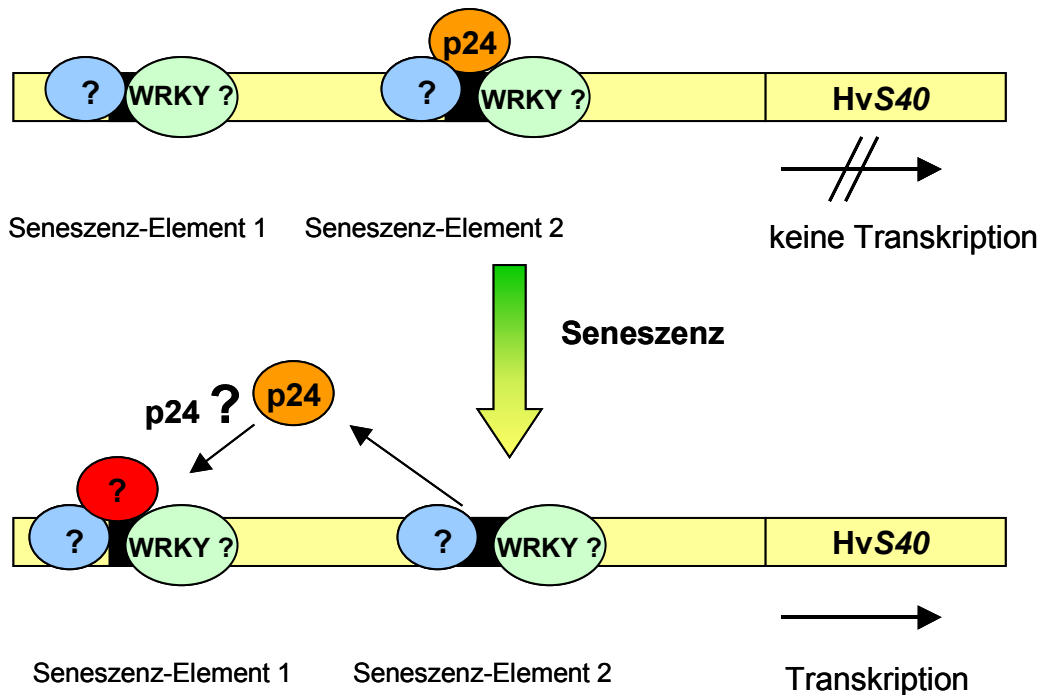


Abb. 39: Modell zur Aktivierung der Transkription des *HvS40* Gens während der Seneszenz.

Die Transkription des *HvS40* Gens könnte während der Seneszenz dadurch aktiviert werden, dass sich das p24 als Repressorprotein vom zweitem Seneszenz-Element löst und ein anderer Faktor an das erste Seneszenz-Element bindet. Es wäre denkbar, dass der an das erste Seneszenz-Element bindende Faktor das p24 Protein selbst ist.

Darüber hinaus ist es vorstellbar, dass WRKY-Transkriptionsfaktoren Bestandteile der nachgewiesenen DNA-Protein-Komplexe mit dem ersten und zweiten Seneszenz-Element sein könnten.

Untersuchungen zur Regulation des p24 Proteins in der Kartoffel haben gezeigt, dass die Aktivität des p24 Transkriptionsfaktors durch eine Proteinkinase gesteuert wird (Deprés *et al.* 1995). So konnte nachgewiesen werden, dass p24 durch ein zur menschlichen Proteinkinase C homologes Enzym phosphoryliert wird (Subramaniam *et al.* 1997). Durch diese Phosphorylierung könnte das Protein das Vermögen bekommen, mit dem *PR-10a* Promotor zu interagieren. Inwieweit das p24 Protein der Gerste phosphoryliert oder dephosphoryliert an den *HvS40* Promotor bindet, bleibt in weiteren Untersuchungen zu klären.

Ebenso ungeklärt ist auch, ob noch weitere *cis*-Elemente und daran bindende Transkriptionsfaktoren einen Einfluss auf die Expression des *HvS40* Gens haben können.

4.3 Subzelluläre Lokalisierung des HvS40 Proteins

4.3.1 Ultrastrukturelle Veränderungen in Primärblättern der Gerste während der Seneszenz

Untersuchungen zur Lokalisation des HvS40 Proteins wurden an Ultradünnschnitten von Primärblättern 11, 13, 23 und 27 Tage alter Pflanzen vorgenommen. Die untersuchten Primärblätter wurden dabei nicht durch eine konventionelle chemische Fixierung für die Untersuchung im TEM vorbereitet, sondern mittels Hochdruckgefrierfixierung eingefroren und anschließend bei tiefen Temperaturen entwässert und eingebettet. Diese von Müller und Moor (1984) entwickelte Präparationsmethode hat im Gegensatz zur konventionellen chemischen Fixierung Vorteile, auf die im weiteren eingegangen werden soll.

Die Hochdruckgefrierfixierung ermöglicht das Einfrieren einer Probe innerhalb von 15 Millisekunden und gewährleistet somit in Kombination mit der Tieftemperaturentwässerung die Ultrastruktur der Pflanze nahe ihrem natürlichen Zustand zu erhalten. Im Gegensatz dazu kann bei einer konventionellen chemischen Fixierung, die im allgemeinen mehrere Stunden dauert, der natürliche Zustand der Pflanzenultrastruktur im TEM nicht mehr abgebildet werden. Bedingt durch die Penetration der Fixantien von aussen (der Blattoberfläche) nach innen (Zellkerne im Mesophyllgewebe) kommt es bei der konventionell fixierten Probe innerhalb der Probe zu einem Konzentrations- und Zeitgradienten, mit der die eingesetzten Aldehyde in die einzelnen Zellen der Probe eindringen. Während die Fixantien die Epidermiszellen und obersten Zelllagen des Mesophyllgewebes bereits fixiert haben, ist das Gemisch von Aldehyden noch nicht in tiefer gelegene Zellschichten des Mesophylls eingedrungen. Eine Fixierung dieser Zellen kann somit zu diesem Zeitpunkt noch nicht stattgefunden haben. Dieser Konzentrations- und Zeitgradient, dem eine Probe bei der konventionellen chemischen Fixierung ausgesetzt ist, führt u.a. zu Umverteilungen von Ionen, zur Veränderung des pH-Wertes und zur Umverteilung der Ribosomen (Pfeiffer *et al.* 2000). Ein weiterer Nachteil der konventionellen Präparation ist, dass während der Entwässerung mit Ethanol bei Raumtemperatur Lipide und Proteine trotz vorheriger Fixierung aus dem Pflanzengewebe ausgewaschen werden und wichtige Strukturinformationen somit häufig verloren gehen können (Kiss *et al.* 1990, Galway *et al.* 1993, Kaneko *et al.* 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal ultrastrukturelle Veränderungen in Primärblättern der Gerste während der Seneszenz untersucht, die mit Hilfe der beschriebenen Cryopräparationstechnik präpariert wurden. Dabei überrascht nicht, dass im Vergleich zu chemisch fixierten Proben einige ultrastrukturelle Unterschiede zu finden sind. Sowohl diese Unterschiede als auch Gemeinsamkeiten zu den aus der Literatur bekannten ultrastrukturellen Veränderungen werden im folgenden diskutiert.

Am augenscheinlichsten ist die Kontrastumkehr in TEM-Abbildungen von konventionell präparierten im Vergleich zu cryopräparierten Proben. Während in konventionell fixierten Blättern die Membranen im Elektronenmikroskop als dunkle Linien im hellen Stroma abgebildet werden, sind in cryopräparierten Proben die Membranstrukturen der Chloroplasten als helle Linien im dunkleren, also elektronendichteren Stroma zu erkennen (siehe 3.4.1). Dies ist auf die Extraktion von Proteinen und Lipiden in chemisch fixierten Proben während der Entwässerung bei Raumtemperatur zurückzuführen (Kiss *et al.* 1990).

Ein weiterer Unterschied zwischen konventioneller und Cryopräparation zeigt sich in der entwicklungsabhängigen Volumenveränderung der Mesophyllzellen. Während in konventionell fixierten Proben gezeigt werden konnte, dass sich das Volumen der Mesophyllzellen im Laufe der Blattseneszenz nicht signifikant verändert (Kura-Hotta *et al.* 1990), kann mit Hilfe der hier beschriebenen Cryopräparationsmethode die vorübergehende Volumenveränderung der Mesophyllzellen zum ersten Mal festgestellt werden (siehe 3.4.1).

