

**Isolierung, Charakterisierung  
und funktionelle Analyse der Whirly-Proteine  
der Gerste (*Hordeum vulgare* L.)**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel



vorgelegt von

**Evelyn Grabowski**

Kiel

2008

Referentin: Prof. Dr. Karin Krupinska

Korreferent:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt: Kiel, den

.....  
Der Dekan

*Meinem Opa Bernard*

---

## Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>   | <b>VI</b> |
| <b>1 EINLEITUNG .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1 Plastiden und ihre Differenzierung .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.2 Chloroplastenentwicklung in monokotylen Pflanzen am Beispiel der Gerste .....</b>   | <b>2</b>  |
| <b>1.3 Stromules .....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>1.4 Steuerung der Genexpression während der pflanzlichen Entwicklung<br/>        durch anterograde und retrograde Signale .....</b> | <b>5</b>  |
| <b>1.5 Die Blattseneszenz .....</b>  | <b>7</b>  |
| 1.5.1 Regulation der Blattseneszenz .....  | 8         |
| 1.5.2 Das seneszenzassoziierte Gen <i>HvS40</i> .....  | 10        |
| <b>1.6 Die Whirly-Proteinfamilie.....</b>  | <b>12</b> |
| <b>1.7 Zielsetzung .....</b>   | <b>15</b> |
| <b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>  | <b>16</b> |
| <b>2.1 Chemikalien und Enzyme .....</b>  | <b>16</b> |
| <b>2.2 Pflanzenmaterial.....</b>   | <b>16</b> |
| 2.2.1 Anzucht von Gerste .....   | 16        |
| 2.2.2 Behandlung von Gerstenprimärblättern mit Phytohormonen .....   | 16        |
| 2.2.3 Ernte von Gerstenblättern aus dem Freiland .....   | 17        |
| 2.2.4 RNAi-Linien .....  | 17        |
| <b>2.3 Methoden zur Bestimmung physiologischer Parameter .....</b>   | <b>20</b> |
| 2.3.1 Quantifizierung von Chlorophyllen und Carotinoiden .....   | 20        |
| 2.3.2 SPAD-Messung zur Bestimmung des relativen Chlorophyllgehaltes .....  | 20        |
| 2.3.3 Bestimmung der maximalen Effizienz des Photosystems II .....   | 21        |

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>2.4 Allgemeine molekularbiologische Methoden.....</b>  | <b>21</b> |
| 2.4.1 Lösungen und Puffer.....  | 21        |
| 2.4.2 Anzucht, Lagerung und Transformation von Bakterien .....                                      | 22        |
| 2.4.2.1 Bakterienstämme .....   | 22        |
| 2.4.2.2 Anzucht von Bakterienkulturen.....  | 22        |
| 2.4.2.3 Herstellung von Gefrierkulturen.....  | 23        |
| 2.4.2.4 Herstellung kompetenter Zellen.....   | 23        |
| 2.4.2.5 Transformation kompetenter Bakterienzellen.....   | 23        |
| 2.4.3 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....  | 24        |
| 2.4.4 Klonierung von DNA-Fragmenten.....  | 24        |
| 2.4.4.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen .....                                      | 24        |
| 2.4.4.2 Ligation.....   | 25        |
| 2.4.4.3 Klonierung einer partiellen <i>Hvwhy1</i> -cDNA in den<br>Überexpressionsvektor pQE30 ..... | 25        |
| 2.4.5 Isolierung und Aufreinigung von RNA .....   | 26        |
| 2.4.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA unter Verwendung des<br>TriFast-Reagenz.....                      | 26        |
| 2.4.5.2 Isolierung von RNA nach Chirgwin (1979) .....   | 26        |
| 2.4.5.3 Aufreinigung von mRNA .....   | 27        |
| 2.4.6 Semiquantitative RT-PCR.....  | 28        |
| 2.4.6.1 Synthese von cDNA.....  | 28        |
| 2.4.6.2 Polymerase-Kettenreaktion .....   | 29        |
| 2.4.6.3 Densitometrische Analyse .....  | 31        |
| 2.4.7 Sequenzierung von DNA-Fragmenten .....  | 31        |
| 2.4.8 Quantifizierung von Nukleinsäuren.....  | 32        |
| 2.4.8.1 Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese.....                                    | 32        |
| 2.4.8.2 Denaturierende RNA-Agarose-Gelelektrophorese<br>und Northern-„Blot“ .....                   | 32        |

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>2.5 Allgemeine proteinbiochemische Analysen .....</b>                                  | <b>34</b> |
| 2.5.1 Heterologe Überexpression von Genen in <i>E. coli</i> .....                         | 34        |
| 2.5.2 Native Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie<br>an Nickel-NTA ..... | 35        |
| 2.5.3 Isolierung von Gesamtprotein aus Pflanzenmaterial .....                             | 36        |
| 2.5.4 Plastidenisolierung.....  | 36        |
| 2.5.4.1 Isolierung von Chloroplasten nach Gruissem et al. (1986) .....                    | 36        |
| 2.5.4.2 Isolierung von Proplastiden .....   | 37        |
| 2.5.4.3 Isolierung von Stroma- und Membranfraktionen aus Chloroplasten ..                 | 38        |
| 2.5.5 Isolierung von Mitochondrien aus Gerste .....                                       | 39        |
| 2.5.6 Isolierung von Zellkernen aus Gerste .....  | 39        |
| 2.5.7 Proteinfällung .....  | 40        |
| 2.5.8 Bestimmung der Proteinkonzentration .....   | 40        |
| 2.5.9 Gelelektrophorese von Proteinen .....   | 41        |
| 2.5.9.1 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....                           | 41        |
| 2.5.9.2 Diskontinuierliche Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen.....               | 42        |
| 2.5.9.3 Färbung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen .....                    | 43        |
| 2.5.9.4 Trocknen von Proteingelen .....   | 43        |
| 2.5.10 Western-„Blot“-Analyse .....   | 43        |
| 2.5.11 Entfernen von gebundenem Antikörper von der Membran .....                          | 47        |
| 2.5.12 Aufreinigung und Analyse von Antikörpern .....                                     | 47        |
| 2.5.13 Phosphorylierung von Proteinen .....   | 48        |
| <b>2.6 Datenbanken und Internetseiten .....</b>   | <b>49</b> |
| <br>  |           |
| <b>3 ERGEBNISSE .....</b>   | <b>51</b> |
| <br>  |           |
| <b>3.1 Untersuchungen zur HvWhy1- und HvWhy2-Proteinstruktur .....</b>                    | <b>51</b> |

---

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 3.1.1      | Analyse der Primär- und Sekundärstruktur .....  | 51        |
| 3.1.2      | Modellierung der Tertiärstruktur der Proteine HvWhy1 und HvWhy .....  | 53        |
| 3.1.3      | Herstellung und Aufreinigung rekombinanter Whirly-Proteine der Gerste ....  | 55        |
| 3.1.4      | Phosphorylierung der rekombinanten HvWhy1- und HvWhy2-Proteine .....  | 58        |
| <b>3.2</b> | <b>Herstellung von Antikörpern, die gegen das HvWhy1-Protein gerichtet sind .....</b>   | <b>59</b> |
| 3.2.1      | Charakterisierung eines Antikörpers, der gegen das rekombinante HvWhy1-Protein gerichtet ist .....  | 59        |
| 3.2.2      | Charakterisierung eines Antikörpers, der gegen eine Peptidsequenz des HvWhy1-Proteins gerichtet ist.....  | 60        |
| 3.2.2      | Immunologische Untersuchung von Gewebeextrakten aus Gerste zur Charakterisierung beider HvWhy1-Antikörper.....                                    | 61        |
| <b>3.3</b> | <b>Untersuchungen zur Regulation der Expression beider <i>whirly</i>-Gene und zur Verteilung des Whirly1-Proteins im Gerstenprimärblatt .....</b> | <b>64</b> |
| 3.3.1      | Untersuchungen zur Expression der <i>whirly</i> -Gene während der Blattentwicklung und Seneszenz .....  | 64        |
| 3.3.2      | Immunologischer Nachweis des Whirly1-Proteins während der Blattentwicklung.....   | 68        |
| 3.3.3      | Analyse der Expression der <i>whirly</i> -Gene und immunologischer Nachweis des Whirly1-Proteins während der Blättergrünung.....                  | 70        |
| 3.3.4      | Untersuchung zur subzellulären Verteilung des Whirly1-Proteins .....  | 74        |
| 3.3.5      | Immunologische Untersuchung zur subplastidären Verteilung des Whirly1-Proteins.....   | 77        |
| <b>3.4</b> | <b>Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Faktoren auf die Expression der <i>whirly</i>-Gene .....</b>   | <b>78</b> |
| 3.4.1      | Einfluss der Phytohormone auf die Induktion der Expression des <i>Hvwhy1</i> - und <i>Hvwhy2</i> -Gens.....                                       | 78        |
| 3.4.2      | Expression der <i>whirly</i> -Gene im Gerstenprimärblatt bei Langzeit-Inkubation mit Salicylsäure und Methyljasmonat .....                        | 81        |
| 3.4.3      | Einfluss von Umweltfaktoren auf die Abundanz des HvWhy1-Proteins in Fahnenblättern unter Freilandbedingungen .....                                | 85        |
| <b>3.5</b> | <b>Analyse von HvWhy1-RNAi-Linien .....</b>   | <b>88</b> |

---

|  |            |
|--|------------|
| <b>3.6 Immunologischer Nachweis des Whirly2-Proteins .....</b>   | <b>97</b>  |
| 3.6.1 Charakterisierung eines Antikörpers, der gegen das HvWhy2-Protein<br>gerichtet ist .....             | 97         |
| 3.6.2 Immunologischer Nachweis des Whirly2-Proteins in Proteinextrakten aus<br>Gerstenprimärblättern ..... | 99         |
| <b>4 DISKUSSION .....</b>  | <b>101</b> |
| <b>4.1 Das Whirly1-Protein der Gerste.....</b>   | <b>101</b> |
| 4.1.1 Genexpression und Modifizierung des HvWhy1-Proteins .....  | 101        |
| 4.1.1.1 Entwicklungsabhängige Veränderung der Genexpression<br>von <i>whirly1</i> .....                    | 101        |
| 4.1.1.2 Einfluss von Licht auf die <i>whirly1</i> -Genexpression .....                                     | 102        |
| 4.1.1.3 Posttranslationale Modifizierung des Whirly1-Proteins.....   | 104        |
| 4.1.1.4 Struktur von HvWhy1.....   | 105        |
| 4.1.2 Subzelluläre Lokalisierung des HvWhy1-Proteins .....   | 106        |
| 4.1.3 Funktion des HvWhy1-Proteins in den Plastiden .....  | 109        |
| 4.1.4 Das HvWhy1-Protein im Zellkern.....  | 111        |
| 4.1.5 Funktion des HvWhy1-Proteins im Zellkern .....   | 111        |
| 4.1.6 Wirkung von Phytohormonen auf die Expression der<br><i>Hvwhy1</i> - und <i>HvS40</i> -Gene .....     | 113        |
| <b>4.2 Das Whirly2-Protein der Gerste.....</b>   | <b>115</b> |
| 4.2.1 Struktur des Whirly2-Proteins und posttranslationale Modifizierung.....                              | 115        |
| 4.2.2 Regulation der <i>Hvwhy2</i> -Genexpression .....  | 115        |
| 4.2.3 Funktion von HvWhy2 .....  | 117        |
| <b>4.3 Ausblick.....</b>   | <b>118</b> |
| <b>5 ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY .....</b>   | <b>120</b> |
| <b>6 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>  | <b>122</b> |
| <b>7 ANHANG .....</b>  | <b>135</b> |



---

**Abkürzungsverzeichnis**

|                |   |
|----------------|---|
| ABA            | Abscisinsäure                                       |
| AK             | Antikörper  |
| APS            | Ammoniumpersulfat                                   |
| BPB            | Bromphenolblau                                      |
| BSA            | Rinderserumalbumin                                  |
| cDNA           | komplementäre DNA                                   |
| cpm            | Zerfälle pro Minute (counts per minute)             |
| dNTP           | Desoxynukleosidtriphosphat                          |
| D              | Dunkelheit  |
| DTT            | Dithiothreitol                                      |
| ECL            | verstärkte Lumineszenz (enhanced chemiluminescence) |
| EDTA           | Ethylendiamintetraessigsäure                        |
| ERE            | „elicitor response“ Element                         |
| EST            | „expressed sequence tag“                            |
| EtOH           | Ethanol   |
| F <sub>0</sub> | Grundfluoreszenz                                    |
| FG             | Frischgewicht                                       |
| F <sub>m</sub> | maximale Fluoreszenz                                |
| F <sub>v</sub> | variable Fluoreszenz                                |
| Gib            | Gibberellin   |
| HEPES          | 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure     |
| IPTG           | Isopropyl-β-D-thiogalactosid                        |
| IR             | „inverted repeat“                                   |
| Kin            | Kinetin   |
| LB             | Nährmedium nach Luria Bertani                       |
| L/D            | Licht-/Dunkel-Rhythmus                              |
| LHC            | „light harvesting complex“                          |
| MCS            | „multiple cloning site“                             |
| MJ             | Methyljasmonat                                      |
| MOPS           | 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure                  |
| MS             | Murashige und Skoog Medium                          |
| MTS            | mitochondriale Transitsequenz                       |
| Ni-NTA         | Nickel-Nitrilotriessigsäure-Komplex                 |
| NLS            | „nuclear localisation signal“                       |
| OB             | „oligonucleotide/oligosaccharide binding“           |
| PAD            | „putative autoregulatory domain“                    |
| PAM            | Puls-Amplituden-Modulation                          |
| PCR            | Polymerase-Kettenreaktion                           |
| PEG            | Polyethylenglycol                                   |
| PMSF           | Phenylmethylsulfonylfluorid                         |

---

|           |  |
|-----------|--|
| PR        | „pathogenesis related“                                     |
| PS        | Photosystem  |
| PTD       | „putative transactivation domain“                          |
| PTS       | plastidäre Transitsequenz                                  |
| RNAi      | RNA-Interferenz  |
| ROS       | reaktive Sauerstoffspezies                                 |
| rpm       | Umdrehung pro Minute                                       |
| RT        | Raumtemperatur   |
| RT-PCR    | reverse Transkriptase PCR                                  |
| SA        | Salicylsäure   |
| SAG       | seneszenzassoziiertes Gen                                  |
| SDG       | „seneszenz downregulated gen“                              |
| SDS       | Natriumdodecylsulfat                                       |
| SSB       | DNA-Einzelstrang-Bindeprotein                              |
| TEMED     | Tetramethylethyldiamin                                     |
| Tic       | Translocon der inneren Hüllmembran der Plastiden           |
| Toc       | Translocon der äußeren Hüllmembran der Plastiden           |
| Tris      | Tris-(hydroxymethyl)aminomethan                            |
| U         | Units  |
| v/v       | Volumenprozent   |
| w/v       | Gewichtsprozent  |
| wt        | Wildtyp  |
| Proteine: |  |
| COXII     | Cytochrom-c-Oxidase  |
| CP        | Chlorophyllbindendes Protein                               |
| ELIP      | „early light induced protein“                              |
| GFP       | grün fluoreszierendes Protein                              |
| GUN       | „genomes uncoupled “                                       |
| PEP       | Plastiden-kodierte Polymerase (plastid encoded polymerase) |
| RubisCO   | Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase             |
| SOD       | Superoxiddismutase   |
| SUMO      | „small ubiquitin-related modifier“                         |

## 1 Einleitung

### 1.1 Plastiden und ihre Differenzierung

Mit der Keimung des Samens beginnt die Entwicklung des pflanzlichen Organismus. Die gelagerten Reserven im Samen werden aufgebraucht und neue Energiequellen müssen genutzt werden. Pflanzen zeichnen sich nicht nur durch ihre sessile Lebensweise aus, eine entscheidende Fähigkeit ist die photoautotrophe Lebensweise. Pflanzen sind mit Hilfe ihrer Chloroplasten in der Lage, alle im Stoffwechsel benötigten Substanzen aus anorganischen Stoffen unter Ausnutzung des Sonnenlichtes aufzubauen.

Nach der Endosymbionten-Theorie wurden sowohl Mitochondrien als auch Chloroplasten als Procyte von einer Eucyte aufgenommen. Deswegen besitzen diese für eukaryotische Organismen typischen Zellorganellen eine doppelte Hüllmembran. Sie können nicht vom Organismus „de novo“ synthetisiert werden. Die Plastiden stammen aus einer Phagozytose eines Vorläufers der Cyanobakterien (Gray 1998). Im Verlauf der Evolution übernahm der eukaryotische Wirt immer mehr die Kontrolle über den Endosymbionten, wobei der Hauptteil des endosymbiontischen Genoms in den Kern der Eucyte transferiert wurde (Martin et al. 2002). Eine zunehmende Einbindung in den Stoffwechsel der Wirtszelle erforderte Anpassungen wie z.B. der Plastidenteilung, der plastidären Transkriptions- und Translationsmaschinerie sowie Entstehung von Importmechanismen für Proteine, die im Cytoplasma translatiert werden.

Alle Plastidenformen gehen auf eine gemeinsame Vorstufe, die Proplastiden, zurück. Nach Ausbildung der meristematischen Region kommt es zur Proplastidenvermehrung, um bei der Zellteilung eine gleichmäßige Verteilung in jegliche Tochterzellen abzusichern (Chaly und Possingham 1981). In einer meristematischen Zelle sind ca. 10-20 Proplastiden zu finden. Aus den Proplastiden können sich unter Einfluss von Licht Chloroplasten entwickeln (Lopez-Juez und Pyke 2005) (Abb. 1.1). Diese sind Ort der Photosynthese und enthalten das dafür notwendige Chlorophyll. In Angiospermen ist Licht notwendig, um aus Protochlorophyllid Chlorophyll zu bilden. Dabei können sich diese photosynthetisch aktiven Organellen auch aus den sogenannten Etioplasten entwickeln. Diese Form der Plastiden entsteht bei Anzucht in Dunkelheit. Die internen Membranen zeigen eine semikristalline Struktur, die Prolamellarkörper genannt wird. Bei Belichtung bildet sich das typische Thylakoidmembransystem aus Grana- und Stromathylakoiden heraus. Gerontoplasten sind alternde Chloroplasten, die sich aus Chloroplasten während der Seneszenz bilden (siehe 1.5). Chromoplasten sind frei von Chlorophyll, enthalten aber Carotinoide, die für die gelben, orangen und roten Blüten- bzw. Fruchtfarben verantwortlich sind. Amyloplasten weisen keine Farbstoffe auf, sie deponieren in ihrem Stroma Stärke in Form von Stärkekörnern. Leukoplasten beinhalten ebenfalls keine Farbstoffe, sie dienen der Bildung und Lagerung von weiteren Speichersubstanzen. Werden Lipide und Monoterpene eingelagert, spricht man auch von Elaioplasten (Abb. 1.1).

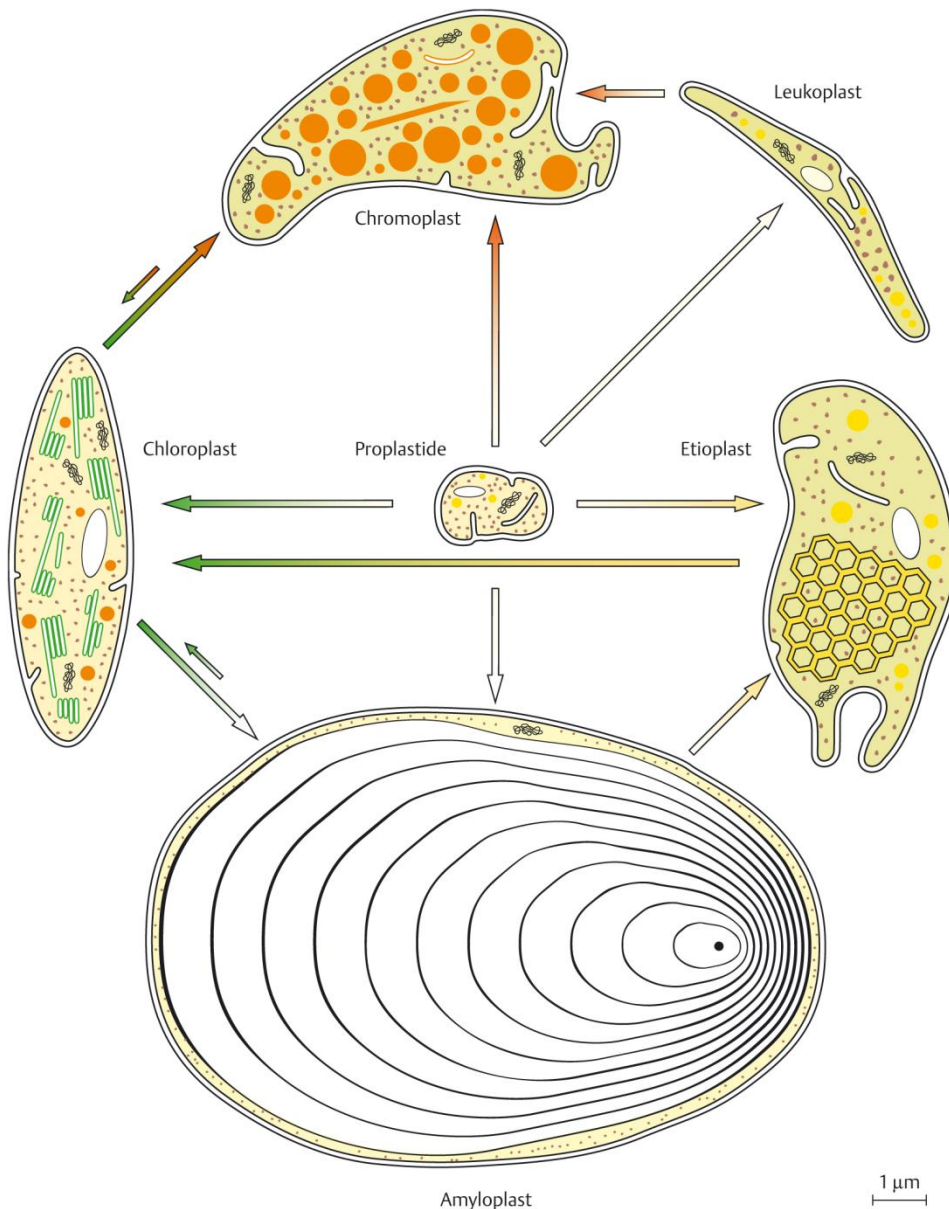


Abb. 1.1: Darstellung der möglichen Plastidenformen. Die Pfeile kennzeichnen die Entwicklungsrichtung (aus: Wanner, Mikroskopisch Botanisches Praktikum 2005).

## 1.2 Chloroplastenentwicklung in monokotylen Pflanzen am Beispiel der Gerste

Bei Monokotylen werden die Blätter primär aus dem sich an der Blattbasis befindenden Meristem produziert. Dadurch befinden sich junge Zellen nahe der Blattbasis und ältere an der Blattspitze (Mullet 1988, Robertson und Laetsch 1974, Sharman 1942). In Blättern von Gräsern befindet sich entlang dieses Altersgradienten auch ein Gradient der Chloroplastenentwicklung, der mit einem Anstieg des Plastidenvolumens pro Zelle einhergeht (Abb. 1.2). Deshalb kann auch das Zellalter durch die Beschreibung der Ausdifferenzierung der Chloroplasten und des eingenommenen Plastidenvolumens erfasst

werden (Mullet 1988). Die Zelldifferenzierung ist abhängig von einer ungestörten Chloroplastenentwicklung.

Nur im Meristem, das sich an der Blattbasis befindet, teilen sich die Zellen. Bis zum Ende der Zellteilung bleibt das Plastidenvolumen sehr gering. Die Proplastiden weisen einen Durchmesser von 2  $\mu\text{m}$  auf und beinhalten pro Organell ca. 130 Kopien der plastidären DNA (Baumgartner et al. 1989). Im Meristem wird die plastidäre DNA-Synthese und Replikation aktiviert, um die Anzahl der Plastiden und deren DNA-Gehalt in den sich teilenden Zellen aufrechtzuerhalten. Im basalen Bereich des monokotylen Blattes ist in den Plastiden die Transkriptionsaktivität und die Transkriptmenge geringer als in der darauffolgenden Region von ca. 1 cm bis 3 cm über der Blattbasis (Mullet 1993). Dort steigt die Zellgröße von 18  $\mu\text{m}$  auf 60  $\mu\text{m}$  an und die plastidäre Transkriptionsaktivität steigt um 10fache, die DNA-Kopiezahl erhöht sich von 130 auf 210 pro Plastide (Baumgartner et al. 1989). Das entsprechende Plastidenvolumen vergrößert sich, bis das Maximum der Plastidengröße in reifen bzw. photosynthetisch aktiven Zellen erreicht ist. Sobald sich die Zellen in der Zellstreckungszone befinden, nimmt die Transkriptionsaktivität und die Transkriptmenge in den Plastiden zu. Transkripte der Gene wie *rpoB*, *rpoC1*, *rpoC2*, die für die Untereinheiten der plastidären RNA-Polymerase (PEP) kodieren, erreichen ihre maximale Menge früh in der Chloroplastenentwicklung. Daraufhin kommt es zur Aktivierung der plastidären und kernkodierten Gene, die für Photosystemkomponenten kodieren und zum Zusammenbau des Photosyntheseapparates (Baumgartner 1993, Klein und Mullet 1987, Mullet und Klein 1987). Erst in reifen Chloroplasten verringert sich die Transkriptrate wieder (Mullet und Klein 1987). Im Fall des D1-Proteins, das einen hohen „turn-over“ hat, bleibt die Proteinsynthese hoch (Greenberg et al. 1989). Reife Mesophyllzellen enthalten durchschnittlich 60 Chloroplasten, die einen Durchmesser von 6-8  $\mu\text{m}$  aufweisen. In einer Zelle mit ausdifferenzierten Chloroplasten befinden sich 8000-12000 Kopien der plastidären DNA (Baumgartner et al. 1989).

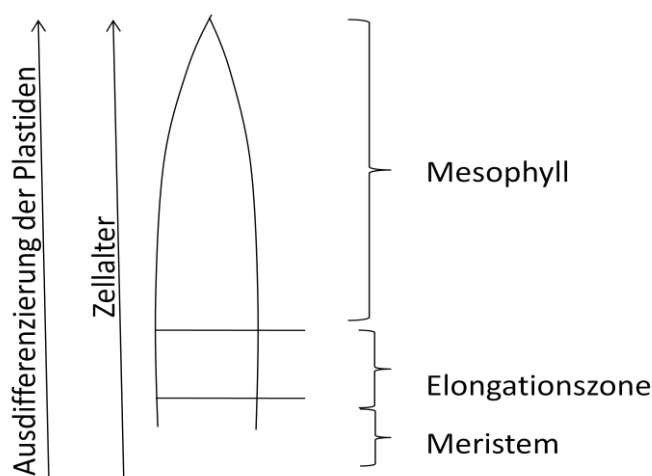


Abb. 1.2: Darstellung der verschiedenen Entwicklungszonen im monokotylen Blatt.

Ein sich entwickelnder Chloroplast muss ca. 3000 Proteine, die im Kern kodiert sind, importieren (Martin et al. 2002). Die meisten der importierten Proteine haben eine N-terminale Transitsequenz (Hörmann et al. 2007). Diese ist zwischen 20 und 80 Aminosäuren lang und wird von dem Chloroplastenimportapparat erkannt (Lopez-Juez und Pyke 2005). Die zu importierenden Proteine werden durch Chaperone entfaltet gehalten (Bauer et al. 2001). Der Import wird ermöglicht durch Proteinkomplexe, die sich in beiden Hüllmembranen befinden und als Translocon der äußeren (Toc) und der inneren Hüllmembran (Tic) bezeichnet werden (Hörman et al. 2007, Vothknecht und Soll 2005). Importierte Proteine werden nach dem Einschleusen ins Stroma mit Hilfe einer spezifischen Peptidase von ihrer Transitsequenz getrennt und können dann suborganellar verteilt werden (Vothknecht und Soll 2005). Mit Hilfe weiterer Transitsequenzen können Bestimmungsorte wie innere Hüllmembran, Thylakoide und Lumen erreicht werden (Jarvis und Robinson 2004).

### 1.3 Stromules

Plastiden weisen mit Stroma gefüllte Ausläufer auf, die von der Oberfläche der Plastiden ausgehen. Diese von zwei Hüllmembranen umschlossenen Strukturen, die Stromules (stroma filled tubules) genannt werden (Gray et al. 2001), sind hochdynamisch mit einer sich sehr schnell verändernden Gestalt. Sie wurden bisher in allen Plastidentypen (siehe 1.1) beobachtet, haben einen Durchmesser von ca. 0,4  $\mu\text{m}$  bis 0,8  $\mu\text{m}$  und sind bis zu 100  $\mu\text{m}$  lang (Hanson und Sattarzadeh 2008, Köhler und Hanson 2000, Köhler et al. 1997, Kwok und Hanson 2004a, b, Natesan et al. 2005). Sie bewegen sich durch das Aktin-Cytoskelett mit Hilfe von Myosin. Sie erhöhen die Oberfläche der Plastiden und sind eher stark vertreten bei relativ kleinen Plastidenformen im Gegensatz zum großen Chloroplasten, bei denen sie nicht nur in geringerer Zahl vorkommen, sondern auch in verminderter Größe (Natesan et al. 2005). Stromules können verschiedene Plastiden verbinden und sogar Makromoleküle wie GFP und RubisCO austauschen (Kwok und Hanson 2004a, Köhler et al. 1997). Eine physische Interaktion könnte durch den Austausch von Intermediaten die Effizienz des pflanzlichen Stoffwechsels fördern (Kwok und Hanson 2004b). In *Euglena gracilis*, *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum* wurde eine dichte Anlagerung von Plastiden am Zellkern beobachtet (Ehara et al. 1990, Hanson und Sattarzadeh 2008, Natesan et al. 2005). Einen ausgeprägten Kontakt von Stromules zu Einfaltungen und Einkerbungen der Kernhülle konnte in Tabak festgestellt werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass eine Funktion dieser Stromules im Austausch von Makromolekülen liegt. Möglicherweise könnte der Austausch der Moleküle über die Stromules einen Einfluss auf die plastidäre und nukleäre Genexpression haben (Kwok und Hanson 2004 b). Zusätzlich wurde eine Freisetzung von Vesikeln aus dem Endbereich der Stromules festgestellt, die mit einem sofortigen Zurückziehen des restlichen Stromules einhergeht (Gunning 2005). Die Beobachtung, dass sich die Anzahl und Morphologie der Stromules während der Zellentwicklung ändern, deutet darauf hin, dass diese Strukturen in Zell- und Entwicklungsprozesse involviert sind (Natesan et al. 2005).

## 1.4 Steuerung der Genexpression während der pflanzlichen Entwicklung durch anterograde und retrograde Signale

Die Koordination der Genexpression ist essentiell für die pflanzliche Entwicklung und das Überleben des ganzen Organismus. Pflanzliche Zellen beinhalten drei Genome, diese sind im Zellkern und in den Organellen, den Plastiden und Mitochondrien, zu finden, deren Genexpression untereinander abgestimmt sein muss. Chloroplasten beinhalten über 3000 verschiedene Proteine, von denen mehr als 95 % im Kern kodiert und posttranslational in die Plastiden importiert werden müssen (siehe 1.2). Eine Vielzahl plastidärer Proteinkomplexe, wie z.B. RubisCO und beide Photosysteme bestehen sowohl aus importierten als auch aus im Chloroplasten translatierten Proteinen. Eine Konsequenz daraus ist ein intensiver anterograde (vom Zellkern zu den Organellen) und retrograder Signalaustausch (von den Organellen zum Zellkern) (Beck 2005, Nott et al. 2006). Dieser ist erforderlich für die Koregulation der Expression von Kern- und Organellengeneten (Abb. 1.3), damit die Stöchiometrie der in einem Komplex beteiligten Proteine aufeinander abgestimmt ist.

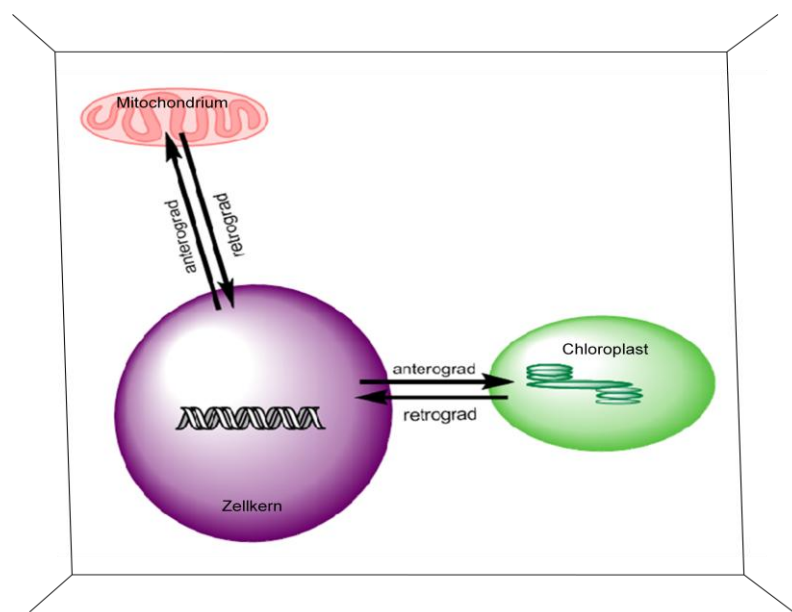


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der anterograden (vom Zellkern zu den Plastiden bzw. Mitochondrien) und retrograden Signalwege (von den Organellen zum Zellkern) in einer pflanzlichen Zelle (ohne Zellwand abgebildet).

Es ist eine Herausforderung für die Zelle, die Genexpression der verschiedenen Genome aufeinander abzustimmen. Eine sich permanent verändernde Umwelt beeinflusst den Entwicklungs- und Funktionsstatus der Plastiden insbesondere die Chlorophyllsynthese und Photosyntheseleistung. Diese Änderungen bedingen eine Anpassung der nukleären Genexpression, welche wiederum ein aufeinander abgestimmtes Genexpressionsverhalten ermöglicht (Beck 2005, Koussevitzky et al. 2007, Nott et al. 2006).

Genetische und physiologische Studien zeigen fünf Signalwege, über die der Chloroplast die retrograde Kontrolle über die Expression der Kerngene ausüben kann (Beck 2005):

- Die plastidäre Proteinsynthese ist erforderlich für die Expression von einigen Kerngenen. Eine Behandlung mit Chloramphenicol und anderen für das Organell spezifischen Inhibitoren der Translation führt zu einer verminderten Expression von Kerngenen, die für Untereinheiten des Photosyntheseapparates kodieren (Oelmüller et al. 1986, Oelmüller und Mohr 1986, Sullivan und Gray 1999). Das GUN1-Protein wurde als Komponente dieses ersten Signalweges identifiziert (Beck 2005, Koussevitzky et al. 2007).
- Reaktive Sauerstoffspezies werden unter Starklicht vermehrt in den Chloroplasten generiert. Dabei entsteht am Photosystem II Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ), wenn Chlorophyll vom Triplettzustand in den Grundzustand übergeht und dabei den Anregungszustand auf Sauerstoff überträgt (Apel und Hirt 2004, Niyogi 1999).  $^1\text{O}_2$  wird durch Antioxidantien wie Carotinoide unschädlich gemacht (Niyogi 1999). Die Akkumulierung von  $^1\text{O}_2$  beeinflusst ebenfalls die Genexpression im Zellkern. Es konnten bisher zwei Proteine aus *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden, die als Executer1 und Executer2 bezeichnet und als Komponenten des  $^1\text{O}_2$  vermittelten Signalweges identifiziert wurden (Lee et al. 2007).
- Im Verlauf der plastidären Elektronentransportkette werden Elektronen auf Ferredoxin und von dort auf  $\text{NADP}^+$  übertragen. In Stresssituationen wie bei Starklicht können aber Elektronen auch direkt auf molekularen Sauerstoff transferiert werden (Mehler-Reaktion). Dabei entsteht das Superoxidradikal ( $\text{O}_2^-$ ). Dieses führt zu oxidativem Stress.  $\text{O}_2^-$  wird z.B. durch die Superoxiddismutase (SOD) in  $\text{H}_2\text{O}_2$  überführt, das durch die Ascorbatperoxidase abgebaut wird. Auch  $\text{H}_2\text{O}_2$  kann als Signalmolekül eine Rolle spielen (Beck 2005).
- Umweltbedingungen ändern auch den Redoxstatus der Photosynthese-Elektronentransportkette. Dieser reguliert die Genexpression im Chloroplasten (Pfannschmidt et al. 1999) und hat auch Einfluss auf einige Kerngene wie *petE*. Zusätzlich regulieren die Redoxsignale die Stabilität der mRNA kernkodierter Gene und kontrollieren dadurch die nukleäre Genexpression (Sullivan und Gray 2002).
- Ein in den Plastiden gut untersuchter retrograder Signalweg wird ausgelöst durch die Bildung und Anhäufung von Mg-Protoporphyrin IX (Beck 2005, Nott et al. 2006), ein Intermediat der Chlorophyllbiosynthese. Das Intermediat vermindert die Genexpression für Chlorophyllbindeproteine und fördert die Genexpression des Hitzeschockproteins HSP70 (Kropat et al. 2000). Es wurden bereits mögliche Mg-ProtoporphyrinIX-Transporter identifiziert (Woodson und Chory 2008).

Auch in Mitochondrien wurde bereits retrograde Kommunikation beschrieben (Woodson und Chory 2008). Kerngene, die in Beziehung zur Atmung, zur peroxisomalen Biogenese und zum oxidativen Stress stehen, werden durch den physiologischen Status der Mitochondrien reguliert. Dieser Status wird durch das Maß an Energieproduktion bzw. dem Niveau an ROS,  $\text{Ca}^{2+}$  und mitochondrialer Genexpression beschrieben.



## 1.5 Die Blattseneszenz

Im Verlauf der Alterung nimmt der Grad der Schäden am Photosyntheseapparat zu und gleichzeitig verringert sich die Kapazität antioxidativer Schutzsysteme (Meyer und Spiteller 1997), was zu einer Steigerung des oxidativen Stresses führt. Die Initiation der letzten Entwicklungsphase, der Seneszenz, wird durch verschiedene externe und interne Faktoren bedingt. Hierbei spielen im Besonderen auch ROS mit  $H_2O_2$  als Signalmolekül sowie Zucker und andere Metabolite eine Rolle (Gan und Amasino 1997, Mittler 2002, Nam 1997, Neill et al. 2002). Die Seneszenz zeichnet sich durch einen programmierten und koordinierten Abbau von Makromolekülen bzw. Remobilisierung von Nährstoffen aus, die in andere Teile der Pflanze transportiert werden. Die Seneszenz wird in verschiedene Phasen unterteilt (Noodén et al. 1997): die Initiationsphase, die Degenerationsphase und die terminale Phase. Während der Initiationsphase, die durch exogene und endogene Faktoren ausgelöst wird, kommt es zur Reduzierung des vegetativen Wachstums und der Photosynthese (Hensel 1993). In der Degenerationsphase kommt es zum Abbau des Photosyntheseapparates und des Chlorophylls. Diese geordneten Abbauprozesse ermöglichen die Remobilisierung von Makromolekülen. Die Seneszenz ist bis zu einem bestimmten Zeitpunkt reversibel (Kleber-Janke und Krupinska 1997). Am Ende der Entwicklung einer Pflanze steht die terminale Phase, die zum Zelltod führt (Dangl et al. 2000, Penell und Lamb 1997). Eine Form des programmierten Zelltods ist die Apoptose, in die die Mitochondrien involviert sind. Dieser Prozess, der besonders gut im tierischen System untersucht ist, zeichnet sich unter anderem durch die Freisetzung von Cytochrom c und anderen proapoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien aus (Butow und Avadhani 2004).

In Getreidepflanzen scheint die Seneszenz auf der Ebene des individuellen Blattes reguliert zu sein (Gregersen et al. 2008), d.h. Nährstoffe werden von älteren Blättern zu jüngeren Blättern und scheinbar auch ins Fahnenblatt transportiert, das wiederum für die Versorgung der Ähre mit Nährstoffen bzw. Assimilaten verantwortlich ist (Stamp und Herzog 1976, Wiedemuth et al. 2005).

Die Seneszenz des einzelnen Blattes als Ort des größten Stoffumsatzes zeigt enorme Veränderungen auf struktureller und biochemischer Ebene. Bis zu 75 % des reduzierten Stickstoffs in photosynthetisch aktiven Zellen der Getreidepflanzen ist in den Chloroplasten lokalisiert (Peoples und Dalling 1988), wobei die Hauptquelle für die Stickstoffremobilisierung die RubisCO darstellt (Hörtensteiner und Feller 2002). Getreidepflanzen bieten auf Grund ihrer basipetalen Organisation (Mullet 1988) eine gute Möglichkeit die Blattseneszenz zu untersuchen, da aufgrund des Altersgradienten der Zellen in einem Blatt homogene Bereiche vom meristematischen bis hin zu spät-seneszentem Gewebe vorhanden sein können. Der Altersgradient wird begleitet von einem Gradienten der Chloroplastenentwicklung (siehe 1.2). Dadurch ist es möglich, detaillierte biochemische sowie ultrastrukturelle Studien der Chloroplastenveränderungen während der Entwicklung innerhalb eines Blattes durchzuführen (Kolodziejek et al. 2003).

Die Blattalterung geht mit einer Veränderung der Chloroplasten einher, wobei RNA, Lipide (Thompson et al. 1998), Proteine und Chlorophylle abgebaut werden (Gan und Amasino 1997, He und Gan 2001). Durch den koordinierten Abbau wird die Bildung freier Chlorophyll-Radikale verhindert (Hörtensteiner 1999, Takamiya et al. 2000).

Neben Veränderungen innerhalb der Chloroplasten kommt es auch zu einer Abnahme in ihrer Anzahl (Ono et al. 1995). Diese Abnahme scheint in Gerste nicht vorzukommen, die Zahl der Chloroplasten bleibt bis in die fortgeschrittene Seneszenz hinein weitgehend konstant, wobei sich die Chloroplasten aber bereits in der Phase der Remobilisierung befinden (Gregersen et al. 2008). Neben dem Effekt des Abbaus ganzer Chloroplasten wurden ultrastrukturelle Umgestaltungen von seneszierenden Chloroplasten in Gerontoplasten beobachtet (Butler und Simon 1971, Gepstein 1988). Diese zeichnen sich durch Reduktion der Thylakoide, Verschwinden der Grana, Schwellung des intrathylakoidalen Raums, Verringerung der Größe (Kura-Hotta et al. 1990) und Transition von der ellipsoiden zur zirkulären Gestalt aus (Inada et al. 1998, Pleijel et al. 1997). Für die Veränderung der Organellen ist auch die Bildung von Plastoglobuli, die Degradationsprodukte beinhalten, charakteristisch (Austin et al. 2006). Die Zentralvakuole ist das Kompartiment mit der stärksten hydrolytischen Aktivität und bleibt bis zum Ende der Seneszenz intakt (Matile 1997, Noodén 2004). Der größte Anteil der abgebauten Proteine stammt aus den Chloroplasten. Die Art, wie die Proteine aus den Chloroplasten in die Zentralvakuole gelangen, ist noch nicht vollständig geklärt. Der Proteinabbau scheint sowohl in als auch außerhalb der Plastiden abzulaufen. In dem extraplastidären Abbau sind unter anderem seneszenzassoziierte Vakuolen (SAV) involviert (Martínez et al. 2008). Außerdem wurden sogenannte „RubisCO-containing bodies“ beobachtet, die neben den SAVs beim Transport der abgebauten bzw. abzubauenden plastidären Moleküle zur Zentralvakuole eine Rolle spielen (Gregersen et al. 2008, Krupinska 2006).

Im Unterschied zu den Chloroplasten bleiben der Zellkern und die Mitochondrien bis zu einem späten Stadium der Seneszenz intakt. Die Integrität des Zellkerns ist während dieser Phase essentiell für einen koordinierten Abbau und eine effiziente Remobilisierung. Durch den Erhalt der Mitochondrien wird für die notwendige Energie für Abbauprozesse gesorgt (Thompson und Plat-Aloia 1987, Gan und Amasino 1997). Erst nach der DNA-Fragmentierung und Kernkondensierung zerreißt der Tonoplast und die Hydrolasen vermischen sich mit dem Cytosol. Durch den Verlust der Zellkompartimentierung verliert die Zelle ihre Integrität und stirbt ab.

### **1.5.1 Regulation der Blattseneszenz**

Die Blattseneszenz ist nicht nur eine Phase im Verlauf der natürlichen Alterung, sondern kann auch verfrüht ausgelöst werden. Seneszenzfördernde Faktoren sind auch Umweltfaktoren wie Trockenheit, UV-Strahlung, Pathogenbefall, Starklicht, Salzgehalt, Schwermetalle, Ozon und Nährstoffmangel. Diese Faktoren beeinflussen den

Elektronentransfer in den Chloroplasten und führen zur verstärkten Produktion von ROS (Mittler 2002). In Pflanzen sind die Chloroplasten die Hauptquelle von ROS. Es gibt Hinweise, dass ROS in geringen Mengen auch als Signalsubstanzen fungieren (siehe 1.4). So konnte für  $H_2O_2$  gezeigt werden (Abb. 1.4), dass es transient vor dem Ausbruch der Seneszenz akkumuliert (Zapata et al. 2005, Zimmermann und Zentgraf 2005) und die Expression von stressinduzierten Genen fördern kann (Foyer et al. 1998, Ryals et al. 1996).

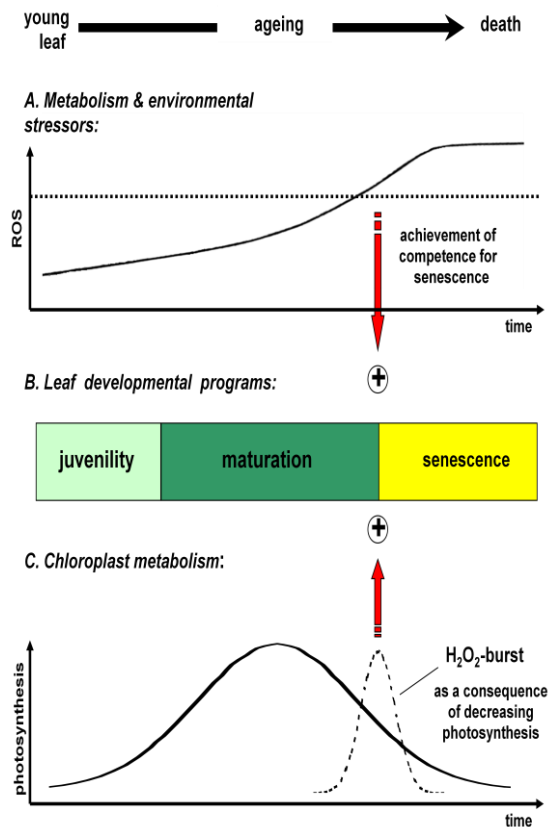


Abb. 1.4: Modell des altersabhängigen Rückgangs der Photosyntheserate.

A: Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) häufen sich während der Alterung an.

B: Unterteilung der Blattentwicklung in drei Stadien

C: Rückgang der Photosyntheserate und Akkumulierung von  $H_2O_2$  vor Übergang in den Prozess der Seneszenz.

(Abb. aus: Krupinska et al. 2003)

Die Blattseneszenz wird durch viele Signale reguliert, wobei interne Stimuli wie z.B. die Phytohormone Methyljasmonat und Salicylsäure und externe Faktoren ein regulatives Netzwerk bilden. Dieses Netzwerk, das aus Aktivatoren bzw. Repressoren besteht, ermöglicht es trotz Remobilisierung noch effektiv Photosynthese durchzuführen.

Auch in dieser letzten Entwicklungsphase produzieren die Chloroplasten Assimilate, die in andere Pflanzenteile exportiert werden (Krupinska und Humbeck 2004). Mit der frühen Seneszenz geht eine Änderung der Transkriptionsaktivität einher (Becker und Apel 1993). Es konnten bisher verschiedene Gene identifiziert werden, die während der Seneszenz herunterreguliert (senescence downregulated gene, SDG) sowie hochreguliert (senescence associated gene, SAG) werden. In *Arabidopsis thaliana* wurden mindestens 41

Transkriptionsfaktoren identifiziert, die in der Blattseneszenz induziert werden (Balazadeh et al. 2008, Chen et al. 2002, Buchanan-Wollaston et al. 2005). Diese während der Seneszenz hochregulierten Transkriptionsfaktoren werden über 20 Familien zugeordnet, zu denen die MYB-, AP2-, NAC- und WRKY-Transkriptionsfaktoren zählen (Balazadh et al. 2008, Eulgem et al. 2000).

### 1.5.2 Das seneszenzassoziierte Gen *HvS40*

Damit in jungen Blättern die Seneszenz nicht ausgelöst wird, ist eine Repression der Transkription von seneszenzassoziierten Genen erforderlich (Balazadeh et al. 2008). Eines der während der Seneszenz hochregulierten Gene ist das in Gerste identifizierte *HvS40*-Gen (Krupinska et al. 2002).

Das *HvS40*-Gen wurde erstmals aus einer cDNA-Bank isoliert. Diese wurde ausgehend von Gerstenprimärblättern erstellt, die sich durch Dunkelinkubation in einem seneszenten Stadium befanden (Becker und Apel 1993). Zusätzlich wurde eine Akkumulierung der *HvS40*-mRNA während der natürlichen Seneszenz festgestellt (Dähnhardt 2003) und auch in seneszierenden Fahnenblättern der Gerste „Carina“ konnte eine Anhäufung der Transkripte des *HvS40*-Gens beobachtet werden (Humbeck et al. 1996). Deshalb wird das *HvS40*-Gen als allgemeiner Seneszenzmarker in Gerste betrachtet. Die Genexpression von *HvS40* kann auch durch externe Stimuli wie Pathogenbefall, Verwundung, Trockenheit, osmotischer Stress und Hitze (Haußühl 1998) sowie durch interne Faktoren wie durch die Phytohormone Abscisinsäure, Ethylen, Methyljasmonat und Salicylsäure ausgelöst werden (Dähnhardt 2003, Haußühl 1998, Krupinska et al. 2002). Dieses seneszenzassoziierte Gen kodiert für ein 15,4 kDa Protein, dessen Funktion noch unbekannt ist. Durch die Fusion mit GFP konnte die Lokalisierung im Zellkern beobachtet werden (Krupinska et al. 2002).

In der Promotorregion des *HvS40*-Gens wurden zwei Sequenzmotive (MI und MII), die dem „elicitor response“ Element (ERE) des *PR10 $\alpha$* -Gens (pathogenesis related gene) der Kartoffel ähneln, nachgewiesen (Dähnhardt 2003) (Abb. 1.5). Durch Gelretardierungsanalysen, unter Verwendung von Kernproteinen aus Gerstenprimärblättern unterschiedlichen Alters, konnte gezeigt werden, dass sich an diesen Motiven spezifische DNA-Protein-Komplexe ausbilden. Eine Proteinbindung an das Motiv I konnte nur in seneszierendem Blattgewebe und eine Proteinbindung an das Motiv II in jungen, fünf Tage alten Blättern nachgewiesen werden. Die Proteinbindung an Motiv II nimmt im Verlauf der Ausdifferenzierung ab und ist in seneszierendem Gewebe nicht mehr nachweisbar (Abb. 1.5). Ein an das Motiv II spezifisch gebundenes Protein konnte durch Affinitätschromatografie aufgereinigt werden. Nach Trypsinverdau wurden die Peptide massenspektrometrisch analysiert. Dieses Protein der Gerste ist homolog zu dem Whirly1-Protein aus Kartoffel (Dähnhardt 2003).

**A**

**ERE:** 5'- **TGACAnnnnTGTC**A-3'  
IR1 IR2

**Motiv I:** 5'- **TGTCAGAAAATGGTCA**-3'  
IR2

**Motiv II:** 5'- **TGAGAACTCTGTCAAAATATTGGTCA**-3'  
IR1-ähnlich IR2

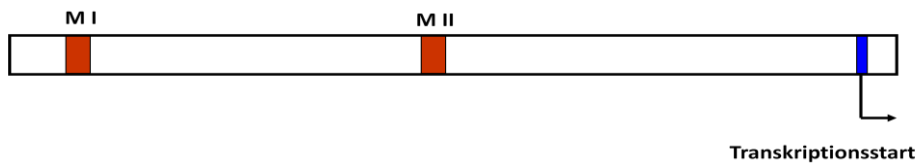
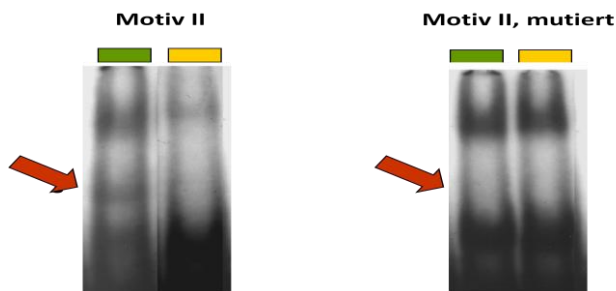
**B****C**

Abb. 1.5: Darstellung der Sequenzen und der Lage der Motive I und II der Promotorregion des *HvS40*-Gens sowie der spezifischen DNA-Protein-Komplexbildung des HvWhy1-Proteins in jungen Gerstenprimärblättern.