Im Gegensatz zu diesen ultrastrukturellen Unterschieden konnten die bereits in der Literatur beschriebenen strukturellen Veränderungen von Mesophyllzellen während der Seneszenz, die sich nach konventioneller Präparation der Blätter zeigten, auch mit der hier verwendeten Cryopräparationstechnik beobachtet werden (siehe 3.4.1). So kann die Abnahme in der Anzahl an Chloroplasten und die Veränderung der Chloroplastenform von ellipsoid zu kugelförmig in ähnlicher Weise wie in konventionell präparierten Proben beobachtet werden (Martinoia *et al.* 1983, Kura-Hotta *et al.* 1990).

Über den Verbleib der Chloroplasten gibt es in der Literatur zwei verschiedene Modellvorstellungen. So wird diskutiert, dass die Chloroplasten als komplettes Zellorganell von der Vakuole phagozytiert werden (Gepstein 1988). Man kann während der Seneszenz beobachten, dass einige Chloroplasten sich nicht mehr in der Nähe der

Zellwand befinden und zur Zellmitte wandern. Da gleichzeitig gezeigt werden konnte, dass man das plastidäre Enzym RubisCo immunocytochemisch während der Seneszenz sowohl in Chloroplasten als auch in der Vakuole nachweisen kann, nimmt man an, dass eine Phagocytose stattgefunden hat (Minamikawa *et al.* 2001). Auch an den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten seneszierenden Primärblätter der Gerste konnte gezeigt werden, dass die Chloroplasten sich gelegentlich von der Zellwand lösen und anschließend in die Zellmitte wandern.

Die zweite Modellvorstellung geht davon aus, dass die Chloroplasten graduell abgebaut werden und als einzelne Chloroplastenbestandteile abtransportiert werden (Noodén 1988 a). Einige Untersuchungen weisen darauf hin, dass beide Mechanismen nebeneinander existieren können (Gepstein 1988). Inwieweit diese Modellvorstellungen auch für die untersuchten Primärblätter der Gerste zutreffen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. In Übereinstimmung mit der Literatur konnte außerdem festgestellt werden, dass die Anzahl der Plastoglobuli während der Seneszenz zunimmt (Daten nicht gezeigt).

Der Seneszenzprozess obliegt einer aktiven Steuerung durch den Zellkern (Smart 1994, Gan & Amasino 1997, Nam 1997). So verwundert es nicht, dass im Zellkern wie auch in den Mitochondrien erst zu einem sehr späten Zeitpunkt der Seneszenz ultrastrukturelle Veränderungen auftreten (Thomson & Platt-Aloia 1987). In den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben kann in Primärblättern aus 23 und 27 Tage alten Pflanzen beobachtet werden, dass vereinzelt Zellen einen Zellkern besitzen, der eine stärkere Kondensierung des Chromatins, sowie ein starkes Schrumpfen und eine Wanderung von der Zellwand zur Zellmitte zeigt (siehe 3.4.1). Dieses Merkmal ist für tierische Zellen als typisches Apoptosemerkmal beschrieben (Kerr *et al.* 1972). Da Zellen mit einem solchen Zellkern häufig keine Zellorganellen mehr besitzen, könnten diese Zellen bereits den sogenannten „*point of no return*“ überschritten haben und damit Symptome zeigen, die der Seneszenz und Apoptose gemeinsam sind (Noodén *et al.* 1997).

4.3.2 Immunlokalisierung des HvS40 Proteins während der Seneszenz

Zu Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt, dass das HvS40 Protein das Potential besitzt, in den Zellkern zu wandern (Krupinska *et al.* 2002). Ob es nur dort oder auch in anderen Zellkompartimenten zu finden ist, war hingegen nicht bekannt. Ungeklärt war auch, ob sich die Lokalisation des HvS40 Proteins entwicklungsabhängig in der Zelle verändert. Zur Klärung dieser Fragestellungen wurde an den bereits beschriebenen Ultradünnschnitten in Primärblättern 11, 13, 23 und 27 Tage alter Pflanzen Immunmarkierungen mit einem HvS40-Antikörper durchgeführt. Es zeigte sich, dass nur in stark seneszierenden Primärblättern 27 Tage alter Pflanzen das HvS40 Protein markiert werden konnte. Aufgrund dieses Ergebnisses kann man annehmen, dass in Primärblättern von 11, 13 und 23 Tage alten Pflanzen im Vergleich zu 27 Tage alter Gerste weniger oder kein HvS40 Protein vorliegt. Vergleicht man dieses Ergebnis mit den durchgeführten *Northern Blot* Analysen der entsprechenden Seneszenzstadien, zeigt sich ein erhöhter mRNA Gehalt des *HvS40* Gens auch nur in Primärblättern 27 Tage alter Pflanzen. Da mit dem erhöhten Transkriptgehalt auch eine vermehrte Proteinmenge des HvS40 Proteins in der Zelle korreliert, kann man annehmen, dass die Menge des *HvS40* Proteins über die RNA-Menge reguliert wird.

Die durchgeführten Immunmarkierungen zeigen im weiteren, dass das HvS40 Protein im Cytosol, an den Kernporen, im intranukleären Spalt sowie am Heterochromatin des Zellkerns nachgewiesen werden kann. Während Markierungen im Cytoplasma in Primärblättern 27 Tage alter Gerste nur vereinzelt zu finden sind, zeigt der Zellkern die höchste Markierungsdichte. Es ist daher denkbar, dass das HvS40 Protein, nachdem es während der Seneszenz in den Zellkern transportiert wurde, eine ständige Lokalisation dort hat und nicht zu den sogenannten Transportproteinen (Shuttle-Proteine) gehört, die zwischen Cyto- und Karyoplasma hin und her wandern und daher relativ gleichmäßig zwischen beiden Kompartimenten verteilt sind. Die vereinzelt auftretenden Markierungen des HvS40 Proteins im Cytoplasma und an der Kernhülle könnten hierbei den Transport des Proteins vom Cyto- ins Karyoplasma zeigen. Als Protein mit einer Masse von 15,4 kDa kann es als reifes Protein vom Cytosol, dem Ort der Proteinsynthese, über reine Diffusion durch die Kernporen in den Kern transportiert werden.

Für die ständige Lokalisation des HvS40 Proteins im Zellkern spricht auch, dass die Sequenz des *HvS40* Gens zwei NLS-Sequenzen (*nuclear localization signal*) aufweist

(Krupinska *et al* 2002). Für Proteine mit ständiger Lokalisation im Zellkern konnte gezeigt werden, dass sie mindestens eine NLS-Sequenz (*nuclear localization signal*) besitzen, während Shuttle-Proteine häufig eine M9 Domäne tragen (Merkle 2001). Nachdem beobachtet werden konnte, dass das HvS40 Protein während der Seneszenz fast ausschließlich am Heterochromatin des Zellkerns zu finden ist, stellt sich die Frage, welche Funktion es dort haben könnte. Da das Heterochromatin in den Zellen den Bereich mit der höchsten DNA-Dichte darstellt (Testillano *et al.* 1995), ist es vorstellbar, dass das HvS40 Protein an DNA assoziiert ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Doppelmarkierungen mit dem HvS40- und einem DNA-Antikörper ausgeführt. Es zeigte sich, dass sich sowohl der DNA- als auch der HvS40-Antikörper bevorzugt an das Heterochromatin anlagern, jedoch nie in direkter Nachbarschaft zueinander vorkommen.

Bei der Interpretation dieses Ergebnisses müssen zunächst folgende Eigenschaften des verwendeten DNA-Antikörpers, der erstmals 1986 von Hansmann & Falk beschrieben wurde, berücksichtigt werden. Der eingesetzte DNA-Antikörper markiert nicht nur Einzel- und Doppelstrang-DNA, sondern auch alle Chromatinproteine mit Ausnahme der Histone (Scheer *et al.* 1987). Die hohe Ansammlung von Markierungen des verwendeten DNA-Antikörpers im Heterochromatin kann somit nicht nur auf die hohe DNA-Dichte sondern auch die Anhäufung von Chromatinproteinen mit Ausnahme der Histone zurückgeführt werden.