A: Abbildung der 5'-3' Sequenzen des kodierenden Stranges der Motive I und II der Promotorregion des *HvS40*-Gens (Dähnhardt 2003) aus Gerste im Vergleich zum ERE der Promotorregion des *PR10a*-Gens der Kartoffel (Després et al. 1995). Die „inverted repeat“ (IR)-Sequenzen sind hervorgehoben.

B: Schematische Darstellung der Lage der Motive I und II der Promotorregion des *HvS40*-Gens.

C: Gelretardierungsexperimente mit einem Oligonukleotid, das unter anderem das IR2-Motiv einschließt und verschiedenen Kernproteinextrakten aus jungen (grüne Box) und seneszierenden (gelbe Box) Primärblättern der Gerste. Die Spezifität der gebildeten DNA-Protein-Komplexe ist mit mutiertem Oligonukleotid gezeigt (Dähnhardt 2003).

## 1.6 Die Whirly-Proteinfamilie

Die Whirly-Proteine wurden bisher nur in Pflanzen identifiziert (Desveaux et al. 2005, Krause et al. 2005). In Cyanobakterien, die ebenfalls oxygene Photosynthese betreiben und als Vorläufer der Chloroplasten gelten, wurden keine Whirly-Proteine gefunden.

Das zuerst beschriebene Whirly-Protein stammt aus der Kartoffel (*Solanum tuberosum*) und wurde auf Grund seines Molekulargewichtes von 24 kDa als p24 bezeichnet. Analysen zur Kristallstruktur zeigten, dass sich vier p24 Proteine zu einem Homotetramer formieren können (Desveaux et al. 2002) (Abb. 1.6). Jedes Monomer weist drei  $\alpha$ -Helices und acht  $\beta$ -Faltblätter auf, die antiparallel angeordnet sind (Desveaux et al. 2002). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass das Tetramer durch die Ausbildung eines C-terminalen Helix-Loop-Helix-Motivs bei jedem Monomer gebildet und stabilisiert wird. Dabei formieren sich die Untereinheiten in der Art, dass sich eine wirbelförmige Struktur bildet. Aufgrund dieser besonderen Quartärstruktur wurde diese Proteinfamilie in Whirly (Kurzform: Why-Proteine) umbenannt. p24 wird seitdem als StWhy1 geführt (Whirly1-Protein aus *Solanum tuberosum*).

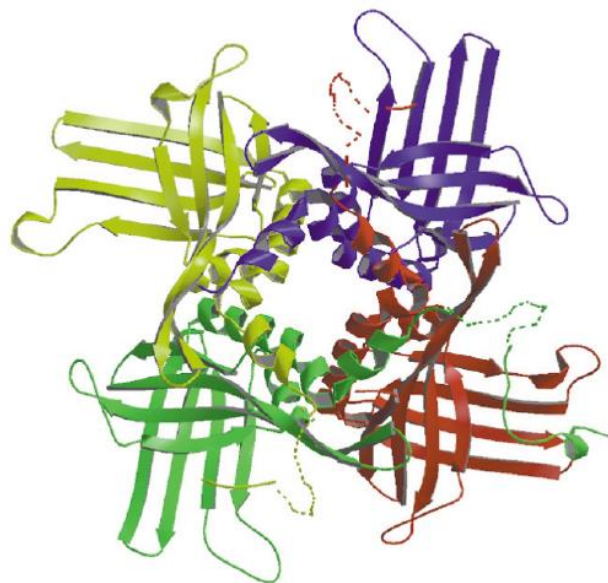


Abb. 1.6: Kristallstruktur des tetrameren Whirly1-Komplexes aus Kartoffel (aus: Desveaux et al. 2002).

Das Whirly1-Tetramer der Kartoffel ist für die Aktivierung der Expression des *PR10 $\alpha$* -Gens nach Pathogenbefall verantwortlich (Després et al. 1995, Desveaux et al. 2000). Dabei binden je zwei Untereinheiten an ein „elicitor response“ Element (ERE) im Promotorbereich des *PR10 $\alpha$* -Gens, das aus zwei „inverted repeat“ (IR)-Sequenzen besteht (siehe 1.5). Anders als viele Transkriptionsfaktoren ist StWhy1 ein Einzelstrang-Bindeprotein (SSB) (Desveaux et al. 2000). Einzelstrang-Bindeproteine kommen sowohl als Monomer als auch als Oligomer in Bakterien (Sigal et al. 1972), Archaeobakterien (Wadsworth und White 2001) sowie in

Eukaryoten im Zellkern (Marton et al. 1994) und Organellen (van Dyck et al. 1992) vor. Sie sind in verschiedene Prozesse wie Replikation, Reparatur, Rekombination und negatives „supercoiling“ während der Transkription involviert. Im Gegensatz zu diesen SSB-Proteinen weisen die Whirly-Proteine keine charakteristische OB-Faltung („oligomere binding“) auf. Diese zeichnet sich durch fünf  $\beta$ -Faltblätter aus, wobei sich zwischen dem dritten und vierten  $\beta$ -Faltblatt eine  $\alpha$ -Helix befindet. Aus der Struktur herausragende Schleifen sind für die Bindung an Oligonukleotide verantwortlich (Murzin 1993). In Desveaux et al. (2005) wurde beschrieben, dass die für die DNA-Bindung essentielle Domäne KGKAAL weitere Sequenzen und Strukturen wie z.B. eine Schleife zwischen dem dritten und vierten  $\beta$ -Faltblatt für die Stabilisierung der Protein-DNA-Interaktion benötigt.

Durch Sequenzvergleiche wurden 26 homologe Proteine zu StWhy1 in 16 Höheren Pflanzen identifiziert (Desveaux et al. 2005, Krause et al. 2005), bei denen die N- und C-terminalen Bereiche variieren. Bei einigen homologen Proteinen fehlt trotz großer Übereinstimmungen die charakteristische KGKAAL-DNA-Bindedomäne, wie z.B. bei der Gymnospermenart *Pinus pinea* (Desveaux et al. 2005). Bei vielen untersuchten Arten finden sich zwei Vertreter der Whirly-Proteine, die als Whirly1 und Whirly2 bezeichnet werden. Die Aminosäuresequenz von Whirly1 zeigt eine Vorhersage für einen Import in die Plastiden und die Aminosäuresequenz von Whirly2 weist eine mögliche mitochondriale Transitsequenz auf (Krause et al. 2005). Die Aminosäuresequenz, die in Desveaux et al. (2005) unter der Accessionnummer TC90883 als HvWhy1 geführt wird, muss nach Krause et al. (2005) als Whirly2 bezeichnet werden (BF627441). Die eigentliche HvWhy1-Sequenz ist mit der Accessionnummer BF625136 annotiert (Abb. 1.7). Diese Benennung deckt sich mit den durchgeführten Stammbaumanalysen sowohl in Desveaux et al. (2005) als auch in Krause et al. (2005), in denen das HvWhy2-Protein eindeutig den homologen mitochondrialen Whirly2-Proteinen aus Angiospermen zugeordnet wurde (Abb. 1.7). Bei zwei Arten wurden drei Whirly-Proteine identifiziert: Sojabohne (*Glycine max*) und *Arabidopsis thaliana* (Desveaux et al. 2005).

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde die vorhergesagte Lokalisierung von AtWhy1 und AtWhy3 in den Plastiden und von AtWhy2 in den Mitochondrien mit transienten Transformationsansätzen von GFP-Fusionskonstrukten mit Protoplasten und Zwiebelepidermiszellen und mit der Importanalyse für die Proteine AtWhy1 und AtWhy2 in isolierte Organellen bestätigt (Krause et al. 2005). Die möglichen plastidär lokalisierten Whirly1-Proteine weisen zueinander größere Homologien auf, als zu den möglichen mitochondrialen Whirly2-Proteinen. Es wird angenommen, dass eine Duplikation des ursprünglichen *whirly*-Gens früh während der Evolution der Angiospermen vor der Aufspaltung in mono- und dikotyle Pflanzen stattfand (Krause et al. 2005).

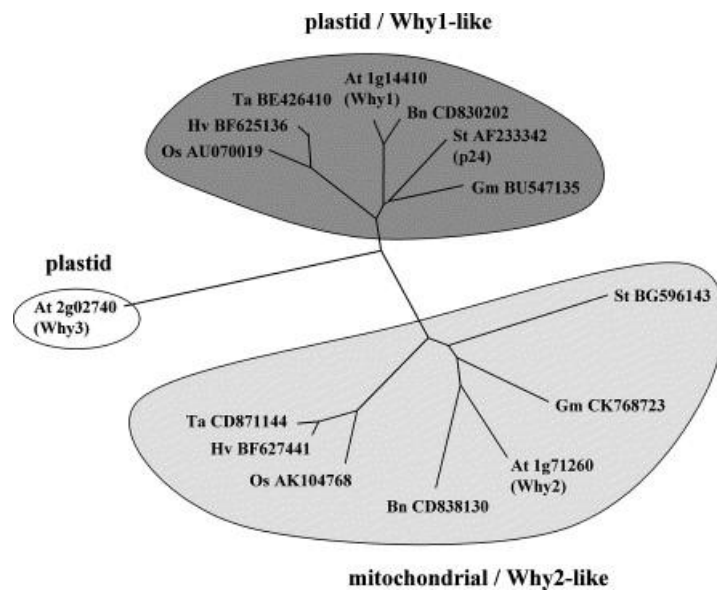


Abb. 1.7: Stammbaumanalyse der Whirly-Homologen von ausgewählten Pflanzen (aus: Krause et al. 2005). At= *Arabidopsis thaliana*, Bn = *Brassica napus*, Gm = *Glycine max*, Hv = *Hordeum vulgare*, Os = *Oryza sativa*, St = *Solanum tuberosum*, TA = *Triticum aestivum*.

Um weitere Hinweise auf die Funktion und Regulation dieser Proteine zu erhalten, wurden zu StWhy1 homologe Proteine in anderen Pflanzen untersucht. Am Beispiel des Whirly1 aus *Arabidopsis thaliana* konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von Salicylsäure die DNA-Bindeaktivität induziert werden kann (Desveaux et al. 2004). Salicylsäure dient als Aktivator von Abwehrgenen, die in der systemisch erworbenen Resistenz eine Rolle spielen. Neben der beschriebenen Funktion als Transkriptionsaktivator im Zellkern konnte dem AtWhy1-Protein eine Funktion in der Regulierung der Telomerintegrität zugeordnet werden (Yoo et al. 2007). Telomere sind Nukleoprotein-Komplexe an den Enden eukaryotischer Chromosomen. Jedes Telomer besteht aus einer langen Folge an kurzen tandemartig wiederholten Sequenzen. In Pflanzen zeigen diese eine TTAGGG-Wiederholung (Richards und Ausubel 1988). Diese Telomere sind essentiell für den Erhalt der Chromosomenintegrität. Es wird angenommen, dass die Telomerverkürzung ein regulatorischer Mechanismus ist, der die Vervielfältigung der Zelle kontrolliert, bevor diese in die Seneszenz übergeht (Harley 1991). Yoo et al. (2007) konnten zeigen, dass AtWhy1 an Einzelstrang-DNA im Telomerbereich bindet und „knock-out“-Mutanten einen Anstieg der Telomerlänge und der Telomeraseaktivität über mehrere Generationen aufweisen. Transgene Pflanzen, die das AtWhy1 überexprimieren, zeigen im Gegensatz dazu einen Rückgang der Telomeraseaktivität und verkürzte Telomere. Das HvWhy1-Protein (*Hordeum vulgare*) kann ebenso wie das AtWhy1 an DNA-Telomersequenzen und mit geringerer Affinität auch an die RNA-Matrize der Telomere binden (Kilbiński 2007).



## 1.7 Zielsetzung

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden die Whirly-Proteine als DNA-Bindeproteine im Zellkern von Kartoffel und von *Arabidopsis thaliana* beschrieben (Desveaux et al. 2005, Yoo et al. 2007). In Gerste wurde das Whirly1-Protein als DNA-Bindeprotein am Promotor des seneszenzassoziierten *HvS40*-Gens identifiziert. Da es nur in jungem Gewebe an den Promotor bindet, könnte es ein möglicher Repressor des seneszenzassoziierten *HvS40*-Gens sein (Dähnhardt 2003). Neben den beschriebenen Funktionen im Zellkern konnte zusätzlich ein erfolgreicher Import in die Organellen unter *in vitro* Bedingungen nachgewiesen werden, wobei das AtWhy1-Protein in die Plastiden und das AtWhy2-Protein in die Mitochondrien importiert wurde (Krause et al. 2005). Unter Verwendung von spezifischen Antikörpern soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst diese mögliche duale subzelluläre Verteilung von HvWhy1 und dem verwandten HvWhy2-Protein *in vivo* in Gerstenblättern überprüft werden. Dabei soll auch geklärt werden, ob die Verteilung des Whirly1-Proteins auf die Kompartimente vom Gewebetyp oder von der Entwicklung abhängig ist bzw. von externen und internen Stimuli beeinflusst wird. Um Hinweise auf eine mögliche Funktion in den Plastiden zu erhalten, soll die Verteilung des Whirly1-Proteins innerhalb der Organellen untersucht werden.

Von besonderem Interesse ist die Überprüfung der postulierten Funktion als Repressor des seneszenzassoziierten *HvS40*-Gens. Dazu soll die Genexpression in Blättern von HvWhy1-RNAi-Linien untersucht werden. Diese Pflanzen sollen auch im Hinblick auf die Blattseneszenz analysiert werden. Die Blattseneszenz wird beeinflusst von internen und externen Faktoren. Unter der Annahme, dass das HvWhy1-Protein Regulator der Blattseneszenz ist, könnte die Genexpression von *whirly1* von seneszenzfördernden Phytohormonen beeinflusst sein. Auch der Einfluss von Umweltfaktoren, wie z.B. Licht, auf die Expression des *Hvwhy1*-Gens soll analysiert werden.

Parallel zu den Untersuchungen von *Hvwhy1* soll die Regulation der Genexpression des homologen *Hvwhy2* und das subzelluläre Vorkommen des reifen Proteins analysiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Enzyme

Die Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (München), Bio-Rad (München), MilesRoad (Cleveland, Ohio), Fischer Scientific (Düsseldorf), Amersham GE Healthcare (Freiburg) und Agrisera (Vännäs, Schweden) bezogen. Die Radionukleotide  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP und  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP stammten von der Firma Hartmann Analytic (Braunschweig).

Die Restriktionsendonukleasen sowie DNA- (1 kb DNA-Ladder) und Protein-Größenstandards (Prestained-Protein-Ladder 10-180 kDa) wurden von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Alle weiteren Enzyme stammten von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe) und Promega (Mannheim).

### 2.2 Pflanzenmaterial

#### 2.2.1 Anzucht von Gerste

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde die Sommergerste *Hordeum vulgare* L cv. Steffi (Ackermann Saatzeit, Irlbach) verwendet. Das Saatgut wurde entweder auf Vermiculit von der Firma Rieck (Rendsburg) oder auf Erde ausgelegt. Für letztere wurde eine Mischung aus 1/3 Sand und 2/3 Einheitserde verwendet. Das Saatgut wurde zusätzlich mit Substrat überschichtet (Miersch et al. 2000), befeuchtet und in der Klimakammer im Licht-/Dunkelrhythmus (16h/21 °C, 125  $\mu\text{E} \times \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  sowie 8h/18 °C) angezogen. Unter den gewählten Versuchsbedingungen wurden zur Analyse der natürlichen Alterung die Gerstenprimärblätter nach 5 Tagen, 7 Tagen, 9 Tagen, 14 Tagen und 22 Tagen geerntet. Zur Untersuchung der dunkelinduzierten Seneszenz wurden die ausdifferenzierten Gerstenprimärblätter nach sechs Tagen abgeschnitten und für zwei Tage ins Dunkle gestellt. Zusätzlich wurde das Saatgut auf Vermiculit von der Firma Rieck (Rendsburg) für 6 Tage in Dunkelheit und anschließend im Dauerlicht (150  $\mu\text{E} \times \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) für 2 Stunden, 4 Stunden, 8 Stunden und 24 Stunden bzw. nur für 7 Tage in Dunkelheit angezogen. Zur Überprüfung der verschiedenen Entwicklungszustände wurden die jeweiligen Chlorophyllgehalte des Blattmaterials bestimmt (siehe 2.3.1).

#### 2.2.2 Behandlung von Gerstenprimärblättern mit Phytohormonen

Die Gerstenprimärblätter wurden an der Blattspitze und an der Blattbasis abgeschnitten. Die Segmente wurden unter Dauerlicht in Leitungswasser oder in eine entsprechende Inkubationslösung gelegt. Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 2.1 aufgelistet. Nach

erfolgter Phytohormonbehandlung für 8 Stunden, 12 Stunden, 1 Tag, 2 Tage bzw. 3 Tage im Dauerlicht wurden die Blattsegmente wiederum an den Enden um ca. 0,5 cm gekürzt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren oder gleich weiterverarbeitet.

Tabelle 2.1: Phytohormone, die für die Behandlung der Gerstenprimärblätter verwendet wurden.

| Phytohormon/Lösungsmittel     | gelöst in                          | verwendete Konzentration |
|-------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| Abscisinsäure                 | 1% (v/v) Ethanol in Leitungswasser | 100 µM                   |
| Methyljasmonat                | Leitungswasser                     | 100 µM                   |
| Salicylsäure                  | Leitungswasser                     | 2 mM                     |
| Indolessigsäure               | Leitungswasser                     | 100 µM                   |
| Gibberellinsäure              | Leitungswasser                     | 100 µM                   |
| Kinetin                       | Leitungswasser                     | 100 µM                   |
| EtOH                          | Leitungswasser                     | 1 % (v/v)                |
| Methyljasmonat + Salicylsäure | Leitungswasser                     | 100 µM + 2 mM            |

### 2.2.3 Ernte von Gerstenblättern aus dem Freiland

Für die Untersuchungen zur Seneszenz von Fahnenblättern der Gerste unter Freilandbedingungen wurde eine Sommergerste vom Stamm BE162203 verwendet. Die Blattspreiten wurden auf dem Feld oberhalb der Blattscheide abgetrennt, direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.4 RNAi-Linien

Das zu transformierende Konstrukt wurde von Dr. Ying Miao hergestellt. Dabei wurde eine partielle cDNA-Sequenz von *Hvwhy1* (Abb. 2.1 A) in „sense“ Richtung in den binären Vektor pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert. Am IPK Gatersleben wurde diese Sequenz in einen Expressionsvektor sowohl in „sense“ als auch in „antisense“ Richtung ligiert (Abb. 2.1 B), der für die Transformation in *Agrobacterium tumefaciens* benutzt wurde. Die cDNA-Sequenzen wurden durch ein Intron separiert, um eine Ausbildung eines Palindroms nach Transkription des Konstruktes zu ermöglichen.

A

```

TTTCAAGGGAAGGAGCGACGAAGGGAAGTGCGCAAGGTTCTCAAAGTTGAGCCAACGCCAGATGGGAATG   71
GTCGCTTTTTCAACCTCAGTGTCAAACCGTCTTTTGAATGTTGATGAGAACATATACATCCCTATAACCAAAGGA   148
GAATATGCAGTCATTGTATCAACCTTCAATTACATCAT                                       186

```

B



Abb. 2.1: Partielle *Hvwhy1*-cDNA-Sequenz in „sense“ Richtung vom EST-Klon BF625136, die für die Klonierung in den binären Vektor pENTR™/D-TOPO® verwendet wurde (A). Struktur eines RNAi induzierenden Transgens (B). P kennzeichnet den Promotor und T markiert den Terminatorbereich.

Die Generierung der RNAi-Linien erfolgte am IPK Gatersleben durch Dr. Jörg Hensel (IPK Gatersleben). Die stabile Transformation wurde mit der Gerste „Golden Promise“ durchgeführt (Tingay et al. 1997, Hensel und Kumlehn 2004, Hensel et al. 2007). Die Transformation erfolgte durch die Kokultivierung von unreifen Embryonen mit *Agrobacterium tumefaciens* des Stammes AGL 1 (Lazo et al. 1991). Bei dieser Methode werden die Embryonen zusammen mit den Agrobakterien, die den zu transformierenden binären Vektor enthalten, für ca. drei Tage kultiviert. Die infizierten Embryonen bilden nach drei bis fünf Wochen Kalli, die nach zwei weiteren Wochen ergrünen und Sprosse bilden. Zur Selektion der positiven Transformanten wachsen die Kalli in Anwesenheit des Antibiotikums Hygromycin B 50 mg/l, Boehringer, Deutschland. Nach Abschluss des Wurzelwachstums wurde die transgene Pflanze auf Erde transferiert. Anschließend wurde genomische DNA isoliert, um die erfolgreiche Integrierung des Transgenes zu überprüfen (Tabelle 2.2). Diese Arbeiten fanden ebenfalls am IPK Gatersleben statt.

Die transgenen Pflanzen wurden im Gewächshaus im Licht-/Dunkelrhythmus (16h /21 °C, 125  $\mu\text{E} \times \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  sowie 8h/18 °C) auf Erde (TKS2 und grober Sand im Verhältnis 1/1) angezogen und analysiert. Die nächste Generation wurde mit Hilfe des „embryo rescues“ gewonnen, dabei wurden unreife Samen mit bereits keimungsfähigen Embryonen (Stadium der Teigreife) mit 1 % (v/v) Ethanol für eine Minute und für 20 Minuten in 5 % (w/v) Natriumhypochlorid sterilisiert. Aus diesen Samen wurden die Embryonen herauspräpariert und unter sterilen Bedingungen auf MS-Medium angezogen. Nach der Keimung wurden diese Keimlinge auf Selektionsmedium (MS mit Hygromycin B 50 mg/l) transferiert. Pflanzen, die trotz Selektionsdruck eine lange Primärwurzel und ein langes Primärblatt bildeten, wurden auf Einheitserde ausgetopft.

In folgender Tabelle 2.2 sind die Linien der T0-Generation aufgelistet, die für die Analyse verwendet wurden. Zusätzlich ist gekennzeichnet, ob nur eine oder zwei antiparallel angeordnete *Hvwhy1*-cDNA-Sequenzen ins Genom inseriert sind. Der Nachweis der Insertion beider bzw. einer der antiparallel angeordneten cDNA-Sequenzen wurde mit Hilfe der PCR am IPK Gatersleben durchgeführt.

Tabelle 2.2: Für die Analyse verwendete *HvWhy1*-RNAi-Linien mit Auspflanzdatum und der Bestätigung der erfolgreichen Insertion von einem (+) oder beiden (++) cDNA-Sequenzen des *Hvwhy1*-Gens ins Pflanzengenom.

| Name | Auspflanzdatum | Insertion ins Genom |
|------|----------------|---------------------|
| E1   | 08.01.2008     | ++                  |
| E2   | 08.01.2008     | +                   |
| E3   | 08.01.2008     | ++                  |
| E4   | 08.01.2008     | ++                  |
| E5   | 08.01.2008     | ++                  |
| E6   | 08.01.2008     | ++                  |
| E7   | 08.01.2008     | ++                  |
| E8   | 08.01.2008     | ++                  |
| E9   | 08.01.2008     | ++                  |
| E10  | 08.01.2008     | +                   |
| E13  | 21.01.2008     | ++                  |
| E17  | 21.01.2008     | ++                  |
| E18  | 21.01.2008     | ++                  |
| E20  | 21.01.2008     | ++                  |
| E26  | 21.01.2008     | ++                  |

## 2.3 Methoden zur Bestimmung physiologischer Parameter

### 2.3.1 Quantifizierung von Chlorophyllen und Carotinoiden

Für die Bestimmung des Gesamtchlorophyllgehalts sowie des Carotinoidgehalts wurde eine Methanolextraktion durchgeführt. Das Blattgewebe wurde mit Methanol und einer Spatelspitze Magnesiumhydroxidcarbonat bei 100 °C behandelt. Diese Extraktion wurde durchgeführt bis das Gewebe ausgebleicht war. Die jeweiligen Extrakte wurden nach einer Zentrifugation von 800 x g nach 5 Minuten vereinigt. Die anschließende photometrische Bestimmung am Spektralphotometer (Shimadzu, UV-2501PC Spectralphotometer, Duisburg) und Berechnung erfolgte nach den Angaben von Lichtenthaler (1987). Der Gesamtchlorophyllgehalt des Extrakts wurde nach Abzug des bei 720 nm gemessenen Trübungswertes nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Chl}_{a+b} [\mu\text{g}/\text{mg FG}] = [1,44 \times A_{665,2} + 24,93 \times A_{652,4}] \times \text{Extraktionsvolumen}/\text{mg FG}$$

Extraktionsvolumen= Menge an eingesetztem Methanol (in ml)

FG= Frischgewicht

Der Gesamtcarotinoidgehalt wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Carotinoide} [\mu\text{g}/\text{mg FG}] = 1000 \times A_{470} - 1,63 \times \text{Chla} - 104,96 \times \text{Chlb}/221 \times \text{Extraktionsvolumen}/\text{mg FG}$$

$$\text{mit: Chla} = 16,72 \times A_{665,2} - 9,16 \times A_{652,4}$$

$$\text{Chlb} = 34,09 \times A_{652,4} - 15,28 \times A_{665,2}$$

Extraktionsvolumen= Menge an eingesetztem Methanol (in ml)

FG= Frischgewicht

Die Chlorophyllgehalte und Carotinoidwerte wurden durch mindestens drei voneinander unabhängige Messungen bestimmt.

### 2.3.2 SPAD-Messung zur Bestimmung des relativen Chlorophyllgehaltes

Mit einem Chlorophyllmeter der Firma Minolta (SPAD 502, Japan) wurde in der Mitte der Blattfläche der relative Chlorophyllgehalt ermittelt. Dabei wird in Bezug auf eine Meßfläche von 2 x 3 mm durch Absorption im roten bzw. Infrarotbereich die relative Menge an Chlorophyll erfasst.

### 2.3.3 Bestimmung der maximalen Effizienz des Photosystems II

Die Ermittlung der maximalen Quanteneffizienz der Photochemie des Photosystems II ( $F_v/F_m$ ) fand in Anlehnung an Schreiber et al. (1986) statt und wurde mit Hilfe des Imaging-PAM (Puls-Amplituden-Modulation)-Chlorophyllfluorometer der Firma Walz GmbH (Effeltrich) durchgeführt. Die zu messenden Blattproben wurden für 30 Minuten zwischen feuchtem Papier dunkeladaptiert, um eine vollständige Oxidation der Reaktionszentren hervorzurufen. Die Anregung der Photosysteme erfolgte über aktinisches Licht ( $126 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) mit einer Wellenlänge von 650 nm. Die Grundfluoreszenz  $F_0$  wurde über gepulstes Schwachlicht von  $33 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  erzeugt. Das Reaktionszentrum des Photosystems II wurde durch einen Sättigungspuls von  $1000 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  vollständig reduziert. Die dadurch erzeugte maximale Fluoreszenz  $F_m$  wurde gemessen. Die maximale Quantenausbeute ( $F_v/F_m$ ) wird errechnet:  $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$

Für die Auswertung der Daten wurde die dazugehörige ImagingWin-Software benutzt. Es wurde jeweils der Mittelwert über die gesamte Blattfläche von vier bis fünf Blättern bestimmt.

## 2.4 Allgemeine molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 Lösungen und Puffer

|                            |            |                    |
|----------------------------|------------|--------------------|
| <b>10 x Bromphenolblau</b> | 50 % (v/v) | Glycerin           |
|                            | 0,1 %      | Bromphenolblau     |
| <b>MS-Medium</b>           | 4,4 g      | MS (DUCHEFA M0245) |
|                            | 30 g       | Saccharose         |

Der pH-Wert wurde mit einer KOH-Lösung auf 5,8 eingestellt und das Volumen mit deionisiertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt. Außerdem wurde 0,8 % Phytagar (DUCHEFA, Haarlem, Niederlande) zugefügt.

|                  |      |                   |
|------------------|------|-------------------|
| <b>LB-Medium</b> | 10 g | NaCl              |
|                  | 10 g | Pepton aus Casein |
|                  | 5 g  | Hefeextrakt       |

Das Medium wurde auf einen Liter mit deionisiertem Wasser aufgefüllt und vor Gebrauch autoklaviert. Für die Herstellung von LB-Platten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 15 g Agar pro Liter Medium zugesetzt.

**RNase-Stammlösung: [10 mg/ml]**

|                 |         |               |
|-----------------|---------|---------------|
| <b>20 x SSC</b> | 3 M     | NaCl          |
|                 | 300 mM  | Natriumcitrat |
| <b>10 x TAE</b> | 242 g   | Tris          |
|                 | 57,1 ml | Eisessig      |
|                 | 100 ml  | 0,5 M EDTA    |

Das Volumen wurde mit deionisiertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt. Der pH-Wert wurde auf 8,0 mit HCL eingestellt.

|                 |         |          |
|-----------------|---------|----------|
| <b>10 x TBE</b> | 1340 mM | Tris     |
|                 | 450 mM  | Borsäure |
|                 | 25 mM   | EDTA     |

|               |       |                |
|---------------|-------|----------------|
| <b>1 x TE</b> | 10 mM | Tris/HCL, pH 8 |
|               | 1mM   | EDTA           |

## 2.4.2. Anzucht, Lagerung und Transformation von Bakterien

### 2.4.2.1 Bakterienstämme

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten (siehe 2.4.4) und Amplifizierung rekombinanter Plasmide wurde der Bakterienstamm *E. coli* Dh5 $\alpha$ , der sich durch einen Defekt in der DNA-Rekombination auszeichnet, eingesetzt. Für die Synthese (siehe 2.5.1) der rekombinanten Proteine HvWhy1 und HvWhy2 wurde der *E. coli* Stamm SG13009 mit dem Expressionsvektor pQE30 und der Stamm BL21 für mit pet14b transformiert.

### 2.4.2.2 Anzucht von Bakterienkulturen

Die Bakterien des Stammes *E. coli* DH5 $\alpha$  wurden in Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten angezogen, wobei dem Medium Ampicillin mit einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  Kulturmedium zugesetzt wurde. Die Bakterien des Stammes *E. coli* SG13009 wurden in Flüssigmedium oder Festmedium angezogen, in welchem die Antibiotika Ampicillin und Kanamycin mit einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  bzw. 50  $\mu\text{g/ml}$  zugegeben waren. Die Bakterien des Stammes *E. coli* BL21 wurden in Flüssigmedium oder Festmedium angezogen, in welchem das Antibiotika Ampicillin mit einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  zugegeben wurde. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator (Labshaker, Innova<sup>TM</sup>4400) oder im Brutschrank (WTB Binder).



### 2.4.2.3 Herstellung von Gefrierkulturen

Zur langfristigen Lagerung von Bakterienkulturen wurden Gefrierkulturen angelegt. Es wurden 500 µl einer frisch gewachsenen Übernachtskultur mit 250 µl 80%ig (v/v) Glycerin vermischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### 2.4.2.4 Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde die CaCl<sub>2</sub>-Methode nach Cohen et al. (1972) durchgeführt.

1,2 ml einer Übernachtskultur wurden in 250 ml LB-Medium überimpft und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,6 angezogen. Die photometrische Messung der optischen Dichte wurde am Spektralphotometer (Shimadzu, UV-2501PC, Spectrophotometer, Duisburg) bei einer Wellenlänge von 450 nm durchgeführt. Dabei diente reines LB-Medium als Blindwert. Die Bakteriensuspension wurde für 30-45 Minuten geschwenkt und auf Eis gekühlt. Die Bakterienzellen wurden anschließend durch eine Zentrifugation bei 3000 x g für 10 Minuten und 4 °C sedimentiert, in 50 ml kalter 100 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und nach weiterer Zentrifugation in 50 ml kalter 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen. Die Kultur wurde für 30 Minuten auf Eis geschwenkt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterienzellen in 10 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung und 1,8 ml 100 % (v/v) Glycerin aufgenommen. Diese Suspension wurde aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### 2.4.2.5 Transformation kompetenter Bakterienzellen

Zur Elektrotransformation von *E. coli*-Zellen SG13009 wurden die tiefgefrorenen kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Diese wurden mit dem zu transformierenden DNA-Konstrukt gemischt und für 30 Sekunden auf Eis inkubiert. Dieser Ansatz wurde in eine für die Elektrotransformation geeignete und auf 4 °C vorgekühlte 0,2 cm Küvette gegeben und die Transformation erfolgte bei einer Spannung von 2,5 kV, einer Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 200 Ohm. Sofort danach wurde dem Ansatz 1 ml LB-Medium (siehe 2.4.1) zugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte das Ausplattieren der transformierten Zellen auf LB-Agarplatten mit dem Antibiotikum Kanamycin (50 mg/ml) und Ampicillin (100 mg/ml). Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Zur Hitzeschocktransformation wurden die kompetenten Zellen (siehe 2.4.2.4) auf Eis aufgetaut. Daraufhin wurden bis zu 10 µl der zu transformierenden DNA mit 50 µl TCM-Puffer und 100 µl kompetenten Bakterienzellen versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden anschließend die Bakterien einem Hitzeschock von 43 °C für 60 Sekunden ausgesetzt, um die Aufnahme der Plasmide durch die Bakterienmembran zu erleichtern.

Danach wurde sofort 250  $\mu\text{l}$  von 37 °C vorgewärmtem LB-Medium zugegeben. Diese Suspension wurde 60 Minuten bei 37 °C geschüttelt und anschließend auf Indikatorplatten ausgestrichen, die wiederum über Nacht im Brutschrank inkubierten.

### TCM-Puffer

|                   |                               |
|-------------------|-------------------------------|
| 10 $\mu\text{l}$  | Tris/HCL pH 7,5               |
| 100 $\mu\text{l}$ | 100 mM $\text{CaCl}_2$        |
| 10 $\mu\text{l}$  | 1M $\text{MgCl}_2$            |
| 780 $\mu\text{l}$ | steriles $\text{H}_2\text{O}$ |

### 2.4.3 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA wurde nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) hergestellt. Bei dieser Präparation werden 1,5 ml einer Übernachtskultur bei 16000 x g für zwei Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert (Tischzentrifuge, Eppendorf, Hamburg). Die sedimentierten Bakterien werden zunächst auf Eis gekühlt und in 100  $\mu\text{l}$  Lösung 1 aufgenommen und für fünf Minuten auf Eis gekühlt. Danach werden 200  $\mu\text{l}$  Lösung 2 zugegeben und die Suspension wiederum für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Dabei werden die Bakterienzellen alkalisch lysiert und somit die Plasmid-DNA zugänglich. Zur Abtrennung genomischer DNA wird diese durch Zugabe von 150  $\mu\text{l}$  3 M NaAc (pH 4,8-6,0) für 10 Minuten bei maximaler Umdrehung (16000 x g) abgetrennt. Dem Überstand wird 0,6 Vol. Isopropanol zugegeben, um die Plasmid-DNA auszufällen

(10 Minuten, 16000 x g). Das Sediment wird mit 70 % EtOH gewaschen und nach Trocknung in 20  $\mu\text{l}$  1 x TE Puffer (siehe 2.4.1) resuspendiert. Zusätzlich wird durch eine Behandlung mit 10  $\mu\text{g}$  RNase A (30 Minuten, 37 °C) die noch vorhandene RNA entfernt.

#### Lösung 1

|       |               |
|-------|---------------|
| 50 mM | Glukose       |
| 25 mM | Tris/HCl pH 8 |
| 10 mM | EDTA          |

#### Lösung 2

|           |      |
|-----------|------|
| 0,2 M     | NaOH |
| 1 % (w/v) | SDS  |

### 2.4.4 Klonierung von DNA-Fragmenten

#### 2.4.4.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Für eine Spaltung der DNA wurden 2  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA eingesetzt und in einem 20  $\mu\text{l}$  Ansatz mit 10-20 U Enzym versetzt und nach Angaben des Herstellers (MBI, Fermentas) inkubiert.

### 2.4.4.2 Ligation

Für die Ligation von DNA-Fragmenten (siehe 2.4.4.1) in einen linearisierten Vektor (siehe 2.4.4.1, 2.4.4.3) wurden Insert und Vektor im Verhältnis 1:1 oder 2:1 eingesetzt. Neben Vektor und Insert enthielt der 20 µl Ansatz noch Ligationspuffer und Ligase nach Angaben des Herstellers (MBI, Fermentas). Die Ligation wurde nach einem speziellen Temperaturprofil durchgeführt. Dabei wurde ausgehend von der Idealtemperatur für das Anlagern zwischen Vektor und Insert von 10 °C nach 30 Sekunden 0,1 °C pro Sekunde auf 25 °C erhöht und wieder erniedrigt, sodass die Idealtemperatur von 10 °C wieder erreicht wurde. Dies wurde 160 mal durchgeführt. Nach 10 Minuten Inkubation bei 65 °C wurde der Reaktionsansatz auf 4 °C heruntergekühlt.

### 2.4.4.3 Klonierung einer partiellen *Hvwhy1*-cDNA in den Überexpressionsvektor pQE30

Zunächst wurde die partiell vorhandene *Hvwhy1*-cDNA-Sequenz aus Gerste vom EST-Klon BF625136 unter Erhalt des Leserahmens mit Hilfe der Restriktionsendonucleasen BamHI und KpnI in den Überexpressionsvektor pQE30 kloniert (Abb. 2.2). Mit dessen Hilfe wird das abgelesene Protein am N-Terminus um sechs Histidine verlängert. Diese Hexahistidinsequenz kann im Folgenden für eine effiziente Aufreinigung des Proteins mittels Nickel-NTA-Affinitätschromatografie (siehe 2.5.2) verwendet werden.

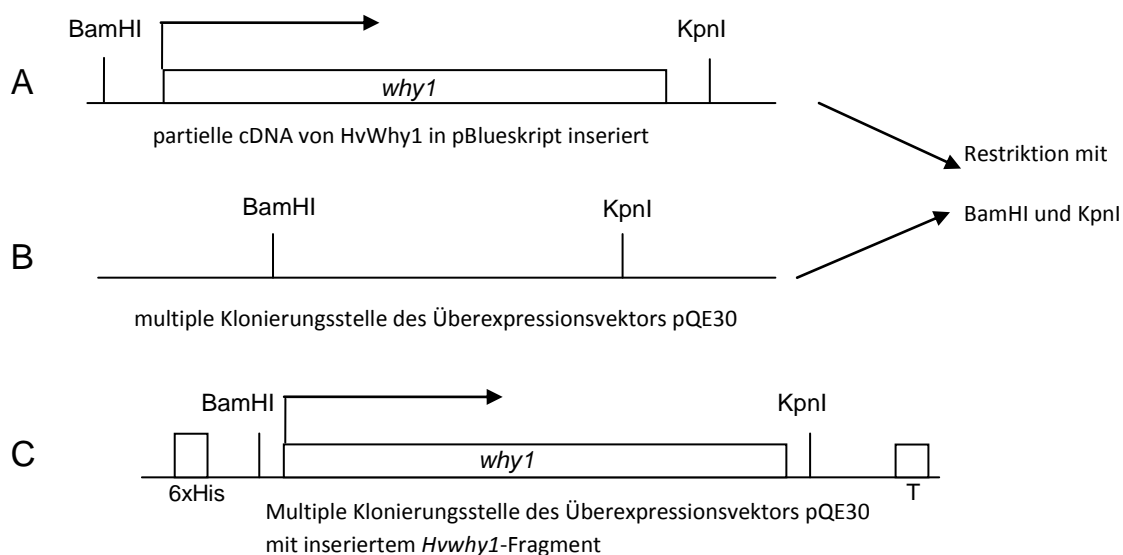


Abb. 2.2 Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der partiell vorhandenen cDNA Sequenz von *Hvwhy1* in den Überexpressionsvektor pQE30 mit Hilfe der Restriktion der Endonucleasen BamHI und KpnI.

A= Hydrolyse der cDNA-Sequenz von *why1* in pBlueskript (EST-Klon BF625136) mit Hilfe der Restriktionsendonucleasen BamHI und KpnI

B= Hydrolyse des pQE 30 mit Hilfe der Restriktionsendonucleasen BamHI und KpnI

C= Ligation des Fragmentes (aus A) in den geschnittenen Vektor (aus B)

## 2.4.5 Isolierung und Aufreinigung von RNA

### 2.4.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA unter Verwendung des TriFast-Reagenz

Zur Verwendung der RNA für eine anschließende cDNA-Synthese wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe des TriFast-Reagenz von Peqlab Biotechnologie (Erlangen) nach Angaben des Herstellers extrahiert.

Es wurden ca. 100 mg Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 1 ml Trifast aufgeschlossen, danach gründlich durchmischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden 200 µl Chloroform mit 1 % (v/v) Isoamylalkohol hinzugefügt und ca. 15 Sekunden kräftig geschüttelt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte eine Trennung in drei Phasen nach Zentrifugation bei 12000 x g für fünf Minuten (Tischzentrifuge, Rotor A5-30-11, Eppendorf, Hamburg). Die oberste Phase, in der die RNA angereichert vorliegt, wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl (v/v) Isopropanol vermischt. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA durch Zentrifugation (10 Minuten, 12000 x g, 4 °C) pelletiert. Die gefällte RNA wurde zweimal mit 500 µl kaltem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 2.4.5.2 Isolierung von RNA nach Chirgwin (1979)

Die Isolierung von gesamter RNA, die anschließend für die Aufreinigung von mRNA eingesetzt wurde, erfolgte nach Chirgwin et al. (1979).

5-10 g Pflanzenmaterial wurden mit flüssigem Stickstoff im Mörser aufgebrochen und mit 20 ml Lysispuffer pro 5 g Pflanzenmaterial versetzt. Das lysierte Pflanzenmaterial wurde mit der Turrax (Ultra TURRAX®, Staufen, Deutschland) homogenisiert. Zur besseren Lösung der Nukleinsäuren wurde die Probe bei 37 °C für 15 Minuten ins Wasserbad gestellt und anschließend für 10 Minuten bei 8500 x g zentrifugiert (Kontron, Rotor A8/24). Der Überstand wurde mit 0,02 Volumen 3 M NaAc pH 5 und 0,75 Volumen 100 % Ethanol vermischt und über Nacht bei -20 °C gefällt. Am zweiten Tag wurden die Proben 10 Minuten bei ca. 3800 x g zentrifugiert (Tischzentrifuge Eppendorf 5804R, Festwinkel-Rotor F34-6-38). Das Sediment wurde mit 8 ml TES Puffer gelöst und anschließend mit einem „Potter“ homogenisiert. Nachdem mit 4 ml TES Puffer nachgespült wurde, wurde das Homogenat in Oakridge-Röhrchen (Fisher Scientific, Ahrensburg, Deutschland) überführt und mit einem Phenol-Chloroform-Gemisch im Verhältnis 1:1 mit 1 % (v/v) Isoamylalkohol versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation bei 8500 x g (Kontron, Ausschwingrotor AS4/13) für 10 Minuten bei RT wurde die obere Phase abgenommen und 1:1 in Chloroform + 1 % (v/v) Isoamylalkohol vermischt und wieder wie oben angegeben zentrifugiert. Die obere Phase wurde erneut abgenommen und in ein Corexglas überführt. Der Suspension wurde 1/3 Volumen 8 M LiCl zugefügt und die RNA bei 4 °C über Nacht gefällt. Am dritten Tag wurde die RNA bei 8000 rpm (Kontron, Ausschwingrotor AS4/13) für

15 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und anschließend in 5 ml TES Puffer pH 7,5 resuspendiert. Nach Lösen für 10 Minuten bei 65 °C im Wasserbad wurde 1/10 Volumen 4 M NaCl und 2 ½ Volumen 100 % EtOH zugegeben. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei -80 °C wurde für 15 Minuten bei 8500 x g zentrifugiert und das RNA-Pellet getrocknet. Das Pellet wurde in 500 µl sterilem H<sub>2</sub>O resuspendiert und wenn nötig zur besseren Lösung für kurze Zeit in 60 °C inkubiert. Zur Bestimmung der RNA Konzentration wurde bei einer Extinktion bei 260 nm gemessen.

Die RNA-Ausbeute wurde durch folgende Formel ermittelt:

$$\frac{OD_{260} * 40 * \text{Verdünnungsfaktor}}{1000} = \mu\text{g RNA}/\mu\text{l Probe}$$

Der Grad der Kontamination mit DNA wurde durch die Berechnung des Quotienten der Extinktionswerte E<sub>260</sub>/E<sub>280</sub> bestimmt. Dieser sollte zwischen 1,8 und 2 liegen.

Die isolierten RNA-Proben wurden bei -80 °C gelagert.

#### Lysispuffer

4,5 M Guanidinium-Thiocyanat  
50 mM HEPES/KOH pH 7,5  
2 % (w/v) N-Lauroylsarkosin  
1 % (v/v) β-Mercaptoethanol

#### TES Puffer

10 mM Tris/HCl pH 7,4  
5 mM EDTA  
1 % (w/v) SDS

### 2.4.5.3 Aufreinigung von mRNA

Die Isolierung von mRNA wurde mit Hilfe des „PolyAtract® mRNA Isolation Systems“ (Promega, USA) durchgeführt. Bei dieser Methode wird die mRNA durch Hybridisierung von biotinylierten Oligonukleotiden an dem PolyA-Schwanz der reifen Transkripte separiert. Durch Zugabe von Streptavidin gekoppelten paramagnetischen Partikeln und Anlegen eines Magneten kann die mRNA stringent gewaschen werden. Die mRNA wird in DEPC-H<sub>2</sub>O eluiert.

Die Konzentration der isolierten mRNA wurde durch „aufdotten“ definierter Mengen auf ein 1 % (w/v) Agarosegel und Vergleich mit definierten Mengen an Plasmid-DNA bestimmt. Dafür wurden die Signalstärken der „Dots“ bei UV-Licht von 312 nm verglichen.

2 µg mRNA wurden für die Gelelektrophorese (siehe 2.4.8.2) und anschließendem Transfer auf eine Nylonmembran (siehe 2.4.8.2) eingesetzt. Wenn die Konzentration der mRNA zu gering war, wurden die Nukleinsäuren aus der Lösung gefällt, indem einem Volumen von

100 µl Lösung 1,3 µl 4 M NaCl und 200 µl 100 % Ethanol zugefügt und vermischt wurde. Nach 30 minütiger Inkubationszeit bei -80 °C wurden die Proben anschließend 15 Minuten bei 20800 x g in 4 °C sedimentiert. Das Sediment wurde daraufhin mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und im RNA-Auftragspuffer (siehe 2.4.8.2) resuspendiert.

## 2.4.6 Semiquantitative RT-PCR

Die reverse Transkription (RT) gekoppelt mit anschließender Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Möglichkeit zur Analyse der Genexpression. Mit Hilfe dieser Methode wird nach Zugabe einer reversen Transkriptase zunächst RNA in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Daraufhin wird die cDNA exponentiell durch die PCR amplifiziert.

Um die extrahierte RNA von der mit aufgereinigten DNA zu befreien, wurde der RNA-Lösung RNase-freie DNase I zugegeben. Hierbei wurde ein 50 µl bzw. 100 µl Ansatz nach Angaben des Herstellers (MBI Fermentas) mit DNase I für zwei Stunden bei 37 °C behandelt. Die Reaktion wurde nach Zugabe von EDTA (10 Minuten, 65 °C) gestoppt. Anschließend wurde die RNA mit zwei Volumen EtOH und 1/10 Volumen 4 M NaCl bei -80 °C für 30 Minuten gefällt bzw. wurde die Ausfällung der RNA durch Zugabe von 10 µl 3 M NaAc und 2,5 Volumen 100 % kaltem EtOH bei -20 °C und einer Inkubation über Nacht erreicht, für 15 Minuten bei 16000 x g, 4 °C zentrifugiert und in sterilem Wasser aufgenommen.

### 2.4.6.1 Synthese von cDNA

Die cDNA Synthese wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase (Revert Aid™H Minus M Mul V Reverse Transcriptase) durchgeführt. Es wurden jeweils 2 µg Gesamt-RNA eingesetzt und 250 ng „Random-Primer“ (Promega) verwendet. Die cDNA-Synthese fand nach Angaben des Herstellers statt (MBI Fermentas) und nach Beendigung der cDNA Synthese wurde die restliche RNA mit 2 U RNase H abgebaut. Die cDNA wurde für die folgende PCR 1:3 verdünnt. Vor Analyse mit genspezifischen Primern (Tabelle 2.3) wurde zunächst die Vergleichbarkeit der Proben in Bezug auf gleiche Mengen mittels internen Standards der 18S rRNA (Ambion) quantifiziert. Unter der Voraussetzung, dass gleiche Mengen an RNA in den verschiedenen Proben eingesetzt werden und identische RT-PCR Bedingungen genutzt werden, sollte die Menge an Produkt nach der PCR proportional zur RNA und eine quantitative Analyse der Genexpression möglich sein.

### 2.4.6.2 Polymerase-Kettenreaktion

Für die Amplifizierung von cDNA (siehe 2.4.6.1) bei der semiquantitativen RT-PCR wurde die *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l) von MBI Fermentas und dem PCR-Gerät „Primus 96 Plus“ von MWG Biotech (Ebersberg) verwendet. Die „annealing“-Temperatur ( $T_m$ ) wurde der physikalischen Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide (Tabelle 2.3) angepasst. Die Elongationszeit wurde durch die Fragmentgröße beeinflusst, d.h. bei einer Fragmentgröße von unter 0,5 kb des zu amplifizierenden Produktes betrug die Elongationszeit 30 Sekunden und bei einer Größe ab 0,5 kb bis 1 kb wurde 1 Minute elongiert. Die Zyklenzahl variierte abhängig der eingesetzten „Primer“-Paare (Tabelle 2.3). Für die Amplifizierung des 18S-Transkripts, das als interner Standard für die semiquantitative RT-PCR (siehe 2.4.6) diente, wurde das „Quantum RNA Internal Standard Kit“ von Ambion (Hamburg) verwendet.

Die PCR erfolgte in einem 20  $\mu$ l Ansatz und die Reaktion bestand aus folgenden Komponenten:

|             |   |
|-------------|---|
| 10-50 ng    | Matrizen-DNA oder 2 $\mu$ l cDNA (1:3 verdünnt) |
| 1 x         | PCR-Puffer                                      |
| 200 $\mu$ M | dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)                  |
| 5 pmol      | „Primer forward“                                |
| 5 pmol      | „Primer reverse“                                |
| 0,1 $\mu$ l | <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)       |
| 1,5 mM      | MgCl <sub>2</sub>                               |
|             | Deionisiertes Wasser ad 20 $\mu$ l              |

Temperaturprofil der PCR:

Initialdenaturierung: 95 °C

Denaturierung: 95 °C

„Annealing“:  $T_m$

„Elongation“: 72 °C

Anschließend wurde der Reaktionsansatz über ein Agarosegel aufgetrennt und wurde mit Hilfe der densitometrischen Analyse quantifiziert. Außerdem konnten die amplifizierten PCR-Fragmente aus dem Gel eluiert werden (siehe 2.4.8.1).

Tabelle 2.3: Oligonukleotide für die RT-PCR

Es sind die verwendeten „Primer“ von 5` in 3` Richtung, die erforderliche „Annealing“-Temperatur und die Größe des amplifizierten Fragmentes in bp (Basenpaaren) angegeben.

| Name   | cDNA<br>Matrize | 5`-3`Richtung  | „Annealing“-<br>Temperatur<br>(T <sub>m</sub> ) | Fragmentgröße<br>(in bp) |
|--|-----------------|--|---|--------------------------|
| pp 18S for<br>pp 18S rev<br>pp Com-sense 18S<br>pp Comp-anti 18S | <i>18S rRNA</i> | AGGAATTGACGGAAGGGCAC<br>GGACATCTAAGGGCATCACA<br>AGGAATTGACGGAAGGGCAC-Pho<br>GGACATCTAAGGGCATCACA-Pho | 50 °C   | 315                      |
| EST24forP3<br>HvWhy1rev  | <i>Hvwhy1</i>   | CGCAGTTCGTGCCGCTCGAATCT<br>TATGGCTGCGACTCCTCGGGCTT   | 65 °C   | 492                      |
| P1Why2BamH1<br>P2Why2Xba   | <i>Hvwhy2</i>   | CGCGGATCCAGCAGCAACAATGCTCCGCCT<br>GCTCTAGACCTGTCCATTGAGAATCTG  | 58 °C   | 726                      |
| S40for1<br>S40rev3`UTR   | <i>HvS40</i>    | GCCGACGTCCTCTGGC<br>TCACCTCTGCTCTCACCG   | 58 °C   | 500                      |
| S40for1<br>S40rev2   | <i>HvS40</i>    | GAGGACGAGGTTCTGATA   | 57 °C   | 360                      |
| rbcLfor1<br>rbcLrev1   | <i>rbcL</i>     | GGACGATGCTATCACATCGAGCC<br>CCTACTACGGTACCAGAGTG  | 59 °C   | 750                      |
| Hy23for<br>Hy23bw  | <i>HvSF6</i>    | GTGACGGAGGTGATGGATCT<br>TACTCGTGCATGACGTAGGG   | 63 °C   | 427                      |
| PCfor<br>PCrev   | <i>petE</i>     | CGCGCTCCCTGGGCAAGAA<br>CGTGGGGCTCGCAGTAGAAG  | 63 °C   | 340                      |
| SOD_1_for<br>SOD_1_rev   | <i>sod</i>      | ACCTCCATGAGTTCGGTGAC<br>TGTCTTGCCACACCTTCAG  | 60 °C   | 154                      |
| HvrbcS1for<br>HvrbcS1rev   | <i>rbcS</i>     | GCCGATTGAGGGTATCAAGA<br>CCACCTCGTTAAGCACCTGT   | 60 °C   | 247                      |
| Lhca1_for<br>Lhca1_rev   | <i>Lhca1</i>    | CCAAGTTCGAGGAGCTCAAG<br>ATTTCTGGGGATGACGATGT   | 60 °C   | 179                      |
| Lhcb1_for<br>Lhcb1_rev   | <i>Lhcb1</i>    | AACGGAGTCAAGTTCGGAGA<br>CGTTCTTGAGCTCCTTCACC   | 60 °C   | 292                      |
| ELIP_for1<br>ELIP_rev1   | <i>ELIP</i>     | GACGTACCCTCGTCGTCAG<br>ACGGTGTAGGCGAACCAC  | 60 °C   | 241                      |



### 2.4.6.3 Densitometrische Analyse

Mit Hilfe des Computerprogrammes Chemilmager 4400 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA) konnten aus dem Fluoreszenzbild nach UV-Anregung (siehe 2.4.8) die Intensität der einzelnen Banden berechnet werden, indem in diesen markierten Banden die Pixelzahl mit den dazugehörigen Farbwerten aufsummiert wurden.

### 2.4.7 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Das Prinzip dieser Analyse basiert auf der von Sanger (1977) entwickelten Methode. Die Sequenzreaktion wurde mit dem „Cycle Reader™ Auto DNA Sequenzierung Kit“ angefertigt. Als Sequenzier-„Primer“ diente das IRD800-fluoreszenzmarkierte, vektorspezifische Oligonukleotid (pQE30for-IRD). Die Durchführung richtete sich nach den Angaben des Herstellers (MBI Fermentas). Es wurden 150-300 ng Plasmid-DNA für die Sequenzreaktion eingesetzt.

Temperaturprofil der Sequenzreaktion:

|       |       |   |      |
|-------|-------|---|------|
| 94 °C | 30 s  |   |      |
| 94 °C | 30 s  | } | 28 x |
| Tm    | 30 s  |   |      |
| 70 °C | 1 min |   |      |
| 94 °C | 10 s  | } | 10 x |
| 70 °C | 30 s  |   |      |

Die „annealing“-Temperatur wurde der Schmelztemperatur des eingesetzten Sequenzierprimer angepasst (pQEfor-IRD (CGGATAACAATTTACACAG), 53 °C). Nach Reaktionsende wurde dem Ansatz 1,5 µl Stopp-Reagenz zugegeben und drei Minuten denaturiert. 1,5 µl des Ansatzes wurde auf ein Harnstoffgel (10 g Harnstoff, 2,5 ml 10 x TBE (Licor), 3,75 ml „Rapid-Gel“ Lösung, 14 ml H<sub>2</sub>O, 175 µl 10 % APS, 38 µl TEMED) aufgetragen. Die Auftrennung und Detektion der Fragmente erfolgte über Nacht im Sequenzierer (DNA Sequenzierer Long Reader Licor 4200, MWG).

## 2.4.8 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm und 260 nm am ND-1000 Spektrophotometer (NanoDrop Technologies, Delaware, USA) bestimmt. Dabei stimmt eine Extinktion von 1 mit einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA/ml und 40 µg RNA/ml überein.

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Konzentration ist die Verwendung von ethidiumbromidhaltigen Agarosegelen (siehe 2.4.8.1). Indem man eine definierte Menge an Probe mit einer definierten Menge an DNA-Standard wie dem „Lambda-Marker“ (100 ng/µl) vergleicht. Diese Konzentrationschätzung erfolgt unter UV-Licht der Videodokumentationsanlage (Multiimage™ Light Carbinet, Alpha Innotech Corporation, USA).

### 2.4.8.1 Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten wurden verschieden konzentrierte Agarosegele verwendet. Die Herstellung dieser Agarosegele erfolgte nach Angaben von Sambrook et al. (1989). Abhängig der Größe des aufzutrennenden Fragmentes wurden Gele mit 0,7 % bis 1,5 % (w/v) Agarose verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftrag mit 1/10 Volumen des Auftragspuffers (10x BPB, siehe 2.4.1) vermischt. Als Laufpuffer diente 1x TAE (siehe 2.4.1).

Die Auswertung nach abgeschlossener Gelelektrophorese erfolgte unter UV-Licht bei 312 nm.

Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurde das zu eluierende Fragment aus dem Agarosegel unter UV-Licht ausgeschnitten und mit Hilfe des Gelelutionskits „Nucleo Spin Extract II Kit“ (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers in sterilem Wasser eluiert.

### 2.4.8.2 Denaturierende RNA-Agarose-Gelelektrophorese und Northern-„Blot“

Die Auftrennung von RNA erfolgte durch eine denaturierende Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese. Zur Überprüfung der Qualität und Quantität der Gesamt-RNA-Proben wurden die nach photometrischer Messung ermittelten RNA-Mengen mit RNA-Auftragspuffer (mit 0,75 % (v/v) Ethidiumbromid) versetzt und aufgetrennt.

Wurde das Gel anschließend für den Transfer von RNA auf eine Nylonmembran Hybond N<sup>+</sup> (Amersham Pharmacia, Freiburg) benutzt, wurden 2 µg der mRNA, die mit Auftragspuffer (ohne Ethidiumbromid) vermischt war, aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 1,4 V/cm über Nacht. Als Laufpuffer diente 1 x MOPS-Puffer.

**Formaldehyd-Agarosegel**

|            |                            |
|------------|----------------------------|
| 1 % (w/v)  | Agarose                    |
| 20 % (v/v) | Formaldehyd<br>in 1 x MOPS |

**RNA-Auftragspuffer**

|               |                                |
|---------------|--------------------------------|
| 40 % (v/v)    | Formamid, deionisiert          |
| 20 % (v/v)    | 10 x BPB-Farblösung            |
| 5 % (v/v)     | Formaldehyd                    |
| (0,75 % (v/v) | Ethidiumbromid)<br>in 1 x MOPS |

**10 x MOPS**

|        |               |
|--------|---------------|
| 400 mM | MOPS          |
| 100 mM | Natriumacetat |
| 10 mM  | EDTA          |

Nach erfolgter gelelektrophoretischer Auftrennung der mRNA und anschließendem Transfer auf eine Nylonmembran (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham Pharmacia, Freiburg) werden durch Erhitzen der Membran bei 80 °C für 2 Stunden die Nukleinsäuren kovalent an die Membran gekoppelt. Daraufhin wurde mit Hilfe der Färbelösung Methylenblau überprüft, ob der Transfer erfolgreich war. Dafür wurde die Membran mit 5 % (v/v) Essigsäure für 15 Minuten inkubiert und dann für 15 Minuten in der Färbelösung geschwenkt. Die Entfärbung des Hintergrundes dieser Membran wurde durch Waschen in DEPC-H<sub>2</sub>O durchgeführt. Daraufhin wurde mit Hilfe eines Lineals die Höhe der gefärbten RNA Banden und deren Abstand zu den Geltaschen fotografisch dokumentiert. Die Höhen der Geltaschen und der verschiedenen RNA-Banden wurden auf der Membran markiert.

Für die Hybridisierung von immobilisierter mRNA wurden die mit  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP markierten DNA-Fragmente (Tabelle 2.4) verwendet. Die Nylonmembran wurde zuerst für ca. drei Stunden bei 65 °C in einer Prähybridisierungslösung äquilibriert. Die folgende Hybridisierung mit ca. 750 000 cpm markierter DNA pro ml Hybridisierungslösung wurde bei 65 °C über Nacht durchgeführt. Nicht spezifisch gebundene DNA wurde durch Waschen nach Angaben des Herstellers (Amersham Pharmacia, Braunschweig) entfernt.

**Prähybridisierung-/Hybridisierungslösung**

|             |                                  |
|-------------|----------------------------------|
| 5 % (w/v)   | Dextransulfat                    |
| 1 % (w/v)   | SDS                              |
| 0,75 M      | NaCl                             |
| 0,1 Volumen | DNA aus Heringssperma (10 mg/ml) |

Die hybridisierte Membran wurde blasenfrei in Frischhaltefolie eingewickelt und in eine Autoradiographiekassette mit Verstärkerfolie (Trimax Regular 16, Imation, Rochester, NY, USA) gelegt und bei -80 °C mit einem Hyperfilm™MP von Amersham Pharmacia exponiert. Die Entwicklung und Fixierung des Films erfolgte nach Angaben des Herstellers (Tetenal, Norderstedt).

**20 x SSC**

3 M NaCl  
300 mM Na-Citrat/HCL pH 7,0

**Methylenblaulösung**

500 mM NaAc/NaOH pH 5,2  
0,004 % (w/v) Methylenblau

Die Markierung von definierten DNA-Fragmenten (siehe Tabelle 2.4) erfolgte durch den Einbau radioaktiv markierten  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP. Es wurde das „HexaLabel™DNA Labeling Kit“ nach Angaben des Herstellers (MBI Fermentas) benutzt. Die markierte und nicht markierte DNA wurde von freien Nukleotiden durch eine Gelfiltration mit Sephadex G50 getrennt (Sambrook et al. 1989).

Tabelle 2.4: Auflistung der verwendeten Gensonden für die Northern-, „Blot“-Analyse.

bp= Basenpaare

| Name            | Protein   | Insert (bp) | Vektor      | Restriktionsenzyme |
|-----------------|-----------|-------------|-------------|--------------------|
| EST24 (=Hvwhy1) | Why1      | 700         | pBlueskript | EcoRI              |
| EST21 (=Hvwhy2) | Why2      | 750         | pBlueskript | XhoI               |
| <i>rbcS</i>     | SSU       | 800         | pSR2.1      | EcoRI              |
| <i>Ubi</i>      | Ubiquitin | 728         | pUC18       | EcoRI              |

## 2.5 Allgemeine proteinbiochemische Analysen

### 2.5.1 Heterologe Überexpression von Genen in *E. coli*

Nach Klonierung der partiell vorhandenen *Hvwhy1*-cDNA in den Überexpressionsvektor pQE30 (siehe 2.4.4.3) wurde dieses rekombinante Plasmid in den *E. coli* Stamm SG13009 durch Elektroporation (siehe 2.4.2.5) transformiert. Die Klonierung der partiellen *Hvwhy2*-cDNA in den Überexpressionsvektor pet14b wurde von Anke Schäfer durchgeführt und das Konstrukt wurde durch Hitzeschock (siehe 2.4.2.5) transformiert. Klone, die die gewünschten Vektoren enthielten, wurden mit entsprechenden Antibiotika selektiert.

Für die Protein-Synthese wurde LB-Medium sowie Antibiotika (siehe 2.4.2.2) mit einer über Nacht angezogenen Vorkultur eines rekombinanten Klons angeimpft. Die Zellen wurden bei 37 °C bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,6 angezogen. Die hohen Transkriptionsraten, die am T5-Promotor des pQE30 Vektors bzw. am T7-Promotor des pet 14b Vektors initiiert werden, können durch die Zugabe von 1 mM Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid (IPTG) reguliert werden. Dieser Stoff bindet an das Repressorprotein, welches die Transkriptinitiation des zu überexprimierenden Gens inhibiert, daraufhin kann die Genexpression erfolgen. Die Bakterien wurden nach Zugabe von IPTG zwei Stunden bzw. über Nacht im Schüttelinkubator bei 37 °C kultiviert. Anschließend durch Zentrifugation 15 Minuten bei 3500 x g (Kontron, Festwinkelrotor A6.14) pelletiert und bei -20 °C gelagert.

## 2.5.2 Native Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie an Nickel-NTA

Nach Überexpression in *E. coli* SG13009 (*Hvwhy1*) bzw. BL21 (*Hvwhy2*) wurde die Bakteriensuspension abzentrifugiert. Nach Zugabe von Lysispuffer (auf 1 g Pellet werden 10 ml Puffer zugegeben) und 100  $\mu$ l Lysozym (100 mg/ml) fand eine Inkubation von 30 Minuten auf Eis statt. Die Zellen wurden im Sonicator (Bandelin SONOPULS) 10 x 20 Sekunden bei 70 % aufgebrochen und anschließend 25 Minuten bei 6800 x g in 4 °C zentrifugiert. Die gelösten Proteine konnten so von den vorhandenen Zelltrümmern getrennt werden. Die Proteine wurden daraufhin über eine Nickel-NTA-Affinitätschromatographie nach Angaben des Herstellers (Firma Quiagen, Hilden, Deutschland) aufgetrennt. Nach fünfmaligem Waschen wurden durch Erhöhung der Imidazolkonzentration im Elutionspuffer die an Ni-NTA gebundenen Proteine eluiert, da Imidazol mit diesen um die Bindung an Nickel rivalisiert. Die jeweiligen Zentrifugationen wurden für zwei Minuten bei 3200 x g in 4 °C durchgeführt. Anschließend wurden durch entsalzende Dialyse die Proteine in ihre native Form gebracht. Dafür wurde der Dialyseschlauch (Spectra/Por® Dialysis Membrane MWCO: 3,500, Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, Kalifornien, USA) nach Angaben des Herstellers behandelt (2 ml 0,5 mol EDTA pH 8,0 in 400 ml H<sub>2</sub>O, dreimal aufkochen und in deionisiertem Wasser fünfmal spülen) und in 1 mM Tris/HCl pH 7,6 über Nacht bei 4 °C rotiert. Das dialysierte Eluat wurde sofort verwendet oder im Fall von rekombinantem HvWhy1-Protein zunächst gefriergetrocknet (Christ ALPHA I-5), dadurch wurde die vorhandene Menge an Protein ankonzentriert. Die aufgereinigten Proteine wurden bei -20 °C gelagert.

### Lysispuffer

|        |                                       |
|--------|---------------------------------------|
| 50 mM  | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8 |
| 300 mM | NaCl                                  |
| 10 mM  | Imidazol                              |

### Waschpuffer

|        |                                       |
|--------|---------------------------------------|
| 50 mM  | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8 |
| 300 mM | NaCl                                  |
| 20 mM  | Imidazol                              |

### Elutionspuffer

|        |                                       |
|--------|---------------------------------------|
| 50 mM  | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8 |
| 300 mM | NaCl                                  |
| 250 mM | Imidazol                              |

### 2.5.3 Isolierung von Gesamtprotein aus Pflanzenmaterial

Das zu untersuchende Pflanzengewebe, aus dem die Proteine extrahiert werden sollen, wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert. Dieses wurde daraufhin in ein Reaktionsgefäß übertragen und bis zur 500 µl Markierung aufgefüllt. Das gemörserte Gewebe wurde in 750 µl Extraktionspuffer homogenisiert und dabei gründlich gemischt. Nachdem die Probe für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert wurde, wurden die Zelltrümmer nach einer Zentrifugation von 15 Minuten bei 12000 x g abgetrennt. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und erneut für fünf Minuten bei 12000 x g zentrifugiert. Die gelösten Proteine, die sich im Überstand befanden, wurden in ein neues Reaktionsgefäß übertragen und bei -20 °C gelagert.

### Extraktionspuffer

|            |                   |
|------------|-------------------|
| 62,5 mM    | Tris pH 6,8       |
| 10 % (v/v) | Glycerin          |
| 1 % (w/v)  | SDS               |
| 5 % (v/v)  | β-Mercaptoethanol |

### 2.5.4 Plastidenisolierung

Es wurden unterschiedliche Isolierungsmethoden angewendet. Über Percollgradienten wurden sehr reine und intakte Plastiden gewonnen. Die Art des Gradienten wurde abhängig dem zu isolierenden Plastidentyp gewählt (siehe 2.5.4.1, 2.5.4.2). Um große Mengen an Plastiden zu isolieren, wurde die Präparation mit Hilfe von Saccharosekissen durchgeführt (siehe 2.5.4.3).

#### 2.5.4.1 Isolierung von Chloroplasten nach Grussem et al. (1986)

Jeweils 40 g Blattmaterial wurden mit 200 ml GM-Puffer im „Waring Blendor“ homogenisiert (1x2 Sekunden „low“, 3x2 Sekunden „high“). Grobe Zellbestandteile wurden durch die Filtration über vier Lagen Miracloth abgetrennt. Das Filtrat wurde zwei Minuten zentrifugiert (3500 x g, 4 °C). Das Sediment wurde mit Hilfe eines Pinsels in wenig GM-Puffers

resuspendiert. Die Suspension wurde auf einen zweistufigen Percollgradienten gegeben und zentrifugiert (20 Minuten, 7000 x g, 4 °C). Die intakten Plastiden, die sich auf dem unteren, höher prozentigem Percollkissen befanden, wurden abgenommen und im Verhältnis 1:1 mit Waschmedium versetzt und zentrifugiert (2 Minuten, 7000 x g, 4 °C). Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Plastiden in wenig GM-Puffer resuspendiert.

**GM-Puffer**

|        |                     |
|--------|---------------------|
| 330 mM | Sorbit              |
| 1mM    | Na-Pyrophosphat     |
| 2 mM   | EDTA                |
| 1 mM   | MgCl <sub>2</sub>   |
| 1 mM   | Mn Cl <sub>2</sub>  |
| 2 mM   | DTT                 |
| 50 mM  | HEPES/NaOH (pH 6,8) |

**PCBF**

|           |            |
|-----------|------------|
| 3 % (w/v) | PEG 6000   |
| 1 % (w/v) | BSA        |
| 1 % (w/v) | Ficoll     |
|           | in Percoll |

**Percoll-Gradientenlösung**

|                        |                    |
|------------------------|--------------------|
| 80 %, 40 %, 30 % (v/v) | PCBF               |
| 330 mM                 | Sorbit             |
| 2 mM                   | EDTA               |
| 1 mM                   | MgCl <sub>2</sub>  |
| 2 mM                   | DTT                |
| 0,017 % (w/v)          | Glutathion         |
| 50 mM                  | HEPES/KOH (pH 8,0) |

**Waschmedium**

|        |                    |
|--------|--------------------|
| 330 mM | Sorbit             |
| 50 mM  | HEPES/KOH (pH 8,0) |

**2.5.4.2 Isolierung von Proplastiden**

Das meristematische Gewebe wurde mit Hilfe des „Waring Blendors“ dreimal für je zwei Sekunden auf höchster Stufe mit GM-Puffer (siehe 2.5.4.1) homogenisiert (auf 20 g 200 ml). Die groben Bestandteile wurden durch Filtration über vier Lagen Miracloth abgetrennt. Das Filtrat wurde für zwei Minuten bei 8500 x g in 4 °C zentrifugiert. Das Sediment wurde mit Hilfe eines Pinsels resuspendiert und auf einen zweistufigen Percollgradienten (siehe 2.5.4.1) geschichtet. Nach anschließender Zentrifugation von 20 Minuten bei 7000 x g in 4 °C konnten die intakten Plastiden, die sich in der Grenzschicht zwischen 30 % und 80 % Percoll-Gradientenlösung befanden, entnommen werden. Die Proplastiden wurden in einem Verhältnis von 1:5 im GM-Puffer gewaschen. Dieser Waschschrift wurde nach Zentrifugation von 2 Minuten bei 7000 x g in 4 °C wiederholt. Anschließend wurden die Proplastiden in GM-Puffer resuspendiert und gelagert.

### 2.5.4.3 Isolierung von Stroma- und Membranfraktionen aus Chloroplasten

Für die Isolierung größerer Mengen an Plastiden aus Gerste wurde die von Poulsen (1983) etablierte Methode angewendet.

Das auf Eis gelagerte Blattmaterial wurde mit Isolierungspuffer A (250 ml auf 50 g Blattmaterial) im Mixer „Waring Blendor“ (3x5 Sekunden „high“) homogenisiert. Nach Filtration über 3 Lagen Miracloth wurde das Filtrat zentrifugiert (20 Minuten, 3500 x g, 4 °C). Das Sediment wurde in wenig Isolierungspuffer A resuspendiert. Nach weiterer Filtration über Nylongaze (30 µm) wurden die Zellkerne abgetrennt und jeweils 15 ml auf 200 ml Saccharosekissen geschichtet. Anschließend wurde für 20 Minuten bei 3500 x g und 4 °C zentrifugiert und das Sediment in Isolierungspuffer B resuspendiert. Zweimal wurde mit Isolierungspuffer B gewaschen und wiederum für 20 Minuten bei 3500 x g und 4 °C zentrifugiert. Die dadurch isolierten Plastiden wurden fraktioniert, indem das Plastidenpellet in 100 ml Aufbruchmedium und 15 ml Medium B aufgeschlossen wurden. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 12200 rpm (Kontron, AS4.13) und 4 °C konnte die Stromafraktion von der sedimentierten Membranfraktion getrennt werden. Die gelösten Proteine der Stromafraktion wurden vor der Gelelektrophorese gefällt (siehe 2.5.7).

#### Isolierungspuffer A

|           |                 |
|-----------|-----------------|
| 0,3 M     | Mannitol        |
| 50 mM     | Tris/HCl pH 8,0 |
| 3 mM      | EDTA            |
| 2 % (w/v) | BSA             |
| 10 mM     | DTT             |

#### Saccharosekissen

|       |                |
|-------|----------------|
| 0,5 M | Saccharose     |
| 50 mM | Tris/HCl pH 8, |
| 20 mM | EDTA           |

#### Isolierungspuffer B

|             |                 |
|-------------|-----------------|
| 0,3 % (w/v) | Saccharose      |
| 50 mM       | Tris/HCl pH 8,0 |
| 20 mM       | EDTA            |

#### PMSF- Stammlösung

Spatelspitze PMSF in 1 ml 100 % EtOH

#### Aufbruchmedium

|         |                   |
|---------|-------------------|
| 10 mM   | Tricine           |
| 0,6 mM  | MgCl <sub>2</sub> |
| 1: 1000 | PMSF- Stammlösung |

#### Medium B

|            |                   |
|------------|-------------------|
| 64 % (w/v) | Saccharose        |
| 50 mM      | Tricine           |
| 3 mM       | MgCl <sub>2</sub> |



### 2.5.5 Isolierung von Mitochondrien aus Gerste

Die Isolierung von Mitochondrien aus Gerstenprimärblättern erfolgte nach Newton (1994). Das Blattmaterial wurde in Puffer A mit Hilfe eines Mixers (Waring Blenders) durch drei kurze Miximpulse (3x2 Sekunden) aufgeschlossen. Nachdem grobe Bestandteile durch Filtration durch vier Lagen Miracloth abgetrennt wurden, erfolgte eine differentielle Zentrifugation. Die Suspension wurde 10 Minuten bei 1000 x g und bei 4 °C zentrifugiert, um Zellkerne und Zelltrümmer zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand erneut bei 15900 x g und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Das Sediment wurde in Puffer A vorsichtig mit einem Pinsel resuspendiert, im „Potter“ homogenisiert und auf einen Saccharose-Stufengradienten (je Gradient: 8 ml 52 %, 10 ml 40 %, 10 ml 36 % und 4 ml 20 % (w/v) Saccharose in Puffer A ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol) gegeben. Anschließend wurden die Mitochondrien mit Hilfe der Ultrazentrifugation (Rotor TST 28.36, Centricon T-1065, Kontron (Milan, Italien), 24000 rpm, 1 h, 4 °C) aufgereinigt. Die Mitochondrienbande befand sich zwischen der Schicht mit einer Saccharosekonzentration von 52 % und 40 %. Nach Waschen der entsprechenden Fraktion in Puffer A (ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol) und erneuter Zentrifugation (15 Minuten, 9000 x g, 4 °C), wurden die Mitochondrien in Puffer A (ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol) aufgenommen und nach Zugabe von 10 % (v/v) Glycerin bei -80 °C gelagert.

#### Puffer A

|                |                          |
|----------------|--------------------------|
| 0,5 M          | Saccharose               |
| 5 mM           | EDTA                     |
| 1 % (w/v)      | BSA                      |
| 0,0175 % (v/v) | $\beta$ -Mercaptoethanol |
| 50 mM          | Tris/HCL, pH 7,5         |

### 2.5.6 Isolierung von Zellkernen aus Gerste

Die Isolierung von Kernen aus Gerstenprimärblättern fand nach der Methode von Kanazawa et al. (2000) statt. Dabei wurde das Blattmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und je 10 g Blattmaterial in 40 ml Extraktionspuffer I homogenisiert. Nach Filtration durch eine Lage Miracloth wurde die Suspension auf ein Saccharosekissen von einem Volumen von 5 ml aufgeschichtet. Diese wurden 20 Minuten bei 1800 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in Extraktionspuffer II resuspendiert und 30 Minuten schwenkend auf Eis inkubiert. Nach einer anschließenden Zentrifugation von 10 Minuten bei 1000 x g wurde das Pellet mehrmals mit Extraktionspuffer II gewaschen. Die Kerne wurden in wenig Extraktionspuffer I aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

**Extraktionspuffer I**

|             |                      |
|-------------|----------------------|
| 1,14 M      | Saccharose           |
| 10 mM       | Tris/HCl pH 7,6      |
| 5 mM        | MgCl <sub>2</sub>    |
| 0,1 mM      | PMSF                 |
| 0,1 mM      | 1,10- Phenanthroline |
| 0,1 % (v/v) | Thiodiglykol         |

**Extraktionspuffer II**

|              |                      |
|--------------|----------------------|
| 1,14 M       | Saccharose           |
| 10 mM        | Tris/HCl pH 7,6      |
| 5 mM         | MgCl <sub>2</sub>    |
| 0,1 mM       | PMSF                 |
| 0,1 mM       | 1,10- Phenanthroline |
| 0,1 % (v/v)  | Thiodiglykol         |
| 0,15 % (v/v) | Triton X-100         |

**Saccharosekissen**

|       |                   |
|-------|-------------------|
| 2,8 M | Saccharose        |
| 5 mM  | MgCl <sub>2</sub> |
| 10 mM | Tris/HCl pH 7,6   |

**2.5.7 Proteinfällung**

Wenn die Proteinkonzentration des Extraktes für eine weitere Verwendung zu gering war, wurde eine Proteinfällung mit Aceton durchgeführt. Dafür wurde dem Probenvolumen ein 2,5faches Volumen an Aceton zugesetzt und gut durchmischt. Dann wurden die Proben entweder für 30 Minuten bei -80 °C oder über Nacht bei -20 °C inkubiert. Nach der Fällung wurden die ausgefallenen Proteine bei 12000 x g (Tischzentrifuge, Eppendorf, 5415D) für eine Stunde abzentrifugiert, anschließend getrocknet, in deionisiertem Wasser resuspendiert sowie mit Auftragspuffer (siehe 2.5.9.1) für die anschließende Gelelektrophorese versetzt.

**2.5.8 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (1976) ermittelt.

1-10 µl des extrahierten Proteinextraktes wurden auf 800 µl mit deionisiertem Wasser aufgefüllt und mit 200 µl des Farbstoffkonzentrates Bradford Roti®-Nanoquant (Roth, Karlsruhe) versetzt. Nach Inkubation von 15 Minuten erfolgte die photometrische Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm (Spektralphotometer UV-2501 PC, Shimadzu, China). Weiterhin wurde eine BSA-Eichreihe erstellt, die zur Berechnung der Proteinkonzentration diente.

## 2.5.9 Gelelektrophorese von Proteinen

### 2.5.9.1 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die denaturierende Auftrennung von Proteinen erfolgte in einem SDS-Polyacrylamidgel nach Laemmli (1970). Für Proteine mit einem Molekulargewicht von 24 kDa wurde ein 12 % oder 14%iges (w/v) Trenngel verwendet. Proteinproben für ein einfaches Laemmli-Gel wurden in einfachem PSB Puffer aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 4 °C und 20-30 mA. Dabei wurden entweder Minigele einer Größe von 80 x 85 x 1 mm, Midigele einer Größe von 120 x 75 x 1 mm oder Multigel-Long-Gele mit einer Größe von 120 x 125 x 1 mm (Biometra, Göttingen) benutzt. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde der Marker „Prestained-Protein-Ladder“ (10-180 kD, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet.

#### 2 x PSB

|             |                 |
|-------------|-----------------|
| 100 mM      | Tris/HCl pH 6,8 |
| 100 mM      | DTT             |
| 20 % (v/v)  | Glycerin        |
| 4 % (w/v)   | SDS             |
| 0,2 % (w/v) | Bromphenolblau  |

#### 10 x Puffer nach Laemmli (1970)

|           |                 |
|-----------|-----------------|
| 250 mM    | Tris/HCl pH 6,8 |
| 1,9 M     | Glycin          |
| 1 % (w/v) | SDS             |

Zur besseren Auftrennung von kleinen Proteinen wurde eine modifizierte SDS-PAGE nach Fling und Gregerson (1986) durchgeführt.

#### 5 x „High-Tris“-Puffer

|             |                   |
|-------------|-------------------|
| 160 mM      | Tris/HCl pH 6,8   |
| 5,5 % (w/v) | SDS               |
| 30 % (v/v)  | Glycerin          |
| 0,5 % (w/v) | Bromphenolblau    |
| 19 % (v/v)  | β-Mercaptoethanol |
| 3 M         | Harnstoff         |

#### 10 x „High-Tris“- Laufpuffer

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| 60,6 g/l                  | Tris   |
| 142,8 g/l                 | Glycin |
| 1 % (w/v)                 | SDS    |
| pH 8,5 mit HCl einstellen |        |

Für die Proteinauftrennung wurden SDS-haltige „High-Tris“-Trenngele mit 14 % (w/v) Acrylamid verwendet. Es wurde ein 5%iges (w/v) Acrylamid-Sammelgel benutzt.

Folgende Volumina wurden zur Erstellung eines Sammelgels und Trenngels für ein Multigel-long-Gel verwendet (Tabelle 2.5).

Tabelle 2.5: Auflistung der verwendeten Volumina zur Herstellung eines Sammel- und High-Tris-Trenngels.

| Stammlösung                 | Volumina für Sammelgel | Volumina für Trenngel |
|-----------------------------|------------------------|-----------------------|
| Acrylamid/Bisacrylamid 30 % | 1,1 ml                 | 6,9 ml                |
| 1 M Tris/HCl pH 6,8         | 2 ml                   | -                     |
| 3 M Tris/HCl pH 8,8         | -                      | 3,75 ml               |
| 20 % SDS                    | 38 µl                  | 75 µl                 |
| 10 % APS                    | 75 µl                  | 15 µl                 |
| TEMED                       | 12 µl                  | 9 µl                  |
| H <sub>2</sub> O            | 4,6 ml                 | 4,26 ml               |

Die aufzutragenden Proteine wurden in 1 x „High-Tris“-Puffer für 10 Minuten bei 95 °C denaturiert und für zwei Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden sie aufgetragen und die Gelelektrophorese fand bei 10 mA über Nacht bei 4 °C statt.

### 2.5.9.2 Diskontinuierliche Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen

Die elektrophoretische Trennung der Proteine ist unter nativen Bedingungen von verschiedenen Faktoren abhängig wie Molekulargröße, -form und -ladung. Für wasserlösliche Proteine und Proteinkomplexe mit einem isoelektrischen Punkt von unter 9,5 kann eine Auftrennung nach Laemmli (1970) durchgeführt werden, wobei in das Gel, den Laufpuffer bzw. Auftragslösung kein SDS gegeben wird (siehe 2.5.9.1). Für das Trenngel wurde ein 7-11 % (w/v) Gradientengel verwendet. Es wurden 15 µg der zu untersuchenden Plastiden- und Kernfraktionen mechanisch mit der Spritze (Kanüle: Durchmesser außen 0,6 mm, Länge 25 mm und Kanülendurchmesser 23 Gx1, Roth, Karlsruhe) aufgebrochen. Die elektrophoretische Auftrennung fand bei 15-20 mA und 4 °C statt. Anschließend wurden die nativen Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und immunologisch untersucht (siehe 2.5.10).

#### 4 x Auftragslösung

50 % (v/v) Glycerin

Spatelspitze Bromphenolblau

### 2.5.9.3 Färbung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen

Proteine, die gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden, können durch den Farbstoff Coomassie Brilliantblau angefärbt werden. Die Gele werden dafür für mindestens eine Stunde in der Färbelösung inkubiert. Anschließend wird das Proteingel entweder in Entfärber, der sich aus Färbelösung ohne Coomassie zusammensetzt, inkubiert, bis sich der Hintergrund entfärbt oder das Gel wurde in Wasser transferiert und bei 600 W für 5 Minuten in der Mikrowelle entfärbt.

#### Färbelösung

|             |                              |
|-------------|------------------------------|
| 25 % (v/v)  | Isopropanol                  |
| 10 % (v/v)  | Essigsäure                   |
| 0,1 % (w/v) | Coomassie Brilliantblau R250 |

### 2.5.9.4 Trocknen von Proteingelen

Die Polyacrylamidgele (siehe 2.5.9.1) können zur längerfristigen Lagerung zwischen Einmachfolien getrocknet werden. Das Gel wurde zunächst in 2%iger (v/v) Glycerinlösung geschwenkt und anschließend mit Einmachfolien (DETI GmbH, Meckesheim) luftblasenfrei eingeschlossen. Nach Trocknung wurden die Gele bei Raumtemperatur gelagert. Eine weitere und schnellere Methode der Gel-Trocknung von Polyacrylamidgelen wurde für die Gele der Phosphorylierungsanalyse (siehe 2.5.13) durchgeführt. Diese wurden mit Hilfe eines Geltrockners Phero-Temp 60-Geltrockner (Biotech-Fischer, Reiskirchen) für 1,5 Stunden bei 75 °C auf Whatmanpapier getrocknet.

### 2.5.10 Western-, „Blot“-Analyse

Die nach Gelelektrophorese (siehe 2.5.9.1, 2.5.9.2) aufgetrennten Proteine wurden auf einer Nitrocellulosemembran (Nitrocellulose Transfer Membrane, Porengröße 0,1 µm, Whatman GmbH, Dassel) immobilisiert. Dafür wurden sechs Whatman Filterpapiere (Schleicher und Schuell, Dassel) sowie die Membran auf die Größe des zu blottenden Gels zurechtgeschnitten. Die Filterpapiere, die Membran und das Gel wurden im Western-, „Blot“-Transferpuffer äquilibriert. Dann wurden auf die Anode drei Lagen Filterpapier, dann die Membran und anschließend das Polyacrylamidgel sowie der Kathode zugewandt wieder drei Lagen Filterpapier geschichtet. Für den Proteintransfer wurde eine Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> für 30 Minuten angelegt. Nach Immobilisierung der Proteine wurde die Membran zur Blockierung unspezifischer Bindestellen in der entsprechenden Blockierungslösung (Tabelle 2.6) für eine Stunde bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach anschließendem Waschen (Tabelle 2.6) (zweimal kurz spülen, einmal

15 Minuten, zweimal fünf Minuten) wurde diese Membran mit dem jeweiligen Primärantikörper, der gegen das zu untersuchende Protein gerichtet ist, inkubiert (Tabelle 2.6). Daraufhin wurde die Membran erneut gewaschen (Tabelle 2.6) (zweimal kurz spülen, einmal 15 Minuten, zweimal fünf Minuten). Der Nachweis des ersten Antikörpers und somit des entsprechenden Proteins erfolgte mittels eines Sekundärantikörpers, an dem eine Peroxidase gekoppelt ist. Die Membran wurde für eine Stunde mit dem jeweiligen Sekundärantikörper (Tabelle 2.6) inkubiert und daraufhin wieder gewaschen (zweimal kurz spülen, einmal 15 Minuten, viermal fünf Minuten). Anschließend erfolgte der Nachweis des Protein-Antikörper-Komplexes entweder mit Hilfe der „Luminogen<sup>TM</sup>TMA-6“ Lösungen (Amersham GE Healthcare, UK) oder der „SuperSignal<sup>®</sup>WestPico Chemiluminescent Substrate“ (Thermo Scientific, Rockford, USA) nach Angaben des Herstellers. Die Membran, auf der die entsprechenden Detektionslösungen A und B gleichmäßig verteilt wurden, wurde luftblasenfrei in eine Folie gelegt und die Peroxidaseaktivität in einer ECL-Kassette durch Auflegen eines Films (Hyperfilm<sup>TM</sup>ECL High performance chemiluminescence film, Amersham Bio sciences, Buckinghamshire, England) detektiert. Der belichtete Film wurde in Entwickler gelegt, bis deutlich erkennbare Banden erschienen. Daraufhin wurde der Film kurz in Leitungswasser geschwenkt und dann für 10 bis 20 Minuten fixiert. Anschließend wurde der Film für 20 Minuten gewässert, mit Wasser abgespült und getrocknet. Die für die Herstellung von Entwickler und Fixierer notwendigen Lösungen stammen von der Firma Tetenal (Norderstedt).

**Western-„Blot“-Transferpuffer****10x TBST**

|   |           |          |
|---|-----------|----------|
| 2,93 g Glycin                                 | 12,1 g/l  | Tris     |
| 5,81 g Tris                                   | 87,66 g/l | NaCl     |
| 0,375 g SDS                                   | 5 g/l     | Tween 20 |
| 200 ml Methanol                               |           |          |
| auf 500 ml mit deionisiertem Wasser auffüllen |           |          |

**Entwickler****Fixierer**

|             |                          |            |                 |
|-------------|--------------------------|------------|-----------------|
| 25 % (v/v)  | Roentoroll HC            | 20 % (v/v) | Superfix Part 1 |
| 2,5 % (v/v) | Röntgenentwickler Part 1 | 5 % (v/v)  | Superfix Part 2 |
| 2,5 % (v/v) | Röntgenentwickler Part 2 |            |                 |

Tabelle 2.6: Auflistung der verwendeten Antikörper sowie dazugehörige Blockierungs-, Wasch- und Sekundärantikörperlösung

| Lösung zur Blockierung  | Primärantikörper  | Waschen der Membran in  | Sekundärantikörper  |
|---|---|---|---|
| Blockierungslösung<br>(Candor Bioscience GmbH, Weißenberg)<br><br>1 Stunde  | <b>HvWhy1-Antikörper</b><br>gegen das rekombinante Protein (nicht aufgereinigt)<br><br><b>1:500</b><br><br>über Nacht               | 1fach Waschlösung<br><br>(Candor Bioscience GmbH, Weißenberg) | <b>Anti-Rabbit</b><br><br>(ECL™ Anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from donkey), GE Healthcare, Buckinghamshire, England)<br><br><b>1:50000</b>   |
| 2 % (w/v)<br><br>ECL Advance™ blocking agent (GE Healthcare UK, Buckinghamshire, UK) 1 Stunde   | <b>HvWhy1-Peptid-Antikörper</b><br>(aufgereinigt, nicht aufgereinigt)<br><br><b>1:500</b><br><br>über Nacht                         | 1fach TBST  | <b>Anti-Rabbit</b><br><br>s.o.<br><br><b>1:50000</b>  |
| 2 % (w/v)<br>Blockierungslösung<br><br>ECL Advance™ blocking agent (GE Healthcare UK, Buckinghamshire, UK) 1 Stunde                         | <b>HvWhy2-Antikörper</b><br>gegen das rekombinante Protein (aufgereinigt, nicht aufgereinigt)<br><br><b>1:500</b><br><br>über Nacht | 1fach TBST  | <b>Anti-Rabbit</b><br><br>s.o.<br><br><b>1:50000</b>  |
| 2 % (w/v)<br>Blockierungslösung<br><br>ECL Advance™ blocking agent (GE Healthcare UK, Buckinghamshire, UK) 1 Stunde                         | <b>CoxII-Antikörper</b><br><br><b>1:1000</b><br><br>über Nacht  | 1fach TBST  | <b>Anti-Rabbit</b><br><br>s.o.<br><br><b>1:50000</b>  |
| 15 ml 10xTBS (modifiziert) (24,2 g Tris + 80 g NaCl, pH 7,6) + 135 ml H <sub>2</sub> O + 7,5g Milchpulver + 150 µl Tween 20<br><br>1 Stunde | <b>Histon-Antikörper</b><br><br><b>1:1000</b><br><br>in TBST (modifiziert) + 1g BSA auf 20 ml Lösung angesetzt<br>über Nacht        | 1fach TBS (modifiziert) +<br><br>0,1 % (v/v)<br><br>Tween 20  | <b>Anti-Rabbit</b><br><br>s.o.<br><br><b>1:2000</b>   |
| 4 % (w/v) Milchpulver<br><br>1 Stunde   | <b>Cytochrom b559-Antikörper</b><br><br><b>1:5000 /1:2000</b><br><br>über Nacht   | 1fach TBST  | <b>Anti-Maus</b><br><br>(ECL™ Anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from sheep) GE Healthcare, Buckinghamshire, England)<br><br><b>1:1000/1:10000</b> |

| Lösung zur Blockierung  | Primärantikörper   | Waschen der Membran in  | Sekundärantikörper   |
|---|--|---|--|
| 2 % (w/v)<br>Blockierungslösung<br><br>ECL Advance™ blocking agent (GE Healthcare UK, Buckinghamshire, UK) 1 Stunde | <b>SSU-Antikörper</b><br><br><b>1:500</b><br><br>über Nacht  | 1fach TBST  | <b>Anti-Rabbit</b><br><br>s.o.<br><br><b>1:10000</b>   |
| 2 % (w/v)<br>Blockierungslösung<br><br>ECL Advance™ blocking agent (GE Healthcare UK, Buckinghamshire, UK) 1 Stunde | <b>Lhca1-Antikörper</b><br><br><b>1:2000</b><br><br>über Nacht   | 1fach TBST  | <b>Anti-Rabbit</b><br><br>s.o.<br><br><b>1:100000</b>  |
| 2 % (w/v)<br>Blockierungslösung<br><br>ECL Advance™ blocking agent (GE Healthcare UK, Buckinghamshire, UK) 1 Stunde | <b>LHCI-Antikörper</b><br><br>gerichtet gegen <b>CP29 (= Lhcb4) und Lhca2</b><br><br><b>1:2000</b><br><br>über Nacht | 1fach TBST  | <b>Anti-Maus</b><br><br>s.o.<br><br><b>1:50000</b>   |
| 3 % BSA (w/v) in TBS<br><br>1 Stunde  | <b>Histidin-Tag-Antikörper</b><br><br><b>1:1000</b><br><br>1 Stunde  | TBS-Tween +Triton (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20, 0,2 % (v/v) Triton x-100)<br><br>und TBS (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) | <b>Anti-Maus</b><br><br>s.o.<br><br><b>1: 1000</b>   |
| 2 % (w/v)<br>Blockierungslösung<br><br>ECL Advance™ blocking agent (GE Healthcare UK, Buckinghamshire, UK) 1 Stunde | <b>Anti-ELIP</b><br><br><b>1:2000</b><br><br>über Nacht  | 1fach TBST  | <b>Anti-Goat</b><br><br>Anti-Goat igG, HRP-linked antibody conjugated to horseradish Peroxidase, PromoKine, Heidelberg, Germany)<br><br><b>1:50000</b> |
| 2 % (w/v)<br>Blockierungslösung<br><br>ECL Advance™ blocking agent (GE Healthcare UK, Buckinghamshire, UK) 1 Stunde | <b>SUMO-Antikörper</b><br><br><b>1:1000</b><br><br>über Nacht  | 1fach TBST  | <b>Anti-Rabbit</b><br><br>s.o.<br><br><b>1:75000</b>   |



### **2.5.11 Entfernen von gebundenem Antikörper von der Membran**

Wurde die Membran für weitere Western-„Blot“-Analysen benötigt, musste neben der Detektionslösung die gebundenen Primär- und Sekundärantikörper abgelöst werden. Dafür wurde sie für acht Minuten in 0,4 M NaOH mit 0,1 % (w/v) SDS Lösung geschwenkt.

### **2.5.12 Aufreinigung und Analyse von Antikörpern**

Es wurden drei Antikörper aufgereinigt: der HvWhy1-Antikörper, gerichtet gegen das rekombinante HvWhy1-Protein, der HvWhy1-Peptid-Antikörper, gerichtet gegen eine C-terminal vorhandene Aminosäuresequenz und der HvWhy2-Antikörper, gerichtet gegen das rekombinante HvWhy2-Protein. Diese wurden mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Dafür wurde das SulfoLink®Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Synthese und Aufreinigung der rekombinanten Proteine sind in Kapitel 2.5.1 und 2.5.2 zu finden. Mit Hilfe der Reduktion terminaler Cysteine bzw. verfügbarer Sulfhydryl-Gruppen innerhalb des Peptides oder Proteines wurden die Zielproteine des entsprechenden Antikörpers an die Gelmatrix gekoppelt. Nach spezifischer Bindung des Antikörpers an sein Zielprotein wurde dieser durch Ansäuerung mittels Glycin-Puffer eluiert und sofort durch Zugabe von 1 M Tris pH 7,5 neutralisiert. Die erhaltene Konzentration wurde am NanoDrop (Delaware, USA) ermittelt. Die Eluate, die entsprechende Proteinmengen aufwiesen, wurden vereinigt und dialysiert, wobei der aufgereinigte Antikörper in seinen nativen Zustand überführt wurde. Dafür wurde die nach Angaben des Herstellers aktivierte Dialysemembran (Spectra/Por®Dialysis Membrane MWCO: 3,500, Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, Kalifornien, USA, in Tris/HCl, pH8, steril autoklaviert) über Nacht in 3-5 Litern 1x PBS (modifiziert) bei 4 °C langsam rotiert.

Zur Charakterisierung der aufgereinigten Antikörper wurden „Dot-Blot“ Teststreifen angefertigt. Dafür wurde auf eine Nitrocellulosemembran (Nitrocellulose Transfer Membrane, Porengröße 0,1 µm, Whatman GmbH, Dassel) verschiedene Mengen an aufgereinigtem (siehe 2.5.2) und denaturiertem Protein HvWhy1 und HvWhy2 (1 µg, 200 ng, 100 ng, 10 ng, 1 ng und 0,1 ng) aufgebracht. Dies erfolgte mit Hilfe einer Dot-Blot-Apparatur (SRC 96 D Minifold I, Schleicher & Schuell). In die jeweiligen Auftragslöcher wurde zuerst 200 µl 1 x PBS (modifiziert) gegeben, die Lösung wurde durch ein angelegtes Vakuum durch die angefeuchtete Membran und das darunter liegende Whatman-Filterpapier gesaugt. Daraufhin wurde 100 µl Proteinprobe aufgetragen und nach Absaugen mit 200 µl 1 x PBS Puffer (modifiziert) nachgewaschen. Die Membran wurde getrocknet. Die Detektion der Antikörperbindung erfolgte mit Hilfe des ECL-Systems (SuperSignal® WestPico, Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, Rockford, USA; Luminogen™TMA-6 Solution A, B, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

**10 x PBS (modifiziert)**

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| NaCl                             | 150 mM |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 8,1 mM |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 1,5 mM |
| pH                               | 7,4    |

**2.5.13 Phosphorylierung von Proteinen**

Zur Überprüfung, ob Proteine phosphoryliert werden können, wurden verschiedene Mengen der nativ aufgereinigten, rekombinanten Proteine (siehe 2.5.2) in einem 12 µl Ansatz mit 1 x Kinasepuffer und  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP versetzt. Die Kinase A (SIGMA) wurde nach Angaben des Herstellers gelöst und 2 U dem Ansatz zugegeben. Ein paralleler Kontrollansatz enthielt keine Kinase, ein weiterer Kontrollansatz enthielt weder Kinase noch radioaktiv markiertes ATP. Als weitere Negativkontrolle wurde einem Ansatz kein Protein zugefügt. Nach einer Inkubation bei 30 °C für eine Stunde wurden alle Proteine über Nacht gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Polyacrylamidgel getrocknet (siehe 2.5.9.4). Der Nachweis erfolgte durch Exposition in einer Autoradiografiekassette auf einem Hyperfilm<sup>TM</sup> MP (Amersham Pharmacia).

**5 x Kinasepuffer**

|        |                   |
|--------|-------------------|
| 500 mM | Tris/HCl pH 8     |
| 200 mM | KCl <sub>2</sub>  |
| 25 mM  | MgCl <sub>2</sub> |
| 10 mM  | CaCl <sub>2</sub> |
| 2,5 mM | DTT               |
| 2 mM   | EDTA              |

## 2.6 Datenbanken und Internetseiten

<http://www.bioinformatics.org/sms2/translate.html>

Sequence manipulation

<http://compbio.dfci.harvard.edu>

DFCI - Barley TC report

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>

Clustalw2, Multiple sequence alignments

<http://fokker.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3>

Primer3 Output

<http://expasy.org>

ExPASy, PROSITE, Proteinanalyse

<http://expasy.org/tools/scanprosite/>

ScanProsite, motife scan

<http://psort.nibb.ac.jp>

Prediction of subcellular localisation of protein

<http://scansite.mit.edu>

Motives in protein sequences

<http://signal.salk.edu>

SALK-Institute Genomic Analysis Laboratory

<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/mitoprot.html>

MitoProtII

<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP>

ChloroP

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>

TargetP

<http://www.psort.org>

PSORT, subcellulare localization

<http://biocaml.org/ipsort/iPSORT/>

Subcellulare localisation

<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES>

NETNES, predicts leucine-rich nuclear export signals (NES) in eukaryotic proteins

[http://www.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)

ExPASy, Compute pI/Mw

<http://www.expasy.org/sprot/>

Motifscan

<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

NETPhos, predictions for serine, threonine and tyrosine phosphorylation sites in eukaryotic proteins

<http://www.abgent.com/doc/sumoplot>

SUMOplot™

<http://www.igb.uci.edu>

Sekundärstruktur

<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>

Sekundärstruktur, PSIPRED Prediction Result

<http://www.predictprotein.org>

PredictProtein, Sekundärstruktur, Tertiärstruktur

<http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred/>

Tertiärstruktur

<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>

Scratch Protein Predictor

[http://www.umass.edu/microbio/chime/pe\\_beta/pe/protexpl](http://www.umass.edu/microbio/chime/pe_beta/pe/protexpl)

Tertiärstruktur

<http://www.expasy.org/sprot>

Swiss-Prot-Database

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchungen zur HvWhy1- und HvWhy2-Proteinstruktur

Die Proteine HvWhy1 und HvWhy2 werden aufgrund ihrer Sequenzhomologie einer Familie von DNA-Bindeproteinen, den sogenannten Whirly-Proteinen, zugeordnet. In den folgenden Kapiteln wird versucht, durch Untersuchungen der jeweiligen Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur der Whirly-Proteine der Gerste Aufschluss über den Grad der Sequenz- und Strukturübereinstimmung mit bereits beschriebenen Whirly-Proteinen zu erlangen und Hinweise auf mögliche Lokalisierung und Funktionen zu gewinnen.

##### 3.1.1 Analyse der Primär- und Sekundärstruktur

Gerste besitzt wie die meisten Pflanzen zwei Whirly-Proteine. In Sojabohne (Desveaux et al. 2005) und *Arabidopsis thaliana* wurden hingegen drei Whirly-Proteine identifiziert (Desveaux et al. 2005, Krause et al. 2005).