Da das HvS40 Protein und die DNA nicht kolokalisieren, ist auszuschließen, dass das HvS40 Protein ein DNA-Bindeprotein ist. Eine mögliche Funktion des HvS40 Proteins beispielsweise als Transkriptionsfaktor ist daher in Frage zu stellen. Dies ist nicht zuletzt auch deshalb unwahrscheinlich, weil das HvS40 Protein erst in einem sehr späten Seneszenzstadium, indem viele Zellen nur noch rudimentär Reste einer Zellkompartimentierung erkennen lassen, nachgewiesen werden kann (siehe 3.4.1). Vielmehr ist deshalb anzunehmen, dass das HvS40 Protein eine Funktion am Zelltod des Blattes, der letzten Stufe der Seneszenz haben könnte.

Für diese Hypothese spricht auch, dass die Expression des *HvS40* Gens nicht nur in der Endphase der Seneszenz, sondern auch in einer anderen Form des programmierten Zelltods, dem Pathogenbefall aktiviert wird (Krupinska *et al.* 2002). Da zudem Kosuppressionslinien und antisense Linien des *HvS40* Gens im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich stärkere Anfälligkeit gegenüber Pathogenbefall zeigen, wäre es somit denkbar, dass das HvS40 Protein an der Verhinderung des Zelltods beteiligt ist.

4.4 Ausblick

Das in dieser Arbeit vorgeschlagene Modell zur möglichen Aktivierung der Transkription des *HvS40* Gens während der Seneszenz bietet eine gute Basis für weiterführende Untersuchungen zur Expression des *HvS40* Gens. Da gezeigt werden konnte, dass ein als p24 beschriebener Transkriptionsfaktor an eine bestimmte DNA-Sequenz des *HvS40* Promotors, die aus einer IR2- und einer W-Box besteht, nur in jungen Primärblättern bindet, wird angenommen, dass das p24 möglicherweise als Repressorprotein die Transkription des *HvS40* Gens vor der Seneszenz unterdrückt. Untersuchungen der Transkription des *HvS40* Gens in transgenen Pflanzen, die das p24 Protein überexprimieren oder unterdrücken, im Vergleich zur Wildtyppflanze könnten in diesem Zusammenhang weitere Hinweise für eine Beteiligung des p24 Proteins an der seneszenzinduzierten Transkription des *HvS40* Gens geben.

Neben der beschriebenen DNA Sequenz im *HvS40* Promotor, an die das p24 Protein in jungen Blättern bindet, konnte noch ein weiteres Seneszenz-Element mit einer IR2- und einer W-Box identifiziert werden. Für dieses Seneszenz-Element konnte in Gelretardierungsexperimenten gezeigt werden, dass mit Kernproteinextrakten aus seneszierenden Primärblättern ein zusätzlicher Protein-DNA-Komplex auftritt. Von großem Interesse wäre daher, diesen zusätzlich auftretenden Proteinkomplex zu charakterisieren. Da dieser Protein-DNA-Komplex eine vergleichbare Größe wie der p24-DNA-Komplex des zweiten Seneszenz-Elements besitzt, kann man vermuten, dass das p24 vom einen zum anderen Promotorbereich wandert. Um zu zeigen, dass auch an diesen Promotorbereich p24 bindet, könnten mit einem p24-Antikörper *Supershift* Assays durchgeführt werden. Zeigt sich, dass es sich dabei nicht um p24 handelt, könnte mit der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Methode der DNA-Affinitätschromatographie die oder das DNA-Bindeprotein(e) isoliert werden.

Darüber hinaus wird es von Interesse sein, die mit dem p24 interagierenden Proteine zu identifizieren. Da gezeigt werden konnte, dass das WRKY53 Protein aus Arabidopsis an die beiden identifizierten Seneszenz-Elemente binden kann, wäre es denkbar, dass das p24 Protein mit dem homologen WRKY53 interagieren kann. Mit Hilfe des *yeast-two-hybrid* Systems könnte eine Interaktion zwischen dem p24 und dem homologen WRKY53 oder anderen Kernproteinen gezeigt werden. Auch könnten zur Isolierung von

Proteinen, die mit dem HvS40 Protein interagieren, Koimmunpräzipitationen mit dem HvS40-Antikörper und Kernproteinen aus seneszierenden und nicht seneszierenden Blättern durchgeführt werden.

In Zukunft wird es von großem Interesse sein, eine mögliche Funktion des HvS40 Proteins am Zelltod des Blattes zu belegen oder widerlegen. Zur Klärung dieser Fragestellung wäre denkbar, Immunmarkierung des HvS40-Antikörpers in Kombination mit Zelltodmarkern durchzuführen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation der Genexpression während der Blattseneszenz der Gerste am Beispiel der Gene *hpd* und *HvS40* untersucht. Zudem wurde die entwicklungsabhängige Lokalisation des HvS40 Proteins bestimmt, von der erste Anhaltspunkte auf eine mögliche Funktion des HvS40 Proteins zu erwarten sind.

Erste Hinweise auf die Regulation beider Gene bei der Blattseneszenz der Gerste konnten verschiedene *Northern Blot* Analysen geben. Es zeigte sich, dass der mRNA Gehalt der Gene *hpd* und *HvS40* in Primärblättern der Gerste nach Induktion von oxidativem Stress, der vermehrt während der Seneszenz auftritt, ansteigt. Darüber hinaus konnte ein erhöhter Transkriptgehalt der Gene *HvS40* und *hpd* nach Behandlung von Primärblättern der Gerste mit den seneszenzfördernden Phytohormonen Methyljasmonat und Abscisinsäure beobachtet werden. Es ist daher denkbar, dass die Expression der Gene *hpd* und *HvS40* während der Seneszenz mit oxidativem Stress sowie einer erhöhten Konzentration an Methyljasmonat und Abscisinsäure im Primärblatt der Gerste verbunden ist.

In Übereinstimmung mit den *Northern Blot* Analysen konnten in der Promotorsequenz der Gene *hpd* und *HvS40* Sequenzelemente identifiziert werden, die an einer durch Abscisinsäure induzierten Transkription beteiligt sein können. In Gelretardierungsexperimenten mit Kernproteinen aus jungen und seneszierenden Primärblättern wurden diese Elemente untersucht. Für eines der Abscisinsäure-Elemente im *hpd* Promotor konnten dabei Unterschiede in den sich bildenden Protein-DNA-Komplexen zwischen den Ansätzen mit Kernproteinen aus seneszierenden und jungen Primärblättern beobachtet werden. Die Beteiligung dieses Abscisinsäure-Elements an der seneszenzabhängigen Transkription des *hpd* Gens wäre daher denkbar.

Im Unterschied zum *hpd* Promotor konnte für die identifizierten Abscisinsäure-Elemente im *HvS40* Promotor keine Teilnahme an der Regulation der seneszenzabhängigen Expression dieses Gens nachgewiesen werden. Hingegen scheinen zwei andere Bereiche (Seneszenz-Elemente) des *HvS40* Promotors an der Regulation der Transkription während der Seneszenz beteiligt zu sein. Diese Promotorregionen, die sich im Abstand von 588 bis 618 Basen (Seneszenz-Element 1) und von 376 bis 393 Basen (Seneszenz-Element 2) vom Transkriptionsstart befinden, weisen als

Sequenzmotiv jeweils einen Teil des ERE-Elements (IR2-Box) sowie eine W-Box auf. Gelretardierungsexperimente mit Kernproteinen aus jungen und seneszierenden Primärblättern zeigten, dass sich im Laufe der Seneszenz im Fall des ersten Seneszenz-Elements ein zusätzlicher Protein-DNA-Komplex bildet. Im Fall des zweiten Seneszenz-Elements sind mit Kernproteinen aus jungen Primärblättern drei Protein-DNA-Komplexe, mit Kernproteinen aus seneszierenden Primärblättern jedoch nur zwei Protein-DNA-Komplexe nachweisbar.

Mit Hilfe einer DNA-Affinitätschromatographie, konnte ein Protein, das nur im Fall junger Primärblätter an das zweite Seneszenz-Element bindet, isoliert werden. Mittels einer Nano-Elektrospray-Massenspektroskopie von Teilpeptiden dieses Proteins konnten partielle Aminosäuresequenzen ermittelt werden. Durch Sequenzvergleiche wurde festgestellt, dass es sich um ein Protein mit großen Homologien zum p24 Transkriptionsfaktor der Kartoffel handelt, für den bislang nur eine Beteiligung bei der Pathogenabwehr bekannt war.

Aufbauend auf den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen wurde ein Modell zur Aktivierung der Transkription des *HvS40* Gens während der Seneszenz entwickelt. Dieses Modell geht davon aus, dass sich der p24 Transkriptionsfaktor während der Blattseneszenz vom zweiten Seneszenz-Element löst und an das erste Seneszenz-Element bindet und damit zur Aktivierung der Transkription des *HvS40* Gens beiträgt.

In Ergänzung zu den beschriebenen Ergebnissen konnte im weiteren mit Hilfe von immunoelektronenmikroskopischen Untersuchungen gezeigt werden, dass das HvS40 Protein überwiegend im Zellkern lokalisiert ist. Dort konnte es nur in den Mesophyllzellen stark seneszierender Primärblätter von 27 Tage alten Pflanzen nachgewiesen werden. Da bei einer Immundoppelmarkierung mit Antikörpern gegen das HvS40 Protein und DNA keine Nachbarschaft der Markierungssignale erkennbar ist, ist anzunehmen, dass das HvS40 Protein selbst kein DNA-Bindeprotein ist.

5. Summary

In this thesis the regulation of *HvS40* and *hpd* gene expression was investigated during leaf senescence in barley. Furthermore, the localisation of the HvS40 protein during senescence was determined in order to get a preliminary idea about the putative function of the HvS40 protein.

A first indication for the senescence-mediated regulation of the *HvS40* and *hpd* genes was obtained by various *Northern blot* analyses. It could be shown that the transcripts of the *hpd* and *HvS40* gene accumulate in barley primary foliage leaves after induction of oxidative stress. Furthermore an enhanced *HvS40* and *hpd* transcript level could be demonstrated after treatment of barley leaves with the phytohormones methyl jasmonate and abscisic acid, which are known to promote senescence. These results indicate that the expression of the *HvS40* and *hpd* gene during senescence of barley primary foliage leaves is related to oxidative stress, methyl jasmonate and abscisic acid. In accordance with the *Northern blot* data several putative binding sites for abscisic acid-dependent transcription factors were identified in the promoter sequence of the *hpd* and *HvS40* gene. To investigate whether one of these abscisic acid response elements is involved in the regulation of the *HvS40* or *hpd* gene expression during senescence, gel retardation shift assays were carried out with nuclear extracts derived from young and senescent primary foliage leaves. Nuclear extracts derived from young and senescent primary foliage leaves show different binding capacities for one abscisic acid element but not for the others. This indicates that this element might be involved in the regulation of the *hpd* gene expression during senescence.

In contrast to the *hpd* gene, the abscisic acid response elements of the *HvS40* promoter showed no differences in binding activities with nuclear proteins derived from primary foliage leaves of different developmental stages. In addition to the abscisic acid response elements, the promoter of the *HvS40* gene possesses two motifs that each contain part of the ERE-element (IR2-box), followed by a W-box. The first motif is located 588-616 nt upstream of the transcription start site, whereas the second motif is situated in a distance of 376-393 nt from the transcription start site. Gel retardation assays with nuclear protein extracts derived from young and senescent primary foliage leaves revealed that the upstream IR2- and W-box elements (senescence-element 1)

shows an additional band during senescence while with the downstream IR2- and W-box elements (senescence-element 2) one band disappears during senescence.

By DNA affinity chromatography approach, a protein from young primary foliage leaves which selectively binds to the second senescence-element, was isolated. The amino acid sequence of different peptides derived from this protein was identified *via* nano-electrospray-mass spectrometry. Sequence comparisons with the identified amino acids showed that this protein possesses high homology to p24, a transcription factor known as activator of the potato *PR-10a* promoter.

Based on the results of this thesis a simple model for the regulation of the *HvS40* gene expression during senescence is proposed. The transcription of the *HvS40* gene might be activated during senescence by shifting p24 from the second to the first senescence-element of the *HvS40* promoter.

Localisation studies by immunoelectron microscopy showed that the *HvS40* protein is a nuclear protein. It could be further demonstrated that the *HvS40* protein is only visible in senescent primary foliage leaves of 27 day old plants. Since double immunogold labeling shows no colocalisation of the *HvS40* protein and DNA, it is unlikely that the *HvS40* protein itself is a DNA-binding protein.

6. Literaturverzeichnis

- Aarenstrup L., Falch A.-M., Jakobsen K.K., Neve S., Henriksen L. O., Tommerup N., Leffers H., Kristiansen K. (2002) Expression and post-translational modification of human 4-hydroxy-phenylpyruvate dioxygenase. *Cell Biology International* **26** (7), 615-625.
- Allen R.G., Tresini M. (1999) Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biology & Medicine* **28**, 463-499.
- Becker W., Apel K. (1993) Differences in gene expression between natural and artificially induced leaf senescence. *Planta* **189**, 74-79.
- Berberich T., Sano H., Kusano T. (1999) Involvement of a MAP kinase, ZmMPK5, in senescence and recovery from low-temperature stress in maize. *Molecular Gene Genetic* **262**, 534-542.
- Birnboim H.C., Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7** (6), 1513-1523.
- Blum H., Beier H., Gross H. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- 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. *Journal of Experimental Botany* **48**, 181-199.
- Buchanan-Wollaston V., Ainsworth C. (1997) Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridisation. *Plant Molecular Biology* **33**, 821-834.
- Busk P.K., Pages M. (1998) Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Molecular Biology* **37**, 425-435.
- 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*. *The Plant Journal* **16**, 209-221.
- Chen S.J., Kao C.H. (1998) Methyl jasmonate, ammonium, and leaf senescence in rice. *Journal of Plant Physiology* **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. *Biochemistry* **18**, 5294-5299.

Choi H.-i., Hong J.-h., Ha J.-o., Kang J.-y., Kim S.Y. (1999) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 1723-1730.

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-Akoyunoglou 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. *Physiologica Plantarum* **110**, 111-119.

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.

Cutler A.J., Krochko J.E. (1999) Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science* **4**, 472-478.

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.

del Rio L.A., Pastori G.M., Palma J. M., Sandalio L.M., Sevilla F., Corpas F.J., Jiménez A., López-Huertas E., Hernández J.A. (1998) The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiology* **116**, 1195-1200.

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 Physiology* **123**, 917-927.

Després C., Subramaniam R., Matton D., Brisson N. (1995) The activation of the potato *PR-10a* gene requires phosphorylation of the nuclear factor PBF-1. *The Plant Cell* **7**, 589-598.

Desveaux D., Després C., Joyeux A., Subramaniam R., Brisson N. (2000) PBF-2 is a novel single-stranded DNA binding factor implicated in the PR-10a gene activation in potato. *The Plant Cell* **12**, 1477-1489.

Desveaux D., Allard J., Brisson N., Sygusch J. (2002 a) A new family of plant transcription factors displays a novel ssDNA-binding surface. *Nature structural biology* **9** (7), 512-517.

Desveaux D., Allard J., Brisson N., Sygusch J. (2002 b) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of p24, a component of the potato nuclear factor PBF-2. *Acta Crystallographica* **D58**, 296-298.

Dhindsa R. S., Plumb-Dhindsa P. L., Reid D. M. (1982) Leaf senescence and lipid peroxidation: Effects of some phytohormones, and scavengers of free radicals and singlet oxygen. *Physiologica Plantarum* **56**, 453-457.