Die cDNA des Whirly1 aus Gerste wurde ausgehend vom EST-Klon mit der GenBank-Accessionnummer BF625136 erhalten. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz (ClustalW) des HvWhy1-Proteins zu dem zuerst beschriebenen Whirly-Protein aus Kartoffel (AF233342) und dem Whirly-Protein aus *Arabidopsis thaliana* (At1g14410) zeigt auf Aminosäuresequenzebene eine Homologie von 55 %. Allen diesen dargestellten Whirly-Proteinen ist das charakteristische Motiv KGKAAL (Desveaux et al. 2002) gemein, das für die DNA-Einzelstrangbindung verantwortlich ist (Abb. 3.1). Weiterhin zeigt der Sequenzvergleich, dass der N-terminale Bereich des HvWhy1-Proteins noch nicht vollständig bekannt ist. Die Sequenzen von AtWhy1 und StWhy1 besitzen in dem von HvWhy1 nicht bekannten Bereich eine Transitsequenz für den Import in die Plastiden (Krause et al. 2005, Grabowski et al. 2008). Das von Desveaux et al. (2005) für das StWhy1 identifizierte Kernlokalisierungssignal (pNLS) konnte mit den Programmen ExpASy und SWISS-Prot für das HvWhy1-Protein nicht bestätigt werden. Zusätzlich ist von Desveaux et al. (2005) eine mögliche Transaktivierungsdomäne und eine Autoregulationsdomäne für das homologe StWhy1 beschrieben worden (Abb. 3.1). Außerdem wurde für HvWhy1 mit den Programmen ScanProsite und NetPhos.2.0 mehrere Serin- und Threoninreste vorhergesagt, die möglicherweise phosphoryliert werden könnten (Abb. 3.1). Weiterhin konnte für die Aminosäuresequenz des HvWhy1-Proteins eine mögliche Sumoylierungsstelle (SUMOplot™) identifiziert werden (Abb. 3.1). Aus der bekannten, jedoch unvollständigen cDNA-Sequenz und der sich daraus ableitenden Aminosäuresequenz ergibt sich für das unvollständige HvWhy1-Protein ein Molekulargewicht von ca. 22 kDa (ExpASy, Compute pi/Mw).

Die cDNA des HvWhy2 aus Gerste wurde ausgehend vom EST-Klon mit der GenBank-Accessionnummer BF627441 genutzt. Wird die daraus resultierende erste Aminosäure als Startpunkt verwendet, um den Leserahmen zu erstellen, ist die für alle Whirly-Vertreter charakteristische KGKAAL-Domäne enthalten. Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der

Whirly2-Proteine aus Gerste und *Arabidopsis thaliana* (At1g71260), so weist das HvWhy2-Protein zum AtWhy2-Protein 45 % an identischen Aminosäuren auf. Die Aminosäuresequenz von HvWhy1 zeigt nur eine Übereinstimmung von 30 % zu der Aminosäuresequenz von HvWhy2.

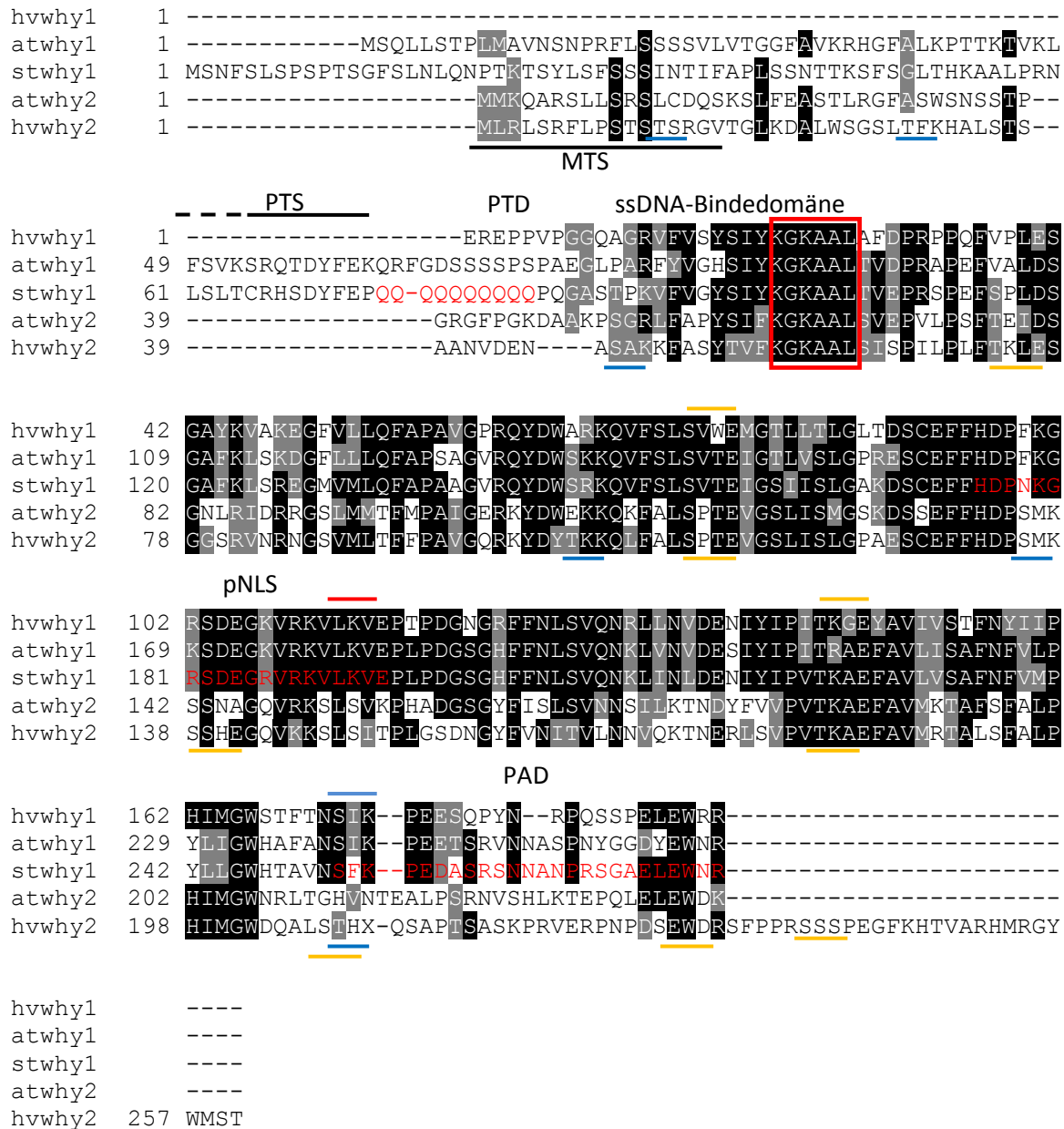


Abb. 3.1: Vergleich der Aminosäuresequenzen ausgewählter Whirly-Proteine. Abgebildet ist die Sequenz der Whirly1- und Whirly2-Proteine der Gerste (*Hordeum vulgare*, Hv) und aus *Arabidopsis thaliana* (At) im Vergleich zum Whirly-Protein StWhy1 aus der Kartoffel (*Solanum tuberosum*, St) (ClustalW, Thompson et al. 1994). Homologe Aminosäuren sind schwarz unterlegt. Die DNA-Einzelstrang-Bindedomäne ist mit einer roten Box, die putative Transaktivierungsdomäne (PTD), das mögliche Kernlokalisierungssignal (pNLS) und die putative Autoregulationsdomäne (PAD) der StWhy1-Sequenz (Desveaux et al. 2005) sind in der Sequenz rot markiert. Mögliche posttranslationale Modifizierungen für HvWhy1 sind über und für HvWhy2 unter der Sequenz markiert. Mögliche Phosphorylierungsstellen sind blau (Phosphorylierung durch Proteinkinase C) und orange (Phosphorylierung durch Caseinkinase II), Sumoylierungsstellen rot gekennzeichnet. Ein schwarzer Balken kennzeichnet die Transitsequenz für den Import in die Plastiden (PTS, plastidäre Transitsequenz ausgehend vom N-Terminus) bzw. in die Mitochondrien (MTS, mitochondriale Transitsequenz).

Im Unterschied zu den Whirly1-Proteinen weisen die Whirly2-Proteine eine vorhergesagte Transitsequenz auf, die einen Import in die Mitochondrien ermöglicht. Dies konnte im Fall von AtWhy2 *in vitro* bestätigt werden (Krause et al. 2005). Für das HvWhy2-Protein wird eine Transitsequenz vorhergesagt, die sich über den Bereich der ersten 17 Aminosäuren erstreckt (MitoProtII). Auch für dieses Whirly-Protein konnte mittels Programmen wie ExPASy und NETNES kein Kernlokalisierungssignal festgestellt werden. Mit Hilfe der Programme ScanProsite und NETPhos wurde für das HvWhy2-Protein mögliche Phosphorylierungsstellen vorhergesagt, die durch die Proteinkinase C und Caseinkinase II phosphoryliert werden könnten (Abb. 3.1). Es konnten keine möglichen Sumoylierungsstellen identifiziert werden. Die Aminosäuresequenz des HvWhy2-Proteins ergibt ein Molekulargewicht von ca. 28,5 kDa (ExPASy, Compute pI/Mw).

### 3.1.2 Modellierung der Tertiärstruktur der Proteine HvWhy1 und HvWhy2

Neben der bereits analysierten Primärstruktur (siehe 3.1.1) beschreibt die Tertiärstruktur die dreidimensionale Organisation aller Aminosäuren in einer Polypeptidkette. Obwohl die 3D-Konformation aus der Primärstruktur folgt, kann die gleiche Tertiärstruktur durch unterschiedliche Primärstrukturen bestimmt werden. Die räumliche Struktur kann Hinweise auf funktionelle Domänen geben.

Mit Hilfe computergestützter Vorhersagen (ExPASy; PSIPRED Prediction Result; PredictProtein; Protein-Explorer.2.80) wurden sowohl die Sekundärstrukturen als auch die Tertiärstrukturen der HvWhy1- und HvWhy2-Proteine modelliert. Die für das StWhy1-Protein bereits veröffentlichte Kristallstruktur (Desveaux et al. 2002) konnte als Basis zur Erstellung des Modells der Tertiärstruktur für das HvWhy1-Protein genutzt werden. Das Modell für das HvWhy1-Protein weist ebenso, wie für das StWhy1-Protein beschrieben, acht  $\beta$ -Faltblätter und drei  $\alpha$ -Helices auf (Abb. 3.2 A, B). Die  $\beta$ -Faltblätter sind antiparallel angeordnet und zwei der  $\alpha$ -Helices sind C-terminal lokalisiert. Da der Vergleich eine starke Ähnlichkeit zwischen Modell und Kristallstruktur zeigt, wurde für das HvWhy2-Protein ein weiteres Modell basierend auf den computergestützten Vorhersagen entworfen. Es wurden elf  $\beta$ -Faltblätter und vier  $\alpha$ -Helices identifiziert (Abb. 3.2 C, D). Dabei zeigen die  $\beta$ -Faltblätter jedoch keine deutliche antiparallele Anordnung wie bei HvWhy1 und StWhy1. Diese Beobachtung zeigt, dass die Tertiärstrukturen der Proteine HvWhy1 und HvWhy2 wie auch die Primärstrukturen (siehe 3.1.1) keine ausgeprägten Ähnlichkeiten zueinander aufweisen. Zusätzlich wird deutlich, dass sich die DNA-Bindedomäne KGKAAL des HvWhy2-Proteins im Gegensatz zum HvWhy1-Protein nicht auf der Oberfläche der Proteinstruktur, sondern in einer Einbuchtung der 3D-Struktur befindet.

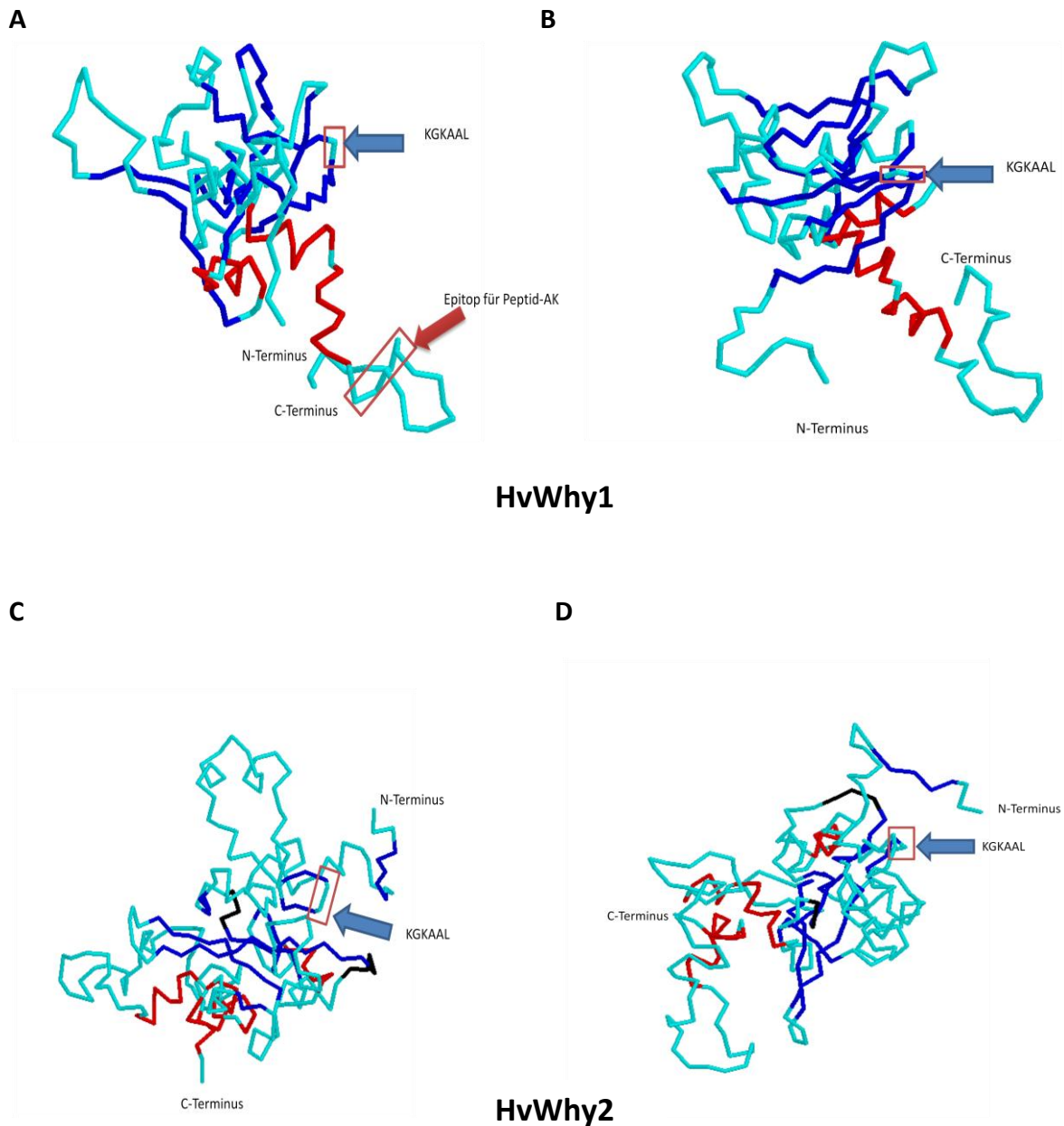


Abb. 3.2: Vergleich der möglichen Tertiärstrukturen der Whirly-Proteine der Gerste. Die Modelle für die Tertiärstrukturen sind für eine bessere räumliche Veranschaulichung jeweils in zwei verschiedenen Positionen dargestellt. Das Modell für das HvWhy1-Protein ist in A und B abgebildet. Das Modell für das HvWhy2-Protein ist in C und D präsentiert. Die  $\alpha$ -Helices sind rot hervorgehoben. Die  $\beta$ -Faltblätter sind in blau (bei C und D auch in schwarz dargestellt, um eng aneinander liegende  $\beta$ -Faltblätter voneinander unterscheiden zu können) eingezeichnet. Zusätzlich sind die N- und C-Termini gekennzeichnet. Blaue Pfeile und rote Boxen markieren die DNA-Bindedomäne KGKAAL. In A ist die Peptidsequenz rot umrandet hervorgehoben, die zur Herstellung des Peptid-HvWhy1-Antikörpers verwendet wurde (siehe 3.2.2).



### 3.1.3 Herstellung und Aufreinigung rekombinanter Whirly-Proteine der Gerste

Um die vorhergesagten posttranslationalen Modifizierungen *in vitro* zu überprüfen bzw. Antikörper für die immunologischen Untersuchungen *in vivo* herstellen zu können, ist es notwendig, die zu untersuchenden Proteine in größeren Mengen herzustellen und aufzureinigen. Für die Herstellung eines rekombinanten HvWhy1-Proteins wurde die partiell vorhandene cDNA-Sequenz BF625136 unter Erhalt des Leserahmens in den Expressionsvektor pQE30 (siehe 2.4.4.3) kloniert und heterolog in *E. coli* exprimiert. Die nicht vollständig vorhandene Sequenz weist im N-terminalen Bereich keine Transitsequenz auf (siehe 3.1.1), beinhaltet aber die Information zur Synthese eines nahezu reifen Whirly-Proteins (Abb. 3.1). Durch die Proteinbiosynthese der cDNA-Sequenz im Überexpressionsvektor wird der Aminosäuresequenz des HvWhy1-Proteins N-terminal unter anderem sechs Histidine hinzugefügt (Abb. 3.3).



Abb.3.3: Schematische Darstellung des rekombinanten HvWhy1-Proteins.

Die Aminosäuresequenz des HvWhy1-Proteins, translatiert aus der bekannten cDNA-Sequenz des EST-Klons BF625136, ist schematisch als blaue Box dargestellt. Nach Proteinbiosynthese der cDNA-Sequenz im Überexpressionsvektor wurde der N-terminale Bereich verlängert, indem neben 6 Histidinresten auch weitere Aminosäuren, die aus der MCS des Überexpressionsvektors stammen, hinzugefügt wurden.

Das synthetisierte Protein wurde mittels dieser N-terminalen Hexahistidinsequenz durch Ni-NTA-Affinitätschromatografie aufgereinigt (siehe 2.5.2). Sowohl nach Anzucht der Bakterienstämme (siehe 2.4.2.2) als auch Induktion der Überexpression (siehe 2.5.1) und Aufreinigung (siehe 2.5.2) wurden die gewonnenen Proteinextrakte ihrer Größe nach im Polyacrylamidgel (siehe 2.5.9.1) aufgetrennt. Außerdem wurde eine Negativkontrolle, in der der Expressionsvektor ohne inserierte HvWhy1-cDNA-Sequenz enthalten war, nach ihrer Größe aufgetrennt und durch eine Färbung mit Coomassie-Brilliantblau (siehe 2.5.9.3) sichtbar gemacht. Es konnte nur nach Aufreinigung und anschließendem Lyophilisieren (siehe 2.5.2) eine Ankonzentration des HvWhy1-Proteins (Vektor+*HvWhy1*; 3) im Vergleich zum Proteinextrakt nach Überexpression (Vektor+*HvWhy1*; 2) erreicht und das rekombinante Protein nachgewiesen werden (Abb. 3.4 A). Das Molekulargewicht des unvollständigen HvWhy1-Proteins (ursprünglich 22 kDa) beträgt durch Anfügen der N-terminalen Aminosäuren, die aus der Sequenz des Expressionsvektors translatiert wurden, inklusive der sechs Histidine, 24 kDa (Abb. 3.4).

Die Proteinextrakte des Kontrollansatzes, bei dem der Leervektor in *E. coli* transformiert, überexprimiert und eluiert sowie lyophilisiert wurde, zeigt weder vor noch nach der Induktion der Proteinsynthese ein ca. 24 kDa schweres Protein (Abb. 3.4 A).

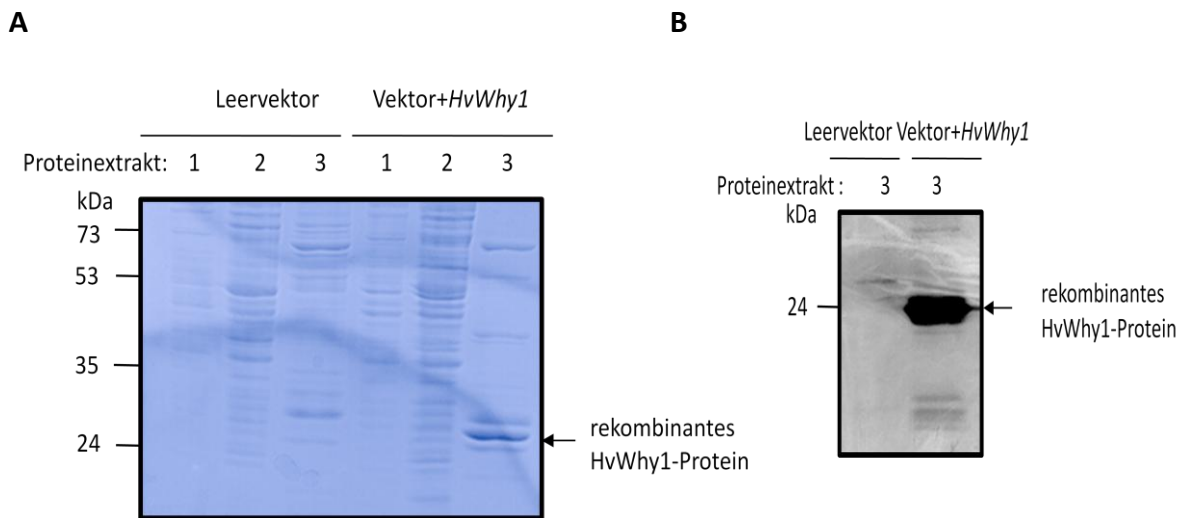


Abb. 3.4 Nachweis des rekombinanten HvWhy1-Proteins.

A: Aufreinigung des in *E. coli* heterolog synthetisierten HvWhy1-Proteins. Nach Überexpression der cDNA wurde das synthetisierte rekombinante HvWhy1-Protein mit Hilfe der 6 Histidine über NiNTA-Affinitätschromatografie aufgereinigt.

Proteinextrakt 1= vor Induktion der Überexpression

Proteinextrakt 2= nach Überexpression

Proteinextrakt 3= nach Aufreinigung des Proteins

Die Proteinextrakte wurden elektrophoretisch auf einem 12 % (w/v) Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt.

B: Die aufgereinigten Proteinextrakte (Leervektor Proteinextrakt 3; Vektor+*HvWhy1* Proteinextrakt 3) wurden elektrophoretisch auf einem 12 % (w/v) Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf einer Nitrozellulosemembran immobilisiert. Die Inkubation der Membran fand mit einem gegen Histidine gerichteten Antikörper (siehe 2.5.10) statt. Die Antikörperdetektion erfolgte mit dem ECL-System. Die Position des rekombinanten HvWhy1-Proteins ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine (Leervektor Proteinextrakt 3, Vektor+*HvWhy1* Proteinextrakt 3) wurden auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (siehe 2.5.10). Mit Hilfe eines Antikörpers, der gegen die N-terminalen Histidinreste des rekombinanten Proteins gerichtet ist, konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem ca. 24 kDa Protein um das rekombinante HvWhy1-Protein handelt (Abb. 3.4 B).

Obwohl eine vollständig bekannte *Hvwhy2*-cDNA vorlag, wurde im Vorfeld dieser Arbeit von Anke Schäfer nur eine partielle cDNA-Sequenz des EST-Klons BF627441 in den Überexpressionsvektor kloniert, da nach Klonierung der kompletten cDNA-Sequenz in den Überexpressionsvektor nach anschließender Überexpression (siehe 2.5.1) das synthetisierte HvWhy2-Protein nicht eluiert werden konnte. Wurde jedoch ein 5'-terminaler Bereich ausgespart, konnte das synthetisierte rekombinante Protein erfolgreich aufgereinigt werden (siehe 2.5.2).

Dabei wurde das aufgereinigte HvWhy2-Protein ausgehend von einer im 5' Bereich gekürzten cDNA-Variante von einer Länge von 570 bp und einer Verlängerung des N-Terminus incl. sechs Histidine durch den Überexpressionsvektor synthetisiert (Abb. 3.5).



Abb.3.5: Schematische Darstellung des rekombinanten HvWhy2-Proteins.

Als violette Box ist die Aminosäuresequenz des HvWhy2-Proteins, translatiert aus einem Teil der bekannten cDNA-Sequenz des EST-Klons BF627441, dargestellt. Nach Proteinbiosynthese der cDNA-Sequenz im Überexpressionsvektor wurde der N-terminale Bereich verlängert, indem neben 6 Histidinresten auch weitere Aminosäuren, die aus der MCS des Überexpressionsvektors stammen, hinzugefügt wurden.

Der zusätzliche N-terminale Bereich (mit dem His-Tag) des rekombinanten Proteins ist im Einbuchstabencode angegeben.

Das rekombinante HvWhy2-Protein weist ein theoretisches Molekulargewicht von 23,9 kDa auf, ist jedoch weniger negativ geladen als das verwandte HvWhy1-Protein und ist im Polyacrylamidgel nach Elektrophorese bei ca. 26 kDa zu finden (Abb. 3.6).

Nach Überexpression in *E. coli* wurde (Abb. 3.6 (1)) das rekombinante HvWhy2-Protein für eine effiziente Aufreinigung an Ni-NTA gebunden und von bakteriellen Proteinen, die sich im Überstand befinden (Abb. 3.6 (2)), abgetrennt. Anschließend wurde das rekombinante Protein eluiert (Abb. 3.6 (3)), gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliantblau angefärbt. So wurde eine Fraktion erhalten, in der ausschließlich das rekombinante HvWhy2-Protein nachgewiesen werden konnte.

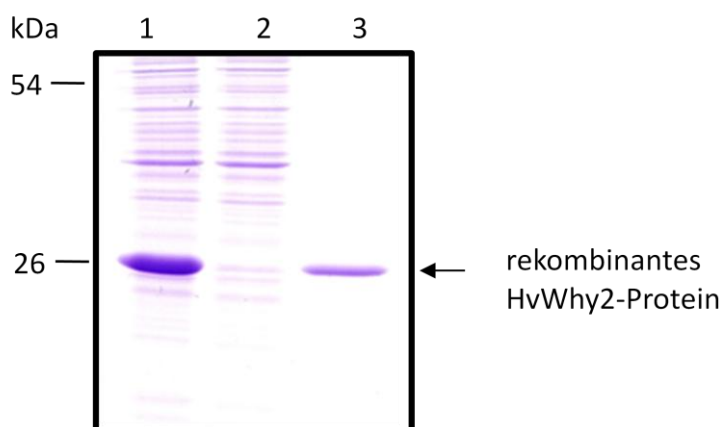


Abb. 3.6: Aufreinigung des in *E. coli* heterolog synthetisierten HvWhy2-Proteins. Nach Überexpression der cDNA wurde das synthetisierte HvWhy2-Protein mit Hilfe von 6 Histidinen an NiNTA gebunden und anschließend aufgereinigt.

1= nach Induktion der Überexpression

2= Überstand nach Bindung des HvWhy2-Proteins an Ni-NTA

3= nach Aufreinigung des Proteins

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine der Extrakte 1, 2 und 3 wurden Coomassie angefärbt.

### 3.1.4 Phosphorylierung der rekombinanten HvWhy1- und HvWhy2-Proteine

Proteine können nach ihrer Synthese noch posttranslational verändert werden. Solche Modifizierungen beeinflussen die biologische Aktivität, Lebensdauer und Lokalisierung von Proteinen. Eine Möglichkeit ist dabei die Phosphorylierung von Serin-, Threonin- und Tyrosinresten. Die Aktivität und damit die Funktion von Proteinen wird häufig durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung gesteuert. Da beide Whirly-Proteine über eine Reihe von möglichen Phosphorylierungsstellen verfügen (siehe 3.1.1), wurde ein Phosphorylierungsexperiment durchgeführt. Dafür wurden die rekombinanten HvWhy1- und HvWhy2-Proteine (siehe 3.1.3), die in *E. coli* (siehe 2.5.1) synthetisiert und durch NiNTA nativ aufgereinigt (siehe 2.5.2) wurden, verwendet. Beide Proteine wurden mit radioaktiv markiertem  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP versetzt. Das rekombinante HvWhy1-Protein besitzt aufgrund der N-terminalen Modifizierung (Abb. 3.3) mit einem „His-Tag“ ein Molekulargewicht von 24 kDa (siehe 3.1.3). Mit Hilfe des Phosphorylierungsansatzes (siehe 2.5.13) konnte gezeigt werden, dass das rekombinante Protein phosphorylierbar ist (Abb. 3.7). Besonders stark ist diese Phosphorylierung bei einer Verwendung von 100 ng aufgereinigtem Protein sichtbar. Das rekombinante HvWhy2-Protein ist im Polyacrylamidgel bei ca. 26 kDa zu finden (Abb. 3.6). Auch in diesem Fall konnte eine erfolgreiche Phosphorylierung beobachtet werden (Abb. 3.7). Beide rekombinanten Proteine zeigen ein weiteres spezifisches, radioaktives Signal bei einem Molekulargewicht von ca. 54 kDa.

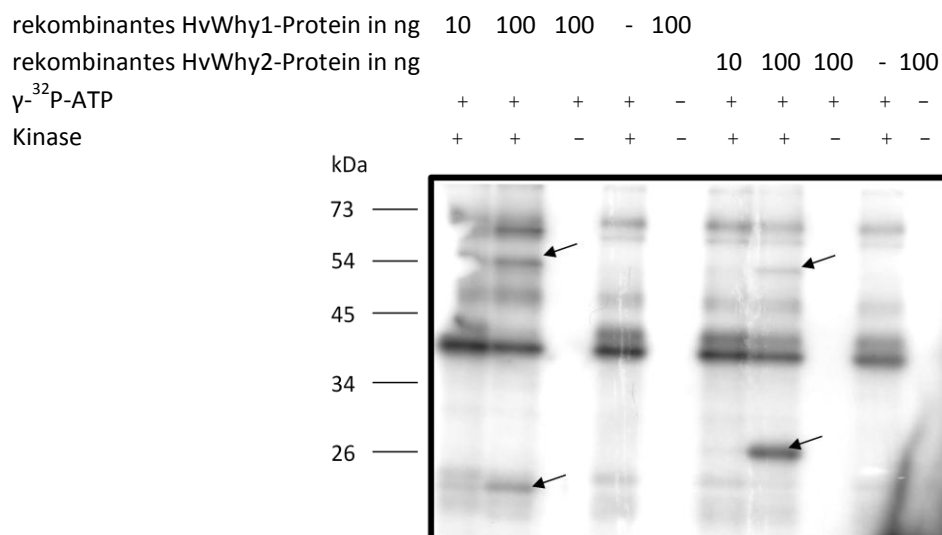


Abb. 3.7: Phosphorylierung der rekombinanten Proteine HvWhy1 und HvWhy2. Es wurden 10 ng bzw. 100 ng aufgereinigtes Protein mit Hilfe der Proteinkinase A mit radioaktivem  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP phosphoryliert. Als negative Kontrollen wurden 100 ng rekombinantes Protein ohne Kinase bzw. ohne ATP verwendet. Als weitere Kontrolle wurde kein rekombinantes Protein zugegeben. Abgebildet ist ein Autoradiogramm eines 14%igen (w/v) „High-Tris“-Polyacrylamidgels nach Auftrennung der Proteine und Trocknung des Gels. Die Pfeile kennzeichnen spezifische Phosphorylierungssignale.

Als Kontrolle zur Autophosphorylierung wurde einem Ansatz keine Kinase und einem weiteren Ansatz sowohl keine Kinase als auch kein radioaktiv markiertes ATP zugegeben. Als zusätzliche Negativkontrolle wurde einem Ansatz kein Protein zugefügt. Alle Kontrollansätze zeigten nach Auftrennung in einem Polyacrylamidgel auf der Höhe der rekombinanten Proteine keine Phosphorylierung (Abb. 3.7).

### **3.2 Herstellung von Antikörpern, die gegen das HvWhy1-Protein gerichtet sind**

Spezifische Antikörper ermöglichen Lokalisierungsstudien von Proteinen bzw. Proteinkomplexen. Außerdem können sie zur biochemischen Aufreinigung und für Protein-Protein-Interaktionsstudien eingesetzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Antikörper produziert, die spezifisch das Antigen HvWhy1 nachweisen: Ein polyklonaler Antikörper, der gegen das aufgereinigte und rekombinante HvWhy1-Protein (siehe 2.5.1, 2.5.2, siehe 3.1.3) gerichtet ist und ein weiterer polyklonaler Antikörper, der eine Peptidsequenz (IKPEESQPYNRPQS) erkennt, welche im C-terminalen Bereich des HvWhy1-Proteins lokalisiert ist (Abb. 3.2).

#### **3.2.1 Charakterisierung eines Antikörpers, der gegen das rekombinante HvWhy1-Protein gerichtet ist**

Für die Antikörperproduktion in Kaninchen wurde eine Menge von 0,7 mg aufgereinigtem Protein benötigt. Deshalb wurde rekombinantes HvWhy1-Protein (ca. 24 kDa) hergestellt (siehe 2.5.1) und aufgereinigt (siehe 2.5.2, 3.1.3). Das im Polyacrylamidgel aufgetrennte und angefärbte HvWhy1-Protein wurde ausgeschnitten und eingeschickt (Biogenes, Berlin).

Zum Nachweis der Sensitivität und Spezifität des daraufhin erhaltenen Antikörperserums wurde dieses mit dem Präimmenserum verglichen. Dazu wurde auf eine Nitrozellulosemembran transferiertes, gelelektrophoretisch aufgetrenntes, rekombinantes HvWhy1-Protein in den Mengen von 25 ng und 100 ng immobilisiert. Nur das Antikörper-Rohserum konnte im Vergleich zum Präimmenserum bei einem erwarteten Molekulargewicht von ca. 24 kDa das rekombinante Protein nachweisen (Abb. 3.8 A, B). Zusätzlich wurden weitere Proteine im höhermolekularen (ca. 54 kDa) sowie im niedermolekularen Bereich (ca. 20 kDa und ca. 26 kDa) detektiert (Abb. 3.8 B, C). Zur weiteren Überprüfung der Spezifität wurde zum Einen zusätzlich aufgereinigtes HvWhy1-Protein in einer Menge von 20 ng sowie 100 ng und zum Anderen das verwandte HvWhy2-Protein (siehe 3.1.3) in einer Menge von 100 ng aufgetrennt und immobilisiert. Es zeigte sich, dass das Rohserum nur das rekombinante HvWhy1-Protein und nicht zusätzliche höher- oder niedermolekulare Proteine sowie das verwandte, rekombinante HvWhy2-Protein (siehe 3.1.3) erkannte (Abb. 3.8 C).

Unterschiede im Nachweis von Proteinen können auf einem unterschiedlichen Transfer beruhen, da kleine Proteine schneller übertragen werden als große Proteine und Proteine auch durch die Membran durchwandern können.

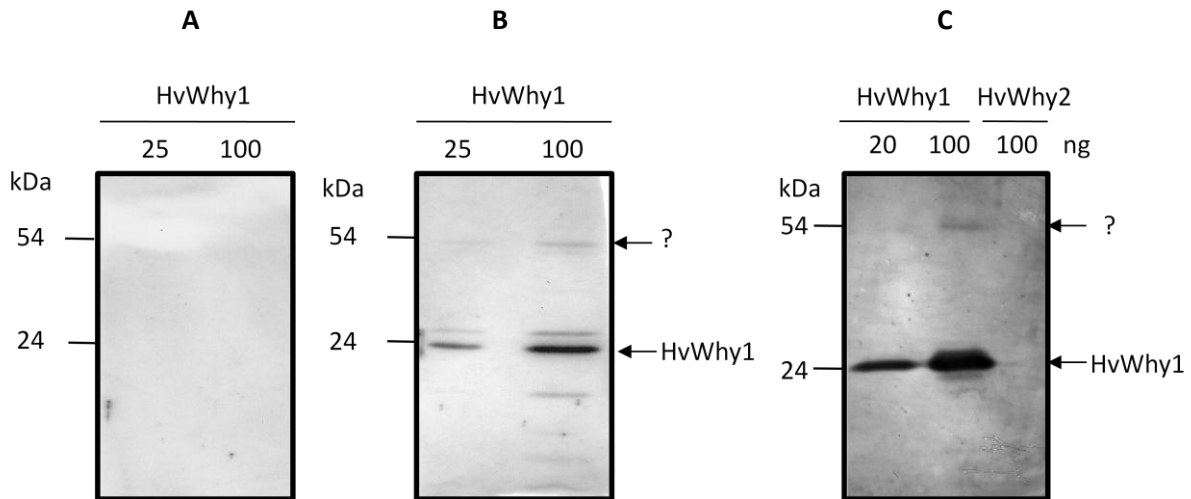


Abb. 3.8: Überprüfung der Sensitivität und Spezifität des HvWhy1-Antikörpers.

Es wurden zwei gleich beladene Membranen hergestellt, auf denen nach Gelelektrophorese 25 ng und 100 ng des aufgereinigten rekombinanten HvWhy1-Proteins immobilisiert wurden. Diese Membranen wurden entweder mit dem Präimmenserum (A) oder mit dem Rohserum (B) inkubiert (siehe 2.5.10). Zusätzlich wurden 20 ng und 100 ng des rekombinanten HvWhy1-Proteins und 100 ng des rekombinanten HvWhy2-Proteins gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf der Membran immobilisiert. Die Membran wurde mit dem HvWhy1-Antikörper inkubiert (C) (siehe 2.5.10). Die Antikörperdetektion erfolgte mit dem ECL-System. Die Position des rekombinanten HvWhy1-Proteins ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Zusätzlich auftretende Proteinbanden (bei 54 kDa) sind durch ein Fragezeichen hervorgehoben.

### 3.2.2 Charakterisierung eines Antikörpers, der gegen eine Peptidsequenz des HvWhy1-Proteins gerichtet ist

Zusätzlich wurde ein weiterer polyklonaler Antikörper hergestellt (Biogenes, Berlin), der gegen ein C-terminales Peptid mit der Sequenz IKPEESQPYNRPQS gerichtet ist (Abb. 3.2 A). Zur Überprüfung der Spezifität des Rohserums im Vergleich zum Präimmenserum wurden verschiedene Mengen an aufgereinigtem, rekombinanten HvWhy1-Protein (0,5 ng; 5 ng; 50 ng; 100 ng) sowie 100 ng aufgereinigtes, rekombinantes HvWhy2-Protein (siehe 3.1.3) gelelektrophoretisch aufgetrennt und immobilisiert. Nur das rekombinante HvWhy1-Protein bei 24 kDa konnte mit dem Rohserum nachgewiesen werden (Abb. 3.9). Die Nachweisgrenze liegt zwischen 0,5 ng und 5 ng Protein. Das verwandte Protein HvWhy2 wird nicht durch das Serum erkannt. Zusätzlich werden weitere Proteine durch den Antikörper erfasst. Diese liegen bei ca. 20 kDa und um 54 kDa. Das Präimmenserum zeigt keine Wechselwirkungen mit den aufgereinigten, rekombinanten Proteinen HvWhy1 und HvWhy2 (Abb. 3.9).

Beide HvWhy1-Antikörper (siehe 3.2.1 und 3.2.2) erkennen sowohl das Monomer bei einem Molekulargewicht von 24 kDa als auch höhermolekulare Proteine von ca. 54 kDa.

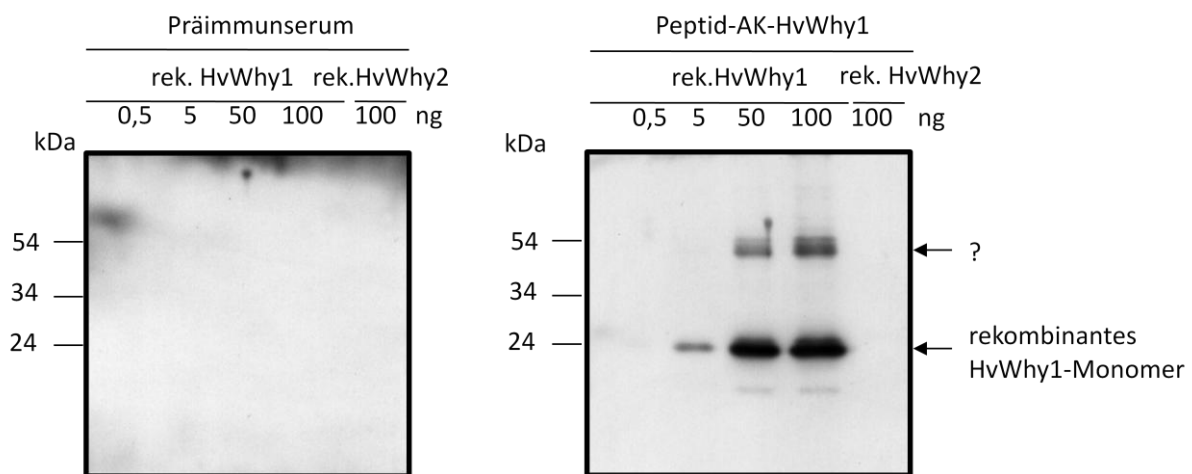


Abb. 3.9: Überprüfung der Spezifität und Sensitivität des Peptid-HvWhy1-Antikörpers. Es wurden zwei gleiche Membranen hergestellt, auf denen 0,5 ng, 5 ng, 50 ng und 100 ng rekombinantes HvWhy1-Protein und 100 ng rekombinantes HvWhy2-Protein gelelektrophoretisch aufgetrennt und immobilisiert wurden. Diese wurden entweder mit dem Präimmunserum oder mit dem Rohserum (siehe 2.5.10) inkubiert. Der Nachweis erfolgte mit dem ECL-System. Die Position des rekombinanten HvWhy1-Proteins ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Zusätzlich auftretende Proteinbanden sind durch ein Fragezeichen hervorgehoben.

### 3.2.3 Immunologische Untersuchung von Gewebeextrakten aus Gerste zur Charakterisierung beider HvWhy1-Antikörper

Mit beiden Antikörpern, die gegen das HvWhy1-Protein gerichtet sind, konnte das rekombinante Protein nachgewiesen werden (siehe 3.2.1 und 3.2.2). Ein Vergleich sollte zeigen, ob beide Antikörper auch in der Lage sind, das Whirly1-Protein in Gesamtproteinextrakten der Gerste zu erkennen. Dazu wurden Gesamtproteinextrakte (siehe 2.5.3) aus ausdifferenziertem Blattgewebe isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf einer Nitrozellulosemembran immobilisiert. Beide Antikörper erkennen im Gesamtproteinextrakt ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 25 kDa (Abb. 3.10). Dieses Protein ist somit größer als das rekombinante HvWhy1-Protein, das aus einer nicht vollständig bekannten cDNA-Sequenz synthetisiert wurde. Beide Antikörper-Rohseren erkennen mit unterschiedlicher Intensität ebenfalls ein höhermolekulares 54 kDa Protein. Auch im niedermolekularen Bereich von ca. 17 kDa sind Antigen-Antikörper-Reaktionen von beiden Antikörpern vorhanden. Das Präimmunserum weist Proteine nach, die nicht vom Rohserum detektiert werden. Da beide Antikörper ein Protein von 25 kDa im Gewebe erkennen, ist davon auszugehen, dass das *in vivo* vorhandene HvWhy1-Protein ein höheres Molekulargewicht hat als das rekombinante Protein einschließlich des „His-Tags“ (24 kDa).

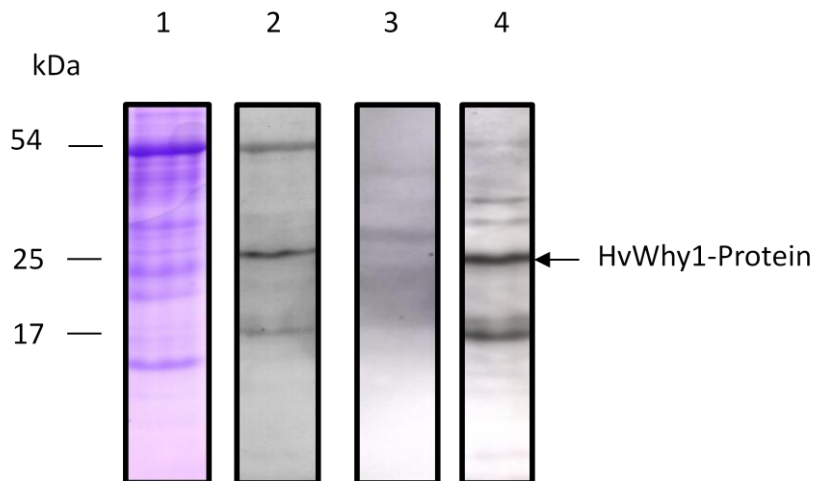


Abb. 3.10: Immunologische Untersuchungen mit Gesamtproteinen aus ausdifferenzierten Gerstenprimärblättern (sieben Tage nach Anzucht). Die Proteinextrakte wurden elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf einer Membran immobilisiert. Das 14 % (w/v) Polyacrylamidgel wurde nach dem Transfer mit Coomassie gefärbt (1). Die Membranen wurden immunodekoriert. Dabei wurde eine Inkubation mit beiden Rohseren der HvWhy1-Antikörper (2) und Peptid-HvWhy1-Antikörper (4) sowie des zum Peptid-HvWhy1-Antikörpers gehörigen Präimmunserums (3) durchgeführt (siehe 2.5.10). Der Pfeil kennzeichnet das *in vivo* vorhandene HvWhy1-Protein. Die Antikörperdetektion erfolgte mit dem ECL-System.

Die Rohseren beider Antikörper wurden mit Hilfe einer Sulfolink-Affinitätschromatografie (siehe 2.5.12) aufgereinigt. Zunächst wurden die Disulfidbrücken des rekombinanten Proteins bzw. Peptides reduziert und konnten dann an eine Matrix gebunden werden. Die darüber aufgereinigten Antikörper wurden im gleichen Volumen eluiert und auf ihre Sensitivität überprüft. Dazu wurde eine steigende Menge an rekombinantem HvWhy1-Protein auf einer Nitrozellulosemembran aufgetragen und immobilisiert. Alle Antikörper wurden im gleichen Verhältnis verdünnt und die Membran mit gleichen Volumina an Antikörperlösung inkubiert. Im Vergleich zwischen Rohserum und aufgereinigtem Antikörper zeigt der Antikörper, der gegen das rekombinante HvWhy1-Protein gerichtet ist, einen starken Verlust in der Sensitivität und eine Verringerung der Nachweisgrenze des rekombinanten Proteins von mindestens 1 ng auf 1  $\mu$ g (Abb. 3.11). Im Gegensatz dazu zeigt der HvWhy1-Antikörper, der gegen das C-terminale Peptid gerichtet ist, kaum Verlust der Sensitivität nach Aufreinigung und weist bereits das rekombinante Protein mit einer Menge von 1 ng nach (Abb. 3.11).



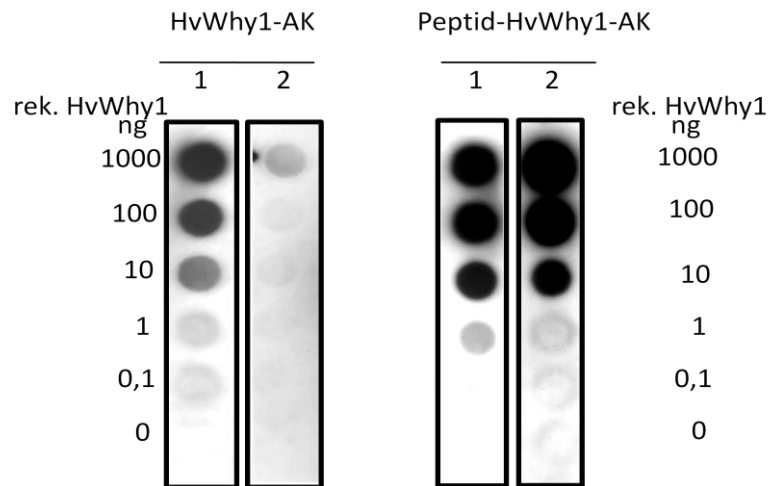


Abb. 3.11 Untersuchungen zur Sensitivität der aufgereinigten HvWhy1-Antikörper und Peptid-HvWhy1-Antikörper im Vergleich zum Rohserum. Die Menge von 0,1 ng bis 1000 ng rekombinantem HvWhy1-Protein wurde auf eine Nitrozellulosemembran gedotet, immobilisiert und daraufhin mit den entsprechenden Antikörperlösungen (1= Rohserum, 2= aufgereinigter Antikörper, siehe 2.5.10) inkubiert. Die Antikörperdetektion erfolgte mit dem ECL-System.

Da sich der HvWhy1-Peptid-Antikörper nach Aufreinigung im Vergleich zum anderen aufgereinigten HvWhy1-Antikörper durch eine etwa 1000fach stärkere Sensitivität auszeichnet, wurde dieser für die weiteren immunologischen Analysen verwendet. Die Überprüfung der Spezifität fand zusätzlich durch die gelelektrophoretische Auftrennung einer steigenden Menge an HvWhy1-Proteinen statt. Diese wurden auf drei Membranen immobilisiert und anschließend folgendermaßen immunodekoriert: Inkubation der ersten Membran mit aufgereinigtem Peptid-HvWhy1-Antikörper ohne Zusatz von Protein, Behandlung der zweiten Membran mit aufgereinigtem Antikörper unter Vorinkubation mit dem Peptid (IKPEESQPYNRPQS) und Inkubation der dritten Membran mit aufgereinigtem Antikörper unter Zugabe von BSA. Die Antikörperlösungen mit Peptid oder BSA wurden für eine Stunde geschwenkt bevor sie für die entsprechenden Immunodekorationen genutzt wurden.

Fügt man der Antikörperlösung das entsprechende Peptid hinzu, kommt es zu einer Antigen-Antikörperreaktion. Das Paratop des Antikörpers bindet das Epitop und somit wird der Antikörper maskiert und kann nicht mehr das auf der Membran immobilisierte Protein nachweisen. Wenn es sich bei dem rekombinanten Protein (24 kDa) um ein spezifisch vom Antikörper erkanntes Protein handelt, wird die Signalstärke des Proteinnachweises aufgrund der wenigen freien, unmaskierten, zur Verfügung stehenden Antikörper verringert. Fügt man stattdessen ein anderes Protein wie BSA dazu, das vom Antikörper nicht als Antigen erkannt wird, bleibt die nachgewiesene Proteinmenge vergleichbar mit dem Ansatz, dem kein Protein zusätzlich hinzugegeben wurde. Mit Hilfe dieser Analyse konnte für den Peptid-HvWhy1-Antikörper gezeigt werden, dass dieser spezifisch das HvWhy1-Protein erkennt (Abb. 3.12). Dieser Kompetitionsansatz zeigt zusätzlich, dass ebenso der Antikörper spezifisch das Protein von 54 kDa nachweist.

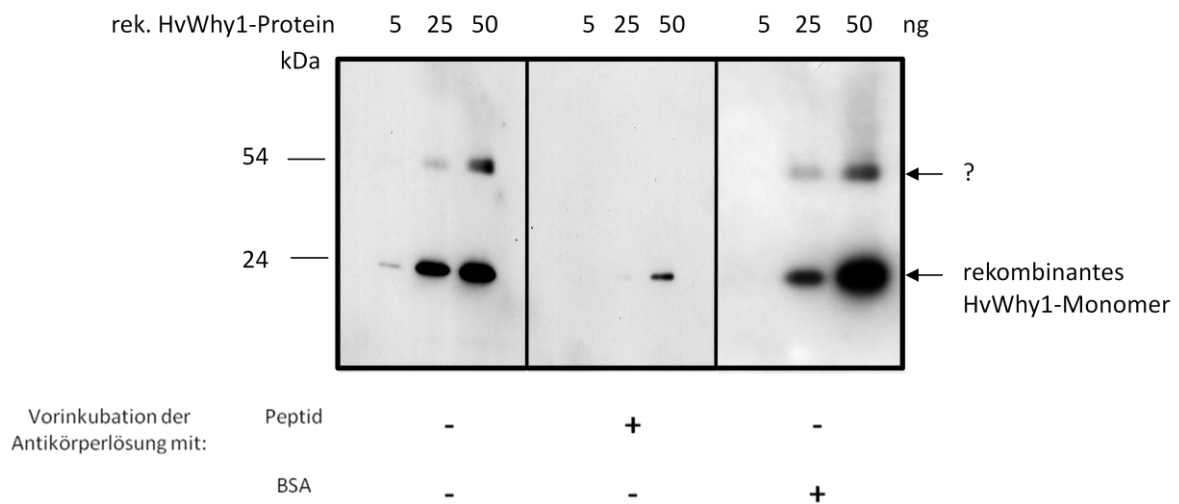


Abb. 3.12: Untersuchung zur Spezifität des Peptid-HvWhy1-Antikörpers. Es wurden 5 ng, 25 ng und 50 ng rekombinantes HvWhy1-Protein gelelektrophoretisch aufgetrennt und immobilisiert. Drei gleich beladene Membranen wurden mit verschiedenen Peptid-HvWhy1-Antikörperlösungen (siehe 2.5.10) inkubiert. Einer Lösung wurde nichts, einer zweiten 10 µg Peptid und der dritten 10 µg BSA zugegeben und für die Immunodekoration verwendet. Die Antikörperreaktion erfolgte mit dem ECL-System. Die Position des rekombinanten HvWhy1-Proteins ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Das zusätzlich nachgewiesene 54 kDa Protein ist mit einem Pfeil und Fragezeichen hervorgehoben.