- 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. *Plant Molecular Biology* **30**, 755-767.
- Durner J., Shah J., Klessig D.F. (1997) Salicylic acid and the induction of defense genes. *Trends in Plant Science* **2**: 266-274.
- Eulgem T., Rushton P.J., Schmelzer E., Hahlbrock K., Somssich I.E. (1999) Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO Journal* **18 (17)**, 4689-4699.
- Eulgem T., Rushton P.J., Robatzek S., Somssich I. (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science* **5**, 199-206.
- Evans P. T., Malmberg R.L. (1989) Alternative pathways of tobacco placental development: time of commitment and analysis of a mutant. *Developmental Biology* **136 (1)**, 273-283.
- Fan L., Zheng S., Wang X. (1997) Antisense suppression of phospholipase D alpha retards abscisic acid- and ethylene-promoted senescence of postharvest Arabidopsis leaves. *The Plant Cell* **9**, 2183-2196.
- 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*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 219-234.
- Fiedler E., Soll J., Schultz G. (1982) The formation of homogentisate in the biosynthesis of tocopherol and plastoquinone in spinach chloroplasts. *Planta* **155**, 511-515.
- Foster R. (1992) Analysis of protein/DNA interactions. In: C. Koncz, N.-H. Chua and J. Schell (Hrsg.), *Methods in Arabidopsis research*. World Scientific, Singapore, 378-392.
- Foster R., Izawa T., Chua N.-H. (1994) Plant bZip proteins gather at ACGT elements. *FASEB Journal* **8**, 192-200.
- Friedrich J.W., Huffaker R.C. (1980) Photosynthesis, leaf resistance, and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase degradation in sensing barley leaves. *Plant Physiology* **105**, 405-413.
- Fryer M.J. (1992) The antioxidant effects of the thylakoid Vitamin E (α -tocopherol). *Plant, Cell and Environment* **15**, 381-392.
- Galway M.-E., Rennie P.J., Fowkw L.-C. (1993) Ultrastructure of the endocytotic pathway in glutaraldehyde-fixed and high-pressure frozen/freeze-substituted protoplasts of white spruce (*Picea glauca*). *Journal of Cell Science* **106**, 847-858.
- 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 Physiology* **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 Physiology* **109**, 1371-1378.
- Gepstein S. (1988) Photosynthesis. In: Nooden L.D. and Leopold A.C. (Hrsg.): Senescence and aging in Plants. Academic Press Inc, San Diego, 85-109.
- Gerber H.P., Seipel K., Georgiev O., Höfferer M., Hug M., Rusconi S., Schaffner W. (1994) Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science* **263**, 808-811.
- Grbic V., Bleecker A.B. (1995) Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **8**, 595-602.
- Greenberg J. T., Ausubel F.M. (1993) *Arabidopsis* mutants compromised for the control of cellular damage during pathogenesis and aging. *The Plant Journal* **4** (2), 327-341.
- Guan L.M., Zhao J., Scandalios J.G. (2000) Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize Cat1 antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H₂O₂ is the likely intermediary signaling molecule for the response. *The Plant Journal* **22** (2), 87-95.
- Hansmann P., Falk H. (1986) Ultrastructural localization of DNA in two cryptomonas species by use of a monoclonal DNA antibody. *European Journal of Cell Biology* **42**, 152-160.
- Haußühl K. (1999) Charakterisierung der Blattseneszenz von *Hordeum vulgare* L. unter besonderer Berücksichtigung des Gens *HvS40*. Dissertation, Universität zu Köln.
- Hensel L.L., Grbic V., Baumgarten D.A., Bleecker A.B. (1993) Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **5**, 553-564.
- He Y., Gan S. (2001) Identical promoter elements are involved in regulation of the *OPR1* gene by senescence and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **47**, 595-605.
- He Y., Tang W., Swain J.D., Green A.L., Jack T. P., Gan S. (2001) Networking senescence-regulating pathways by using *Arabidopsis* enhancer trap lines. *Plant Physiology* **126**, 707-716.
- He Y., Fukushige H., Hildebrand D.F., Gan S. (2002) Evidence supporting a role of jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Physiology* **128**, 876-884.
- Herbers K., Meuwly P., Frommer W.B., Metraux J.P., Sonnewald U. (1996) Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway. *The Plant Cell* **8** (5), 793-803.

- Hinderhofer K., Zentgraf U. (2001) Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence. *Planta* **213**, 469-473.
- Hofius D., Sonnewald U. (2003) Vitamin E biosynthesis: biochemistry meets cell biology. *Trends in Plant Science* **8** (1), 6-8.
- 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. *Proceedings of the national academy of science* **97**, 8717-8722.
- Hörtensteiner S. (1999) Chlorophyll breakdown in higher plants and algae. *Cellular and Molecular Life Sciences* **56**, 330-347.
- Humbeck K., Kloppstech K., Krupinska K. (1994) Expression of early light-inducible proteins in flag leaves of field-grown barley. *Plant Physiology* **105**, 1217-1222.
- Humbeck K., Krupinska K. (1996) Does the Clp protease play a role during senescence-associated protein degradation in barley leaves? *Journal of Photochemistry and Photobiology* **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. *Plant, Cell and Environment* **19**, 337-344.
- Hundal T., Forsmark-Andrée P., Ernster L., Andersson B. (1995) Antioxidant activity of reduced plastoquinone in chloroplast thylakoid membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **324**, 117-122.
- Inada N., Sakai A., Kuroiwa H., Kuroiwa T. (1998) Three-dimensional analysis of the senescence program in rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles. *Planta* **205**, 153-164.
- Inada N., Sakai A., Kuroiwa H., Kuroiwa T. (1999) Senescence program in rice (*Oryza sativa* L.) leaves: analysis of the blade of the second leaf at the tissue and cellular levels. *Protoplasma* **207**, 222-232.
- Itzhaki H., Maxson J.M., Woodson W.R. (1994) An ethylene-responsive enhancer is involved in the senescence-related expression of the carnation glutathione-S-transferase (*GST1*) gene. *Proceedings of the national academy of science* **91**, 8925-8929.
- Jiang M., Zhang J. (2001) Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant Cell Physiology* **42** (11), 1265-1273.
- Jing H.-C., Sturre M.J.G., Hille J., Dijkwel P.P. (2002) *Arabidopsis* onset of leaf death mutants identify a regulators pathway controlling leaf senescence. *The Plant Journal* **32**, 51-63.
- 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. *The Plant Journal* **7** (3), 483-490.

John C.F., Morris K., Jordan B.R., Thomas B., Mackerness S. A.-H. (2001) Ultraviolet-B exposure leads to upregulation of senescence-associated genes in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1367-1373.

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. *Plant, Cell and Environment* **23**, 279-289.

Kaneko Y., Walther P. (1995) Comparison of ultrastructure of germinating pea leaves prepared by high-pressure freezing/freeze-substitution and conventional chemical fixation. *Journal of Microscopy* **44**, 104-109.

Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. (1972) Apoptosis a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* **26**, 239-257.

Kim S.Y., Chung H.J., Thomas T.L. (1997) Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the Dc3 promoter using a modified yeast one-hybrid system. *The Plant Journal* **11(6)**, 1237-1251.

Kiss J.-Z., Giddings T.-H., Staehelin L.-A., Sack F.-D. (1990) Comparison of the ultrastructure of conventionally fixed and high-pressure frozen/freeze-substituted root tips of *Nicotiana* and *Arabidopsis*. *Protoplasma* **157**, 64-74.

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 T. M., Fitzpatrick-McElligott S. (1993) Particle bombardment: a universal approach for gene transfer to cells and tissues. *Current Opinion in Biotechnology* **4**, 583-590.

Knetsch M.L.W., Wang M., Snaar-Jagalska B.E., Heimovaara-Dijkstra S. (1996) Abscisic acid induces mitogen-activated protein kinase activation in barley aleurone protoplasts. *The Plant Cell* **8**, 1061-1067.

Knippers R. (1997) Molekulare Genetik. 7. Auflage, Thieme Verlag, S. 306.

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. *Physiologica Plantarum* **104**, 143-152.

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., Haussühl K., Schäfer A., van der Kooij T., Leckband G., Lörz, H and Falk J. (2002) A novel nucleus-targeted protein is expressed in barley leaves during senescence and pathogen infection. *Plant Physiology* **130**, 1172-1180.
- Krupinska K., Humbeck K. (2003) Photosynthesis and chloroplast breakdown. In Noodén N.D. (Hrsg.) Cell Death in Plants. In press: Academic Press Inc., San Diego.
- Krupinska K., Falk J., Humbeck K. (2003) Genetic, metabolic and environmental factors associated with ageing in plants. In Osiewacz H.D. (Hrsg.) Aging of Organisms, Kluwer Verlag.
- Kura-Hotta M., Hashimoto H., Satoh K., Katoh S. (1990) Quantitative determination of changes in number and size of chloroplasts in naturally senescing leaves of rice seedlings. *Plant Cell Physiology* **31**, 33-38.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- 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. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1117-1121.
- Léon J., Rojo E., Sánchez-Serrano J.J. (2001) Wound signalling in plants. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1-9.
- Lers A., Khalchitski A., Lomaniec E., Burd S., Green P.J. (1998) Senescence-induced RNases in tomato. *Plant Molecular Biology* **36**, 439-449.
- Leshem Y.Y., Harmaty E. (1996) The Characterization and Contrasting Effects of the Nitric Oxide Free Radical in Vegetative Stress and Senescence of *Pisum sativum* Linn. Foliage. *Journal of Plant Physiology* **148**, 258-263.
- 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 Physiology and Biochemistry* **36**, 825-833.
- Li X., Zhang Y., Clarke J. D., Li Y., Dong X. (1999) Identification and cloning of a negative regulator of systemic acquired resistance, SNI1, through a screen for suppressors npr1-1. *Cell* **98** (3), 329-339.
- Lichtenthaler H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* **148**, 350-383.
- Lohman K.N., Gan S., John M.C., Amasino R.M. (1994) Molecular analysis of natural senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologica Plantarum* **92**, 322-328.
- Lund A.H., Duch M., Pedersen F.S. (1996) Increased cloning efficiency by temperature-cycle ligation. *Nucleic Acid Research* **24** (4), 800-801.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein measurements with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275.

- Mae T., Thomas H., Gay A.P., Makino A., Hidema J. (1993) Leaf development in *Lolium temulentum*: photosynthesis and photosynthetic proteins in leaves senescing under different irradiances. *Plant Cell Physiology* **34**, 391-399.
- Mäenpää P., Gonzalez E.B., Ahlandsberg S., Jansson C. (1999) Transformation of nuclear and plastomic plant genomes by biolistic particle bombardment. *Molecular Biotechnology* **13**, 67-72.
- Malamy J., Klessig D. F. (1992) Salicylic acid and plant disease resistance. *The Plant Journal* **2** (5), 643-654.
- Mandel M., Higa A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of Molecular Biology* **53**, 159-162.
- Martin C., Thimann K.V. (1972) The role of protein synthesis in the senescence of leaves. I. The formation of protease. *Plant Physiology* **49**, 64-71.
- Martinoia E., Heck U., Dalling M.J., Matile P. (1983) Changes in chloroplast number and chloroplast constituents in senescing barley leaves. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* **178**, 147-155.
- Matile P., Hörtensteiner S., Thomas H. (1999) Chlorophyll degradation. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 67-95.
- Mc Elroy D., Blowers A.D., Jenes B., Wu R. (1991) Construction of expression vectors based on the rice actin 1(*Act1*) 5' region for use in monocot transformation. *Molecular Gene Genetic* **231**, 150-160.
- Mc Elroy D., Zhang W., Cao J., Wu R. (1990) Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *The Plant Cell* **2**, 163-171.
- McKendree W.L., Paul A.L., DeLisle A.J., Ferl R.J. (1990) In vivo and in vitro characterization of protein interactions with the dyad G-box of the *Arabidopsis* Adh gene. *The Plant Cell* **2** (3), 207-214.
- Mengliang C. (2001) Performance of autoregulatory senescence-inhibition gene in rice. *Human Agricultural Science & Technology Newsletter* **2**, 17-23.
- Merkle T. (2001) Nuclear import and export of proteins in plants: a tool for the regulation of signalling. *Planta* **213**, 499-517.
- Miersch I., Heise J., Zelmer I., Humbeck K. (2000) Differential degradation of the photosynthetic apparatus during leaf senescence in barley (*Hordeum vulgare* L.) *Plant Biology* **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 Physiology* **120**, 1015-1023.

- Minamikawa T., Toyooka K., Okamoto T., Hara-Nishimura I., Nishimura M. (2001) Degradation of ribulose-bisphosphate carboxylase by vacuolar enzymes of senescing French bean leaves: immunocytochemical and ultrastructural observations. *Protoplasma* **218**, 144-153.
- Mittler R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**, 405-410.
- Morita K. (1980) Release of nitrogen from chloroplasts during senescence in rice (*Oryza sativa* L.). *Annual Botany* **46**, 297-302.
- Morris K., MacKerness S.A., 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. *The Plant Journal* **23** (5), 677-685.
- Müller M., Moor H. (1984) Cryofixation of thick specimens by high pressure freezing. *Scanning Electron Microscopy* **1984**, 131-138.
- Munné-Bosch S., Alegre L. (2002) The Function of Tocopherols and Tocotrienols in Plants. *Critical Reviews in Plant Science* **21** (1), 31-57.
- Munnik T. (2001) Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends in Plant Science* **6** (5), 227-233.
- Nam H.G. (1997) The molecular genetic analysis of leaf senescence. *Current Opinion of Biotechnology* **8**, 200-207.
- Noh Y.-S., Amasino R.M. (1999 a) Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of *SAG12*. *Plant Molecular Biology* **41**, 181-194.
- Noh Y.-S., Amasino R.M. (1999 b) Regulation of developmental senescence is conserved between *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology* **41**, 195-199.
- Noodén L.D., Singh S., Letham D.S. (1990) Correlation of xylem sap cytokinin levels with monocarpic senescence in soybean. *Plant Physiology* **93**, 33-39.
- Noodén L.D., Guaimét J.J., John I. (1997) Senescence mechanisms. *Physiologica Plantarum* **101**, 746-753.
- Noodén L.D. (1988 a) The phenomena of senescence and aging. In: Nooden L.D. and Leopold A.C. (Hrsg.): Senescence and aging in Plants. Academic Press Inc, San Diego, 1-50.
- Noodén L.D. (1988 b) Whole plant senescence. In: Nooden L.D. and Leopold A.C. (Hrsg.): Senescence and aging in Plants. Academic Press Inc, San Diego, 391-439.
- Norris S.R., Barrette, T.R., DellaPenna D. (1995) Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. *The Plant Cell* **7**, 2139-2149.

- Norris S.R., Shen X., DellaPenna D. (1998) Complementation of the *Arabidopsis pds1* mutation with the gene encoding p-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase. *Plant Physiology* **117**, 1317-1323.
- Obregón P., Martín R., Sanz A., Castresana C. (2001) Activation of defence-related genes during senescence: a correlation between gene expression and cellular damage. *Plant Molecular Biology* **46**, 67-77.
- 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. *Plant Molecular Biology* **30**, 739-754.
- Ono K., Hashimoto H., Katoh S. (1995) Changes in the number and size during senescence of primary leaves of wheat grown under different conditions. *Plant Cell Physiology* **36**, 9-17.
- Pandey S., Ranade S.A., Nagar P.K., Kumar N. (2000) Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. *Journal of Bioscience* **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*. *Plant Molecular Biology* **37**, 445-454.
- Parthier, B (1990) Jasmonates: Hormonal regulators or stress factors in leaf senescence? *Journal of Plant Growth Regulation* **9**, 57-63.
- Pastori G.M., del Rio L.A. (1994) An activated-oxygen mediated role for peroxisomes in the mechanism of senescence of pea leaves. *Planta* **193**, 385-391.
- Pennell R.I., Lamb C. (1997) Programmed cell death in plants. *The Plant Cell* **9**, 1157-1168.
- Pérez-Amador M.A., Abler M.L., DeRocher E.J., Thompson D.M., van Hoof 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 Physiology* **122**, 169-179.
- Petersen M., Brodersen P., Naested H., Andreasson E., Lindhart U., Johansen B., Nielsen H.B., Lacy M., Austin M.J., Parker J.E., Sharma S.B., Klessig D.F., Martienssen R., Mattsson O., Jensen A.B., Mundy J. (2000) *Arabidopsis* map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103** (7), 1111-1120.
- Pfeiffer S., Vielhaber G., Vietzke J.-P., Wittern K.-P., Hintze U., Wepf, R. (2000) High-pressure freezing provides new information on human epidermis: simultaneous protein antigen and lamellar lipid structure preservation. Study on human epidermis by cryoimmobilization. *The Journal of Investigative Dermatology* **114**, 1030-1038.
- Pla M., Vilardell J., Gultinan M.J., Marcotte W.R., Niogret M.F., Quatrano R.S., Pages M. (1993) The cis-regulatory element CCACGTGG is involved in ABA and water-stress responses of the maize gene *rab 28*. *Plant Molecular Biology* **21**, 259-266.