### 3.3 Untersuchungen zur Regulation der Expression beider *whirly*-Gene und zur Verteilung des Whirly1-Proteins im Gerstenprimärblatt

Die Genexpression kann an verschiedenen Punkten kontrolliert werden. Um einen Einblick zu erlangen, wie die Expression der *whirly*-Gene in Gerste reguliert ist, wurden sowohl Studien zur entwicklungsabhängigen Expression beider *whirly*-Gene auf Transkriptebene, als auch auf Proteinebene durchgeführt. Die immunologischen Untersuchungen mit Hilfe des beschriebenen Peptid-HvWhy1-Antikörpers (siehe 3.2.2, 3.2.3) ergab zudem Hinweise auf die Lokalisierung der HvWhy1-Proteine im Gewebe und auch auf subzellulärer Ebene.

#### 3.3.1 Untersuchungen zur Expression der *whirly*-Gene während der Blattentwicklung und Seneszenz

Zur Klärung, ob sich die Expression der *whirly*-Gene entwicklungsabhängig verändert, wurden Blätter von *Hordeum vulgare* (Gerste) verwendet, da sie sich besonders für entwicklungsabhängige Analysen eignen (Krupinska und Falk 1994). Die Blätter einer monokotylen Pflanze sind nicht nur unterschiedlich alt, sondern besitzen auch einen Altersgradienten innerhalb eines Blattes. Um einen detaillierten Einblick zu erhalten, inwieweit sich die relativen Transkript- und Proteinmengen (siehe 3.3.2) entwicklungsabhängig ändern, wurde RNA und Gesamtprotein aus verschiedenen

Blattsegmenten isoliert (Abb. 3.13). Entlang der Achse des monokotylen Blattes befinden sich von der Basis bis zur Blattspitze Zellen steigenden Alters, d.h. in der Blattbasis ist meristematisches und an der Blattspitze ausdifferenziertes Gewebe zu finden. Für die Isolierung wurde meristematisches (Segment I), junges (Segment IIa), älteres (Segment IIb) und ausdifferenziertes Gewebe (Segment III) (Abb. 3.13) sowie Blätter zu Beginn der Seneszenz (14 Tage) und Blätter fortgeschrittener Seneszenz (22 Tage) verwendet (siehe 2.2.1). Zur Untersuchung der dunkelinduzierten Seneszenz wurden die ausdifferenzierten Gerstenprimärblätter nach sechs Tagen abgeschnitten und für zwei Tage ins Dunkle gestellt (Krupinska und Falk 1994). Für diese Untersuchung wurde das Segment IV isoliert und verwendet (Abb. 3.13).

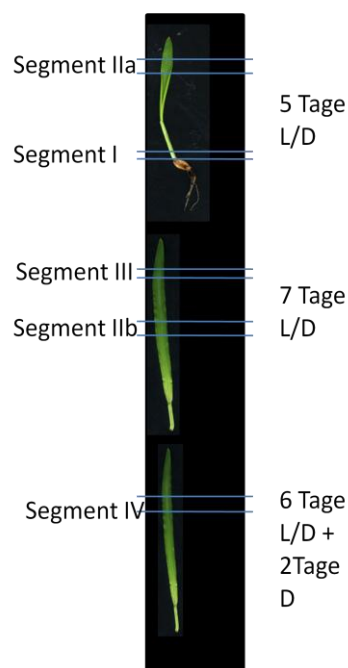


Abb. 3.13: Darstellung der zu untersuchenden Segmente aus Primärblättern der Gerste nach fünf und sieben tägiger Anzucht. Für die dunkelinduzierte Seneszenz wurde sechs Tage alte Gerste für zwei Tage dunkel inkubiert.

- Segment I: meristematisches Gewebe
- Segment IIa und IIb: junges Gewebe
- Segment III: ausdifferenziertes Gewebe
- Segment IV: seneszenten Gewebe nach einer Dunkelphase von zwei Tagen

Zur physiologischen Charakterisierung der Entwicklungszustände wurde der Gesamtchlorophyllgehalt bestimmt (siehe 2.3.1). Der Gesamtchlorophyllgehalt nimmt während der Blattentwicklung und Ausdifferenzierung vom meristematischen (Segment I) bis hin zum photosynthetisch aktiven Gewebe (Segment IIa, b, III) zu. Wird durch Dunkelheit Seneszenz ausgelöst, kommt es im Mittel zu einer Abnahme des Gesamtchlorophyllgehalts (Segment IV) im Vergleich zum ausdifferenzierten Gewebe (Segment III) (Abb. 3.14 A).

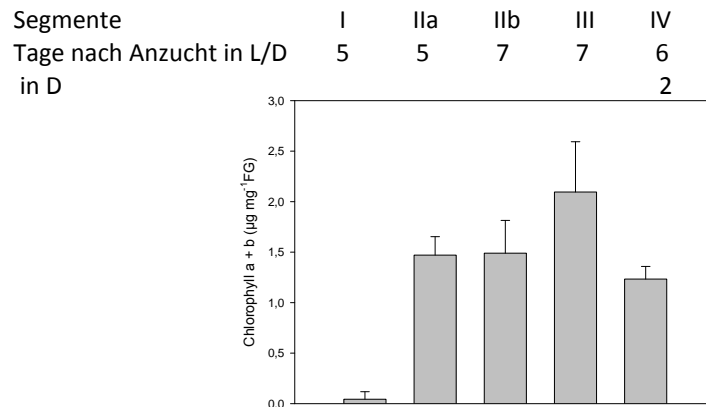
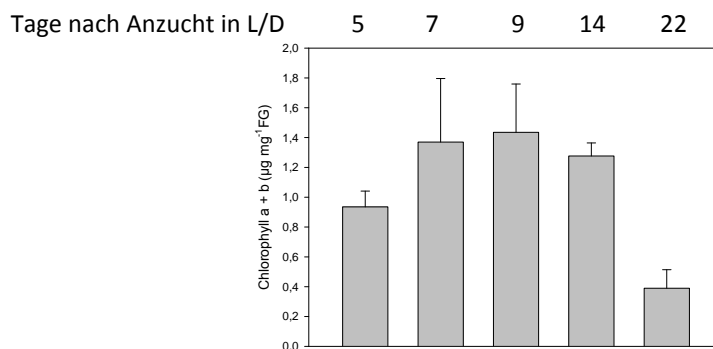
**A****B**

Abb. 3.14: Gesamtchlorophyllgehalte der Blattsegmente in A (siehe Abb. 3.13) sowie ganzer Gerstenprimärblätter nach 5, 7, 9, 14, 22 tägiger Anzucht in B.

Eine Bestimmung der Chlorophyllgehalte von photosynthetisch aktivem Gewebe (5, 7, 9 und 14 Tage) zeigte keine signifikanten Änderungen bei der Verwendung ganzer Gerstenprimärblätter (Abb. 3.14 B). Der Entwicklungszeitpunkt 14 Tage nach Anzucht wurde als Beginn der natürlichen Seneszenz beschrieben (Dähnhardt 2003). Der Tag 22 nach Anzucht des Gerstenprimärblattes stellt bereits ein spätes Seneszenzstadium dar. Zu diesem Zeitpunkt beträgt der Gesamtchlorophyllgehalt weniger als ein Drittel des Chlorophyllgehaltes im nicht-seneszenten Gewebe.

Die Bestimmung von Transkriptmengen von Kontrollgenen ist eine weitere Möglichkeit die Entwicklungszeitpunkte zu charakterisieren, die während der semiquantitativen RT-PCR Verwendung fand. Eine erhöhte Menge an *HvS40*-RNA ist charakteristisch für ein seneszenten Stadium (Krupinska et al. 2002). Zusätzlich wurde, wie bereits unter Kapitel 1.5.2 beschrieben, das *HvWhy1*-Protein als ein DNA-Bindeprotein an der Promotorregion des *HvS40*-Gens identifiziert. Eine Induktion der Expression des *rbcl*-Gens beschreibt photosynthetisch aktives Gewebe, in dem unter anderem das *HvWhy1*-Protein als DNA-Bindeprotein des *HvS40*-Promotors identifiziert wurde (Dähnhardt 2003). Für die Durchführung der Transkriptstudien wurde Gesamt-RNA aus den beschriebenen Segmenten (Abb. 3.13) isoliert (siehe 2.4.5). Untersuchungen zur Genexpression wurden mit der

semiquantitativen RT-PCR (siehe 2.4.6) und Northern-„Blot“-Analyse (siehe 2.4.8.2) durchgeführt. Zunächst werden die Ergebnisse der Northern-„Blot“-Analyse vorgestellt.

Für die Northern-„Blot“-Analyse wurde aus der Gesamt-RNA die mRNA aufgereinigt (siehe 2.4.5.3), auf einer Nylonmembran immobilisiert und mit spezifischen Gensonden hybridisiert (siehe 2.4.8.2). Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung wurde die Nylonmembran vor der Hybridisierung mit Methylenblau angefärbt.

Eine erhöhte Transkriptmenge von *Hvwhy1* ist im meristematischen Blattgewebe (Segment I) zu beobachten, die im Verlauf der Blattentwicklung (Segment II a, b und Segment III) bis hin zum seneszenten Stadium (Segment IV) stetig abnimmt. Auch bei *Hvwhy2* ist die höchste RNA-Menge im basalen Blattgewebe (Segment I) vorhanden. Das *Hvwhy2*-Transkript ist im Unterschied zur *Hvwhy1*-mRNA kaum noch im jungen und ausdifferenzierten Blattgewebe nachzuweisen. Beide *whirly*-Gene zeigen keine Induktion der Expression durch den Prozess der dunkelinduzierten Seneszenz (Abb. 3.15).

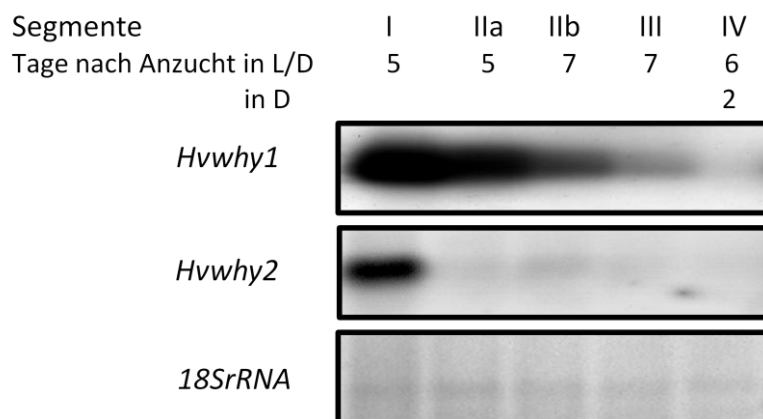


Abb. 3.15: Nachweis der Expression der *whirly*-Gene in Blättern der Gerste mittels Northern-„Blot“.

Die PolyA-RNA wurde aus den in Abb. 3.13 beschriebenen Blattsegmenten I, IIa, IIb, III und IV isoliert.

2 µg mRNA wurden gelelektrophoretisch in einem denaturierenden Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran immobilisiert. Für die Hybridisierung wurden genspezifische Sonden für die Gene *Hvwhy1* und *Hvwhy2* verwendet. Die 18S rRNA wurde im Gel mit Methylenblau angefärbt (siehe 2.4.8.2).

Für die semiquantitative RT-PCR wurde die cDNA synthetisiert (siehe 2.4.6.1) und diese für die anschließende Amplifizierung mit spezifischen Oligonukleotiden (siehe 2.4.6.2) eingesetzt. Für quantitative Aussagen ist es notwendig, gleiche Mengen an cDNA für die PCR einzusetzen. Als Beladungskontrolle wurde die 18S rRNA amplifiziert, welche nahezu konstitutiv während der Blattentwicklung vorhanden ist.

Die Zu- und Abnahme der relativen Menge des *rbcl*-Transkripts korreliert mit der Veränderung des Gesamtchlorophyllgehaltes. Eine Zunahme der relativen *HvS40*-Transkriptmenge kennzeichnet das späte Seneszenzstadium während der natürlichen Alterung (Abb. 3.16) und der dunkelinduzierten Seneszenz (Abb. 7.1).

Die Abnahme der RNA-Menge von *Hvwhy1* und *Hvwhy2* während der Blattausdifferenzierung vom meristematischen zum photosynthetisch aktiven Gewebe konnten mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR bestätigt werden (Abb. 3.16).

Während der natürlichen Blattalterung scheint jedoch bereits nach neun Tagen ein leichter Anstieg der relativen Transkriptmenge von *Hvwhy1* vorzuliegen. Eine Zunahme der mRNA-Menge ist auch bei dem *Hvwhy2*-Gen zu beobachten, jedoch erst im Zeitraum zwischen 9 und 22 Tagen. Die relativen Transkriptmengen sind von *Hvwhy2* im späten seneszenten Stadium vergleichbar mit der Höhe derjenigen im meristematischen Gewebe (Abb. 3.16).

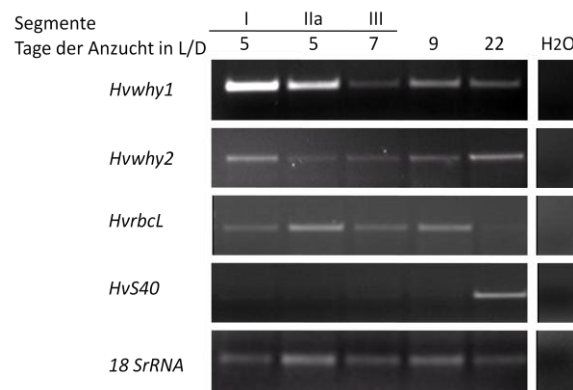


Abb. 3.16: Expression der *whirly*-Gene in verschiedenen Segmenten von Gerstenprimärblättern.

Aus den Blattsegmenten (I, IIa, III) und ganzen Blättern wurde Gesamt-RNA isoliert. Zur Synthese von cDNA wurden 2 µg Gesamt-RNA eingesetzt und die relativen Transkriptmengen durch semiquantitative RT-PCR ermittelt. Neben der relativen RNA-Menge von *Hvwhy1* und *Hvwhy2* wurden die Transkripte der Gene *rbcl* und *HvS40* ermittelt. Als Beladungskontrolle diente der Nachweis des 18S rRNA Transkriptes. H<sub>2</sub>O: Kontrolle des PCR-Ansatzes ohne Zugabe von cDNA.

### 3.3.2 Immunologischer Nachweis des Whirly1-Proteins während der Blattentwicklung

Um zu überprüfen, ob die Änderungen der RNA-Menge (siehe 3.3.1) mit entsprechenden Änderungen in der HvWhy1-Proteinmenge einhergehen, wurden die für die Expressionsanalyse (Abb. 3.15, 3.16) eingesetzten Blattgewebe (Abb. 3.13) für den immunologischen Nachweis verwendet. Es wurden Gesamtproteinextrakte (siehe 2.5.3) und rekombinantes HvWhy1-Protein (siehe 2.5.2, 3.1.3) gelelektrophoretisch auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe 2.5.9.1). Die aufgetrennten Proteine wurden entweder mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt (2.5.9.3) oder auf einer Nitrozellulosemembran immobilisiert (siehe 2.5.10). Die Färbung des Proteingels diente zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung. Zusätzlich spiegelt die Proteinmenge von prominenten Proteinen wie der kleinen und der großen Untereinheit der RubisCO (SSU, LSU), die in großen Mengen im photosynthetisch aktiven Gewebe vorhanden sind, direkt den Entwicklungszustand wieder. Die Nitrozellulosemembran wurde mit dem aufgereinigten Peptid-HvWhy1-Antikörper inkubiert. Der aufgereinigte Antikörper erkennt ebenso wie das Rohserum (Abb.

3.10), das sich bereits durch spezifische Antigen-Antikörperreaktionen auszeichnet, das HvWhy1-Protein (Abb. 3.17). Das HvWhy1-Protein wurde in allen untersuchten Geweben bei einem Molekulargewicht von 25 kDa nachgewiesen. Im Unterschied zur Transkriptebene (siehe 3.3.1) steigt der Gehalt an HvWhy1-Protein vom meristematischen Gewebe über das junge zum ausdifferenzierten Gewebe an. Eine Abnahme der HvWhy1-Proteinmenge ist im späten seneszenten Stadium von 22 Tagen zu beobachten (Abb. 3.17 A), wenn auch die *Hvwhy1*-Transkriptmenge wieder etwas abnimmt (Abb. 3.16).

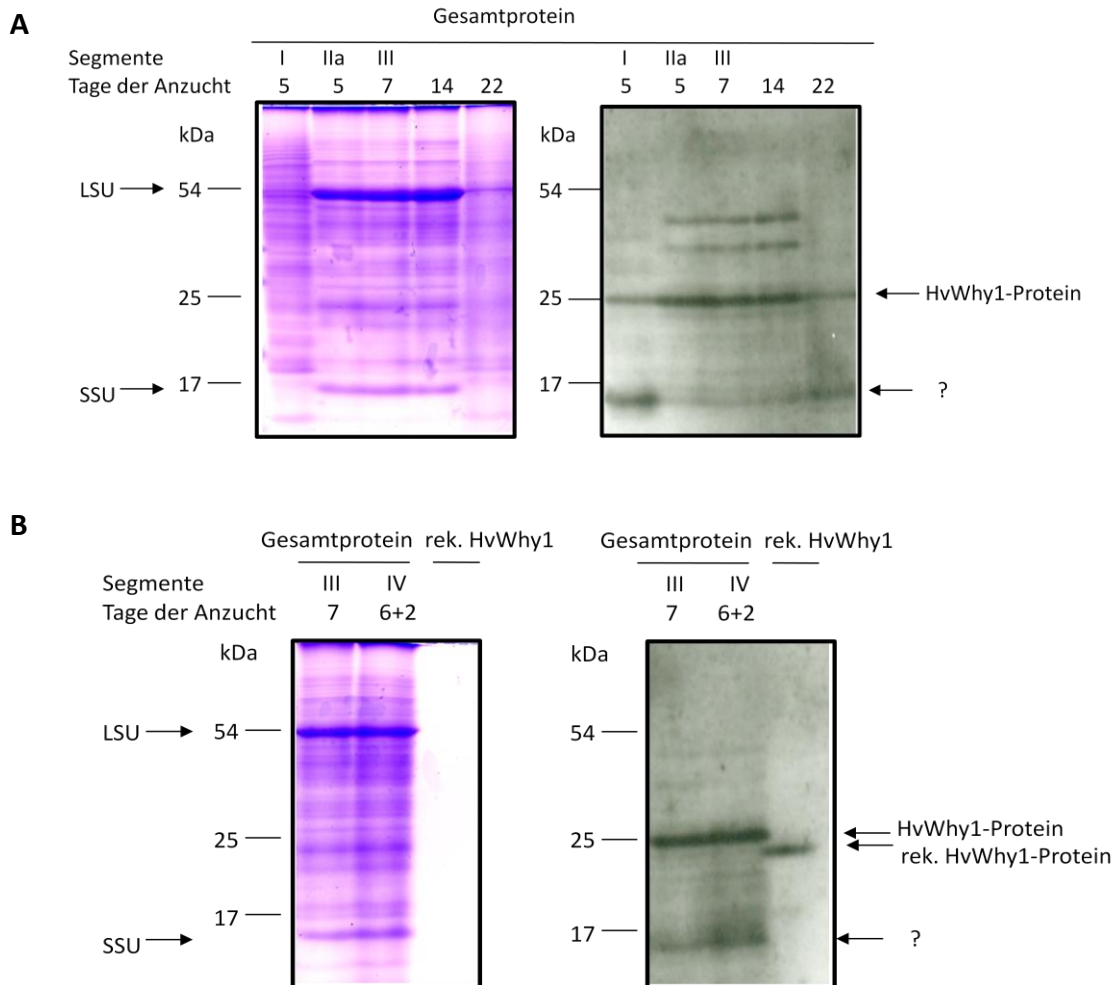


Abb. 3.17: Immunologische Analyse des HvWhy1-Proteins in Proteinextrakten verschieden alter Gewebe.

A: Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine (20 µg Gesamtprotein), die aus verschiedenen Segmenten (I, Ila, III) und unterschiedlich alten Gerstenprimärblättern (sowie 5, 7, 14, 22 Tage) stammen, wurden auf einer Membran immobilisiert und nach anschließender Inkubation mit dem Peptid-HvWhy1-Antikörper (siehe 2.5.10) immunodekoriert.

B: Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine (20 µg) aus ausdifferenziertem Blattgewebe (Segment III) sowie nach Dunkel induzierter Seneszenz (Segment IV) wurden auf einer Membran immobilisiert und nach anschließender Inkubation mit dem Peptid-HvWhy1-Antikörper (siehe 2.5.10) immunodekoriert.

Zur Überprüfung der Proteinbeladung wurde das Polyacrylamidgel mit Coomassie gefärbt. Als Kontrolle der erfolgreichen Transferierung der Proteine auf die Membran wurden 20 ng rekombinantes HvWhy1-Protein mit aufgetragen. Die Antikörperdetektion erfolgte mittels ECL-System. Nachgewiesene sowie bekannte Proteine sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

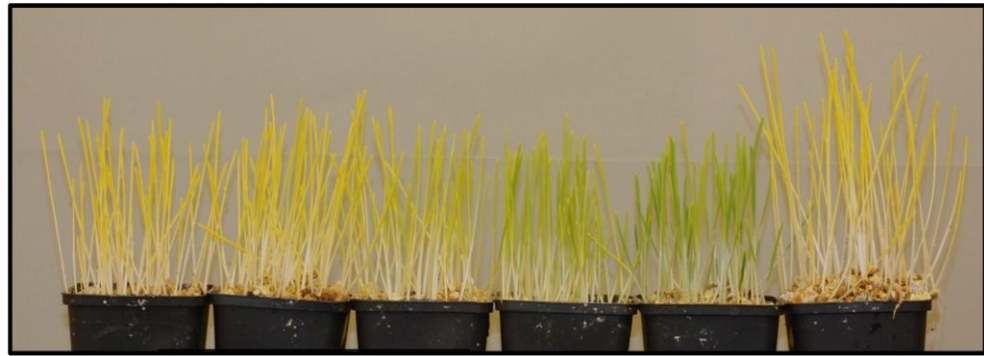
Anhand der Verringerung der Proteinmenge der großen und kleinen Untereinheit der RubisCO (LSU und SSU) im Coomassie gefärbten Gel sowie des geringeren Chlorophyllgehalts in altem Gewebe (22d) (Abb. 3.17 A) wird deutlich, dass die Blätter in einem fortgeschrittenen seneszenten Zustand sind. Da für die Analyse jedoch gleiche Mengen an Gesamtprotein eingesetzt wurden und die Menge an RubisCO geringer ist, steigt der prozentuale Anteil der anderen Proteine. Deshalb ist die nachgewiesene Menge an HvWhy1 überproportional groß. Vergleicht man den Proteingehalt von HvWhy1 vor und nach zweitägiger Dunkelinkubation, kann keine Veränderung im Proteingehalt festgestellt werden (Abb. 3.17 B). Zusätzlich wurden Antigen-Antikörperreaktionen auf der Höhe von ca. 17 kDa nachgewiesen (Abb. 3.17), die besonders in Proben aus meristematischem Gewebe vertreten sind (Segment I, Abb. 3.17 A). Weitere Kreuzreaktionen zeigte der verwendete Antikörper auf der Höhe von ca. 30 kDa bei Proteinextrakten, die aus jungem und ausdifferenziertem Gewebe (Segment IIa, Segment III und 14 Tage) isoliert wurden.

### **3.3.3 Analyse der Expression der *whirly*-Gene und immunologischer Nachweis des Whirly1-Proteins während der Blättergrünung**

Werden die Gerstenprimärblätter in einem Licht- und Dunkelrhythmus angezogen, entwickelt sich während des Differenzierungsprozesses aus meristematischem Gewebe photosynthetisch aktives Gewebe. Diese Entwicklung ist nur durch die Aufnahme und Verarbeitung des Lichtsignals möglich. Im Folgenden soll geklärt werden, ob das Alter des Gewebes oder das Lichtsignal, das zu der Ausdifferenzierung des Gewebes führte, verantwortlich für die Zunahme der Menge an HvWhy1-Protein (siehe 3.3.2) ist.

Für diese Analyse wurde die Gerste sechs Tage in Dunkelheit angezogen und für zwei, vier und acht Stunden sowie für einen Tag belichtet (siehe 2.2.1). Als Kontrolle wurden sechs und sieben Tage in Dunkelheit angezogene Gerste untersucht. Sowohl belichtete als auch dunkel inkubierte Blätter zeigen eine eingerollte und wenig pigmentierte Basalregion (Segment I). Die Apikalregion (Segment II) ist nach Belichtung breiter. Nach Anzucht in Dunkelheit ist die Apikalregion teilweise eingefaltet. Die Primärblätter sind ohne Belichtung größer und im Vergleich zu den belichteten Blättern gelblich (Abb. 3.18).





|                             |   |   |   |   |    |   |
|-----------------------------|---|---|---|---|----|---|
| Anzucht in Dunkelheit (d):  | 6 | 6 | 6 | 6 | 6  | 7 |
| Stunden der Belichtung (h): | 0 | 2 | 4 | 8 | 24 | 0 |

Abb. 3.18: Fotografische Darstellung der gewachsenen Gerstenprimärblätter nach 2, 4, 8, 24 Stunden (h) Belichtung im Vergleich zu sechs und sieben Tage alten (d), in Dunkelheit angezogenen Blättern.

Für eine genaue Charakterisierung der Ergrünung wurden die Gesamtchlorophyllgehalte (siehe 2.3.1) des Blattgewebes vom Segment II bestimmt. Der Anstieg des Chlorophyllgehalts korreliert mit der Dauer der Belichtung (Abb. 3.19). Die zusätzlich durchgeführte Bestimmung der Carotinoidgehalte zeigte zunächst eine Reduzierung der Carotinoidmenge, die dann wieder ansteigt und durch längere Belichtungszeit (6dD+24hL) im Vergleich zu gleich altem dunkelinkubierten Gewebe (7dD+0hL) etwas erhöht ist. Das Alter zeigt keinen Einfluss auf die Menge an Carotinoiden (6dD+0hL bzw. 7dD+0hL) (Abb. 3.19).

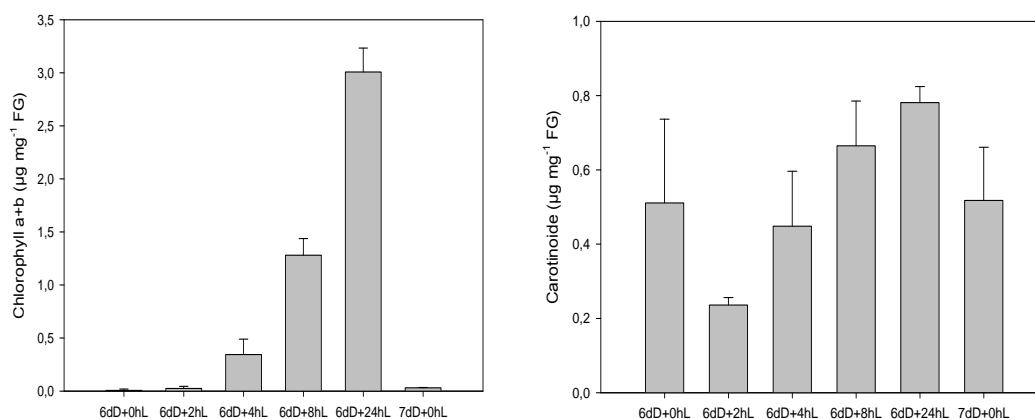


Abb. 3.19 Untersuchung zur Ergrünung im Verlauf der Blattbelichtung nach sechstägiger Anzucht in Dunkelheit. Bestimmung der Chlorophyllgehalte und Carotinoidgehalte des Blattsegments II. Als Kontrolle wurde zusätzlich sieben Tage altes Blattgewebe überprüft

Mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR sollte zunächst untersucht werden, ob das *whirly1*-Gen und das nah verwandte *Hvwhy2*-Gen durch Licht auf der Transkriptebene reguliert werden. Weitere Transkriptmengen bereits beschriebener lichtregulierter Gene wie die der Chlorophyllbindeproteine *Lhca1*, *Lhcb1* und *ELIP* wurden zur Kontrolle ermittelt (Abb. 3.20). Die Länge der Belichtung zeigt sowohl im basalen als auch im apikalen Gewebe einen

positiven Einfluss auf die Transkriptmenge der Chlorophyllbindeproteine. Eine geringe Menge an *Lhca1*-Transkripten bzw. *Lhcb1*-RNA ist bereits im dunkel angezogenen Gewebe sowie nach zweistündiger Belichtung vorhanden (Segment I) und steigt im Verlauf der Belichtung an (Abb. 3.20). In der apikalen Region (Segment II) konnte dieser Anstieg nicht festgestellt werden, in dieser Region wurde in allen untersuchten Geweben eine erhöhte relative Menge an *Lhca1*- und *Lhcb1*-Transkripten beobachtet. Die *ELIP*-mRNA-Menge nimmt sowohl im basalen, als auch im apikalen Gewebe während der Belichtung zu. Im apikalen Gewebe sechs Tage alter Pflanzen, die nicht belichtet wurden, ist allerdings schon eine geringe Menge an *ELIP*-Transkripten vorhanden. Im Unterschied zu den Chlorophyllbindeproteinen *Lhca1*, *Lhcb1* nimmt die Menge der *ELIP*-Transkripte im Verlauf der Belichtung nach acht Stunden wieder ab (Abb. 3.20).

Für beide *whirly*-Gene konnte kein Einfluss des Lichtes auf die Transkriptmenge im Segment I beobachtet werden. Die bereits in Kapitel 3.3.1 gezeigte Herunterregulierung der *whirly*-Transkriptmenge von Segment I zu Segment II ist nicht durch Licht reguliert, sondern ist als ein Einfluss des Alters des Gewebes zu bewerten. Nur im Segment II scheint ein positiver Einfluss des Lichtes auf die Transkriptmenge vorzuliegen. Es konnte nach 24 Stunden Belichtung eine Erhöhung des Transkriptgehalts von *Hvwhy1* im Vergleich zu gleich altem Gewebe, das in Dunkelheit angezogen wurde, beobachtet werden (Abb. 3.20).

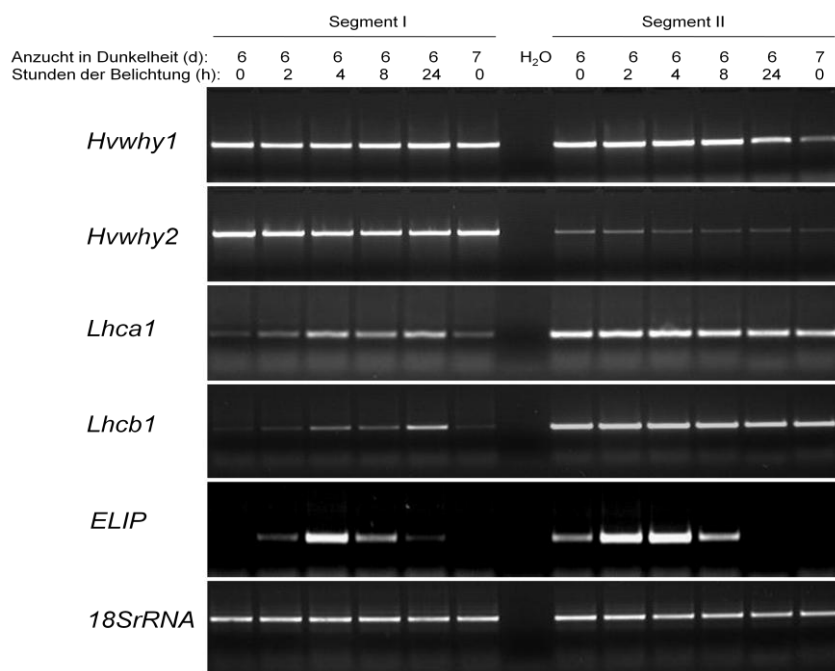
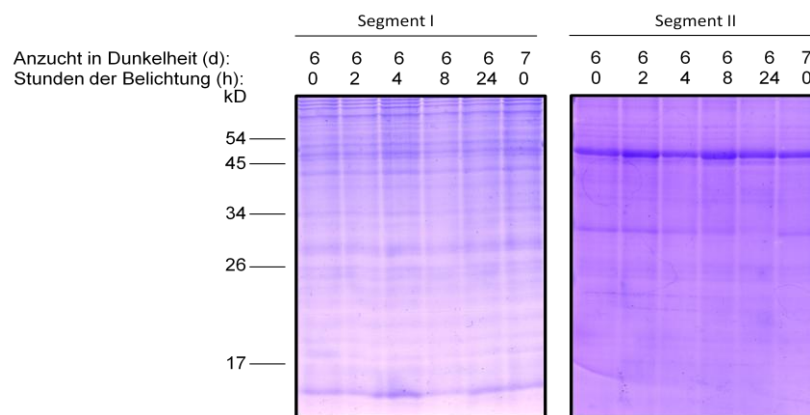


Abb. 3.20: Expression der *whirly*-Gene in verschiedenen Segmenten von Gerstenprimärblättern nach sechstägiger Anzucht (d), die einer unterschiedlichen Belichtungsdauer von zwei, vier, acht und 24 Stunden (h) ausgesetzt waren. Als Kontrolle wurde zusätzlich sieben Tage (d) altes Blattgewebe überprüft.

Aus den Blattsegmenten (I, II) wurde Gesamt-RNA isoliert. Zur Synthese von cDNA wurde 2 µg Gesamt-RNA eingesetzt und die relativen Transkriptmengen durch semiquantitative RT-PCR ermittelt. Neben der relativen RNA-Menge von *Hvwhy1* und *Hvwhy2* wurden die Transkripte der Gene *Lhca1*, *Lhcb1* und *ELIP* ermittelt. Als Beladungskontrolle diente der Nachweis des 18S rRNA Transkriptes. H<sub>2</sub>O: Kontrolle des PCR-Ansatzes ohne Zugabe von cDNA.

Außerdem sollte in diesem Zusammenhang ermittelt werden, ob die Whirly-Proteine auf der Proteinebene durch Licht reguliert werden können. Dafür wurde aus dem oben beschriebenen Blattmaterial zusätzlich Gesamt-Protein (siehe 2.5.3) isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf einer Membran immobilisiert. Wie bereits auf Transkriptebeine wurde durch eine Kontrollimmunodekoration mit dem Antikörper, der gegen das lichtregulierte Protein Lhca1 gerichtet ist, auf immunologischer Ebene der Einfluss der Belichtung überprüft. Der Antikörper, der gegen das Lhca1-Protein gerichtet ist, weist nur das Chlorophyllbindepotein nach Belichtung in jungem, ausdifferenziertem Gewebe (Segment II) und nicht im meristematischen Gewebe (Segment I) nach (Abb. 3.21). Auf der Proteinebene konnte für HvWhy1 keine Regulation durch Licht beobachtet werden.

## A



## B

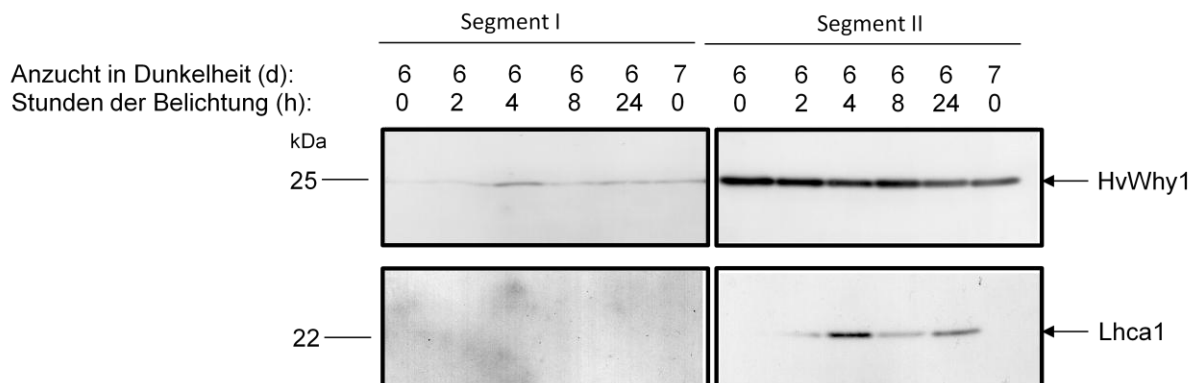


Abb. 3.21: Immunologische Analyse von HvWhy1 nach Belichtung von im Dunkeln angezogenen Pflanzen. Sechs Tage (d) alte Gerste wurde für zwei, vier, acht bzw. 24 Stunden (h) belichtet. Als Kontrolle wurde Blattgewebe analysiert, das nur der Dunkelheit für sechs und sieben Tage ausgesetzt war. Aus den Blattgeweben des Segments I und des Segments II wurden die Proteine isoliert und gelelektrophoretisch aufgetrennt (20 µg Gesamtprotein), auf einer Membran immobilisiert und nach anschließender Inkubation mit dem Peptid-HvWhy1-Antikörper (siehe 2.5.10) nachgewiesen. Zur Überprüfung der Proteinbeladung wurde das Polyacrylamidgel nach Transfer mit Coomassie gefärbt (A). Die Antikörperdetektion erfolgte mittels ECL-System. Nachgewiesene Proteine sind mit Pfeilen gekennzeichnet (B).

Das HvWhy1-Protein ist in jeglichem Gewebe (Segment I und II) in gleichen Mengen nachweisbar (Abb. 3.21). Geringe Unterschiede in der HvWhy1-Proteinmenge sind eher auf eine ungleiche Beladung zurückzuführen (Segment I). Im Segment II scheint die HvWhy1-Proteinmenge mit dem Alter abzunehmen. Dunkelheit oder Licht scheinen keinen Einfluss auf die HvWhy1-Proteinmenge zu haben (Abb. 3.21).

### 3.3.4 Untersuchung zur subzellulären Verteilung des Whirly1-Proteins

Die computergestützte Vorhersage (siehe 3.1.1) für die Lokalisierung der Whirly1-Proteine sowie die *in vitro* Analysen mit Hilfe von GFP-Fusionskonstrukten (Krause et al. 2005) geben keinen Hinweis auf eine Lokalisierung im Zellkern, die auf Grund der Funktion als Transkriptionsfaktor zu erwarten wäre. Für das HvWhy1-Protein konnte bisher noch nicht eindeutig ein NLS (nuclear localisation signal) identifiziert werden. Das Protein ist jedoch klein genug, um ohne eine solche Sequenz in den Zellkern importiert werden zu können (siehe 3.1.1). Nach Fusion an das GFP-Protein (Krause et al. 2005) ist das chimäre Protein jedoch vermutlich zu groß, um passiv in den Kern zu diffundieren.

Wie bereits in Kapitel 3.2.3, 3.3.2 und 3.3.3 gezeigt werden konnte, kann in Gesamtproteinextrakten das *in vivo* vorhandene HvWhy1-Protein nachgewiesen werden. Um zu prüfen, ob das HvWhy1-Protein unter natürlichen Bedingungen im Chloroplasten und/oder im Zellkern lokalisiert ist, wurden zusätzlich Zellkerne und Chloroplasten aus gleichem Gewebe isoliert (siehe 2.5.4.1, 2.5.6). Die Proteinextrakte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Mit Hilfe des aufgereinigten Peptid-HvWhy1-Antikörpers konnte das HvWhy1-Protein sowohl in der Zellkernfraktion als auch in der Chloroplastenfraktion nachgewiesen werden (Abb. 3.22). Das erkannte Protein weist sowohl im Zellkern als auch in den Chloroplasten ein Molekulargewicht von ca. 25 kDa auf. Die immunologische Analyse zeigt außerdem, dass der größte Teil des im Gesamtproteinextrakt detektierten HvWhy1-Proteins in den Chloroplasten vorliegt (Abb. 3.22). Zur Überprüfung der Spezifität wurden zwei weitere gleich beladene Membranen hergestellt, auf die wiederum Proteine aus Chloroplasten- und Zellkernfraktionen transferiert wurden. Die Spezifität der Immunreaktionen wurde durch den Vergleich der Immundetektion vor und nach Vorinkubation des Antikörpers mit Peptid oder BSA als spezifischen und unspezifischen Kompetitor getestet. Da das 25 kDa Protein nach Vorinkubation der Antikörperlösung mit dem Peptid nicht mehr nachgewiesen werden konnte, ist von einer spezifischen Antigen-Antikörperreaktion auszugehen.

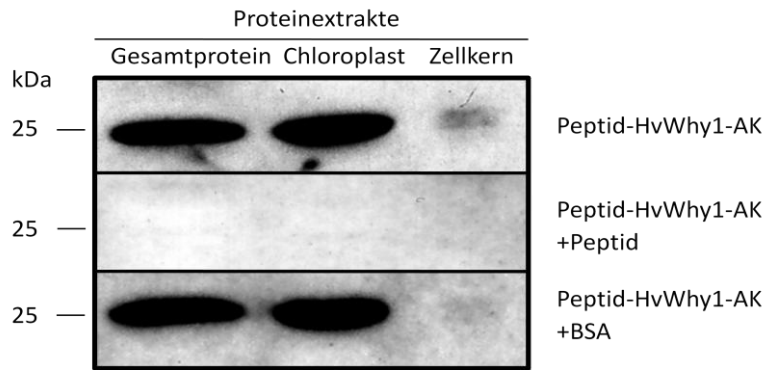


Abb. 3.22: Immunologischer Nachweis des HvWhy1-Proteins in Gesamtprotein-, Chloroplasten- und Zellkernfraktionen aus sieben Tage alten Gerstenprimärblättern. Es wurden drei Membranen nach Gelelektrophorese der Proteinextrakte (10 µg) sowie Immobilisierung dieser auf einer Membran hergestellt und mit dem Peptid-HvWhy1-AK (siehe 2.5.10) behandelt. Für einen Ansatz wurden der AK-Lösung noch Peptid (10 µg) und für einen zweiten Ansatz BSA (10 µg) zugegeben. Die Antikörperdetektion erfolgte mit dem ECL-System.

Um Aufschluss darüber zu erlangen, ob sich die subzelluläre Verteilung von HvWhy1 während der Blattentwicklung verändert, wurden aus meristematischem, jungem und ausdifferenziertem Blattgewebe sowohl Zellkerne (siehe 2.5.6) als auch Plastiden über Percollgradienten (siehe 2.5.4.1, 2.5.4.2) isoliert. Proteinextrakte der jeweiligen Zellkern- und Plastidenfraktionen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine auf einer Membran immobilisiert. Die Reinheit dieser Fraktionen wurde mit Hilfe von Antikörpern, die gegen Histon H2B und Cytb559 gerichtet sind, kontrolliert. Die nachgewiesene Proteinmenge von HvWhy1 ist in allen untersuchten Entwicklungsstadien in den Plastidenfraktionen höher als in den Kernfraktionen. In den untersuchten Fraktionen hat das HvWhy1-Protein ein Molekulargewicht von 25 kDa (Abb. 3.23). Der relative Gehalt von HvWhy1 scheint in den angereicherten Proplastiden aus Segment I im Vergleich zu jungen und ausdifferenzierten Chloroplasten aus Segment IIa und III am geringsten zu sein. Die Zunahme der HvWhy1-Proteinmenge pro Zelle ist während der Chloroplastenausdifferenzierung stärker als die, die nach Auftrag gleicher Proteinmengen im Western-„Blot“ (Abb. 3.23) zu beobachten ist, da in einer meristematischen Zelle weniger Plastiden (Proplastiden) als in einer ausdifferenzierten Zelle (Chloroplasten) vorhanden sind (siehe 1.2). In den analysierten Zellkernfraktionen ist die nachgewiesene HvWhy1-Proteinmenge in der Zellkernfraktion aus meristematischem Gewebe (Segment I) am geringsten. Die Proteinmenge an HvWhy1 ist in Zellkernen aus fünf Tage jungem Blattgewebe (Segment IIa) am stärksten und scheint während der Ausdifferenzierung wieder abzunehmen (Abb. 3.23).

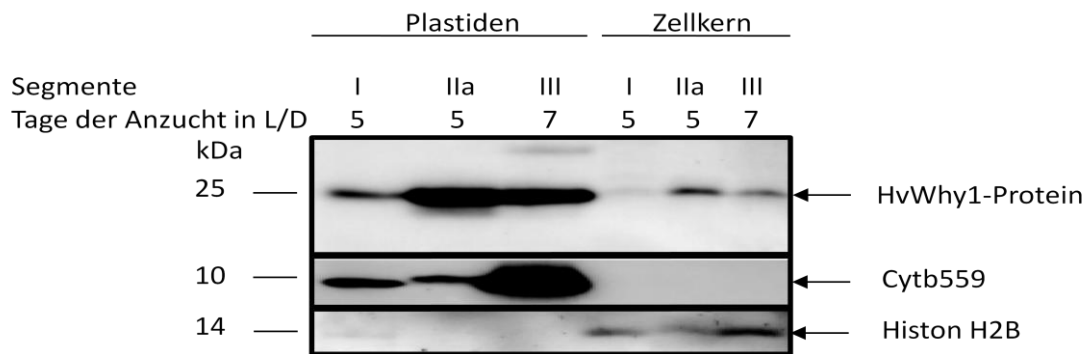


Abb. 3.23: Immunologischer Nachweis des HvWhy1-Proteins in Proteinextrakten, die aus Plastiden und Zellkernen isoliert wurden. Diese Extrakte wurden von den gleichen Blattsegmenten nach fünf- und siebentägiger Anzucht isoliert. Nach Auftrennung von 15 µg Protein und Immobilisierung der Proteine auf einer Membran wurde diese mit dem Peptid-HvWhy1-Antikörper (siehe 2.5.10) sowie den Kontrollantikörpern (siehe 2.5.10) gegen Cytb559 und Histon H2B immunodekoriert. Der Nachweis der mit Pfeilen gekennzeichneten Proteine fand mit dem ECL-System statt.

Desweiteren wurde versucht, das HvWhy1-Protein unter nativen Bedingungen in beiden Kompartimenten nachzuweisen. Nach Isolierung von intakten Zellkernen und Chloroplasten wurden diese mechanisch aufgebrochen und unter nicht denaturierenden Bedingungen (siehe 2.5.9.2) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach Immobilisierung der Proteine auf einer Membran wurde diese mit dem Peptid-HvWhy1-Antikörper inkubiert. Die nachgewiesenen Proteine bzw. Proteinkomplexe laufen unter nativen Bedingungen im Polyacrylamidgel in der Plastidenfraktion höher als in den Zellkernen (Abb. 3.24). Diese Beobachtung ist ein Hinweis darauf, dass sich das HvWhy1-Protein in den beiden Kompartimenten zu unterschiedlichen Proteinkomplexen zusammenlagern kann, die sich in Größe oder Ladung unterscheiden.

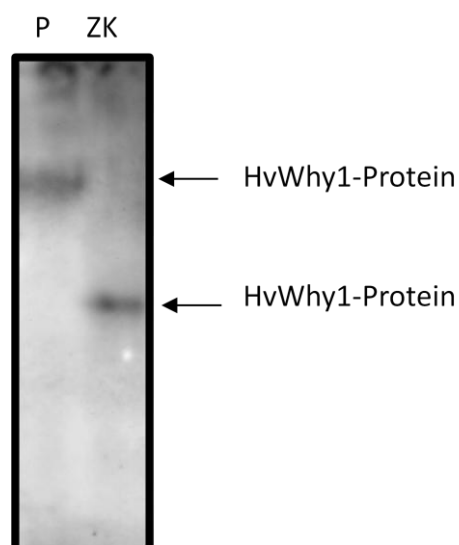


Abb. 3.24: Immunologischer Nachweis des HvWhy1-Proteins in Chloroplasten- (P) und Zellkernfraktionen (ZK) aus sieben Tage alten Gerstenprimärblättern. Die Proteinextrakte wurden in einem nativen Polyacrylamidgel (7 % - 11 % (w/v)) aufgetrennt und anschließend auf einer Membran immobilisiert. Nach Inkubation mit dem Peptid-HvWhy1-Antikörper (siehe 2.5.10) wurden Proteinkomplexe nachgewiesen (Markierung durch Pfeile).

### 3.3.5 Immunologische Untersuchung zur subplastidären Verteilung des Whirly1-Proteins

Um die genaue Verteilung des HvWhy1-Proteins innerhalb der Chloroplasten aufzuklären, wurden ganze Plastiden osmotisch aufgebrochen. Im Unterschied zu den eben beschriebenen Plastiden wurden diese nicht über Percoll (siehe 2.5.4.1, 2.5.4.2) aufgereinigt. Um größere Mengen an Chloroplasten zu isolieren, wurde die Präparation über Saccharose (siehe 2.5.4.3) durchgeführt. Nach Aufreinigung wurden die Plastiden dann in eine Stroma- und eine Membranfraktion aufgetrennt (siehe 2.5.4.3). Die erhaltenen Proteinextrakte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf einer Membran immobilisiert. Die HvWhy1-Proteine lassen sich sowohl in der Stromafraktion als auch in der Membranfraktion identifizieren, wobei annähernd die doppelte Menge an HvWhy1-Protein im Stroma zu finden ist (Abb. 3.25). Die Reinheit der Fraktionen wurde mit Hilfe von Antikörpern, die gegen das sich im Stroma befindende Protein SSU (kleine Untereinheit der RubisCO) und das membrangebundene Chlorophyllbindeprotein des Photosystem I (Lhca1) gerichtet sind, überprüft. Weiterhin wurden durch den Peptid-HvWhy1-Antikörper höhermolekulare Banden bei 34 kDa und 54 kDa vor allem in der Membranfraktion erkannt. Im Unterschied zum 17 kDa Protein konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um spezifische Signale handelt (Abb. 7.2).

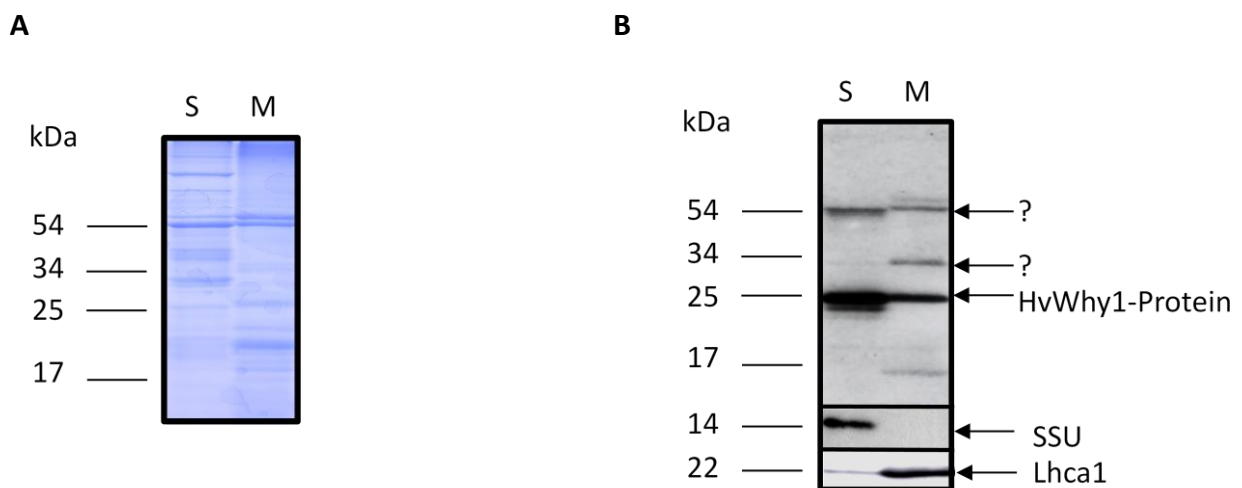


Abb. 3.25: Immunologische Untersuchung der HvWhy1-Proteine in Chloroplastenfraktionen.

A: Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung wurde das Polyacrylamidgel mit Coomassie gefärbt.

B: Immunologischer Nachweis zur Lokalisierung des HvWhy1-Proteins in Chloroplastenfraktionen aus fünf Tage alten Gerstenprimärblättern. Es wurden Proteine (10 µg) aus isolierten Stroma- und Membranfraktionen gelelektrophoretisch aufgetrennt, immobilisiert und mit dem Peptid-HvWhy1-Antikörper inkubiert. Zur Kontrolle der Reinheit der Fraktionen wurden Antikörper (siehe 2.5.10) verwendet, die gegen SSU und Lhca1 gerichtet sind. Spezifische Proteine sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Die Stromafraktion ist mit S und die Membranfraktion mit M gekennzeichnet.