- Pontier D., Gan S., Amasino R.M., Roby D., Lam E. (1999) Markers for hypersensitive response and senescence show distinct patterns for expression. *Plant Molecular Biology* **39**,1243-1255.
- Porfirova S., Bergmüller E., Tropf S., Lemke R., Dörmann P. (2002) Isolation of an *Arabidopsis* mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase for all tocopherol biosynthesis. *Proceedings of the national academy of science* **99 (19)**, 12495-12500.
- 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. *Plant Molecular Biology* **40**, 267-278.
- Quirino B.F., Noh Y.-S., Himelblau E., Amasino R.M. (2000) Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in Plant Science* **5**, 278-282.
- Rao M.V., Davis K.R. (1999) Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. *The Plant Journal* **17 (6)**, 603-614.
- Rao M.V., Davis K.R. (2001) The physiology of ozone induced cell death. *Planta* **213 (5)**, 682-690.
- Rao M.V., Lee H.-i., Creelmann R.A., Mullet J.E., Davies K.R. (2000) Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *The Plant Cell* **12**, 1633-1646.
- Reynolds E.-W. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **17**, 208-212.
- Rise M., Cojocar M., Gottlieb H.E., Goldschmidt, E.E. (1989) Accumulation of α -Tocopherol in senescing organs as related to chlorophyll degradation. *Plant Physiology* **89**, 1028-1030.
- Robatzek S., Somssich I. (2001) A new member of the *Arabidopsis* WRKY transcription factor family, *AtWRKY6*, is associated with both senescence- and defence-related processes. *The Plant Journal* **28 (2)**, 123-133.
- Robatzek S., Somssich I. (2002) Targets of *AtWRKY6* regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes & Development* **16**: 1139-1149.
- Rushton P.J., Torres J.T., Parniske M., Wernert P., Hahlbrock K., Somssich I.E. (1996) Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements of parsley PR1 genes. *The EMBO Journal* **15 (20)**, 5690-5700.
- Ryu B.S., Wang X. (1995) Expression of phospholipase D during castor bean leaf senescence. *Plant Physiology* **108**, 713-719.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Spres, New York.
- Sanford J. C. (1990) Biolistic plant transformation. *Physiologia Plantarum* **79**, 206-209.

Santos C.L., Campos A., Azevedo H., Caldeira G. (2001) In situ and in vitro induced KCl stress: nutritional imbalance, lipid peroxidation and antioxidant metabolism. *Journal of Experimental Botany* **52** (355), 351-360.

Schaller F. (2001) Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. *Journal of Experimental Botany* **52**, 11-23.

Scharrenberg C. (2001) Untersuchungen zur transkriptionellen Kontrolle der Genexpression während der Blattseneszenz der Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Dissertation an der Christian Albrechts Universität zu Kiel.

Scharrenberg C., Quast S., Humbeck K., Krupinska K. (2003) Leaf senescence in flag leaves of field-grown barley plants: cloning and characterization of three senescence-related cDNAs. *Physiologica Plantarum im Druck*.

Scheer U., Messner K., Hazan R., Raska I., Hansmann P., Falk H., Spiess E., Franke W.W. (1987) High sensitivity immunolocalization of double and single-stranded DNA by a monoclonal antibody. *European Journal of Cell Biology* **43**, 358-371.

Schreiber U., Schliwa U., Bilger W. (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research* **10**, 51-62.

Schultz G., Soll J., Fiedler E., Schulze-Siebert D. (1985) Synthesis of prenylquinones in chloroplasts. *Physiologica Plantarum* **64**, 123-129.

Schultz G. (1990) Biosynthesis of Alpha-Tocopherol in Chloroplasts of Higher Plants. *Fat. Sci. Technol.* **92** (2), 86-90.

Shen Q., Ho T.-H. (1995) Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel cis-acting element. *The Plant Cell* **7**, 295-307.

Shen Q., Zhang P., Ho T.-H. (1996) Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *The Plant Cell* **8**, 1107-1119.

Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry* **68** (5), 850-858.

Smart C. (1994) Transley Review No. 64: Gene expression during leaf senescence. *New Phytologist* **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. *Physiologica Plantarum* **93**, 673-682.

Soll J., Kemmerling M., Schultz G. (1980) Tocopherol and plastoquinone synthesis in spinach chloroplast subfractions. *Archives Biochemistry and Biophysics* **204** (2), 544-550.

Southern E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA-fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**, 503-517.

Stoy V. (1973) Assimilatbildung und –verteilung als Komponenten der Ertragsbildung beim Getreide. *Angewandte Botanik* **47**, 17-26.

Srivalli B., Khanna-Chopra R. (2001) Induction of new isoforms of superoxide dismutase and catalase enzymes in the flag leaf of wheat during monocarpic senescence. *Biochemistry Biophysic Research Communication* **288** (4), 1037- 1042.

Subramaniam R., Després C., Brisson N. (1997) A functional homolog of mammalian protein kinase C participates in the elicitor-induced defense response in potato. *The Plant Cell* **9**, 653-664.

Surplus S. L., Jordan B.R., Murphy A.M., Carr J.P., Thomas B., MacKerness S.A.-H. (1998) Ultraviolet-B-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: role of salicylic acid and reactive oxygen species in the regulation of transcripts encoding photosynthetic and acidic pathogenesis-related proteins. *Plant, Cell and Environment* **21**, 685-694.

Sutherland M.W. (1991) The generation of oxygen radicals during host responses to infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **39**, 79-93.

Takamiya K., Tsuchiya T., Ohta, H. (2000) Degradation pathway(s) of chlorophyll: what has gene cloning revealed? *Trends in Plant Science* **5** (10), 426-431.

Terzaghi W.B., Cashmore A.R. (1995) Light-regulated transcription. *Annual Reviews Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**, 445-474.

Testillano P.S., González-Melendi P., Ahmadian P., Risueno M.C. (1995) The methylation-acetylation method: an ultrastructural cytochemistry for nucleic acids compatible with immunogold studies. *Journal of Structural Biology* **114**, 123-139.

Tevini M., Steinmüller K. (1985) Composition and function of plastoglobuli. II. Lipid composition of leaves and plastoglobuli during beech leaf senescence. *Planta* **163**, 91-96.

Thomas H., Donnison I. (2000) Back from the brink: Plant senescence and its reversibility. In: Bryant J.A., Hughes S.G. and GJM (Hrsg.): Programmed Cell Death in Animals and Plants. BIOS Scientific Publishers Ltd Oxford, 149-162.

Thomas H., Horwarth C.J. (2000) Five ways to stay green. *Journal of Experimental Botany* **51**, 329-337.

Thompson J. E., Legge R. L., Barber R. F. (1987) The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytologist* **105**, 317-344.

Thomson W.W., Platt-Aloia K.A. (1987) Ultrastructure and senescence in plants. In: W.W. Thomson, E.A. Nothnagel and R.C. Huffaker (Hrsg.), Plant Senescence: Its Biochemistry and Physiology, American Society of Plant Physiology, Rockville, pp. 20-30.

- Tiedemann J., Hohenberg H., Kollmann R. (1998) High-pressure freezing of plant cells cultured in cellulose microcapillaries. *Journal of Microscopy* **189**: 163-171.
- Ward E.R., Uknes S.J., Williams S.C., Dincher S.S., Wiederhold D.L., Alexander D.C., Ahl-Goy P., Métraux J.-P., Ryals J.A. (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *The Plant Cell* **3**, 1085-1094.
- Wasternack C., Hause B. (2000) Jasmonate- chemische Signale in Pflanzen. *Biologie in unserer Zeit* **6**, 312-319.
- 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. *Plant Molecular Biology* **37**, 455-469.
- Weaver L.M., Amasino R.M. (2001) Senescence is induced in individually darkened *Arabidopsis* leaves, but inhibited in whole darkened plants. *Plant Physiology* **127**, 876-886.
- White J.A., Todd J., Newman T., Focks N., Girke T., de Ilárduya O.M., Jaworski J.G., Ohlrogge J.B., Benning C. (2000) A new set of *Arabidopsis* expressed sequence tags from developing seeds. The metabolic pathway from carbohydrates to seed oil. *Plant Physiology* **124**, 1582-1594.
- Wojtaszek P. (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemistry Journal* **322**, 691-692.
- 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*. *The Plant Cell* **13**, 1779-1790.
- Yamasaki T., Kudoh T., Kamimura Y., Katoh S. (1996) A vertical gradient of the chloroplast abundance among leaves of *Chenopodium album*. *Plant Cell Physiology* **37**, 43-48.
- Yang J., Zhang J., Wang Z., Zhu Q., Liu L. (2002) Abscisic acid and cytokinins in the root exudates and leaves and their relationship to senescence and remobilization of carbon reserves in rice subjected to water stress during grain filling. *Planta* **215**, 645-652.
- Yoshida S., Ito M., Callis J., Nishida I., Watanabe A. (2002 a) A delayed leaf senescence mutant is defective in arginyl-tRNA:protein arginyltransferase, a component of the N-end rule pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **32**, 129-137.
- Yoshida S., Ito M., Callis J., Nishida I., Watanabe A (2002 b) Identification of a novel gene *HYS1/CPR5* that has a repressive role in the induction of leaf senescence and pathogen-defence responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **29**, 427-437.
- 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 Physiology* **42**, 170-178.