### 3.4 Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Faktoren auf die Expression der *whirly*-Gene

Interne Faktoren wie Phytohormone und externe Faktoren wie Trockenheit, Nährstoffmangel, Temperatur- und Lichtverhältnisse, die wiederum auf den Phytohormonhaushalt wirken, beeinflussen die Blattalterung. Um einen detaillierteren Eindruck zu erhalten, durch welche Faktoren die Genexpression von *Hvwhy1* und *Hvwhy2* beeinflusst wird, wurde der Einfluss der Phytohormone untersucht. Außerdem sollte noch ein Vergleich mit der Expression des *HvS40*-Gens zeigen, ob die Annahme einer Funktion von *HvWhy1* als Repressor bestätigt werden kann.

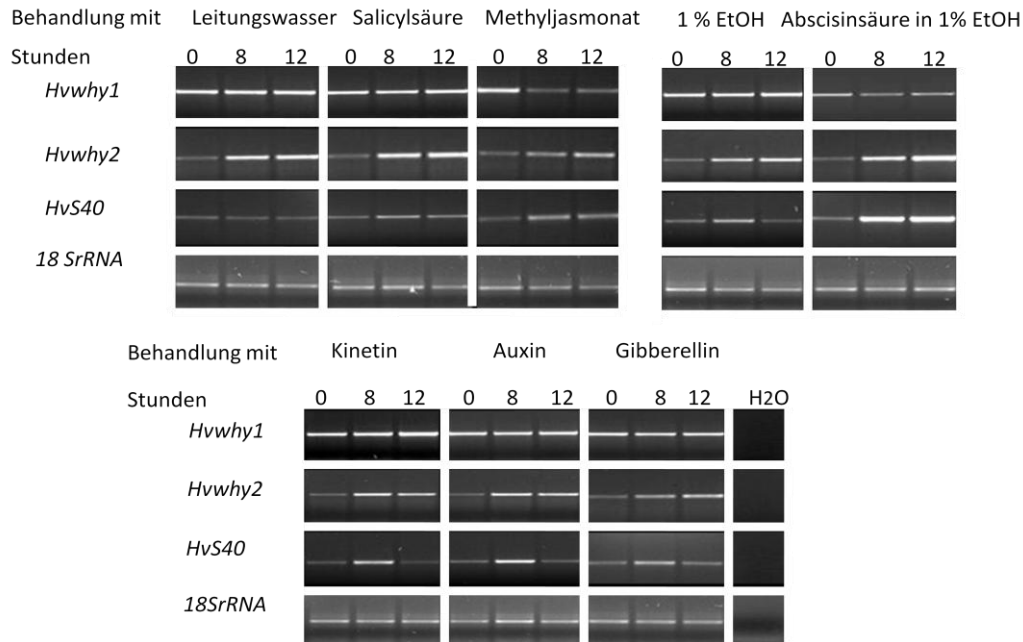
#### 3.4.1 Einfluss der Phytohormone auf die Induktion der Expression des *Hvwhy1*- und *Hvwhy2*-Gens

Um die mögliche Regulation der *Hvwhy1*-Genexpression durch Phytohormone zu untersuchen, wurden Experimente mit folgendem Versuchsaufbau durchgeführt. Die unter kontrollierten Bedingungen sieben Tage angezogenen Gerstenprimärblätter wurden oberhalb ihres Blattgrundes und unterhalb der Blattspitze abgeschnitten und für acht und zwölf Stunden im Dauerlicht in unterschiedliche Phytohormonlösungen gelegt (siehe 2.2.2). Dabei finden zum Einen die Phytohormone ABA, Salicylsäure (SA) und Methyljasmonat (MJ) Verwendung, die in den Prozess der Seneszenz durch Induktion seneszenzassoziierter Gene involviert sind. Zum Anderen werden seneszenzverzögernde Phytohormone wie Gibberellin (Gib), Auxin und Kinetin (Kin), die auch im meristematischen Gewebe vorkommen, untersucht. Als Kontrolle dienten Primärblätter, die entweder in Leitungswasser oder in 1 % (v/v) EtOH Lösung gelegt wurden. Das Phytohormon Abscisinsäure wurde in 1 % (v/v) EtOH und die anderen in Leitungswasser gelöst. Nach der Inkubationszeit wurden erneut die Schnittflächen abgeschnitten, um Verwundungseffekte zu vermindern. Aus den behandelten Blattproben wurde Gesamt-RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Für die Amplifizierung der Gene *Hvwhy1*, *Hvwhy2* und *HvS40* fanden spezifische Oligonukleotide Verwendung (siehe 2.4.6.2). Die erhaltenen PCR-Produkte (Abb. 3.26 A) wurden nach Gelelektrophorese densitometrisch ausgewertet (siehe 2.4.6.3) (Abb. 3.26 B). Zunächst wurden die erhaltenen PCR-Produkte in Bezug zur 18S-rRNA-Beladungskontrolle gesetzt und danach der Anstieg zum Ausgangswert vor Behandlung errechnet. Der Vergleich zur Behandlung nur mit Leitungswasser bzw. 1 % (v/v) Ethanol gab Aufschluss über Zu- oder Abnahme der relativen Transkriptmengen, induziert durch die Behandlung mit den Phytohormonen. Die seneszenzfördernden Phytohormone zeigten nach einer Behandlungsdauer von acht bzw. zwölf Stunden einen Einfluss auf die relative Transkriptmenge von *Hvwhy1*. Abscisinsäure bewirkte nach zwölf Stunden eine schwache und Methyljasmonat eine noch deutlichere Verringerung der Transkriptmenge von *Hvwhy1*. Eine kurzfristige Behandlung mit Salicylsäure scheint eher zu einer geringen Zunahme der Transkriptmenge zu führen (Abb.



3.26). Die seneszenzverzögernden Phytohormone wie Auxin, Kinetin und Gibberellin zeigen einen differenzierten Einfluss auf die *Hvwhy1*- Genexpression. Auxin zeigt wie auch Gibberellin einen negativen Einfluss auf die Genexpression von *Hvwhy1*.

## A



## B

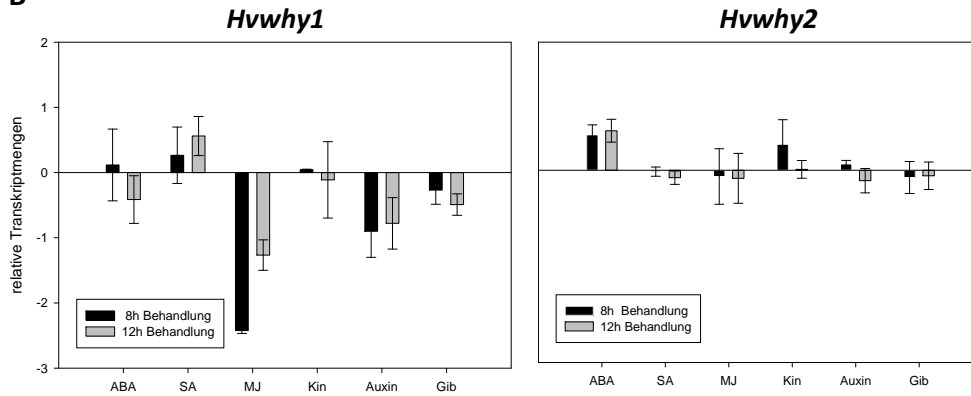


Abb. 3.26: RT-PCR-Analyse der Genexpression nach Phytohormonbehandlung von Gerstenprimärblättern.

A: Expressionsanalyse der Gene *Hvwhy1*, *Hvwhy2* und *HvS40* nach Behandlung mit den Phytohormonen Methyljasmonat (MJ), Salicylsäure (SA), Abscisinsäure (ABA), Gibberellin (Gib), Kinetin (Kin) und Auxin für acht bzw. zwölf Stunden. Als Kontrolle wurden Gerstenprimärblätter auf Leitungswasser bzw. 1 % Ethanol (EtOH) gelegt. Aus 2 µg Gesamt-RNA wurde cDNA synthetisiert und die relativen Transkriptmengen durch RT-PCR semiquantitativ ermittelt. Als Kontrolle der Beladung wurde 18S rRNA Transkript abgebildet. H<sub>2</sub>O: Wasserkontrolle der PCR ohne Zugabe von cDNA. Exemplarische Darstellung einer PCR von mindestens drei unabhängig durchgeführten Ansätzen.

B: Densitometrische Analyse für die Gene *Hvwhy1* und *Hvwhy2*. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängig durchgeführten Ansätzen. Es ist der Anstieg bzw. Abstieg der relativen Transkriptmenge in Bezug zur Kontrollbeladung und im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit Leitungswasser bzw. 1 % EtOH erfasst. Negative Werte spiegeln die Abnahme und positive Werte die Zunahme des Transkriptgehaltes nach Behandlung wieder.

Nach Behandlung mit Auxin wird eine stärkere Erniedrigung des Transkriptgehaltes erzielt, die jedoch nicht so stark ist wie nach Behandlung mit Methyljasmonat. Kinetin hat dagegen im untersuchten Zeitraum und mit den verwendeten Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf die Menge an *Hvwhy1*-mRNA.

Die Signale, die mit der semiquantitativen RT-PCR erhalten wurden, zeigen nach Behandlung mit Leitungswasser für das *Hvwhy2*-Gen im Gegensatz zum *Hvwhy1*-Gen eine Transkriptakkumulation. Dieses Verhalten spricht dafür, dass im Gegensatz zu dem *Hvwhy1*-Gen das *Hvwhy2*-Gen auf Verwundungsprozesse reagiert. Bei der Induktion des *Hvwhy2*-Gens handelt es sich eher um eine systemische Verwundungsantwort, da die Transkriptmenge von *HvS40*, die sich durch lokale Verwundung erhöht (Haußühl 1998), gleich bleibt.

Eine Veränderung in der relativen Transkriptmenge von *Hvwhy2* konnte darüber hinaus nur nach Behandlung mit Abscisinsäure beobachtet werden, die nach acht Stunden zu einer deutlichen Transkriptakkumulation führt (Abb. 3.26). Diese entgegengesetzte Regulierung von *Hvwhy1* und *Hvwhy2* spricht dafür, dass die Whirly-Proteine antagonistisches Verhalten im abscisinsäurevermittelten Signalweg zeigen. Die mit der semiquantitativen RT-PCR gewonnenen Daten zeigen Tendenzen der Regulierung von *Hvwhy1* und *Hvwhy2*, aber die hohen Standardabweichungen sprechen dafür, dass diese noch mit einer quantitativen Methode wie der RealTime-PCR überprüft werden sollten.

Die beschriebene Induktion der Expression des *HvS40*-Gens nach Behandlung mit Salicylsäure, Abscisinsäure bzw. Methyljasmonat konnte bestätigt werden (Haußühl 1998, Krupinska et al. 2002). Eine gegenläufige Expression der Gene für *Hvwhy1* und *HvS40* konnte unter diesen Bedingungen nur nach Behandlung mit Abscisinsäure und Methyljasmonat festgestellt werden (Abb. 3.26, 3.27). Die Veränderungen der relativen Transkriptmengen von *Hvwhy1* und *HvS40* zeigten, dass im methyljasmonatvermittelten Signalweg eine starke Verringerung der *HvWhy1*-Transkriptmenge mit einer schwachen Erhöhung des relativen *HvS40*-Transkriptgehalts einhergeht. Die zwölfstündige Inkubation mit Abscisinsäure zeigt eine geringfügige Verringerung der *HvWhy1*-Transkriptmenge sowie eine starke Induktion der *HvS40*-Genexpression (Abb. 3.27).

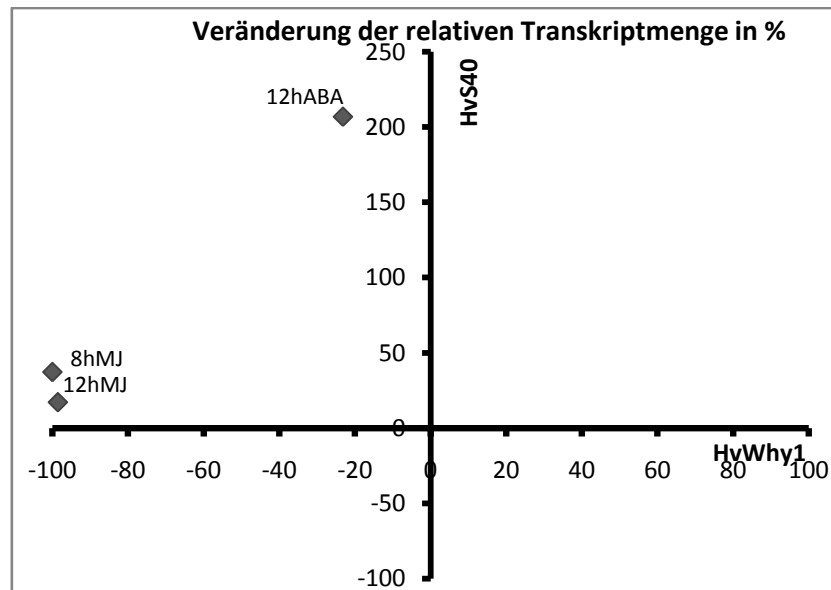


Abb. 3.27: Analyse der Genexpression nach Phytohormonbehandlung mit Methyljasmonat (MJ) nach einer acht und zwölf stündigen Inkubation sowie mit Abscisinsäure (ABA) nach zwölf Stunden Behandlung von Gerstenprimärblättern.

Die Produkte einer semiquantitativen RT-PCR wurden densitometrisch ausgewertet, wobei der Anstieg bzw. Abfall der relativen Transkriptmenge in Bezug zur Kontrollbeladung und im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit Leitungswasser bzw. 1 % EtOH erfasst wurde. Die prozentualen Werte beziehen sich auf den Ausgangswert nach 0 Stunden Behandlung.

### 3.4.2 Expression der *whirly*-Gene im Gerstenprimärblatt bei Langzeit-Inkubation mit Salicylsäure und Methyljasmonat

In vorangegangenen Arbeiten von Haußühl (1998) und Krupinska et al. (2002) wurde gezeigt, dass Salicylsäure und Methyljasmonat die Expression von *HvS40* fördern, im Unterschied dazu eine Behandlung mit einer Kombination von Salicylsäure und Methyljasmonat die *HvS40*-Genexpression eher hemmt. Um zu überprüfen, ob diese Phytohormone einen antagonistischen Effekt auf die Expression von *Hvwhy1* ausüben und somit die Annahme stützen, dass *HvWhy1* als Repressor auf das *HvS40*-Gen wirkt, wurden Untersuchungen mit Gerstenprimärblättern nach Haußühl (1998) durchgeführt. Dafür wurden sieben Tage alte Keimlinge, die wiederum an der Blattspitze und am Blattgrund beschnitten wurden, für drei Tage im Dauerlicht in die Phytohormonlösungen Methyljasmonat, Salicylsäure und einer Mischung aus beiden gelegt (siehe 2.2.2). Die lange Dauer der Phytohormonbehandlung soll absichern, dass direkte und indirekte Regulationsmechanismen ablaufen können. Als Kontrolle wurden Primärblätter mit Leitungswasser behandelt. Außerdem wurden sieben Tage alte Gerste für einen Tag entweder mit Salicylsäure oder Methyljasmonat benetzt und dann für die restlichen zwei Tage in eine Mischung aus beiden Phytohormonen gelegt.

Die verwendeten Blattproben wurden zunächst physiologisch charakterisiert, um eine Wirkung der Phytohormone zu verdeutlichen (Abb. 3.28). Die Gesamtchlorophyllgehalte

sinken nach Behandlung mit Salicylsäure und Methyljasmonat, jedoch am deutlichsten nach alleiniger Behandlung mit Methyljasmonat. Die Abnahme des Gesamtchlorophyllgehalts, die durch die Behandlung mit Methyljasmonat induziert wird, scheint durch die zusätzliche Inkubation mit Salicylsäure verringert. Eine Abnahme des Chlorophyllgehalts bei Zugabe von Jasmonat wurde bereits von Parthier (1990) gezeigt.

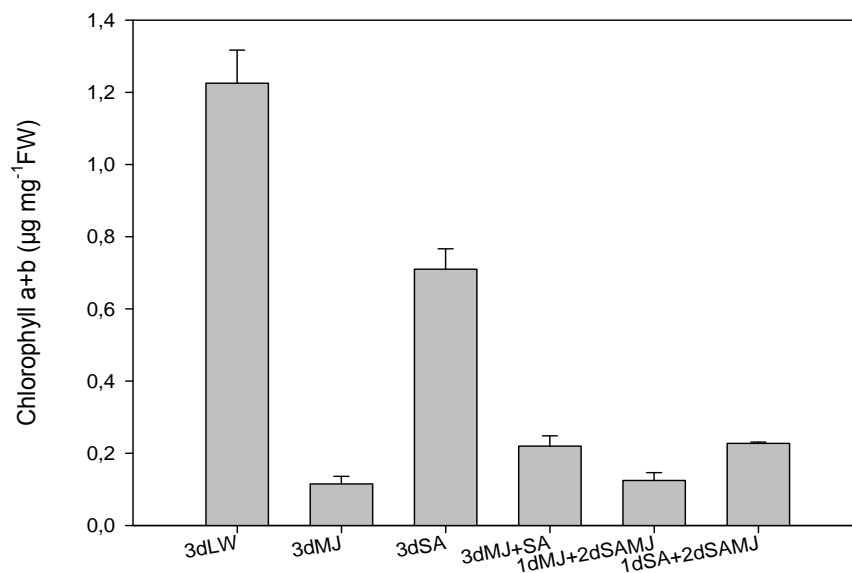


Abb. 3.28: Änderung der Chlorophyllwerte nach Inkubation der Gerstenprimärblätter in Phytohormonlösungen für drei Tage im Vergleich zur Behandlung in Leitungswasser.

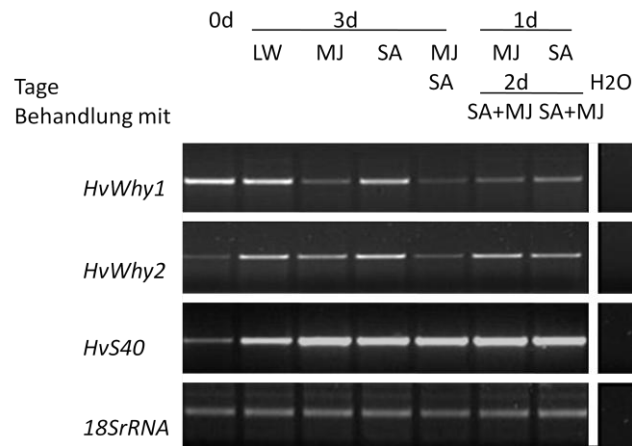
LW= Leitungswasser

MJ= Methyljasmonat

SA= Salicylsäure

Die Expression wurde mit Hilfe der semiquantitative RT-PCR analysiert und densitometrisch ausgewertet (Abb. 3.29). Es konnte durch Salicylsäure als auch durch Methyljasmonat eine Zunahme der *HvS40*-mRNA induziert werden. Diese Beobachtung spricht ebenso wie bereits die Chlorophyllkonzentrationen (Abb. 3.28) dafür, dass die Behandlung der Gerstenprimärblätter mit den Phytohormonen Wirkung zeigte. Im Gegensatz zu der Beobachtung in Haußühl (1998) konnte bei gleichzeitiger Behandlung mit beiden Phytohormonen keine Inhibierung der Genexpression von *HvS40* beobachtet werden. Die Induktion der Genexpression von *HvS40* nach Behandlung mit Leitungswasser zeigt im Vergleich zu Abbildung 3.26, dass eine länger andauernde Verwundung Einfluss auf die Genexpression hat (Abb. 3.29 A).

**A**



**B**

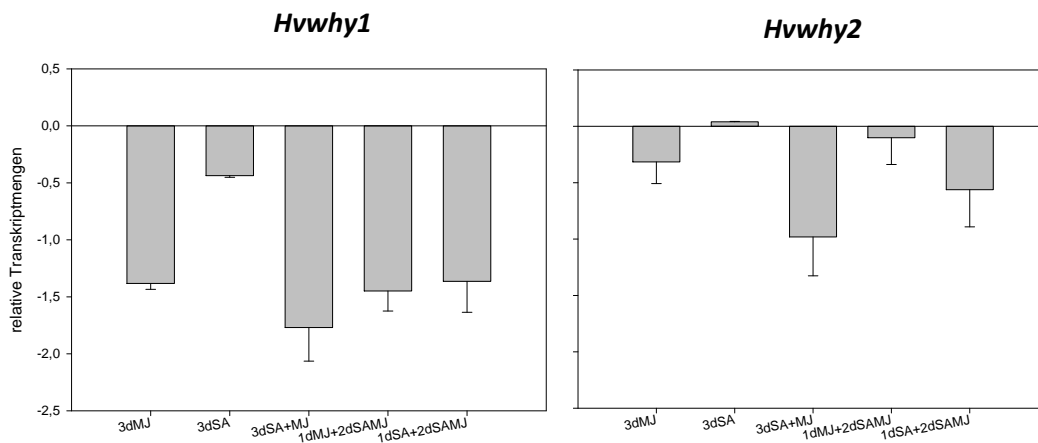


Abb. 3.29: Analyse der Genexpression nach Phytohormonbehandlung von Gerstenprimärblättern.

A: Expressionsanalyse der Gene *Hvwhy1*, *Hvwhy2* und *HvS40* nach Behandlung mit den Phytohormonen Methyljasmonat (MJ) und Salicylsäure (SA) für drei Tage bzw. nach eintägiger Vorbehandlung in einer Phytohormonlösung und dann zweitägiger Behandlung in einer Lösung aus beiden Phytohormonen. Als Kontrolle wurden Gerstenprimärblätter auf Leitungswasser (LW) gelegt. Aus 2 µg Gesamt-RNA wurde cDNA synthetisiert und die relativen Transkriptmengen durch RT-PCR semiquantitativ ermittelt. Als Beladungskontrolle wurde das 18S rRNA Transkript abgebildet. H<sub>2</sub>O: Wasserkontrolle der PCR ohne Zugabe von cDNA. Exemplarische Darstellung einer PCR von mindestens drei unabhängig durchgeführten Ansätzen.

B: Densitometrische Analyse der in A abgebildeten PCR-Signale für die Gene *Hvwhy1* und *Hvwhy2*. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängig durchgeführten Ansätzen. Es ist der Anstieg bzw. Abfall der relativen Transkriptmenge in Bezug zur Kontrollbeladung und im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit Leitungswasser erfasst. Negative Werte spiegeln die Abnahme und positive Werte die Zunahme des Transkriptgehaltes nach Behandlung wieder.

Nach dreitägiger Methyljasmonat (MJ)-Behandlung kommt es zur starken Erniedrigung des *Hvwhy1*-Transkriptgehalts. Die Behandlung mit Salicylsäure führt zu einer schwächeren Abnahme der relativen Transkriptmenge. Die Inkubation der Gerstenprimärblätter mit einer Mischung aus beiden bzw. Vorbehandlung mit jeweils einer Lösung führt auch zu einer Erniedrigung des Transkriptgehalts, die bei allen drei Ansätzen mit der dreitägigen Methyljasmonatbehandlung vergleichbar ist.

Im Gegensatz dazu zeigt nur die dreitägige Behandlung mit einer Kombination aus beiden Phytohormonen einen deutlichen Effekt auf die Genexpression von *Hvwhy2*. Jedoch ist eine leichte Abnahme der *Hvwhy2*-Transkriptmenge bereits nach zweitägiger Behandlung mit Methyljasmonat und Salicylsäure sichtbar, nachdem die Blätter einen Tag mit Salicylsäure vorbehandelt wurden (Abb. 3.29). Die Expression des *Hvwhy2*-Gens scheint auch nach dreitägiger Behandlung durch Verwundungseffekte induziert (Abb. 3.29 A).

Der Zusammenhang zwischen der Herunterregulierung von *Hvwhy1* und der Induktion der Expression von *HvS40* ist bei der dreitägigen Behandlung mit einer Kombination aus Methyljasmonat und Salicylsäure (3dSAMJ) am stärksten. Nach Behandlung mit dem Phytohormon Salicylsäure konnte die geringste Abnahme der *Hvwhy1*-Transkriptmenge und eine geringe Zunahme der *HvS40*-Transkriptmenge erfasst werden (Abb. 3.30). Die Induktion des *HvS40*-Gens durch länger andauernde Verwundungsprozesse scheint nicht von der *Hvwhy1*-Transkriptmenge abhängig zu sein (Abb. 3.29 A).

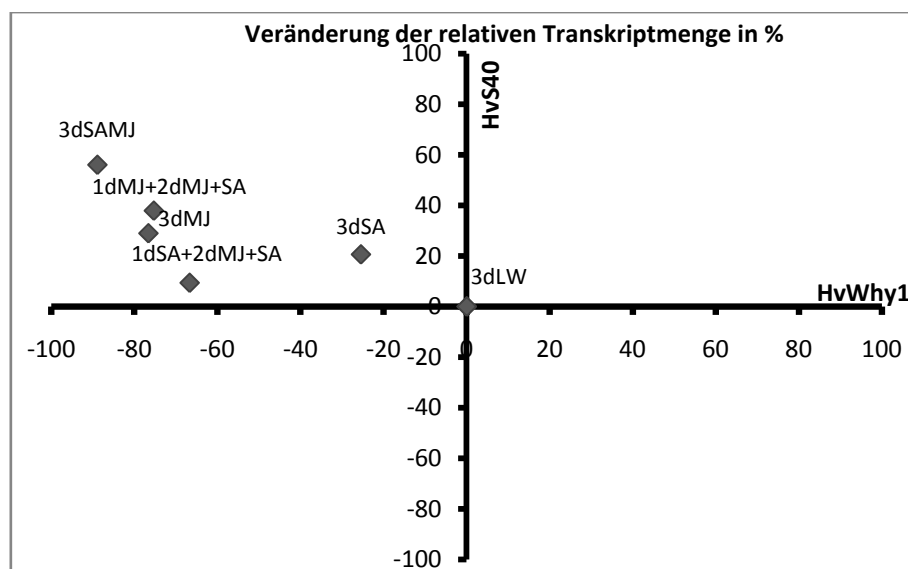


Abb.3.30: Analyse der Genexpression nach Behandlung von Primärblattsegmenten mit Methyljasmonat (MJ) und Salicylsäure (SA).

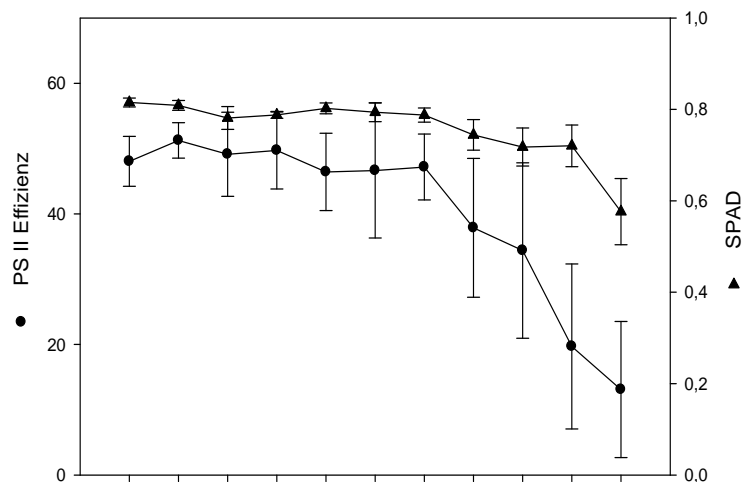
Die Produkte einer semiquantitativen RT-PCR wurden densitometrisch ausgewertet, wobei der Anstieg bzw. Abfall der relativen Transkriptmenge in Bezug zur Kontrollbeladung und im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit Leitungswasser erfasst wurde. Die prozentualen Werte beziehen sich auf nur mit Leitungswasser behandelte Proben als Ausgangswert.

### 3.4.3 Einfluss von Umweltfaktoren auf die Abundanz des HvWhy1-Proteins in Fahnenblättern unter Freilandbedingungen

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde das HvWhy1-Protein als DNA-Bindeprotein in der Promotorregion des *HvS40*-Gens gefunden. In jungem Gewebe wirkt das HvWhy1-Protein möglicherweise als Repressor auf die Genexpression von *HvS40* (Dähnhardt 2003). Diese Untersuchungen fanden unter kontrollierten Bedingungen in der Klimakammer statt. Das seneszenzassoziierte Gen *HvS40* wird sowohl durch den Prozess der Dunkelinkubation als auch während der natürlichen Seneszenz (Becker und Apel 1993, Dähnhardt 2003) induziert. Zusätzlich ist bekannt, dass das Transkript in seneszierenden Fahnenblättern von *Hordeum vulgare* L. cv. „Carina“ unter natürlichen Bedingungen im Feld akkumuliert (Scharrenberg et al. 2003). Daher besteht die Annahme, dass der mögliche Repressor HvWhy1 auch im ausgewachsenen Fahnenblatt unter Freilandbedingungen eine Rolle spielt. Untersuchungen zur Blattseneszenz können in der Klimakammer erfolgen. Jedoch können unter diesen kontrollierten Bedingungen keine externen Faktoren, die in einem natürlichen Habitat auf den Prozess der natürlichen Alterung stimulierend wirken, Einfluss nehmen. Somit können Feldstudien nicht nur die *in vivo* sondern auch die natürliche Situation während der Blattseneszenz erfassen. Zusätzlich liefern sie Hinweise auf regulierende Umweltfaktoren, die einen Einfluss auf den Proteingehalt von HvWhy1 haben, um anschließend unter kontrollierten Bedingungen überprüft zu werden.

Um die Abundanz des Whirly-Proteins HvWhy1 während der natürlichen Seneszenz im Fahnenblatt immunologisch zu untersuchen, wurden in einem Zeitraum von 26 Tagen in einem Feldversuch Fahnenblätter der Gerste (siehe 2.2.3) geerntet. Zunächst wurde der physiologische Entwicklungszustand charakterisiert. Es wurden zum Einen die relativen Chlorophyllgehalte mit Hilfe eines SPAD-Messgerätes (siehe 2.3.2) bestimmt. Zum Anderen wurde für jeden Probenahmetag die Effizienz des Photosystems II (2.3.3) der Fahnenblätter erfasst (Abb. 3.31 A). Diese Werte zeigen zum Tag 14.06.2008 den Beginn der Seneszenz an, da sowohl der relative Chlorophyllgehalt als auch die Effizienz des PS II ab diesem Tag abnimmt. Zusätzlich wurden Lufttemperatur und Niederschlag als externe Faktoren durch die aufgezeichneten Wetterdaten des Deutschen Wetterdienstes (DWD) hinzugezogen (Abb.3.31, Abb. 7.3). Anhand der Wetterdaten wurde deutlich, dass im Vergleich zu vorangegangenen Jahren sich die Monate Mai und Juni durch niedrige Niederschlagswerte auszeichneten (Abb. 7.3). Es regnete nur an fünf Probenahmetagen. Die Temperaturen schwankten zwischen 12 °C und 20 °C (Abb. 3.31 B).

A



B

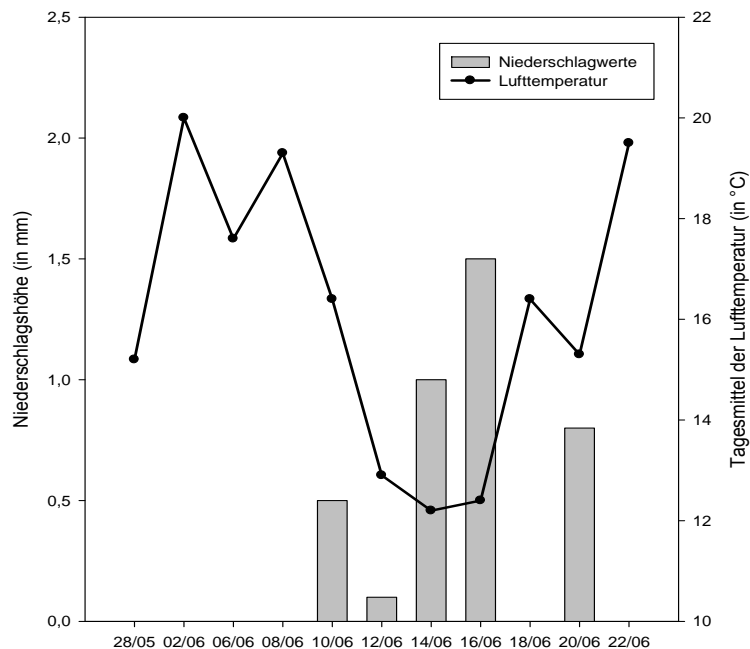


Abb. 3.31: Physiologische Parameter von Fahnblätter der Gerste im Freiland und dazugehörige meteorologische Messwerte. A: Änderung der relativen Chlorophyllwerte und Werte der Effizienz des Photosystems II ( $F_v/F_m$ ) der Fahnblätter über den Probenahmezeitraum. B: Darstellung der Temperaturen an den Tagen der Probenahme sowie der Niederschlagshöhen der Monate Mai und Juni des Jahres 2008 (Daten vom DWD).

Aus den geernteten Blattproben wurden Proteine isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das Gel wurde bei einem parallelen Ansatz zur Kontrolle der Beladung mit Coomassie angefärbt (Abb. 3.32). Der Gehalt an plastidären Proteinen wie der LSU und SSU schwankt im Verlauf des Analysezeitraumes (Abb. 3.32). Angefärbte Proteine im mittleren Molekularbereich von 17-50 kDa sprechen aber für eine relativ gleichbleibende Beladung. Diese Annahme wird durch die Immunodekoration mit dem Lhca1-Antikörper gestützt. Es wurde eine relativ gleichmäßige Proteinverteilung von



Lhca1 im Probenahmezeitraum festgestellt, die während der Seneszenz abnimmt. Zum Zeitpunkt des Seneszenzbeginns (14.06.2008) konnten im Coomassie-gefärbten Gel nur wenige Proteine nachgewiesen werden, ähnliches wurde bereits in der Arbeit von Humbeck et al. (1996) gezeigt. Auch geht die sichtbare Menge an Proteinen, trotz gleich aufgetragener Proteinmengen, im Verlauf der späten Seneszenz zurück (Abb. 3.32). Diese Beobachtungen könnten auf einen partiellen Abbau der Proteine hindeuten. Die nach Abbau vorliegenden Oligopeptide werden bei der Bestimmung der Proteinmenge nach Isolierung aus dem Gewebe mitberechnet (siehe 2.5.8). Sie laufen aufgrund ihres geringen Molekulargewichts sehr schnell durch das Polyacrylamidgel und wurden bei der durchgeführten Auftrennung nicht erfasst.

Die Membran wurde mit dem Peptid-HvWhy1-Antikörper inkubiert und es konnte das *in vivo* vorkommende HvWhy1-Protein im Fahnenblatt nachgewiesen werden. Wie auch im Gerstenprimärblatt (siehe 3.2.3, 3.3.2) weist das HvWhy1-Protein im Fahnenblatt ein Molekulargewicht von 25 kDa auf (Abb. 3.32). Die höchsten Mengen an HvWhy1-Protein wurden an den Probenahmetagen 02.06.2008, 16.06.2008 und 18.06.2008 nachgewiesen. An einigen Tagen war kein HvWhy1-Protein nachweisbar. Die weiterhin analysierten Photosyntheseproteine des PS II, wie Cytb 559 und CP29, sowie das Protein des PS I, Lhca2, zeigen wie auch das HvWhy1-Protein Akkumulierungen im Proteingehalt an den Probenahmetagen 02.06.2008, 10.06.2008, 12.06.2008, 16.06.2008 und 18.06.2008. Diese plastidären Proteine zeigen damit ähnliche Schwankungen wie das HvWhy1-Protein (Abb. 3.32). Um zu überprüfen, ob die Schwankungen durch Licht verursacht wurden, wurde ein bekanntermaßen lichtinduziertes Protein, das „early light induced Protein“ ELIP untersucht. In Gerste können die ELIP-Proteine in zwei Klassen eingeteilt werden. Dabei unterscheidet man zwischen ELIP-Proteinen mit einem höheren und einem niedrigen Molekulargewicht. Der Antikörper erkannte ein 24 kDa Protein. Das erhaltende Proteilmuster gibt Hinweise darauf, dass an diesen Tagen (02.06.2008, 10.06.2008, 12.06.2008, 16.06.2008 und 18.06.2008) die Fahnenblätter auf dem Feld verschiedenen Dosen Starklichts ausgesetzt waren (Humbeck et al. 1994). Dass sich die Schwankungen der Proteinmengen von HvWhy1 und dem höhermolekularen ELIP gleichen, deutet darauf hin, dass das HvWhy1-Protein ebenso wie ELIP lichtreguliert wird. Im Abschnitt 3.3.3 wurde bereits dargelegt, dass die Expression von *Hvwhy1* sowohl auf Transkriptebene als auch auf Proteinebene nicht durch das Vorhandensein von Licht reguliert wird. Die Ähnlichkeit mit einem starklichtregulierten Protein wie ELIP spricht eher dafür, dass die Lichtstärke bzw. Lichtdosis einen Einfluss auf die Proteinmenge haben könnte. Es ist möglich, dass auch andere externe Stimuli oder die Kombination verschiedener Reize einen Einfluss auf den Gehalt an HvWhy1-Protein haben. Ein weiterer externer Faktor könnte neben Licht die Trockenheit sein. Die Niederschlagswerte waren im Probenahmezeitraum sehr gering (Abb. 3.31). Auch wurde vor dem Probenahmezeitraum kaum Niederschlag verzeichnet. Es regnete nur viermal im Monat Mai und zuletzt am 26.05.2008, zwei Tage vor Beginn der Beprobung (Abb. 7.3). Die bereits durchgeführten Phytohormonversuche zeigten zusätzlich, dass Abscisinsäure, die eine Rolle im Trockenstress vermittelten Signalweg spielt (Roelfsema et al. 2004), zur Abnahme der mRNA-Menge von *Hvwhy1* führt.

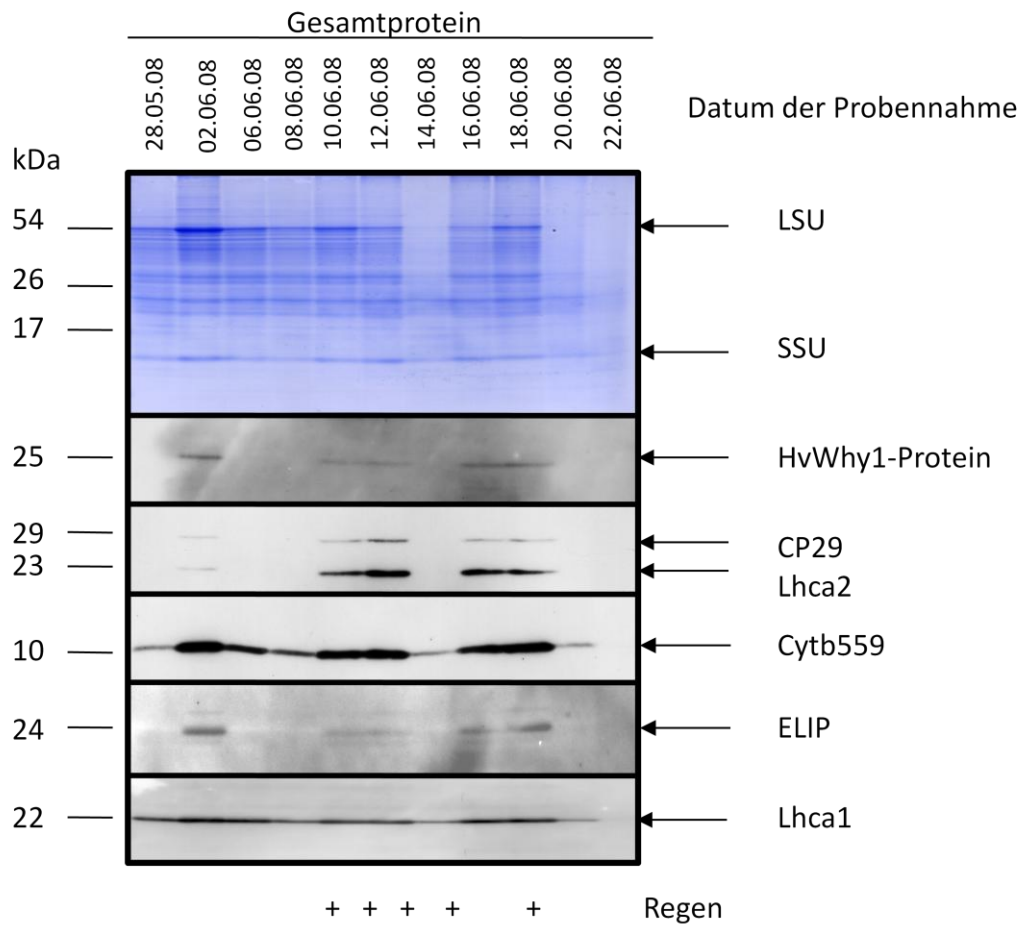


Abb. 3.32: Immunologische Analyse der Proteine aus Fahnenblättern der Gerste aus dem Freiland. Die Extrakte (10 µg Protein) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und immobilisiert. Als Beladungskontrolle wurde das Polyacrylamidgel mit Coomassie angefärbt. Die Membran wurde mit den Antikörpern, die gegen HvWhy1, CP29, Lhca2, Lhca1, Cytb559 und ELIP gerichtet sind (siehe 2.5.10) immunodekoriert. Die nachgewiesenen Proteine sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Mit + sind die Tage gekennzeichnet, an denen Niederschlag fiel (Abb. 3.31).

### 3.5 Analyse von HvWhy1-RNAi-Linien

In der Grundlagenforschung ist das Abschalten von Genen mit molekularbiologischen Methoden ein Standardverfahren, um deren Funktion im Organismus zu verstehen. Eine dieser Methoden ist die RNA-Interferenz (zur Übersicht: Kuhlmann und Nellen 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die T0-Generation der RNAi-Linien des *Hvwhy1*-Gens im Vergleich zum Wildtyp cv. Golden Promise analysiert. Für die Herstellung dieser transgenen Pflanzen wurde ein Konstrukt bestehend aus zwei antiparallel angeordneten *Hvwhy1*-cDNA-Sequenzen zur Transformation von Gerste eingesetzt (siehe 2.2.4). Die Transformanten wiesen eine Insertion von einer bzw. den beiden antiparallel angeordneten cDNA-Sequenzen in das Genom auf. Die Überprüfung der erfolgreichen Insertion ins Pflanzengenom fand mit Hilfe einer PCR-Amplifizierung statt. Diese Arbeiten fanden am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben statt. Die Analyse dieser

RNAi-Linien sollte dazu dienen, weitere Hinweise auf mögliche Funktionen des HvWhy1-Proteins zu erhalten. Dabei war von vorrangigem Interesse, die bereits postulierte Funktion als Repressor des seneszenzassoziierten Gens *HvS40* zu überprüfen.

Die transgenen Pflanzen wurden im Vergleich zum Wildtyp analysiert. Da die höchsten relativen Transkriptmengen von *Hvwhy1* unter anderem im jungen Gewebe vorzufinden sind (siehe 3.3.1) und auch der HvWhy1-Proteingehalt in jungem Gewebe hoch ist (siehe 3.3.2), wurden Blattproben im Bereich der Blattscheide und beginnender Blattspreite von jungen Trieben genommen (Abb. 3.33).

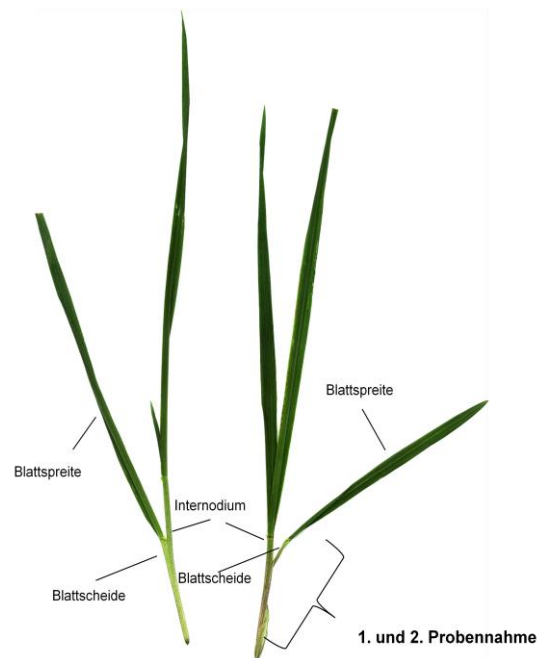


Abb. 3.33: Junger Trieb einer ausgewachsenen Gerstenpflanze, wobei die morphologischen Merkmale von Halm und Blättern wie Internodien, Blattspreite und Blattscheide beschrieben sind. Der Bereich, der für die Probenahmen verwendet wurden, ist mit einer Klammer gekennzeichnet.

Dabei wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten das eben beschriebene Gewebe beprobt (Tabelle 3.1). Von fünf transgenen Pflanzen wurde in einer ersten Probenahme Gewebe im Bereich der Blattscheide für die Isolierung der Gesamt-RNA verwendet (siehe 2.4.5.1).

Tabelle 3.1: Alter und Art der isolierten Pflanzengewebe zum Probenahmetag und die entsprechenden Nummern der HvWhy1-RNAi Linien

| Probenahme | Datum der Probenahme | Gewebe       | Linien                                       |
|------------|----------------------|--------------|--|
| 1          | 10.04.2008           | Blattscheide | E1, E2, E3, E8, E9                           |
| 2          | 29.05.2008           | Blattscheide | E4, E5, E6, E7, E10, E13, E17, E18, E20, E26 |

Aus dieser RNA wurde cDNA synthetisiert (siehe 2.4.6.1) und für die anschließenden Amplifizierungen mit spezifischen Oligonukleotiden (siehe 2.4.6.2) eingesetzt. Mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR (siehe 2.4.6) konnte bestätigt werden, dass im Vergleich zur relativen Menge an Transkript, das aus Wildtypgewebe isoliert wurde, in allen untersuchten RNAi-Linien eine Verringerung der relativen *Hvwhy1*-mRNA-Menge sichtbar ist (Abb. 3.34). Auf Grund der ins Pflanzengenom inserierten *Hvwhy1*-cDNA-Sequenz kommt es nach Transkription zur Hybridisierung mit dem *in vivo* vorhandenen *Hvwhy1*-Transkript und zum Abbau des Hybrids. Zusätzlich wurde deutlich, dass die Verminderung der relativen Transkriptmenge von *Hvwhy1* in jeder untersuchten Linie unterschiedlich stark ausgeprägt ist (Abb. 3.34). Die geringste Menge an *Hvwhy1*-Transkript wurde in den RNAi-Linien E1 und E9 beobachtet. Die höchste Transkriptakkumulation in den transgenen Pflanzen konnte in der Linie E2 erfasst werden.

Das HvWhy1-Protein wurde bereits im Vorfeld dieser Arbeit als DNA-Bindeprotein in der Promotorregion des *HvS40*-Gens identifiziert. Die Annahme, dass es sich bei dem HvWhy1-Protein um einen Repressor des *HvS40*-Gens handelt, soll in folgenden Experimenten untersucht werden.

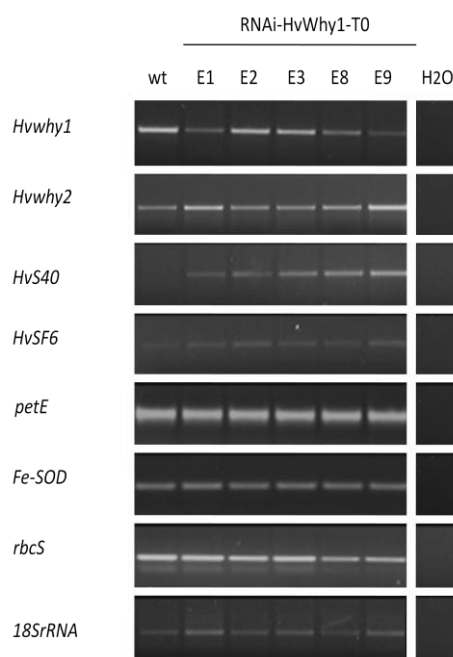
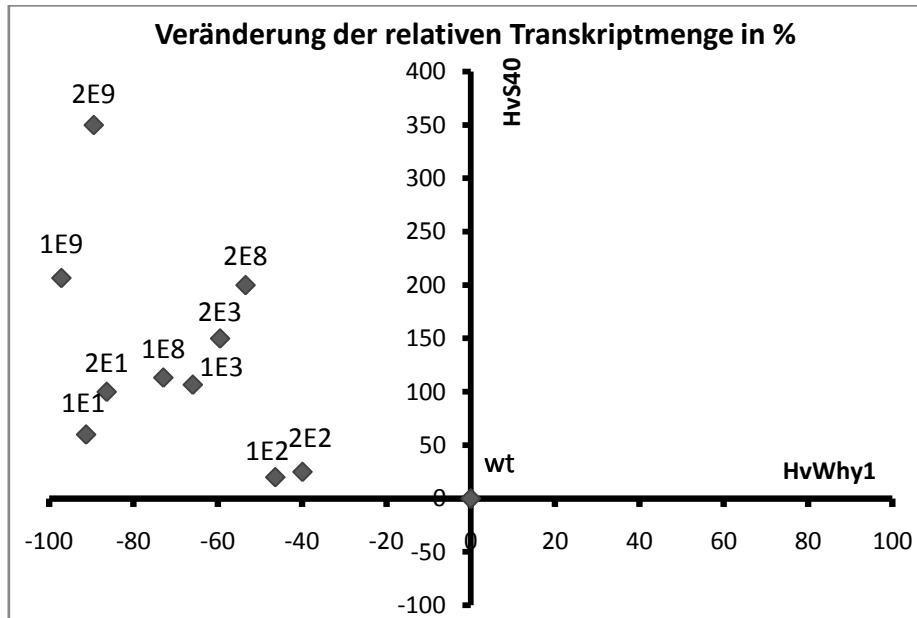


Abb.3.34: RT-PCR Untersuchungen zur Expression von Genen in HvWhy1-RNAi-Linien. Gewebe der Blattscheide wurde aus fünf transgenen Pflanzen (RNAi-HvWhy1) der Generation (T0) im Vergleich zum Wildtyp mittels semiquantitativer RT-PCR auf die Expression des *Hvwhy1*-Gens untersucht. Zusätzlich wurde die Expression weiterer Gene wie *Hvwhy2*, *HvS40*, *HvSF6*, *petE*, *Fe-SOD* und *rbcS* in den RNAi-Linien analysiert. Als konstitutive Kontrolle diente der Nachweis des 18S rRNA-Transkriptes. H<sub>2</sub>O: Kontrolle des PCR-Ansatzes ohne Zugabe von cDNA. Exemplarische Darstellung einer PCR von mindestens drei unabhängig durchgeführten Ansätzen.

Diese Veränderungen wurden densitometrisch ausgewertet (siehe 2.4.6.3), ins Verhältnis zur Beladung gesetzt und das jeweilige Signal der Wildtypprobe als 100 % gewertet, um die entsprechende prozentuale Änderung der Transkriptmenge der RNAi-Linien zu erkennen

(Abb. 3.35). Mit Hilfe dieses Verfahrens wurde trotz der abweichenden Resultate verschiedener PCRs deutlich, dass in allen untersuchten RNAi-Linien eine Erhöhung der Transkriptmenge von *HvS40* zu beobachten ist, die jedoch in allen untersuchten Linien unterschiedlich stark ausfällt (Abb. 3.34, 3.35 A).

**A**



**B**

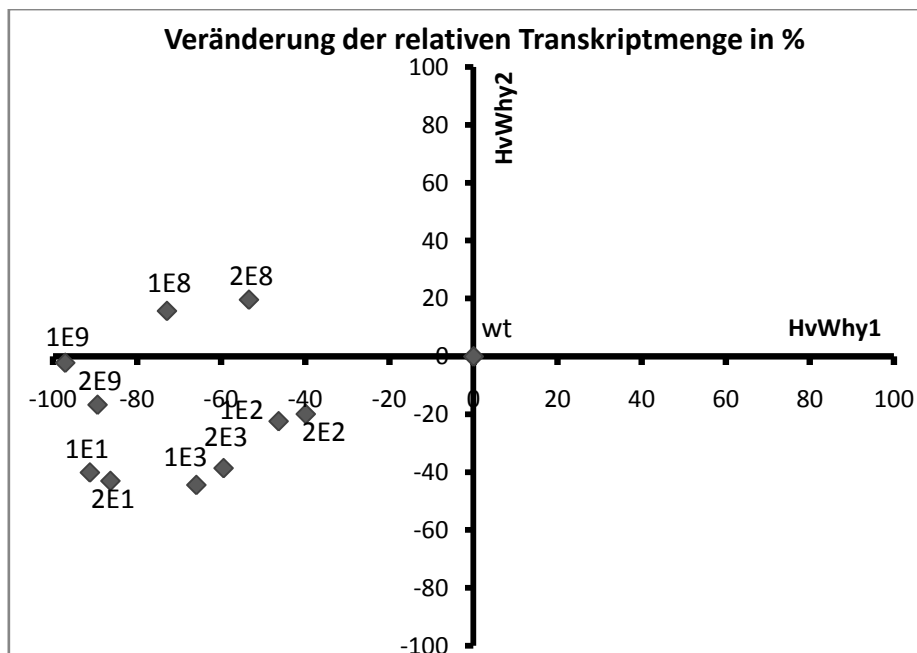


Abb.3.35: Expressionsanalysen der HvWhy1-RNAi Linien der T0-Generation.

Die Produkte zweier semiquantitativer RT-PCRs der RNAi-Linien E1, E2, E3, E8, E9 wurden densitometrisch ausgewertet, wobei der Anstieg bzw. Abfall der relativen Transkriptmenge in Bezug zum Wildtyp (wt) erfasst wurde. In (A) ist die relative Veränderung der Transkriptmengen (in %) von *Hvwhy1* zu *HvS40* und in (B) von *Hvwhy1* zu *Hvwhy2* dargestellt.

Die hohen Steigerungsraten von *HvS40* liegen darin begründet, dass die Menge an Transkript des Wildtyps gleich 100 % gesetzt wurde, obwohl kaum Transkripte vorhanden waren. Deswegen führen kleine Änderungen der *HvS40*-Transkriptmenge des Wildtyps in den RNAi-Linien zu großen prozentualen Steigerungen (Abb. 3.35). Die RNAi-Linie E2 zeigte nicht nur die geringste Abnahme der *Hvwhy1*-Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp, sondern auch eine geringe Transkriptakkumulierung von *HvS40* (Abb. 3.35 A).

Weiterhin wurde auf molekularbiologischer Ebene erfasst, welchen Effekt die Herunterregulierung der *Hvwhy1*-Transkriptmenge auf die Expression anderer Gene hat. Zunächst wurde die Genexpression des *Hvwhy2*-Gens überprüft, um die Möglichkeit der Regulierung durch das verwandte Whirly1-Protein zu erkennen.

Die densitometrische Analyse der semiquantitativen RT-PCR von *Hvwhy2* ergab ebenfalls eine tendenzielle Herunterregulierung im Vergleich zum Wildtyp. Es konnte nur in der Linie E8 eine geringe gegensätzliche Transkriptveränderung von *Hvwhy1* und *Hvwhy2* beobachtet werden (Abb. 3.35 B).

Zusätzlich wurde ein weiteres seneszenzassoziiertes Gen, *HvSF6*, untersucht, um eine mögliche generelle Repression von SAGs festzustellen. Außerdem wurde der Einfluss auf die Expression exemplarisch ausgewählter kernkodierter Gene, die posttranslational in die Plastiden importiert werden, wie *petE*, *Fe-SOD* und *rbcS*, überprüft. Dies sollte zeigen, ob HvWhy1 als Transkriptionsfaktor Einfluss auf den Gehalt an plastidär lokalisierten Proteinen hat. Bei den zusätzlich überprüften kernkodierten Genen *HvSF6*, *petE*, *Fe-SOD* und *rbcS* konnte aufgrund der erhaltenen PCR-Produkte keine eindeutige Korrelation auf die verringerte *Hvwhy1*-Transkriptmenge festgestellt werden.

Zusätzlich wurde überprüft, ob die Proteinmenge von HvWhy1 in den transgenen Linien mit den beobachteten relativen *Hvwhy1*-Transkriptmengen korreliert. Dafür wurde aus demselben Blattmaterial Gesamtprotein isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Linien mit stark verringerter *Hvwhy1*-Transkriptmenge zeigen kaum noch HvWhy1-Protein (Abb. 3.36). Nach Inkubation mit dem aufgereinigten Peptid-HvWhy1-Antikörper konnte die höchste Menge an HvWhy1-Protein in der Wildtypprobe beobachtet werden. Kein HvWhy1-Protein wurde in den RNAi-Linien E1 und E9 nachgewiesen. Die Linien E2 und E3 enthalten deutliche Mengen an HvWhy1-Protein. Die Linien mit der stärksten Verringerung der mRNA weisen auch die geringste Menge an HvWhy1-Protein auf (Abb. 3.36). Diese Analyse bestätigt erneut die bereits beschriebene Spezifität des Peptid-HvWhy1-Antikörpers.

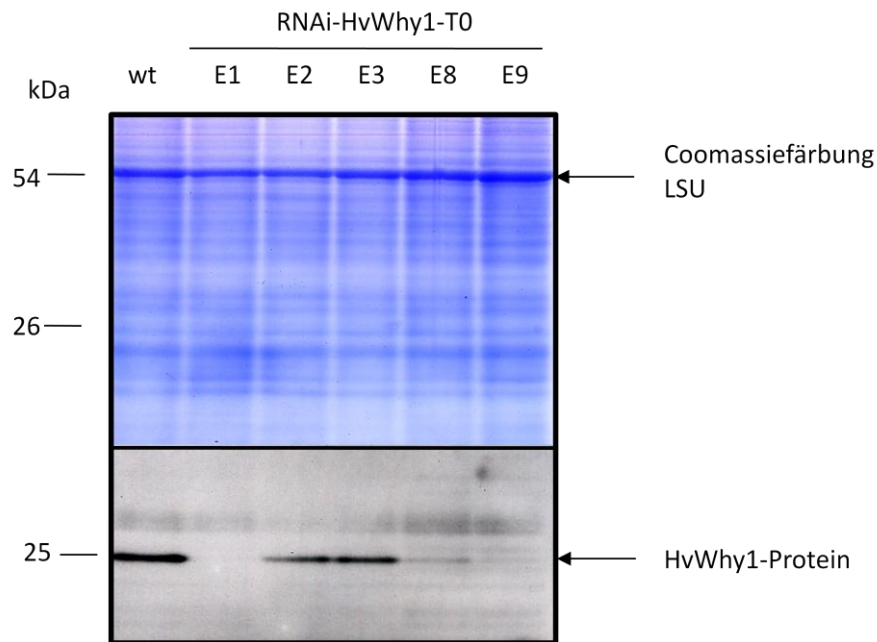


Abb.3.36: Immunologischer Nachweis des HvWhy1-Proteins in Proteinextrakten, die aus dem Gewebe der Blattscheide von fünf transgenen Linien (E1, E2, E3, E8, E9) und des Wildtyps isoliert wurden. 10 µg Protein wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf einer Membran immobilisiert. Zur Kontrolle der Proteinbeladung wurde das Polyacrylamidgel mit Coomassie gefärbt. Die Immunodekoration wurde mit dem Peptid-HvWhy1-Antikörper (siehe 2.5.10) durchgeführt. Die Antikörperdetektion fand mittels ECL-System statt.

Zur Überprüfung, ob die beobachteten Veränderungen der Transkriptmengen von *Hvwhy2* und *HvS40* in den RNAi-Linien auf die Abnahme der HvWhy1-Proteinmenge zurückzuführen sind, wurde eine größere Anzahl an transgenen Linien untersucht. Für diese Analyse wurden von RNAi-Linien zu einem späteren Zeitpunkt (Tabelle 3.1, Probenahme 2) wiederum Blattmaterial im Bereich der Blattscheide für die Isolierung von Gesamt-RNA und Gesamtprotein verwendet (Abb. 3.33). Zunächst wurde nach Synthese der cDNA die relative Menge an *Hvwhy1*-Transkript durch Amplifizierung mit spezifischen Oligonukleotiden analysiert. Die RNAi-Linien E4, E10, E13, E17 und E18 zeigten keine Erniedrigung der *Hvwhy1*-Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.37 A). Diese Beobachtung wurde densitometrisch bestätigt (Abb. 3.38). Eine Verringerung in der Transkriptmenge von *Hvwhy1* konnte dagegen in den Linien E5, E6 und E7 nachgewiesen werden (Abb. 3.37 A, Abb. 3.38). In den Linien E20 und E26 findet auch eine Abnahme der *Hvwhy1*-mRNA-Menge statt, wobei der Grad der Verringerung auf Grund abweichender Ergebnisse bei der PCR nicht eindeutig festgestellt werden konnte. Für die Linien E5, E6, E7, E20 und E22 wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Immobilisierung von Gesamtproteinextrakten die auf Transkriptebeobachtete Herunterregulierung des *Hvwhy1*-Gens auch auf Proteinebene festgestellt (Abb. 3.37 B).

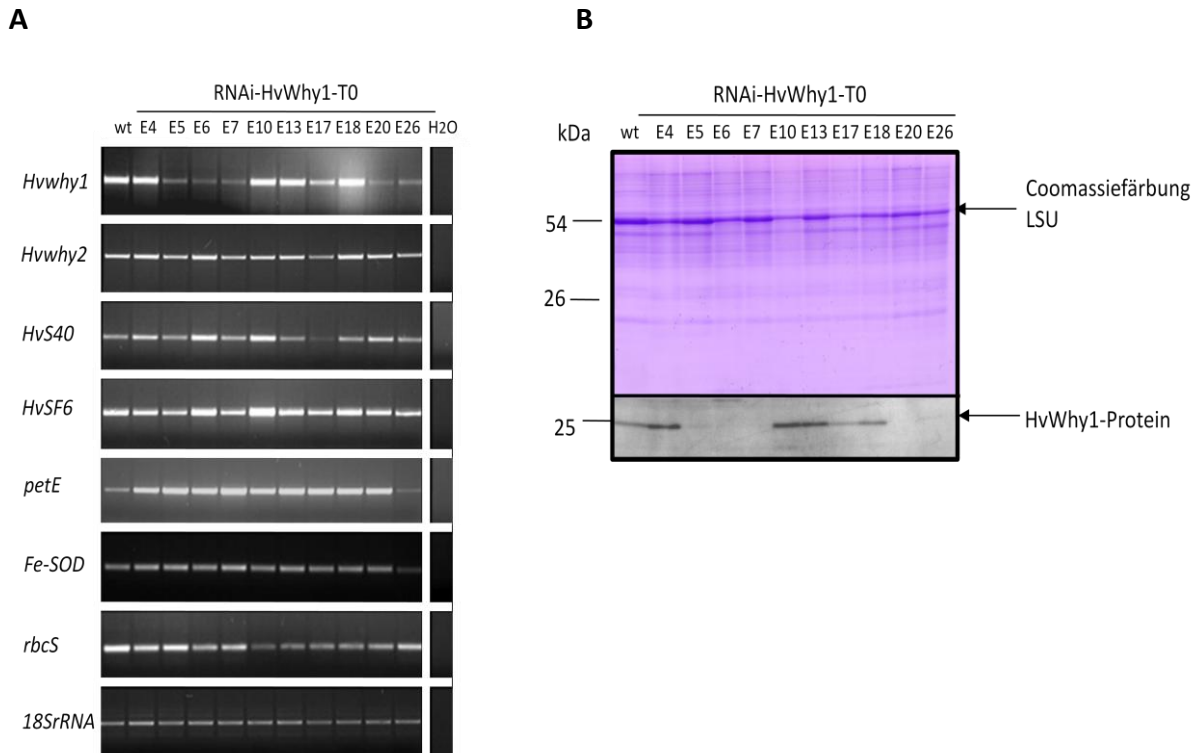


Abb. 3.37: Expressionsanalyse und immunologische Untersuchung der HvWhy1-RNAi Linien.

A: Nachweis des *Hvwhy1*-Transkriptes. Gewebe aus transgenen Pflanzen (RNAi-HvWhy1) der Generation T0 wurde im Vergleich zum Wildtyp mittels semiquantitativer RT-PCR in Hinblick auf die Expression des *Hvwhy1*-Gens untersucht. Zusätzlich wurde die Expression weiterer Gene wie *Hvwhy2*, *Hvs40*, *Hvsf6*, *petE*, *Fe-SOD* und *rbcS* in den RNA-Interferenz Linien analysiert. Als Kontrolle der Beladung diente der Nachweis des konstitutiven 18S rRNA-Transkriptes. H<sub>2</sub>O: Kontrolle des PCR-Ansatzes ohne Zugabe von cDNA. Exemplarische Darstellung einer PCR von mindestens drei unabhängig durchgeführten Ansätzen.

B: Immunologischer Nachweis des HvWhy1-Proteins in den Proteinextrakten isoliert aus dem Gewebe transgener Linien (E4, E5, E6, E7, E10, E13, E17, E18, E20, E26) und des Wildtyps. Die Proteinextrakte (20 µg) wurden auf einem 14 % (w/v) Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf einer Membran immobilisiert. Als Beladungskontrolle wurde das Polyacrylamidgel mit Coomassie gefärbt. Die Immunodekoration der Membran wurde mit dem Peptid-HvWhy1-Antikörper (siehe 2.5.10) durchgeführt.

Ebenso wie bei der ersten Probenahme wurde geprüft, inwieweit die Verringerung der *Hvwhy1*-Transkriptmenge eine Auswirkung auf die Expression anderer Gene hat. Für die Gene *SF6*, *petE*, *Fe-SOD* und *rbcS* konnte keine deutliche Korrelation zwischen Abnahme der HvWhy1-Transkriptmenge und Veränderung der Expression beobachtet werden. Zusätzlich wurden die semiquantitativen RT-PCRs von *Hvwhy2* und *Hvs40* densitometrisch ausgewertet. Es wurde wie bereits bei der ersten Probenahme kaum Einfluss auf die Expression des *Hvwhy2*-Gens sichtbar (Abb. 3.37 A, 3.38). Für zwei der untersuchten Linien (E5, E7), die eine Herunterregulierung der *Hvwhy1*-Transkriptmenge zeigten, wurde derselbe Effekt für das *Hvwhy2*-Gen beobachtet. Zwei weitere Linien E6 und E20 zeigten dagegen eine Induktion der *Hvwhy2*-Genexpression und damit antagonistisches Verhalten (Abb. 3.38) wie die Linie E8 der ersten Probenahme (Abb. 3.35 B).



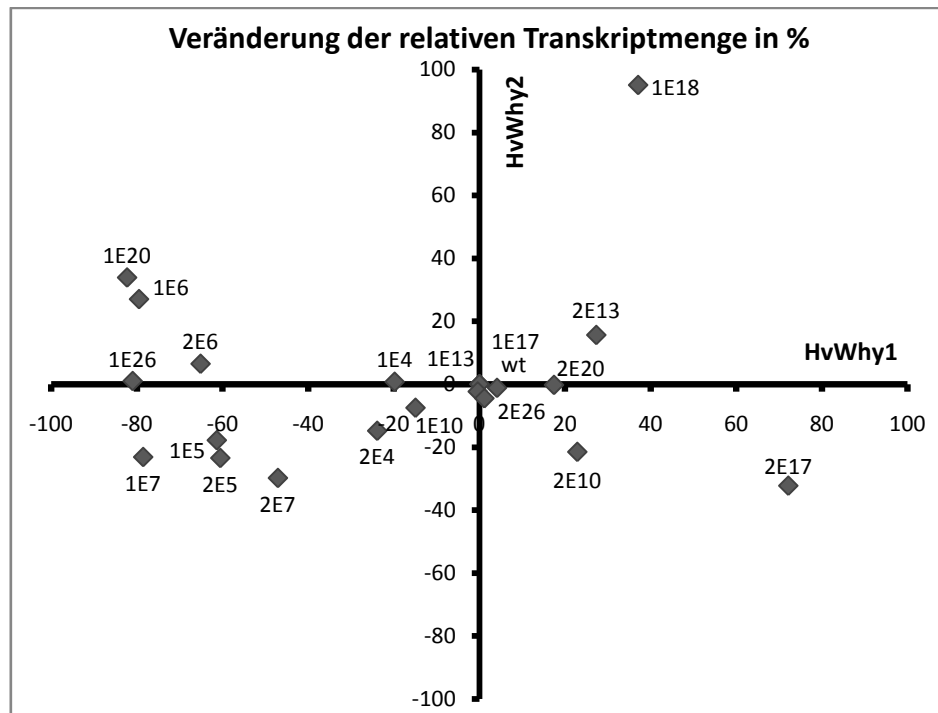


Abb. 3.38: Expressionsanalysen der HvWhy1-RNAi Linien der T0-Generation.

Die Produkte zweier semiquantitativer RT-PCRs der RNAi-Linien E4, E5, E6, E7, E10, E13, E17, E18, E20 und E26 wurden densitometrisch ausgewertet, wobei der Anstieg bzw. Abfall der relativen Transkriptmenge in Bezug zum Wildtyp (wt) erfasst wurde. Es ist die relative Veränderung der Transkriptmengen (in %) von *Hvwhy1* zu *Hvwhy2* dargestellt.

In allen RNAi-Linien, nicht nur bei denen, die eine Verringerung der *Hvwhy1*-Transkriptmenge zeigten (E4, E5, E6, E7, E20, E26), konnte eine erhöhte Induktion der Expression des *HvS40*-Gens festgestellt werden (Abb. 3.37 A, 3.39). Nur in der RNAi-Linie E17 wurde eher eine Abnahme der *HvS40*-RNA-Menge beobachtet. Die densitometrische Auswertung der Expression des *HvS40*-Gens ist für beide Probenahmen (Abb. 3.35 A, Abb. 3.39) in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Die Auswertung der ersten Probenahme (grau unterlegt) zeigt, wie bereits beschrieben, eine deutliche Korrelation zwischen Induktion der *HvS40* Genexpression und Verringerung der *Hvwhy1*-Transkript- bzw. Proteinmenge. Bei der zweiten Probenahme ist dieser Effekt nur bei den rot eingerahmten RNAi-Linien (E5, E6, E7, E20, E26) sichtbar (Tabelle 3.2).

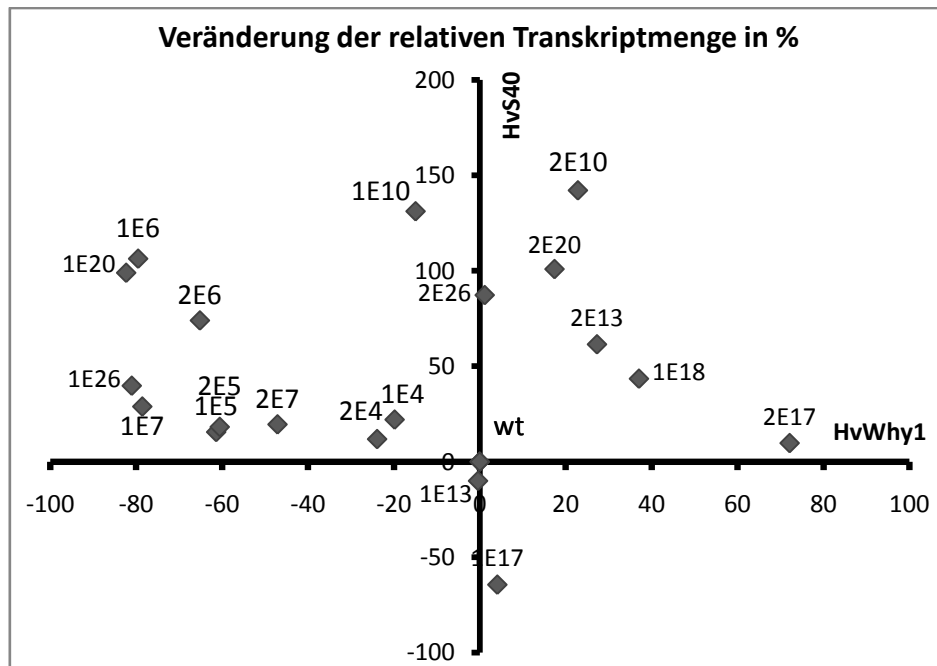


Abb. 3.39: Expressionsanalysen der HvWhy1-RNAi Linien der T0-Generation.

Die Produkte zweier semiquantitativer RT-PCRs der RNAi-Linien E4, E5, E6, E7, E10, E13, E17, E18, E20 und E26 wurden densitometrisch ausgewertet, wobei der Anstieg bzw. Abfall der relativen Transkriptmenge in Bezug zum Wildtyp (wt) erfasst wurde. Es ist die relative Veränderung der Transkriptmengen (in %) von *Hvwhy1* zu *HvS40* dargestellt.

Ein Vergleich der densitometrischen Auswertungen beider Beprobungen zeigt zudem, dass bei der zweiten Probenahme der induzierte Anstieg der Transkriptmenge von *HvS40* schwächer ausgeprägt ist (Abb. 3.39). Dies kann entweder an Positionseffekten oder an dem fortgeschrittenen Alter der Pflanzen liegen (bei der ersten Probenahme waren die Pflanzen 49 Tage jünger). Im Gegensatz zur ersten Beprobung zeigt daher der Wildtyp eine starke Induktion des *HvS40*-Genes (Abb. 3.37 A). Deshalb ist auch der prozentuale Anstieg der Induktion der Genexpression von *HvS40* in den Linien E5, E6, E7, E20 und E26 geringer (Abb. 3.39) als bei Abbildung 3.35 A.

Tabelle 3.2: Zusammenfassung der Resultate der Expressionsanalyse von *Hvwhy1* und *HvS40* sowie des immunologischen Nachweises für HvWhy1. Die Pfeile kennzeichnen die Art der Änderung (→: keine Änderung, ↓↑: starke Zu- bzw. Abnahme, ↘↙: schwache Zu- bzw. Abnahme), () beschreiben eine hohe Standardabweichung nach densitometrischer Analyse und die roten Kästen markieren die RNAi-Linien, die eine Korrelation zwischen Herunterregulation der Transkriptmenge bzw. der Menge an HvWhy1-Protein und Hochregulation des *HvS40* Transkriptes zeigen. Grau unterlegt sind die Linien der ersten Probennahme

| Name der RNAi-Linien der HvWhy1-Knockdownmutante | Änderungen der relativen <i>Hvwhy1</i> -Transkriptmenge zum Wildtyp | Änderungen der Proteinmenge von HvWhy1 zum Wildtyp | Änderungen der relativen <i>HvS40</i> -Transkriptmenge zum Wildtyp |
|--|---|--|--|
| E1   | ↓   | ↓  | ↗  |
| E2   | ↘   | ↘  | ↗  |
| E3   | ↘   | ↘  | ↑  |
| E8   | ↘   | ↓  | ↑  |
| E9   | ↓   | ↓  | ↑  |
| E4   | ↘   | ↑  | →  |
| E5   | ↓   | ↓  | ↗  |
| E6   | ↓   | ↓  | ↑  |
| E7   | ↓   | ↓  | ↑  |
| E10  | →   | ↑  | ↑  |
| E13  | →   | ↗  | →  |
| E17  | →   | →  | ↓  |
| E18  | ↑   | →  | ↗  |
| E20  | (↘)   | ↓  | ↑  |
| E22  | (↘)   | ↓  | ↑  |

### 3.6 Immunologischer Nachweis des Whirly2-Proteins

#### 3.6.1 Charakterisierung eines Antikörpers, der gegen das HvWhy2-Protein gerichtet ist

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch ein polyklonaler Antikörper hergestellt, der gegen das rekombinante HvWhy2-Protein gerichtet ist (siehe 3.1.3).

Nach Erhalt von 1,5 mg eluiertem HvWhy2-Protein wurde dieses für die Antikörperproduktion in Kaninchen eingeschickt (Biogenes, Berlin). Zum Nachweis der Spezifität des erhaltenen Antikörperserums wurde dieses im Vergleich zum entsprechenden Präimmunsersum getestet. Dafür wurden 100 ng bzw. 10 ng des rekombinanten HvWhy2-Proteins gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf einer Membran immobilisiert. Nur das Antikörperrohserum konnte das rekombinante Protein, das ein Molekulargewicht von ca. 26 kDa hat, nachweisen (Abb. 3.40 A, B). Zusätzlich wurden 100 ng des verwandten HvWhy1-Proteins (siehe 3.1.3) sowie 100 ng HvWhy2-Protein gelelektrophoretisch aufgetrennt und immobilisiert. Das HvWhy2-Rohserum weist nur das rekombinante HvWhy2-Protein nach. Das rekombinante HvWhy1-Protein mit einem Molekulargewicht von 24 kDa wird nicht erkannt, jedoch ein höhermolekulares, vermutlich bakterielles Protein (Abb. 3.40 C).

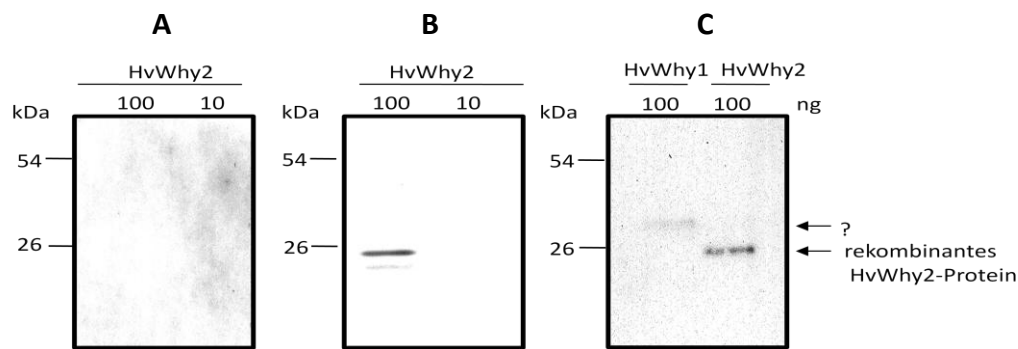


Abb. 3.40: Überprüfung der Spezifität und Sensitivität des HvWhy2-Antikörpers.

Es wurden zwei Membranen hergestellt, auf denen 10 ng und 100 ng rekombinantes HvWhy2-Protein nach Auftrennung immobilisiert wurden. Ein Filter wurde mit dem Präimmenserum (A) und der andere mit dem HvWhy2-Antikörper-Rohserum (B) inkubiert. Es wurden 100 ng rekombinantes HvWhy1- und rekombinantes HvWhy2-Protein aufgetrennt und immobilisiert. Anschließend wurde diese dritte Membran mit HvWhy2-Rohserum (C) inkubiert (2.5.10). Die Antikörperdetektion fand mit dem ECL-System statt und die Pfeile kennzeichnen das rekombinante HvWhy2-Protein.

Zur weiteren Prüfung der Spezifität des Antikörpers wurde eine steigende Menge an HvWhy2-Protein gelelektrophoretisch aufgetrennt und immobilisiert. Es wurden drei identische Membranen hergestellt. Eine Membran wurde mit aufgereinigtem HvWhy2-Antikörper ohne Zusatz von Protein inkubiert. Die zweite Membran wurde mit einer Antikörperlösung unter Vorinkubation mit rekombinantem HvWhy2-Protein und die dritte mit BSA versetzt. Die Antikörperdetektion der zweiten Membran zeigt eine geringfügige Abschwächung der nachgewiesenen rekombinanten HvWhy2-Proteine im Unterschied zur Behandlung ohne Protein bzw. mit BSA und weist somit auf die Spezifität dieses Nachweises hin (Abb. 3.41).

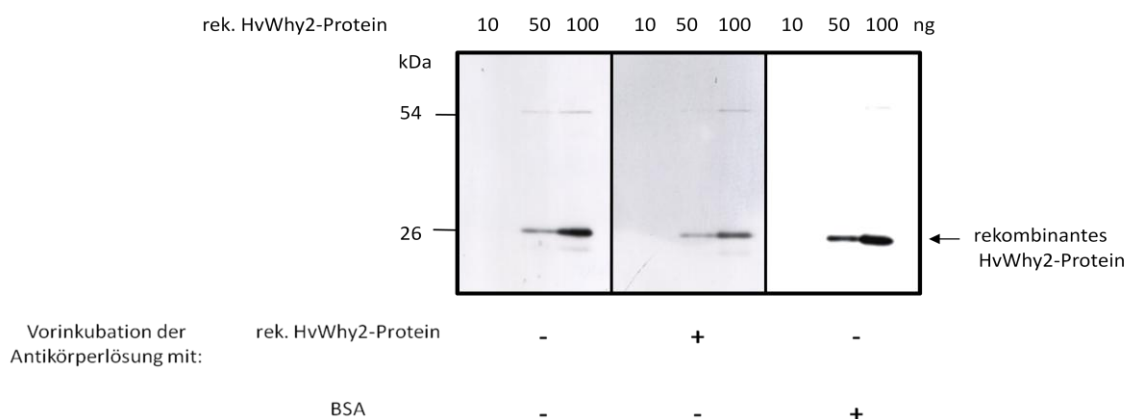


Abb. 3.41: Immunologische Analyse von rekombinantem HvWhy2-Protein. Es wurden 10 ng, 50 ng und 100 ng rekombinantes HvWhy2-Protein gelelektrophoretisch aufgetrennt und immobilisiert. Drei gleich beladene Membranen wurden mit dem HvWhy2-Antikörper (siehe 2.5.10) inkubiert. Eine Antikörperlösung wurde mit rekombinantem Protein (10 µg) und eine zweite mit BSA (10 µg) vorbehandelt. Die Antikörperdetektion erfolgte mit dem ECL-System. Die Position des rekombinanten HvWhy2-Proteins ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Das Rohserum wurde aufgereinigt, indem reduziertes rekombinantes HvWhy2-Protein an eine Matrix gebunden wurde (siehe 2.5.12), an die der Antikörper binden und anschließend eluiert werden konnte. Für die Überprüfung der Sensitivität wurde eine steigende Menge an rekombinantem HvWhy2-Protein auf eine Membran aufgetragen und immobilisiert. Während mit dem Rohserum noch eine Proteinmenge bis 10 ng nachgewiesen wird, kann dagegen der aufgereinigte Antikörper nur noch eine Proteinmenge von 1 µg nachweisen (Abb. 3.42).

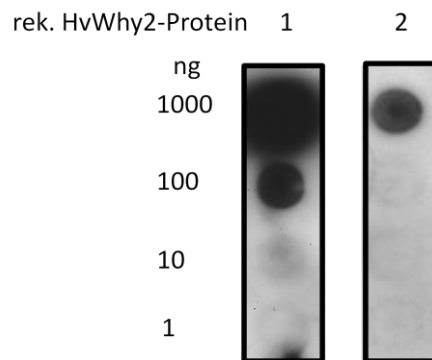


Abb. 3.42: Untersuchungen zur Sensitivität des aufgereinigten HvWhy2-Antikörpers im Vergleich zum Rohserum. Die Menge an rekombinantem HvWhy2-Protein von 1 ng bis 1000 ng wurde aufgedotet und immobilisiert sowie mit entsprechenden Antikörperlösungen (1 = Rohserum, 2 = aufgereinigter Antikörper, siehe 2.5.10) inkubiert. Die Antikörperdetektion erfolgte mit dem ECL-System.

### 3.6.2 Immunologischer Nachweis des Whirly2-Proteins in Proteinextrakten aus Gerstenprimärblättern

Mit Hilfe des HvWhy2-Antikörpers wurde versucht, das HvWhy2-Protein im Blattgewebe und auf subzellulärer Ebene nachzuweisen. Bei diesen immunologischen Untersuchungen traten jedoch folgende Probleme auf: Die Sensitivität des aufgereinigten Antikörpers war so gering (Abb. 3.42), dass kein Proteinnachweis auf Gesamtproteinebene möglich war. Im Blattgewebe konnte nur durch den Vergleich Präimmunserum und Rohserum auf spezifische Antigen-Antikörperreaktionen geschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Mit dem aufgereinigten Antikörper konnte nur auf subzellulärer Ebene ein Proteinnachweis erfolgen (Abb. 3.43).

Aufgrund der Aminosäuresequenz war zu erwarten, dass das HvWhy2-Protein in die Mitochondrien importiert wird (siehe 3.1.1). Die aus Blattgewebe hergestellten Mitochondrienfraktionen (siehe 2.5.5) waren stets mit Plastiden verunreinigt. Es wurde zwar eine Ankonzentration der Mitochondrien erreicht, aber aufgrund einer ähnlichen Dichte kann eine Verunreinigung mit Chloroplasten nicht ausgeschlossen werden, so wurde das plastidäre Protein Cytb 559 in der Mitochondrienfraktion nachgewiesen. HvWhy2 kann somit nicht eindeutig der Mitochondrienfraktion sondern nur einer Organellenfraktion zugeordnet werden (Abb. 3.43).

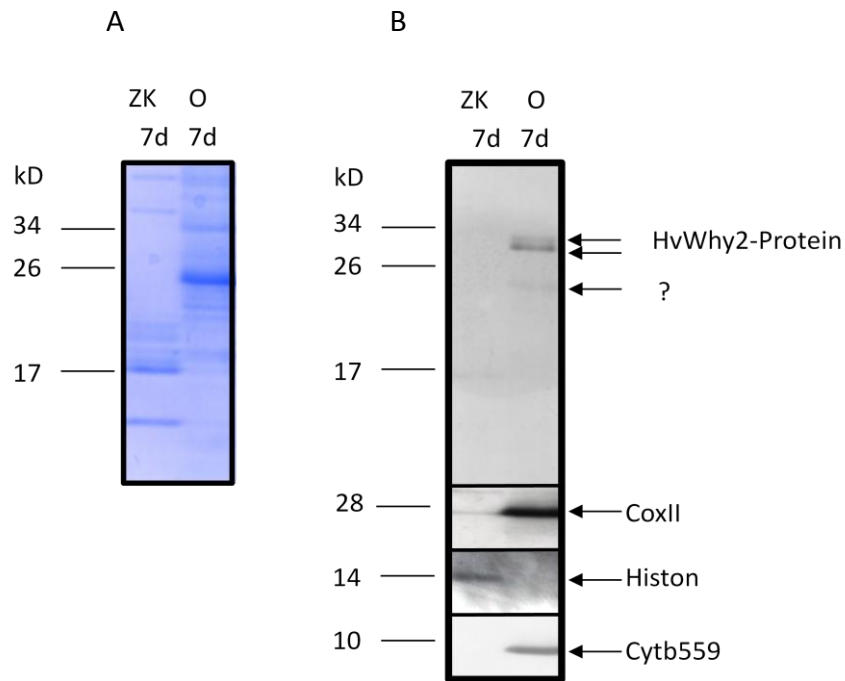


Abb. 3.43: Immunologische Untersuchung der HvWhy2-Proteine in Organellenfraktionen (O) und Zellkernfraktionen (ZK).

A: Zur Kontrolle der Beladung wurde das Polyacrylamidgel mit Coomassie angefärbt.

B: Immunologischer Nachweis der Lokalisierung des HvWhy2-Proteins in Zellkern- und Organellenfraktionen (10 µg), isoliert aus sieben Tage alten Gerstenprimärblättern. Es wurden Proteine aus Zellkern und Organellen isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und immobilisiert sowie mit dem HvWhy2-Antikörper inkubiert. Zur Kontrolle der Reinheit der isolierten Fraktionen wurden Antikörper (siehe 2.5.10) gegen Histon H2B, Cytochrom b 559 und CoxII verwendet. Nachgewiesene Proteine sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

In der Organellenfraktion scheint das HvWhy2-Protein in zwei verschiedenen Formen vorzuliegen, da der HvWhy2-Antikörper neben dem Protein mit dem erwarteten Molekulargewicht von 28 kDa ein weiteres 30 kDa Protein nachweist (Abb. 3.43).

Zwischen 17 kDa und 26 kDa erkannte der Antikörper in geringerer Menge ein weiteres Protein. Ob es sich dabei um eine mögliche plastidäre Form handelt (Krause et al. 2005) ist noch unklar. In der Zellkernfraktion wurde kein HvWhy2-Protein nachgewiesen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Das Whirly1-Protein der Gerste

Bei der Untersuchung von Proteinen, die an die Promotorregion des *PR10a*-Gens (pathogenesis-related) in Kartoffel binden, wurde ein Proteinkomplex gefunden, der als Transkriptionsaktivator fungiert (Després et al. 1995). Dieser Komplex ist ein Homotetramer aus 24kDa Untereinheiten (Desveaux et al. 2000). Die charakteristische Anordnung der Monomere in einer wirbelähnlichen Struktur führte zur Benennung des Proteins als Whirly-Protein (Desveaux et al. 2002). Es wurden bisher 26 homologe Whirly-Proteine in 16 Höheren Pflanzen identifiziert (Desveaux et al. 2005). In vielen dieser Organismen sind zwei *whirly*-Gene zu finden. In *Hordeum vulgare* wurden ebenfalls zwei Whirly-Proteine nachgewiesen (Krause et al. 2005). In Gerste konnte das Whirly1-Protein bindend an der Promotorregion des seneszenzassoziierten Gens *HvS40* identifiziert werden (Dähnhardt 2003). Die Tatsache, dass diese Protein-DNA-Bindung im jungen und ausdifferenzierten und nicht im seneszenten Gewebe beobachtet werden konnte, spricht für eine mögliche Funktion des HvWhy1-Proteins als Repressor der *HvS40*-Genexpression.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Genexpression bzw. zur Proteinbiosynthese und Proteinverteilung von HvWhy1 durchgeführt. Diese geben neue Einblicke in die Entwicklungsbedingungen, unter denen das Protein gebildet wird und eine Funktion ausüben kann. Analysen zur Proteinstruktur und zu posttranslationalen Modifizierungen, wie der Phosphorylierung, geben erste Hinweise auf die Regulierung der Aktivität und werden im Folgenden diskutiert. Weiterhin wurden Untersuchungen zur subzellulären Lokalisierung des HvWhy1-Proteins während der Entwicklung des Gerstenprimärblattes durchgeführt.

#### 4.1.1 Genexpression und Modifizierung des HvWhy1-Proteins

##### 4.1.1.1 Entwicklungsabhängige Veränderung der Genexpression von *whirly1*

Immunologische Untersuchungen bestätigten, dass das Whirly1-Protein der Gerste im Primärblatt vorkommt (siehe 3.3.2). Das Blattgewebe dieser monokotylen Pflanze zeichnet sich dadurch aus, dass sich die teilungsaktiven, meristematischen Zellen an der Blattbasis befinden. Daraus resultiert ein Gradient von jungen Zellen nahe des Blattgrundes und älteren Zellen nahe der Blattspitze (Abb. 3.13). Mit Hilfe von Analysen zur Expression des *Hvwhy1*-Gens konnte festgestellt werden, dass die höchsten Mengen an *Hvwhy1*-RNA im meristematischen und jungen Blattgewebe vorliegen und die Menge im Verlauf der Ausdifferenzierung abnimmt (Abb. 3.15, 3.16). Ein leichter Anstieg ist kurz vor Beginn der Seneszenz zu beobachten, aber mit Fortschreiten der Seneszenz bleibt der RNA-Gehalt weitgehend konstant (Abb. 3.16). Im Unterschied zu den beobachteten Transkriptmengen

wurden durch immunologische Analysen nur geringe Proteinmengen im Meristem und im seneszenten Gewebe erfasst (Abb. 3.17). Es konnten allerdings hohe Mengen an HvWhy1-Protein im grünen Gewebe festgestellt werden. Die Genexpression wird auf mehreren Ebenen geregelt und bietet bereits mit der Initiation der Transkription die Möglichkeit der Regulation. Die Proteinmenge kann auch posttranskriptionell über die Stabilität der mRNA und durch die Translationsrate reguliert werden. Durch den Unterschied in der Transkript- und Proteinmenge während der Entwicklung von HvWhy1 wird deutlich, dass das *Hvwhy1*-Gen nicht nur transkriptionell, sondern auch posttranskriptionell reguliert wird. Die Abnahme der HvWhy1-Proteinmenge während der natürlichen Seneszenz, die in den Primärblättern nachgewiesen wurde (siehe 3.3.2), zeigt sich auch in Fahnenblättern bei Freilandstudien (siehe 3.4.3).

Der Prozess der Seneszenz kann in der Pflanze auch durch eine mehrtägige Dunkelphase ausgelöst werden. Dieser als dunkelinduzierte Seneszenz bezeichnete Vorgang stellt jedoch nur in manchen Aspekten ein zur natürlichen Seneszenz vergleichbares System dar (Becker und Apel 1993, Weaver und Amasino 2001). Auch im Hinblick auf die Expression des *Hvwhy1*-Gens unterscheiden sich die Prozesse der natürlichen Seneszenz und der dunkelinduzierten Seneszenz. Im Vergleich zu ausgewachsenen Blättern nach 7 Tagen Anzucht nimmt die Menge an *Hvwhy1*-RNA während der natürlichen Alterung zu. Da jedoch die Proteinmenge im Verlauf dieser Entwicklung abnimmt, ist anzunehmen, dass entweder der Bedarf für Neusynthese des HvWhy1-Proteins erhöht ist oder weniger HvWhy1-Protein translatiert wird bzw. die Proteinstabilität verringert ist. Eine zweitägige Dunkelphase zeigte aber keinen Einfluss auf die Genexpression, weder auf der mRNA-Ebene noch auf der Proteinebene. Es wurde bereits im Vorfeld dieser Arbeit angenommen, dass das HvWhy1-Protein eine Funktion als Repressor des *HvS40*-Gens ausübt (Dähnhardt 2003). Dieses seneszenzassoziierte Gen wird sowohl während der natürlichen Seneszenz als auch durch die dunkelinduzierte Seneszenz induziert (Dähnhardt 2003). Es scheint, dass HvWhy1 nur unter bestimmten Bedingungen die Funktion als Repressor des *HvS40*-Gens ausübt. So wird während der dunkelinduzierten Seneszenz trotz des vorhandenen HvWhy1-Proteins im Blattgewebe die Expression des *HvS40*-Gens nicht reprimiert. Dies spricht für die Beteiligung weiterer Faktoren an der Regulation des *HvS40*-Gens.

#### **4.1.1.2 Einfluss von Licht auf die *whirly1*-Genexpression**

Im Unterschied zu anderen Pflanzen wie Spinat, Hirse und Erbse ist die Blattentwicklung in Gerste lichtunabhängig (Baumgartner et al. 1993). Wenn Gerstenprimärblätter in Dunkelheit angezogen werden (siehe 1.1), entwickeln sich aus den Proplastiden Etioplasten. Bei der Ergrünung von etiolierten Keimlingen kommt es zur Umwandlung von Etioplasten in Chloroplasten.

Im monokotylen Gerstenprimärblatt geht ein Altersgradient der Zellen einher mit der Chloroplastenentwicklung (Lopez-Juez und Pyke 2005, Baumgartner et al. 1989, Mullet 1988). Die HvWhy1-Proteinmenge nimmt im photosynthetischen Gewebe mit



ausdifferenzierten Chloroplasten zu und im Verlauf der Seneszenz wieder ab. Somit verhält sich die Verteilung des Whirly1-Proteins in der Gerste ähnlich den Proteinen, die an der Photosynthese beteiligt sind (Baumgartner 1993, Klein und Mullet 1987, Mullet und Klein 1987). Proteinkomponenten der Photosynthese, wie Cyt b559 und Chlorophyllbindeproteine, werden während der lichtinduzierten Entwicklung der Proplastiden zu Chloroplasten verstärkt gebildet (Batschauer et al. 1986). Erst nach Abschluss der Chloroplastenentwicklung wird die Translation verringert (Baumgartner et al. 1993). Etioplasten (siehe 1.1) weisen zwar viele membrangebundene und lösliche Proteine wie die SSU auf (Batschauer et al. 1986), beinhalten aber keine Chlorophyllbindeproteine von PS I und PS II (Mullet 1988). Zusätzlich ist die Assoziation der Chlorophyllbindeproteine mit Chlorophyll für die Proteinstabilität notwendig bzw. geringe Translationsraten verhindern eine Akkumulation dieser Proteine in Dunkelheit (Klein und Mullet 1986). Die Bildung von Photosystemkomponenten, wie der Chlorophyllbindeproteine Lhca1 und Lhcb1 sowie „early-light induced“ Protein ELIP, wird durch Licht sowohl auf der Transkriptebene als auch auf der Proteinebene reguliert (siehe 3.3.3) (Mullet 1988). Die Expression des Gens für das ELIP wird sehr früh nach Beginn der Belichtung induziert und nimmt bereits nach vierstündiger Belichtung wieder ab (Abb. 3.20) (Pötter und Kloppstech 1993). Die Genexpression der Chlorophyllbindeproteine wird ebenso durch Licht induziert. Besonders deutlich ist diese Korrelation zwischen Belichtungsdauer und Transkriptmenge der Chlorophyllbindeproteine in der unteren Blattregion. Je ausdifferenzierter die Etioplasten sind, desto schneller scheint die entsprechende Genexpression angeschaltet zu werden (Segment II). Scheinbar reichen bereits geringste Mengen an Licht aus, um die Expression der Gene *Lhca1* und *Lhcb1* in der apikalen Blattregion auszulösen (siehe 3.3.3), das reife Protein Lhca1 ist jedoch erst im ausdifferenziertem Gewebe (Segment II) nach längerer Belichtung nachzuweisen. Eine andauernde Belichtung bewirkt gleichfalls eine starke Zunahme der Chlorophyllkonzentration (Abb. 3.19). Die Umwandlung von Protochlorophyllid zu Chlorophyll ist lichtabhängig. Damit dieses Chromophor nicht zum Radikal wird, muss es nicht-kovalent an die neu gebildeten Chlorophyllbindeproteine (Abb. 3.21) gebunden werden. Für das *whirly1*-Gen konnte durch die Belichtung auf Transkriptebene eine Zunahme im Vergleich zu gleich altem, dunkel angezogenem Gewebe (Segment II) beobachtet werden, auf Proteinebene hingegen wurde kein eindeutiger Einfluss erfasst (Abb. 3.20, 3.21). Da bereits die mRNA und das reife Protein in dunkel angezogenem Gewebe nachzuweisen sind und sich die Mengen an HvWhy1-Protein auch während der Belichtung nicht ändern, scheinen die Mengenunterschiede in verschiedenen ausdifferenzierten Geweben nur vom Zellalter abzuhängen und nicht vom Licht.

#### 4.1.1.3 Posttranslationale Modifizierung des Whirly1-Proteins

Sowohl die Menge als auch die Aktivität eines Proteins können posttranslational reguliert werden. Diese Modifizierungen können durch externe und interne Faktoren ausgelöst werden und können die Struktur, Funktion sowie die Lebensdauer und die Lokalisierung von Proteinen beeinflussen.

Posttranslationale Veränderungen können unter anderem durch Phosphorylierung, Acetylierung, Glykosylierung und Sumoylierung herbeigeführt werden. Die partiell vorhandene Aminosäuresequenz des Whirly1-Proteins der Gerste zeigt mehrere mögliche Phosphorylierungsstellen (siehe 3.1.1). Für das in der Promotorregion bindende Tetramer, das aus vier StWhy1-Proteinen besteht und als Aktivator des *PR10a*-Gens beschrieben ist, wurde eine Veränderung der DNA-Bindeaktivität nach Phosphatasebehandlung nachgewiesen (Després et al. 1995). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Phosphorylierung des rekombinanten HvWhy1-Proteins *in vitro* gezeigt (siehe 3.1.4). Zusätzlich konnte bei der Überprüfung der Phosphorylierbarkeit des rekombinanten HvWhy1-Proteins ein weiteres spezifisches Signal mit einem Molekulargewicht von 54 kDa identifiziert werden (Abb. 3.7). Unter der Voraussetzung, dass es sich bei dem nachgewiesenen Protein aufgrund des Molekulargewichtes um ein HvWhy1-Dimer handelt, ist anzunehmen, dass entweder vermittelt durch den Prozess der Phosphorylierung die Dimerisierung aktiviert wurde oder dass sowohl das Monomer als auch das Dimer phosphoryliert werden können.

Im Pflanzengewebe sowie heterolog in *E. coli* wurde ebenfalls unter denaturierenden Bedingungen im Western-„Blot“ ein höhermolekulares Protein von 54 kDa (Abb. 3.25) nachgewiesen. Dies zeigt, dass das HvWhy1-Protein zur Komplexbildung befähigt ist. Erste Untersuchungen sprechen für eine hohe Stabilität des möglichen HvWhy1-Oligomers. Es wurde untersucht, ob sich das mögliche Dimer durch Erhöhung denaturierender Bedingungen in seine beiden Untereinheiten separieren lässt. Hohe Konzentrationen an Harnstoff, CuCl, EDTA, NaCl, NaI,  $\beta$ -Mercaptoethanol, Guanidiniumhydrochlorid, KCl sowie pH-Veränderungen und Hydrolyse mit DNaseI bzw. RNaseA hatten keinen Einfluss auf die nachgewiesenen Mengen des höhermolekularen 54 kDa Proteins (Tabelle 7.1). Falls es sich um ein HvWhy1-Oligomer handelt, bedeutet dies, dass die Monomere eine kovalente Bindung eingegangen sein müssten. Kovalente Bindungen entstehen zum Beispiel bei der Sumoylierung. Sumoylierte Proteine können wie bei einer Ubiquitylierung mehrere SUMO-Konjugate aufweisen (Palancade und Doye 2008, Vertegaal 2007). Dies würde aufgrund der Erhöhung um jeweils 10 kDa des Molekulargewichtes des Proteins nach Anheftung des SUMOs (Mahajan et al. 1997) auch weitere Signale im Western-„Blot“ erklären (Abb. 3.25 B). In Pflanzen ist jedoch diese Art der posttranslationalen Modifizierung kaum erforscht. Eine Beteiligung in Stressantworten, wie auf Pathogenbefall oder in dem durch Abscisinsäure vermittelten Signalweg, konnte für sumoylierte Proteine gezeigt werden (Novatchkova et al. 2004). Kurepa et al. (2003) konnten einen dramatischen Anstieg an SUMO-Konjugaten nach Hitze- bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung beobachten. Die Annahme, dass HvWhy1 sumoyliert werden kann, wird dadurch gestützt, dass die Aminosäuresequenz von HvWhy1 ein Motiv beinhaltet (91 % Wahrscheinlichkeit), an dem eine Sumoylierung stattfinden kann (Abb. 3.1). Im

Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, die Möglichkeit zur Sumoylierung von HvWhy1 in Gewebeextrakten zu untersuchen. Jedoch konnten mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Antikörpers keine SUMO-Konjugate im pflanzlichen Gewebe identifiziert werden, d.h. dass dieser Antikörper für den Nachweis sumoylierter Proteine in Gerstenextrakten ungeeignet ist.

#### 4.1.1.4 Struktur von HvWhy1

Eine Modellierung der Tertiärstruktur (siehe 3.1.2) sollte Hinweise zur möglichen Funktion geben. Ein Vergleich mit der bereits veröffentlichten Kristallstruktur von StWhy1 (Desveaux et al. 2002) zeigte deutliche Übereinstimmung zum HvWhy1-Modell. HvWhy1 besitzt wahrscheinlich ebenso wie StWhy1 acht antiparallel angeordnete  $\beta$ -Faltblätter und drei  $\alpha$ -Helices. Somit weist auch HvWhy1 keine SSB-Protein („single-stranded binding protein“) typische OB-Faltung („oligomere binding“, siehe 1.6) auf. Ein zu der Whirly1-Quartärstruktur homologer Komplex wurde in den Mitochondrien von *Trypanosoma brucei* gefunden, dabei lagern sich die Proteine MRP1 und MRP2 („mitochondrial RNA binding protein“) zu einem Heterotetramer zusammen, welches in seiner Form des von dem StWhy1 gebildeten Homotetramer gleicht. Die Bildung des Heterotetramers ist für die Stabilisierung beider MRP-Proteine notwendig. Dieser Komplex ist in der Lage, mitochondriale RNA zu binden. Diese Bindung erfolgt dabei nicht über spezifische Motive in der Aminosäuresequenz, sondern über die räumliche Struktur der  $\beta$ -Faltblätter. Im Unterschied zu den MRP-Proteinen weisen die  $\beta$ -Faltblätter bei den Whirly-Proteinen eher aromatische und hydrophobe Aminosäuren auf. Diese Eigenschaft kann die Fähigkeit, an Ribonukleotide zu binden, beeinflussen (Schumacher et al. 2006). In Gelretardierungsexperimenten konnte für das HvWhy1-Protein neben der Fähigkeit an Einzelstrang-DNA zu binden (ERE-ähnliche Elemente und pflanzliche Telomerasequenz) auch die spezifische Bindung an RNA, die von der Telomerase als Matrize verwendet wird, gezeigt werden (Kilbiński 2007). Zusätzlich wird deutlich, dass das KGKAAL-DNA-Bindemotiv des HvWhy1-Proteins auf der Oberfläche der räumlichen Struktur zu finden ist (Abb. 3.2). Diese Beobachtung korreliert mit der bereits beschriebenen Funktion von StWhy1 und AtWhy1 als DNA-Bindeprotein (Desveaux et al. 2002, Yoo et al. 2007). Dies spricht dafür, dass das Whirly1-Protein in Gerste eine ähnliche Funktion ausüben könnte.