Liste der eigenen Veröffentlichungen:

Dähnhardt D., Falk J., Appel J., van der Kooij T. A. W., Schulz-Friedrich R. und Krupinska, K. (2002). The hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 is not required for plastoquinone biosynthesis.
FEBS Letters 523, 177-181.

Falk J., Krauß N., Dähnhardt D. und Krupinska K (2002). The senescence associated gene of barley encoding 4-hydroxyphenyl-pyruvate dioxygenase is expressed during oxidative stress.
Journal of Plant Physiology 159, 1245-1253.

Dähnhardt D., Haussühl K. und Krupinska K. (2003). The transcription factor p24 is involved as a repressor in the senescence related expression of a of the barley gene *HvS40*.
Manuskript in Vorbereitung

Dähnhardt D., Pfeiffer S., Schäfer A. und Krupinska K. (2003).
Immunlocalisation of the *HvS40* protein during leaf senescence of barley primary foliage leaves.
In Vorbereitung

Beiträge in Mitteilungsbänden von Tagungen:

Dähnhardt D., Falk J., Krupinska K., Mölleken H. und Schulz R. (1998).
Tocopherol biosynthesis in *Synechocystis* sp. PCC6803 in response to oxidative stress. In: *The chloroplast: From molecular biology to biotechnology. Tagungsband des "NATO advanced research workshop"*, S. 24. Kreta

Dähnhardt D., Falk J. und Krupinska K. (2001). Expression and promoter analysis of a senescence associated gene of barley encoding a 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *European journal of Biochemistry* 268 (suppl. 1), 106. Lissabon

Pfeiffer S., Dähnhardt D., Beese M. und Krupinska K. (2001). The combination of the confocal laser scanning microscopy (CLSM) technique and transmission electron microscopy (TEM) simplifies the visualisation of the same cells in CLSM and TEM, on the basis of only one preparation technique. *Biology of the Cell* 93, 242. Strassburg

Falk J., Andersen G., Dähnhardt D. und Krupinska K. (2001). Expression of the barley gene encoding 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is related to senescence and stress. In: *Oxygen, free radicals and oxidative stress in plants, Tagungsband der Society for free radical research*, S. 99. Nizza.

Dähnhardt D., Falk J., Appel J., van der Kooij T. A. W., Krupinska K. und Schulz R. (2002). The hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 is not required for plastoquinone biosynthesis. Tagungsband des 5th *European workshop: The molecular biology of cyanobacteria*, Stockholm, S. 51.

Dähnhardt D., Falk J., Appel J., van der Kooij T. A. W., Schulz-Friedrich R. und Krupinska K. (2002). The hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 is not required for plastoquinone biosynthesis. *Mitteilungsband der Jahrestagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, Freiburg, S. 164.

Dähnhardt D., Falk J. und Krupinska K. (2002). Promoter analysis of the senescence associated HvS40 gene of barley. *Mitteilungsband der Jahrestagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, Freiburg, S. 404.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit ergreifen und mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. Karin Krupinska danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft, ihre Unterstützung, das entgegengebrachte Interesse und Vertrauen sowie die gewährten Freiheiten während meiner Arbeit. Vielen Dank !!!

Der FAZIT-Stiftung danke ich für die unkomplizierte und unbürokratische finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Auch ihnen sei an dieser Stelle ganz besonders gedankt.

Herrn Prof. Dr. Rüdiger Schulz-Friedrich danke ich für die Übernahme des zweiten Gutachtens und für die vielen aufmunternden Worte und Ratschläge, mit denen er diese Arbeit begleitet hat.

Ganz besonderer Dank gilt auch Dr. Jon Falk, Dr. Bozena Chrost sowie Dr. Kirsten Krause, die mit vielen fachlichen Ratschlägen und aufmunternden Worten mir zur Seite standen.

Frau Anke Schäfer danke ich für die hervorragende Labororganisation, die das Arbeiten sehr erleichtert hat. Zudem danke ich Dir Anke ganz ausdrücklich für die exzellente Zusammenarbeit im HvS40- und p24-Team. Danke Anke !!!

Marita Beese und Stefan Pfeiffer danke ich für den schnellen Einstieg in die Transmissions-Elektronenmikroskopie. Stefan Pfeiffer danke ich ferner für die sehr große Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Dr. F. Buck danke ich für die Nano-Elektrospray Massenspektroskopie des p24 Proteins.

Markus Böttcher danke ich dafür, dass er als Computernotarzt meine EDV-Probleme lösen konnte und mir beim Festplattencrash meines Laptops rettend zur Seite stand.

Gaby danke ich für die vielen fachlichen Diskussionen, die während dieser Arbeit am Schreibtisch oder auf dem Stepper geführt wurden. Ebenso sei allen weiteren ehemaligen oder jetzigen Mitgliedern der AG Krupinska für die gemeinsame Zeit gedankt!

Meinem Vater verdanke ich die Zuneigung zur Biologie. Ihm sowie dem Rest meiner Familie und meinen Freunden sei dafür gedankt, dass sie mich in meinen Zielen bestärkt und unterstützt haben und mich in der für mich manchmal nicht leichten Zeit der Promotion begleitet haben. Danke Euch allen!

Wenn ich trotz der geführten Liste noch jemanden vergessen haben sollte, so ist das keine böse Absicht, sondern ein Versehen meinerseits.

Lebenslauf

Dorothee Dähnhardt

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 03.10.1974
Geburtsort: Bremen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung:

1980 - 1986 Grundschule und Orientierungsstufe in Lemwerder
1986 - 1990 Gerhard Rohlfs Gymnasium (Bremen)
1990 - 1993 Gymnasium an der Eggestedter Strasse (Bremen)
 Abschluss Abitur
Sept. 1993 - März 1998 Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-
 Universität zu Kiel (10 Studiensemester)
 Hauptfach: Botanik; Nebenfächer: Zoologie, Chemie
Feb. 1996 – Okt. 1996 Auslandssemester an der Rijksuniversiteit
 Groningen/Niederlande
März 1988 - April. 1999 externe Diplomarbeit an der Philipps-Universität Marburg
 (Forschungsgruppe PD Dr. R. Schulz) unter der
 Betreuung von Prof. Dr. K. Krupinska (Botanisches Institut
 der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel)
seit August 1999 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
seit Oktober 2002 Studium der Betriebswirtschaftslehre im Studienkolleg der
 CAU

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:

1. Falk, J, Krauß, N., Dähnhardt, D. und Krupinska, K (2002). The senescence associated gene of barley encoding 4-hydroxyphenyl-pyruvate dioxygenase is expressed during oxidative stress.

Journal of Plant Physiology 159, 1245-1253.

2. Dähnhardt, D., Haussühl, K und Krupinska, K (2003). The transcription factor p24 is involved as a repressor in the senescence related expression of a of the barley gene HvS40.

Manuskript in Vorbereitung

3. Dähnhardt, D, Pfeiffer, S., Schäfer, A. und Krupinska, K. (2003).

Immunlocalisation of the HvS40 protein during leaf senescence of barley primary foliage leaves.

In Vorbereitung

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

Kiel, den 17.3.2003

(Dorothee Dähnhardt)