Ein weiteres Merkmal ist, dass HvWhy1 wie auch StWhy1 C-terminal ein Helix-Loop-Helix-Motiv aufweist. Dieses Motiv befähigt zur Komplexbildung, wobei sowohl Homo- als auch Heterodimere gebildet werden könnten (Toledo-Ortiz et al. 2003). Diese Beobachtung stützt die bereits durch das Phosphorylierungsexperiment angenommene Oligomerisierung.

Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementations-Experimente, die transient in Zwiebelepidermiszellen von Frau Dr. Ying Miao durchgeführt wurden (Grabowski et al. 2008), zeigten die Fähigkeit von HvWhy1-Monomeren zur Bildung von Homooligomeren nur im Zellkern. Es scheinen keine Homooligomere außerhalb des Zellkerns vorzukommen. Ob Heterooligomere gebildet werden können sowie deren mögliche subzelluläre Lokalisierung, ist noch nicht geklärt.

#### 4.1.2 Subzelluläre Lokalisierung des HvWhy1-Proteins

Mit Hilfe von AtWhy1-Fusionskonstrukten in transienten Transformationsansätzen sowie Importanalysen (Krause et al. 2005) konnte zwar *in vitro* ein erfolgreicher Import in die Plastiden belegt werden, eine Lokalisierung im Zellkern wurde nicht beobachtet. Für Whirly1-Homologe (siehe 1.6) wurde jedoch bereits eine Funktion im Zellkern als Transkriptionsfaktor bei der Pathogenabwehr (Desveaux et al. 2002) sowie als Regulator der Telomerlänge (Yoo et al. 2007) beschrieben. Die im vorherigen Kapitel (siehe 4.1.1) diskutierten Änderungen in der HvWhy1-Proteinmenge während der Zell- bzw. der Chloroplastenentwicklung ähneln den von plastidären Proteinen, die im photosynthetisch aktiven Gewebe eine Rolle spielen. Die Expression des *Hvwhy1*-Gens scheint jedoch nicht, wie bei einer Vielzahl an Proteinen des Photosyntheseapparates, durch Licht reguliert zu werden (siehe 4.1.1.2).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Lokalisierung des HvWhy1-Proteins in den Plastiden *in vivo* bestätigt werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass es sich sowohl in Proteinextrakten aus isolierten Plastiden sowie aufgereinigten Zellkernen desselben Gewebes nachweisen lässt (siehe 3.3.4). In Zusammenarbeit mit der Zentralen Mikroskopie wurde gezeigt, dass es in denselben Zellen sowohl im Zellkern als auch in den Plastiden verteilt vorliegt (Grabowski et al. 2008). Üblicherweise werden Proteine, die posttranslational in den Zellkern oder in die Organellen importiert werden, an cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert und dann anhand ihrer Erkennungssequenz, die N-terminal für den plastidären Import und innerhalb der kodierenden Sequenz für den Transport in den Zellkern liegt, sortiert. Proteine, die eine Erkennungssequenz für zwei Kompartimente aufweisen bzw. in zwei verschiedenen Kompartimenten vorkommen, werden als Proteine mit einem „dual targeting“ bezeichnet (Schwacke et al. 2007). Das erste in Pflanzen entdeckte duale Protein ist die Glutathionreduktase, die in den Mitochondrien und im Zellkern vorkommt (Creissen et al. 1995). Boyle und Brisson (2001) konnten auch für das SEBF-Protein zeigen, dass dieses sowohl in Kernfraktionen als auch in Chloroplastenfraktionen nachweisbar ist. Diesem SEBF-Protein wird eine Funktion als Repressor für das in die Pathogenabwehr involvierte *PR10a*-Gen zugeschrieben. Verschiedene *in silico* Analysen ergaben, dass mindestens 48 Transkriptionsfaktoren in die Plastiden importiert werden könnten (Wagner und Pfanschmidt 2006, Schwacke et al. 2007). Proteine, die sich in verschiedenen Kompartimenten befinden, können dorthin sowohl durch duale Verteilung als auch durch Relokalisierung gelangen. Bei der dualen Verteilung können durch verschiedene

Transkriptions- und Translationsstarts, differentielles Spleißen bzw. posttranslationale Modifizierung verschiedene Genprodukte mit unterschiedlichem Ziel entstehen. Dies würde jedoch zu verschiedenen N-terminalen Bereichen des Proteins führen. In Krause et al. (2005) wurde für das AtWhy1 in *in vitro* Translationsexperimenten mit cDNA gezeigt, dass zwei Vorläufer-Proteine mit unterschiedlichem Molekulargewicht entstehen können, die auf ein alternatives Startkodon hinweisen. Im Unterschied dazu weist die Aminosäuresequenz des StWhy1-Proteins kein zweites Methionin für einen möglichen alternativen Translationsstart auf. Auch für das HvWhy1-Protein konnte bisher kein Hinweis auf zwei verschiedenen große translatierte Genprodukte erhalten werden. Northern-„Blot“-Analysen (Abb. 3.15) geben keinen Hinweis auf zwei verschiedenen große Transkripte. Versuche zur Vervollständigung des 5'-Bereiches der *Hvwhy1*-cDNA waren nicht erfolgreich.

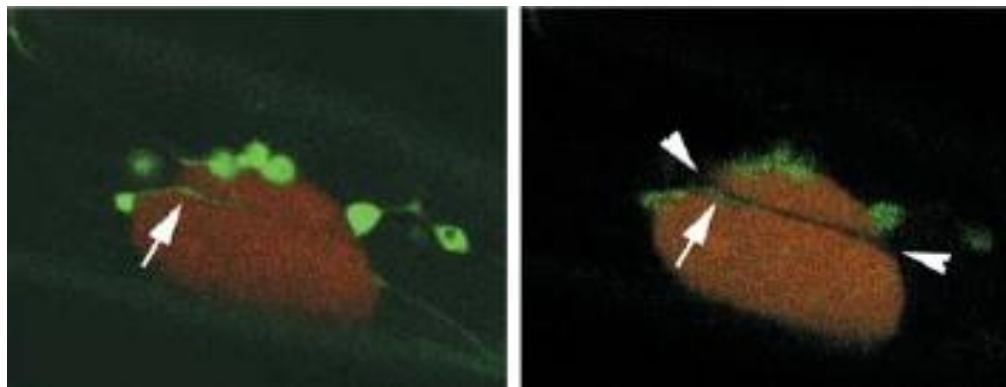
Besitzt ein Protein verschiedene Zielsequenzen, ist eine hierarchische Dominanz eines N-terminalen Transitpeptides über die interne NLS anzunehmen (Sunderland et al. 2006).

Das HvWhy1-Protein liegt in den Plastiden in seiner reifen Form vor, da nach dem Import in die Chloroplasten die N-terminale Transitsequenz abgespalten wird. Eine mögliche Erklärung dafür, dass in beiden Kompartimenten gleich große Proteine nachgewiesen werden, ist, dass das kernlokalisierte Protein erst nach dem Prozessieren bzw. Abspalten der Transitsequenz durch Peptidasen, die nur in den Plastiden vorzufinden sind, in den Kern transloziert wird. Die Möglichkeit einer Translokation aus einem Organell in den Kern wurde bereits für die mitochondriale Fumarase (Ungerma et al. 1994, Singh und Gupta 2006) und eine menschliche DEAD-Box-Helikase (Valgardsdottir et al. 2001) beschrieben, würde jedoch für ein plastidäres Protein ein Novum darstellen.

Um zu klären, ob es sich bei den kernlokalisierten und plastidären HvWhy1-Proteinen um identische Proteine handelt, wäre die Aufreinigung von Zellkernen und Plastiden erforderlich, um die jeweiligen HvWhy1-Proteine mit Hilfe einer Affinitätschromatografie zu isolieren und anschließend mit Hilfe von Massenspektrometrie zu analysieren. Dass Proteine aus den Plastiden freigesetzt werden können, zeigt der Nachweis von RubisCO über RBCs („RubisCO-containing bodies“) (Gregersen et al. 2008). Eine weitere Möglichkeit wäre die Übertragung durch Stromules. Hanson und Sattarzadeh (2008) diskutierten, dass plastidäre Proteine und andere Makromoleküle über Stromules in andere Teile der Zelle gelangen könnten. Kwok und Hanson (2004b) konnten zeigen, dass diese mit Stroma gefüllten Auswüchse der Plastiden bereits in frühen Stadien der Plastidenentwicklung einen engen physischen Kontakt zum Zellkern besitzen (Abb. 4.1) und ein Austausch von Proteinen, wie GFP und RubisCO, zwischen verbundenen Plastiden ermöglichen (Köhler et al. 1997, Kwok und Hanson 2004a). Im Verlauf der Zellentwicklung und Ausdifferenzierung der Chloroplasten verändert sich nicht nur die Plastidengröße, sondern auch die Morphologie der Stromules (Natesan et al. 2005, Hanson und Sattarzadeh 2008). Diese Stromules sind bei Proplastiden sehr lang und bei ausgewachsenen Chloroplasten nur noch in geringer Größe bzw. in geringer Anzahl zu beobachten. Lange Stromules wurden bereits in Einbuchtungen und Einkerbungen der Zellkernhülle (Abb. 4.1 A) gefunden (Hanson und Sattarzadeh 2008, Kwok und Hanson 2004b). Nicht nur der dichte Kontakt zwischen der Kernhülle und den Stromules wurde festgestellt, sondern auch eine Ansammlung von Plastiden um den Zellkern

in teilungsaktiven Geweben (Kwok und Hanson 2004b, Natesan et al. 2005). Über diese dichte Anlagerung an die Kernmembran könnte der Austausch von Proteinen und anderen Molekülen erfolgen. Da sich die Form der Stromules und die Anzahl an Plastiden mit Stromules im Verlauf der Entwicklung ändert, wird angenommen, dass sie in Zell- und Entwicklungsprozesse involviert sind (Natesan et al. 2005). In *Euglena gracilis* konnte zudem zwischen Chloroplasten und Zellkern nicht nur ein dichter Kontakt, sondern auch Verbindungsstellen (Abb. 4.1 B) identifiziert werden (Ehara et al. 1990). Ein enger Kontakt von der Chloroplastenmembran zum ER wurde auch in *Arabidopsis thaliana* beschrieben (Andersson et al. 2007).

**A**



**B**

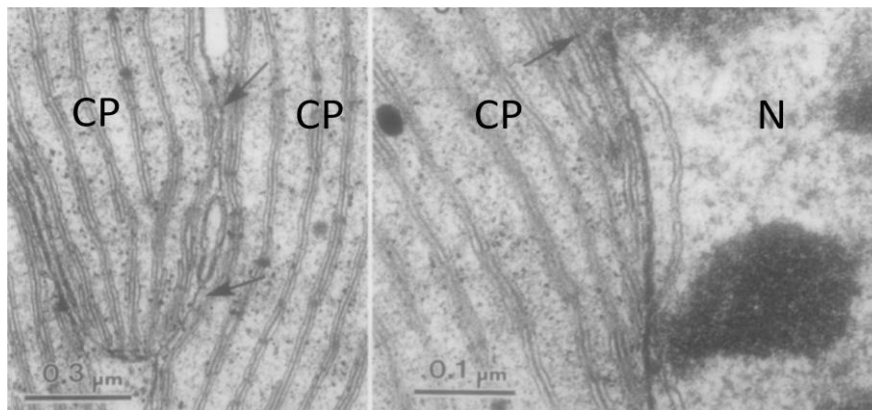


Abb. 4.1: Darstellung von Stromules (A), die in Hypokotylzellen von Tabak in Einkerbungen der Kernhülle einen engen Kontakt zwischen Plastiden und Zellkern herstellen bzw. Verbindungsbereiche (B), die einen Austausch von Material aus Kern und Chloroplast in *Euglena gracilis* ermöglichen könnten. A: aus Kwok und Hanson 2004b; B: aus Ehara et al. 1990; CP kennzeichnet den Chloroplasten und N den Zellkern. Die Pfeile markieren die Kontaktbereiche.

Wie oben erwähnt weisen die HvWhy1-Proteine im Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen in den Zellkernen und Chloroplasten das gleiche Molekulargewicht auf. Unter nativen Bedingungen konnte das HvWhy1-Protein ebenfalls im Zellkern und in Plastiden nachgewiesen werden, jedoch scheinen die nachgewiesenen Proteinkomplexe sich in Größe

oder Ladung zu unterscheiden. Dies korreliert mit dem Nachweis, dass das Homooligomer mit Hilfe der Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementations-Experimente ausschließlich im Zellkern und nicht in den Plastiden beobachtet wurde (siehe 4.1.1.4).

#### 4.1.3 Funktion des HvWhy1-Proteins in den Plastiden

Das HvWhy1-Protein wurde nicht nur in Chloroplasten im ausdifferenzierten Gewebe, sondern auch in Proplastiden aus meristematischem Gewebe und Chloroplasten von jungem Blattgewebe identifiziert (siehe 3.3.4). Die immunologische Analyse zeigte, dass die Proteinmenge in den Plastiden während der Entwicklung zunimmt. Es ist anzunehmen, dass nach Analyse gleicher Proteinmengen im Western-„Blot“ dieser Anstieg pro Zelle noch stärker ist als beobachtet werden konnte, da die Anzahl der Plastiden während der Entwicklung zunimmt. Eine meristematische Zelle beinhaltet ca. 20 Proplastiden und eine ausdifferenzierte Mesophyllzelle mindestens 60 Chloroplasten (siehe 1.2). Zusätzlich nimmt die Menge an Photosyntheseproteinen pro Plastide zu (Baumgartner 1993, Klein und Mullet 1987, Mullet und Klein 1987, Batschauer et al. 1986). In Proplastiden ist die DNA-Synthese bzw. Replikation aktiviert, um die Anzahl der Plastiden sowie deren DNA-Gehalt in den sich teilenden Zellen aufrecht zu erhalten. Die beobachtete Transkriptionsaktivität sowie die vorhandene Transkriptmenge sind aber noch sehr gering im Vergleich zu der in Chloroplasten (Mullet 1993). Unter der Voraussetzung, dass die in den Proplastiden vorkommenden HvWhy1-Proteine in diesen eine Funktion besitzen, ist es möglich, dass diese Proteine aufgrund ihrer Fähigkeit, an DNA zu binden, an der Replikation beteiligt sein könnten. Weiterhin unterstützt diese Annahme, dass das Whirly1-Protein an DNA-Einzelstränge bindet (Desveaux et al. 2000), die sich auch während der DNA-Replikation ausbilden und durch Topoisomerasen stabilisiert werden.

Dass die HvWhy1-Proteine bereits in Proplastiden vorkommen, deutet auf eine essentielle Funktion während der frühen Chloroplastenentwicklung hin. In Prikryl et al. (2008) wurde bereits auf die essentielle Rolle von ZmWhy1 in der Chloroplasten-Biogenese hingewiesen. Es wurden ZmWhy1-Transposon-DNA-Insertionsmutanten analysiert und ein Fehlen plastidärer Ribosomen festgestellt, die zu einem Albinophänotyp führten. Ein entsprechender Phänotyp wurde aber bisher weder in Gersten-RNAi- noch in Arabidopsis-„knock-out“-Mutanten beobachtet.

Der Anstieg der HvWhy1-Proteinmenge geht während der Chloroplastenentwicklung einher mit der Zunahme der Menge an Proteinen, die an der Photosynthese beteiligt sind. Analysen von Fahnenblättern, die im Freiland angezogen wurden (siehe 3.4.3) zeigten ebenfalls eine ähnliche Proteinverteilung von HvWhy1 im Vergleich zu anderen plastidären Proteinen. Die analysierten Proteinmuster des HvWhy1-Proteins nach immunologischer Analyse stimmten am deutlichsten mit dem Muster des ELIP-Proteins überein. Dieses Protein akkumuliert bei Starklicht. Es gehört ebenso wie die Proteine Lhca1, Lhca2 und CP29 (Abb. 3.32) zu den Chlorophyllbindeproteinen (Adamska et al. 2001) und wird sowohl nach Anzucht in Dunkelheit durch Belichtung (4.1.1.2) als auch nach Anzucht im Tag- und Nachtrhythmus

durch Starklicht induziert (Pötter und Klopstech 1993). Es wird angenommen, dass ELIP Chlorophylle binden kann, die im Starklicht durch den Abbau von Photosyntheseproteinen freigesetzt werden und dadurch die Organellen vor Radikalen schützt (Peng et al. 2008). Hutin et al. (2003) zeigten, dass Mutanten von *Arabidopsis thaliana*, die nicht in der Lage waren, ELIP während des Lichtstresses zu akkumulieren, großen photooxidativen Schaden erlitten. Ob die Akkumulierung des HvWhy1-Proteins durch Starklicht reguliert ist, ist noch zu prüfen.

Um zu klären, wo das HvWhy1-Protein innerhalb der Chloroplasten vorliegt, wurden diese osmotisch aufgebrochen und sowohl die Stroma- als auch die Membranfraktion isoliert. In beiden Fraktionen wurde das HvWhy1-Protein identifiziert, jedoch konnte in der löslichen Fraktion annähernd doppelt so viel an Whirly1-Protein als in der Membranfraktion nachgewiesen werden (siehe 3.3.5). Diese Anreicherung der Whirly1-Proteine im Stroma im Vergleich zur Membran- bzw. Thylakoidfraktion wurde nicht nur für Gerste beobachtet (Grabowski et al. 2008), sondern auch für das Whirly1-Protein aus Mais (Prikryl et al. 2008). Immunopräzipitationsuntersuchungen zeigten außerdem, dass das ZmWhy1-Protein mit plastidärer DNA assoziiert ist (Prikryl et al. 2008). Die plastidäre DNA ist organisiert in Nukleoiden, die an der Thylakoidmembran gebunden vorliegen. Der transkriptionsaktive Komplex (TAC) enthält DNA und besteht aus einer Vielzahl von Proteinen, die bei der Transkription und posttranskriptionalen Modifizierung eine Rolle spielen. Eine mögliche Funktion von Whirly1 in der DNA-Bindung bzw. einer Bindung an dem transkriptionsaktiven Komplex könnte den Proteinnachweis in der Membranfraktion erklären. Bereits in Pfalz et al. (2006) wurde das AtWhy1 als mögliche Komponente des konventionell isolierten transkriptionsaktiven Komplexes beschrieben. Auch in Gerste konnte das HvWhy1-Protein in der konventionell isolierten TAC-Fraktion nachgewiesen werden (Joanna Melonek, unveröffentlicht). Prikryl et al. (2008) konnten durch Coimmunopräzipitation mit einem Protein, das in dem Prozess des plastidären Spleißens involviert ist, das ZmWhy1-Protein nachweisen. Das AtWhy1-Protein konnte in Fusion mit GFP in kleinen Aggregaten in den Chloroplasten von Kartoffelprotoplasten nachgewiesen werden (Krause et al. 2005). Diese Aggregate lassen eine Lokalisierung in Nukleoiden vermuten und sprechen für eine Bindung des AtWhy1-Proteins an die plastidäre DNA (Kilbienski 2007).

Das HvWhy1-Protein konnte aber, wie bereits erwähnt, ebenso wie das ZmWhy1-Protein (Prikryl et al. 2008) in großen Mengen in der Stromafraktion nachgewiesen werden, dabei wurde in der Stromafraktion von Plastiden aus Gerste annähernd doppelt so viel an HvWhy1 im Vergleich zur Membranfraktion identifiziert (Abb. 3.25). Es besteht die Möglichkeit, dass diese Proteine im Stroma gelagert und unter bestimmten Bedingungen aus den Plastiden freigesetzt werden, um an anderer Stelle eine Funktion auszuüben.

Obwohl HvWhy1 sowohl in der löslichen als auch in der Membranfraktion nachgewiesen werden konnte, wurde unter nativen Bedingungen nur ein Proteinkomplex in den Plastiden gefunden (Abb. 3.24). Entweder weisen die Whirly1-Proteine in der Stroma- und der Membranfraktion ähnliche Oligomere auf oder der Nachweis war nicht sensitiv genug. Daher



könnte nur das HvWhy1-Protein der löslichen Fraktion aufgrund der größeren Proteinmenge unter den durchgeführten Bedingungen nachgewiesen worden sein. Um diese Frage zu klären, müssten separat sowohl Proteine der Stroma- als auch der Membranfraktion unter nativen Bedingungen analysiert werden.

#### 4.1.4 Das HvWhy1-Protein im Zellkern

Das HvWhy1-Protein wurde in Zellkernen, die aus verschieden altem Gewebe wie Meristem, junges und ausdifferenziertes Blattgewebe isoliert wurden, nachgewiesen (siehe 3.3.4). Im Unterschied zu den HvWhy1-Proteinen in den Plastiden dieser drei Gewebetypen (siehe 4.1.3) konnte in den Kernfraktionen weniger als die Hälfte der HvWhy1-Proteinmenge festgestellt werden. In jungem Gewebe korreliert die Zunahme der HvWhy1-Proteine im Zellkern mit der starken Zunahme der HvWhy1-Proteinmenge in den jungen Chloroplasten. Im Unterschied zu den Chloroplasten nimmt die Menge an HvWhy1-Protein in Zellkernen von ausdifferenziertem Gewebe aber um ca. 40 % ab. Wie bereits in Kapitel 4.1.2 angenommen wurde, könnte eine Übertragung der HvWhy1-Proteine nach Prozessierung im Stroma über die Stromules in den Zellkern stattfinden. Während der Ausdifferenzierung der Zelle und der Entwicklung der Chloroplasten nimmt die Anzahl und Länge der Stromules ab (siehe 1.3, 4.1.2), dadurch verringert sich auch der Kontakt mit dem Zellkern. Diese Änderung in der Morphologie könnte Grund dafür sein, dass die Übertragung von HvWhy1 in den Zellkern im Verlauf der Zellentwicklung von jungem zum ausdifferenzierten Gewebe unterbrochen wird.

Falls der HvWhy1-Proteintransfer während der Ausdifferenzierung der Chloroplasten durch Verkürzung der Stromules eingestellt wird, könnte dies dazu führen, dass kein weiteres HvWhy1-Protein in den Kern nachgeliefert werden kann.

#### 4.1.5 Funktion des HvWhy1-Proteins im Zellkern

Eine bereits im Vorfeld dieser Arbeit angenommene Funktion von HvWhy1 (Dähnhardt 2003) ist die eines Repressors des seneszenzassoziierten Gens *HvS40*. Mit Hilfe von Gelretardierungsexperimenten wurde eine Protein-DNA-Interaktion mit ERE-ähnlichen Elementen in der Promotorregion des *HvS40*-Gens festgestellt (siehe 1.5.2) und das HvWhy1 als ein DNA-Bindeprotein identifiziert. Diese Interaktion konnte nur im grünen Gewebe beobachtet werden und war besonders im jungen Gewebe ausgeprägt (Dähnhardt 2003). Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Hilfe von RNAi-Linien die postulierte Funktion im Gewebe der Blattscheide von jungen Trieben bestätigt werden. Für viele transgene Linien, die sich durch eine Verringerung der *HvWhy1*-Transkriptmenge bzw. HvWhy1-Proteinmenge auszeichneten, wurde eine Induktion der Expression des *HvS40*-Gens festgestellt (siehe 3.5). Dieses antagonistische Verhalten weist darauf hin, dass durch das Fehlen des HvWhy1-Proteins das Gen *HvS40* verstärkt exprimiert werden kann und somit die Präsenz des

HvWhy1-Proteins zur Reprimierung des *HvS40*-Gens führen kann. Dabei ist die Höhe der Induktion der *HvS40*-Genexpression in den untersuchten Linien unterschiedlich. Es wurde deutlich, dass besonders in jungen Pflanzen die Expression der *Hvwhy1*- und *HvS40*-Gene einen starken antagonistischen Einfluss zeigte. Die Repressorfunktion war zu einem späteren Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung nicht mehr so deutlich zu beobachten. Die unterschiedliche Induktion der Genexpression von *HvS40* könnte an vorhandenen Positionseffekten liegen, da bei beiden Probenahmen verschiedene Linien analysiert wurden. Zudem waren die Pflanzen zur zweiten Probenahme älter, bereits der Wildtyp zeigte erhöhte Transkriptmengen von *HvS40*.

Diese altersabhängige Funktion von HvWhy1 als Repressor deckt sich mit den Promotorstudien, in denen das HvWhy1-Protein im jungen Gewebe als Bindeprotein in der Promotorregion des *HvS40*-Gens nachgewiesen wurde. Die spezifische Bindung nimmt während der Ausdifferenzierung ab und ist während der Seneszenz nicht mehr vorhanden (Dähnhardt 2003).

Im ausdifferenzierten Gewebe sinkt bei Abnahme des Imports von HvWhy1 in den Kern dort die Konzentration von HvWhy1. Daher kann die Funktion als Repressor des *HvS40*-Gens nicht mehr aufrecht erhalten werden und die Expression des seneszenzassoziierten *HvS40*-Gens wird ausgelöst. Dadurch wird nach Unterschreiten einer definierten Menge an HvWhy1-Proteinen bedingt durch den Dosiseffekt erst die Induktion der Expression des *HvS40*-Gens möglich (Abb. 4.2).

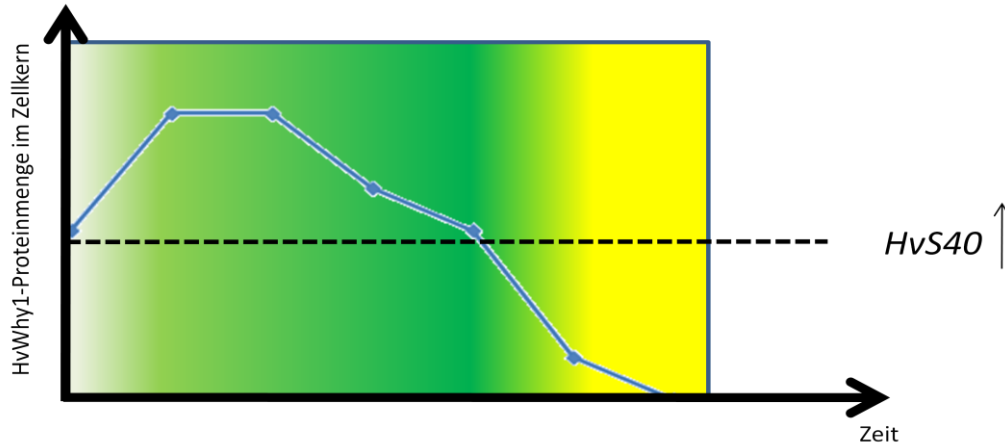


Abb. 4.2: Modell zur Aktivierung des *HvS40*-Gens in Abhängigkeit der HvWhy1-Proteinkonzentration im Zellkern. Die X-Achse beschreibt das Zell- bzw. Gewebealter ausgehend von meristematischen (hellgrün) über junges (grün) und ausdifferenziertes (dunkelgrün) hin zum seneszenten (gelb) Gewebe. Die Y-Achse beschreibt die im Zellkern vorhandene HvWhy1-Konzentration. Die schwarze gestrichelte horizontale Linie kennzeichnet die HvWhy1-Proteinkonzentration, unterhalb der die *HvS40*-Genexpression induziert wird (vertikaler Pfeil).

Unter der Voraussetzung, dass es sich bei dem HvWhy1-Protein im Zellkern um ein aus den Plastiden transferiertes Protein handelt, könnte durch die Unterbrechung der Relokalisierung bzw. durch Verkürzung der Stromules, dem Zellkern der Entwicklungsstand der Plastiden und dadurch der Grad der Ausdifferenzierung der Zelle mitgeteilt werden. Dadurch könnte das Whirly1-Protein nicht nur als ein Kandidat des retrograden Signalweges

angesehen werden (Grabowski et al. 2008), sondern auch als eine Art Zeitmesser, der dem Zellkern das Alter der Plastiden vermittelt und die altersabhängige Blattseneszenz reguliert (Abb. 4.3). Bei einer Übertragung des Modells (Abb. 4.3) auf die RNAi-Linien würde das bedeuten, dass die Zellen der transgenen Pflanzen, die ein antagonistische Verhalten der Transkriptmengen von *Hvwhy1* und *HvS40* zeigen, bereits in einem Stadium sind, bei dem sich kaum bzw. kein Whirly1-Protein im Zellkern befindet. Daher wird dem Zellkern über das HvWhy1/HvS40-System schon früh das Signal zur Seneszenz übermittelt.

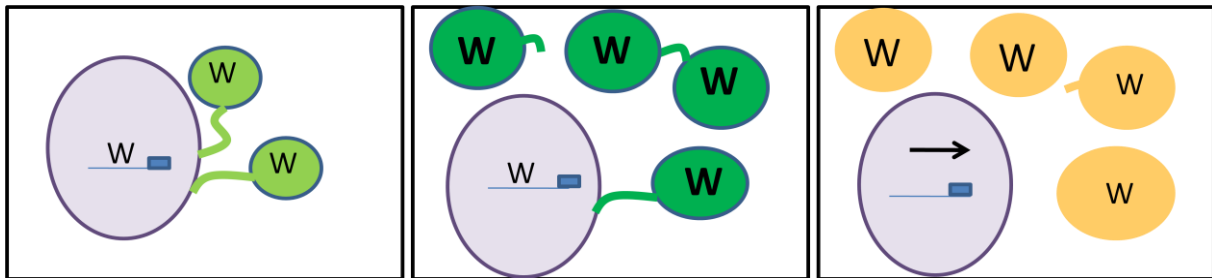


Abb. 4.3: Modell von Whirly1 als Zeitmesser in pflanzlichen Zellen. Dargestellt sind Zellen aus drei verschiedenen alten Geweben (jung, ausdifferenziert und seneszent). Die Konzentration von Whirly1 (W) ist durch die Buchstabenbreite dargestellt. Whirly kann über Stromules, die während des Alters abnehmen, aus Proplastiden (hellgrün) und jungen Chloroplasten (grün) in den Zellkern (violett) gelangen und dort seine Funktion als Repressor von *HvS40* (blaue Box) wahrnehmen. In ausdifferenzierten Zellen findet diese Proteinübertragung aus den Chloroplasten (orange) nicht mehr statt und das *HvS40*-Gen kann aktiviert werden, was zur Auslösung der Seneszenz beiträgt.

#### 4.1.6 Wirkung von Phytohormonen auf die Expression der *Hvwhy1*- und *HvS40*-Gene

Die Seneszenz wird von internen und externen Faktoren beeinflusst. Zu den internen Faktoren, die die Blattseneszenz fördern, zählen diverse Phytohormone sowie das Alter der Pflanze (Noodén 1988). Es ist bekannt, dass die Expression des seneszenzassoziierten Gens *HvS40* intern durch die Phytohormone Abscisinsäure, Ethylen, Methyljasmonat und Salicylsäure sowie extern durch abiotischen Stress wie Verwundung,  $H_2O_2$ , Trockenheit und Hitze induziert wird (Haußühl 1998, Krupinska et al. 2002). Daher liegt die Vermutung nahe, dass ein Repressor für dieses Gen antagonistisch reguliert ist. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Genexpressionsstudien von Gerstenprimärblättern durchgeführt, die unter anderem mit Abscisinsäure, Salicylsäure und Methyljasmonat behandelt wurden.

Die Konzentration von Salicylsäure ist in seneszierenden Blättern stark erhöht und führt zur Induktion verschiedener seneszenzassoziierten Gene (Morris et al. 2000). Die durch Zugabe von Salicylsäure induzierte Expressionssteigerung von *HvS40* und die Abnahme der *Hvwhy1*-mRNA könnte im Zusammenhang mit der Blattalterung sowie mit der systemisch erworbenen Resistenz stehen (siehe 3.4.2). Die Signaltransduktion über Salicylsäure spielt

hauptsächlich eine Rolle bei der Abwehr von Pathogenen und bei der Induktion der systemisch erworbenen Resistenz. Die Pflanze kann durch eine hypersensitive Reaktion, die die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und lokalem Zelltod beinhaltet, die Ausbreitung des Pathogens verhindern (Greenberg 1997). Diese Abwehrreaktion führt zu einer Induktion von Abwehrgenen. Es konnte bereits für das Whirly1-Protein von *Arabidopsis thaliana* eine Aktivierung der DNA-Bindeaktivität und damit eine regulatorische Funktion in Antwort auf Pathogenbefall bzw. Salicylsäurebehandlung festgestellt werden (Desveaux et al. 2004). Jedoch fungierte in diesem Signalweg das Whirly1-Protein als Aktivator (Desveaux et al. 2005).

Methyljasmonat ist ein Wachstumsregulator, der ebenfalls eine wichtige Rolle in der Antwort auf Verwundung sowie Pathogenbefall spielt (Turner et al. 2002) und auch an der Regulation der Blattseneszenz beteiligt ist. Es kann durch Zugabe von Methyljasmonat eine verfrühte Seneszenz verursacht werden (He et al. 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl eine kurzzeitige und eine länger andauernde Behandlung mit Methyljasmonat durchgeführt. Beide Verfahren führten zur Verringerung der Transkriptmenge von *Hvwhy1* und zur Hochregulierung des *HvS40*-Gens (siehe 3.4.1, 3.4.2).

Es wurde deutlich, dass das seneszenzfördernde Phytohormon Abscisinsäure bereits nach kurzer Behandlung negativ auf die Expression des *Hvwhy1*-Gens und positiv auf die *HvS40*-Genexpression wirkt (siehe 3.4.1). Abscisinsäure wird vermehrt bei Trockenheit gebildet (Roelfsema et al. 2004). Daher ist denkbar, dass durch Faktoren wie Wassermangel die *Hvwhy1*-Genexpression herunterreguliert wird. Dieses könnte zu der im Freilandversuch beobachteten Abnahme des HvWhy1-Proteingehalts führen (Abb. 3.32). Die antagonistische Expression von *Hvwhy1* und des seneszenzassoziierten *HvS40*-Gens bei Blattalterung oder weiterer Stimuli wie Phytohormonbehandlungen oder Wassermangel stützt die Annahme, dass HvWhy1 eine Repressorfunktion auf das *HvS40*-Gen ausübt. Abscisinsäure wirkt nicht nur auf die Genexpression, sondern reguliert auch RNA-Bindeproteine (Fedoroff 2002, Kuhn und Schroeder 2003). Die durch die Behandlung mit Abscisinsäure beschriebenen Seneszenzsymptome beruhen dabei auf der Entstehung von oxidativem Stress. Es wurde festgestellt, dass nach Zugabe von Abscisinsäure die Bildung von Wasserstoffperoxid in der Zelle stark zunimmt (Guan et al. 2000). Die Aktivität verschiedener antioxidativer Schutzsysteme der Zelle, wie der Superoxiddismutase, Katalasen und Peroxidasen (Jiang und Zhang 2001) wird ebenfalls hochreguliert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass nicht in allen untersuchten Signalwegen die Expression von *Hvwhy1* und *HvS40* antagonistisch ist. Ein solches Verhalten wurde nur nach Behandlung mit den seneszenzfördernden Phytohormonen Abscisinsäure, Salicylsäure und Methyljasmonat beobachtet. Wenn sich die Proteinmenge von HvWhy1 entsprechend der Abnahme der mRNA-Menge verhält, würde die gegenläufige Expression der Gene *Hvwhy1* und *HvS40* bedeuten, dass HvWhy1 als Repressor für das *HvS40*-Gen in speziellen Signalkaskaden beteiligt ist und eine Abnahme der HvWhy1-Proteinmenge zum Einsetzen der Seneszenz führt. Dies könnte mit immunologischen Untersuchungen überprüft werden.

## 4.2 Das Whirly2-Protein der Gerste

Wie die meisten Höheren Pflanzen besitzt auch *Hordeum vulgare* zwei *whirly*-Gene (Krause et al. 2005). Deshalb wurde parallel zu den für das *Hvwhy1*-Gen durchgeführten Untersuchungen auch die Struktur und Genexpression von HvWhy2 analysiert.

### 4.2.1 Struktur des Whirly2-Proteins und posttranslationale Modifizierung

Eine Modellierung der Tertiärstruktur sollte weiteren Aufschluss geben und zeigen, ob sich die räumliche Struktur und somit die Funktionen beider Whirly-Proteine der Gerste voneinander unterscheiden. HvWhy2 zeigt im Vergleich zu HvWhy1 keine deutliche Exponierung der KGKAAL-Domäne (Abb. 3.2) und kann wahrscheinlich deshalb in dieser Form nicht an DNA-Einzelstrang binden. Erst Konformationsänderungen könnten eine solche Fähigkeit und Funktion ermöglichen. Diese Änderung der Konformation könnte durch Phosphorylierung einer der vielen vorhergesagten Phosphorylierungstellen der Aminosäuresequenz des HvWhy2-Proteins (Abb. 3.1) bewirkt werden. Mit Hilfe des rekombinanten HvWhy2-Proteins konnte ebenso wie für das HvWhy1-Protein gezeigt werden, dass dieses Protein durch die Kinase A *in vitro* phosphoryliert werden kann (siehe 3.1.4). Zusätzlich konnte bei der Überprüfung der Phosphorylierbarkeit des rekombinanten HvWhy2-Proteins ein Signal mit einem Molekulargewicht von 54 kDa identifiziert werden. Falls dies ein HvWhy2-Dimer ist, bedeutet das, dass entweder die Phosphorylierung die Komplexbildung ermöglicht oder sowohl Monomer als auch Dimer phosphoryliert werden könnten. Diese Interpretation scheint auch beim verwandten HvWhy1-Protein denkbar (siehe 4.1.1.3). Ein Beispiel ist die Phosphorylierung des Rtg3-Proteins (Regulator des retrograden Stoffwechsels vom Mitochondrium zum Zellkern), sie ermöglicht die Bildung eines Heterodimers mit Rtg1, das die Translokation des Komplexes aus dem Cytoplasma in den Zellkern gestattet (Liu und Butow 2006). Das HvWhy2-Protein weist ebenso wie das HvWhy1-Protein C-terminal zwei  $\alpha$ -Helices auf, die jedoch durch eine größere Schleife (44 Aminosäuren) voneinander getrennt sind. Ob auch dieses Motiv, das dem Helix-Loop-Helix-Motiv (Toledo-Ortiz et al. 2003) ähnelt, die Komplexbildung ermöglichen könnte, ist noch ungeklärt.

### 4.2.2 Regulation der *Hvwhy2*-Genexpression

Während der Blattentwicklung wird das *Hvwhy2*-Gen ähnlich dem *Hvwhy1*-Gen transkriptionell reguliert. Mit Hilfe von Northern-„Blot“-Analysen sowie der semiquantitativen RT-PCR konnte für das *Hvwhy2*-Gen wie für das *Hvwhy1*-Gen während der Blattentwicklung von meristematischem zum ausdifferenzierten Gewebe die höchsten Transkriptmengen in der basalen Blattregion in teilungsaktiven Zellen beobachtet werden

(siehe 3.3.1). Entwicklungsabhängige Veränderungen in der Transkriptmenge sind bei *Hvwhy2* wie auch bei *Hvwhy1* nicht lichtreguliert (siehe 3.3.3). Im Unterschied zu den *Hvwhy1*-Transkriptmengen wurde eine starke Zunahme der *Hvwhy2*-RNA in Gerstenprimärblättern unter natürlichen Seneszenzbedingungen gezeigt (siehe 3.3.1). Findet eine Steigerung der Genexpression während der Seneszenz statt, werden diese Gene als seneszenzassoziierte Gene bezeichnet (Gan und Amasino 1997). Eine gesteigerte Expression des *Hvwhy2*-Gens konnte aber nicht durch den Prozess der dunkelinduzierten Seneszenz ausgelöst werden. Einige SAGs wie das beschriebene *HvS40* können jedoch von beiden Vorgängen, sowohl von der natürlichen Alterung als auch durch eine Dunkelphase, die die Seneszenz auslöst, in ihrer Expression induziert werden (Kleber-Janke und Krupinska 1997, Scharrenberg 2001). Die erhöhten Transkriptmengen von *Hvwhy2* im teilungsaktiven und im seneszenten Gewebe weisen darauf hin, dass in diesen Geweben die Transkriptionsrate von *Hvwhy2* erhöht ist. Ob sich diese Änderung in der Transkriptmenge auch auf der Proteinebene widerspiegelt, ist noch unklar. Der verwendete Antikörper, der gegen das HvWhy2-Protein gerichtet ist, konnte nach Aufreinigung keine Proteine in Gesamtproteinextrakten, die aus verschiedenen alten Geweben isoliert wurden, nachweisen (siehe 3.6.2).

Zusätzlich wurde die Frage geklärt, ob das *Hvwhy2*-Gen ähnlich wie das *Hvwhy1*-Gen durch verschiedene Phytohormone reguliert wird. Es konnte nur nach der Behandlung mit dem seneszenzfördernden Phytohormon Abscisinsäure ein Anstieg der relativen *Hvwhy2*-Transkriptmenge verzeichnet werden (siehe 3.4.1). Unter diesen Bedingungen nahm die mRNA-Menge von *Hvwhy1* ab. Nach einer dreitägigen Behandlung mit einer Kombination aus Salicylsäure und Methyljasmonat wurde wie auch bei *Hvwhy1* eine Abnahme der *Hvwhy2*-Transkriptmenge beobachtet.

Im Rahmen der Untersuchungen an HvWhy1-RNAi-Pflanzen zeigte sich, dass eine verringerte Menge an *Hvwhy1*-mRNA bzw. HvWhy1-Protein bei einigen Linien mit einer erhöhten Expression des *Hvwhy2*-Gens einhergeht. Viele Linien zeigten keine signifikante Veränderung, sondern sogar eine geringe Abnahme der relativen Transkriptmenge von *Hvwhy2*. Da die RNAi-Linien kaum Einfluss auf die Genexpression von *Hvwhy2* zeigen, könnte eine Regulierung durch HvWhy1 gegebenenfalls nur in bestimmten Entwicklungsstadien stattfinden. Zudem besteht die Möglichkeit, dass dieses antagonistische Verhalten erst in einer „knock-out“-Mutante sichtbar wird, falls bereits kleine Mengen an HvWhy1-Proteinen ausreichen, um das *Hvwhy2*-Gen zu reprimieren (Abb. 4.4). In Analysen von AtWhy1- und AtWhy2-„knock-out“-Mutanten von *Arabidopsis thaliana* konnte in der Tat beobachtet werden, dass in  $\Delta$ AtWhy1 die Menge an *Hvwhy2*-Transkripten steigt (Isemer 2007). Auch befinden sich in der Promotorregion des Atwhy2-Gens die IR1- und IR2-Elemente, die eine DNA-Bindung des StWhy1 in der Promotorregion des *PR10a*-Gens (Desveaux et al. 2000) und des HvWhy1-Proteins in der Promotorregion des *HvS40*-Gens (Dähnhardt 2003) ermöglichen (Abb. 7.4). Ob die Expression des *Hvwhy2*-Gens direkt durch HvWhy1 (Abb. 4.4) oder indirekt über eine während der Seneszenz induzierten Signalkaskade induziert wird, ist noch zu klären.

### 4.2.3 Funktion von HvWhy2

Die Erhöhung der *Hvwhy2*-Transkriptmenge durch Abscisinsäure (siehe 3.4.1) bzw. während der natürlichen Seneszenz (siehe 3.3.1) deutet auf eine aktive Rolle von HvWhy2 während der Blattalterung hin. Mit Hilfe der immunologischen Analyse konnten in der Zellkernfraktion keine HvWhy2-Proteine nachgewiesen werden. Die Lokalisierung von HvWhy2 wurde in der mit Mitochondrien angereicherten Organellenfraktion beobachtet (siehe 3.6.2). Im Unterschied zu HvWhy1 scheint das HvWhy2-Protein nicht dual verteilt vorzuliegen, daher kann es im Zellkern auch nicht die Funktion eines spezifischen Transkriptionsfaktors wie HvWhy1 einnehmen. Die mitochondriale Lokalisierung steht in Übereinstimmung mit den durchgeführten Überexpressionsstudien von AtWhy2 von Maréchal et al. (2008). Es wurden dabei unspezifische DNA-Bindungen von AtWhy2 überall im Chondriom nachgewiesen, die zu einer verringerten mitochondrialen Genexpression bzw. Proteinsynthese führten. Durch den Ausfall der mitochondrial kodierten Untereinheiten wird die Atmungskette gestört, diese Dysfunktion der Mitochondrien führt zu einer schnelleren Seneszenz und somit fördert AtWhy2 die Seneszenz.

Zusätzlich konnte in *Arabidopsis thaliana* gezeigt werden, dass Whirly2 auch als Aktivator der Seneszenz nach Pathogenbefall sowie als Aktivator von Zelltodprozessen fungiert (Miao et al., unveröffentlicht). Diese für das Whirly2-Protein aus *Arabidopsis thaliana* gezeigten Funktionen gehen einher mit den Aussagen des Modells, das für das HvWhy2-Protein aufgestellt wurde. In diesem wird nach Unterschreiten einer bestimmten HvWhy1-Konzentration im Zellkern die Expression des *HvS40*- und *Hvwhy2*-Gens induziert, was zum Zelltod führt (Abb. 4.4).

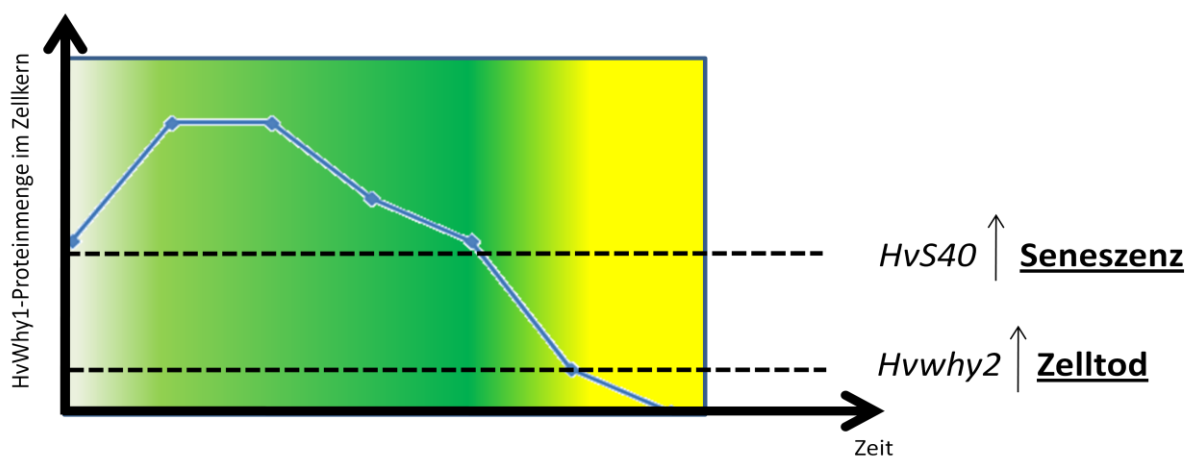


Abb. 4.4: Modell zur Aktivierung des *HvS40*-Gens bzw. des *Hvwhy2*-Gens in Abhängigkeit der HvWhy1-Proteinkonzentration im Zellkern. Die X-Achse beschreibt das Zell- bzw. Gewebeeralter ausgehend von meristematischen (hellgrün) über junges (grün) und ausdifferenziertes (dunkelgrün) hin zum seneszenten (gelb) Gewebe. Die Y-Achse die im Zellkern vorhandene HvWhy1-Konzentration. Die schwarze, gestrichelten Linien kennzeichnet die Konzentrationen, unterhalb derer die entsprechenden Gene transkribiert werden können (*HvS40*) bzw. deren Genprodukte akkumulieren können (*Hvwhy2*).

### 4.3 Ausblick

Mit den in dieser Arbeit angefertigten Analysen zur entwicklungsabhängigen Transkript- bzw. Proteinverteilung wurde die Whirly-Proteinfamilie in Gerste charakterisiert. Zusätzlich ergab der subzelluläre Nachweis des HvWhy1-Proteins in den Plastiden und im Zellkern derselben Zelle erste Hinweise auf einen neuen Weg der Proteinsortierung sowie Relokalisierung und somit auf eine mögliche neue retrograde Kommunikation zwischen Plastiden und Zellkern.

Bisher wurden keine Hinweise auf unterschiedliche Transkripte bzw. Genprodukte erhalten, die das Vorkommen des HvWhy1-Proteins in verschiedenen Kompartimenten erklären würde. Zur genaueren Analyse ist es notwendig, die unvollständige cDNA von *Hvwhy1* zu komplettieren. Desweiteren müsste bestätigt werden, dass es sich bei den kernlokalisierten und plastidären HvWhy1-Proteinen um identische Proteine handelt. Dafür ist es erforderlich, dass die Zellkerne und Plastiden isoliert werden, die jeweiligen HvWhy1-Proteine mittels einer Affinitätschromatografie aufgereinigt und anschließend mit Hilfe der Massenspektrometrie analysiert werden. Eine Plastidentransformation in Tabak könnte anschließend zeigen, ob das HvWhy1-Protein aus den Plastiden in den Zellkern transloziert wird.

Eine Möglichkeit zur Übertragung von Proteinen aus den Plastiden in den Zellkern sind Stromules. Dies würde erklären, warum die HvWhy1-Proteinmenge im Zellkern während der Ausdifferenzierung der Chloroplasten durch Verkürzung der Stromules abnimmt. Dies könnte durch mikroskopische Analyse der Veränderung der Stromulemorphologie, unter Verwendung von GFP- bzw. YFP-Fusionsproteinen im Stroma oder in der Hüllmembran, einhergehend mit der Abnahme der HvWhy1-Proteinmenge im Zellkern überprüft werden. Da scheinbar die Behandlung von Phytohormonen die Anzahl von Plastiden mit Stromules verändern, sollte analysiert werden, ob durch die erzielte Änderung der Stromuleanzahl in einer Zelle die Lokalisierung des HvWhy1-Proteins im Zellkern im Vergleich zu unbehandelten Gewebe beeinflusst wird. Zusätzlich könnte die Bewegung von Stromules, die über das Aktincytoskelett verläuft, inhibiert werden, um eine mögliche Translokation des HvWhy1-Proteins zu verhindern.

Die Identifizierung weiterer regulativer Faktoren, die die Genexpression beeinflussen bzw. posttranslationale Modifizierungen auslösen, ist von großem Interesse. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das Licht im meristematischen und ausdifferenzierten Gewebe keinen Einfluss auf die Genexpression von *Hvwhy1* hat. Die Untersuchung des Einflusses der Lichtdosis bzw. Lichtstärke könnte Hinweise darauf geben, ob eine denkbare Schutzfunktion unter Starklicht ähnlich dem ELIP-Protein möglich wäre. Zudem könnten Analysen der posttranslationalen Modifizierung wie der Sumoylierung Aufschluss geben, ob mit Hilfe dieser kovalenten Bindungen die Hvwhy1-Proteine in den Plastiden reguliert werden und dadurch die stabilen Proteinkomplexe im denaturierenden Gel erklärbar sind. Erste Hinweise sprechen bereits dafür, dass in den Plastiden und im Zellkern die HvWhy1-Proteine



unterschiedliche Komplexe ausbilden. Mit Hilfe von nativen Gelen und der Coimmunopräzipitation könnten in den beiden Kompartimenten mögliche Interaktionspartner identifiziert und damit Hinweise auf die Funktionen der Whirly-Proteine in den verschiedenen Kompartimenten erhalten werden.

Die Funktion des kernlokalisierten HvWhy1-Proteins als Repressor des seneszenzassoziierten *HvS40*-Gens wurde im Rahmen dieser Arbeit mit heterozygoten HvWhy1-RNAi-Linien bestätigt. Die nächste Generation mit homozygoten Pflanzen sollte analysiert werden, ob sie im Hinblick auf das Einsetzen der Seneszenz einen Phänotyp zeigt. Ob HvWhy1 ausschließlich als Repressor auf das *HvS40*-Gen wirkt oder weitere Gene durch dieses Whirly-Protein reguliert werden, kann durch die Verwendung von DNA-„Microarrays“ erfasst werden. In Mais wurde bereits festgestellt, dass das Fehlen von Whirly1 zu einer Dysfunktion der Plastiden führt. Die Möglichkeit, dass HvWhy1 Auswirkungen auf die Genexpression in den Plastiden hat, kann mittels *run-on*-Transkriptanalysen von isolierten Plastiden aus den RNAi-Linien im Vergleich zum Wildtyp überprüft werden.

## 5 Zusammenfassung

Die Familie der Whirly-Proteine wurde erst vor kurzem beschrieben. Pflanzen enthalten in der Regel zwei Whirly-Proteine mit ausgeprägter Sequenzhomologie. In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Charakterisierung der *whirly*-Gene und Whirly-Proteine in Gerste durchgeführt. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf dem Whirly1-Protein, das zuerst als Transkriptionsaktivator eines PR-Gens in Kartoffel beschrieben wurde. In Gerste wurde das Whirly1-Protein als möglicher Repressor des seneszenzassoziierten Gens *HvS40* entdeckt. Zur Untersuchung der Whirly-Proteine wurden zunächst spezifische Antikörper hergestellt und charakterisiert. Untersuchungen zur Regulation der Genexpression ergaben, dass die Expression des *whirly1*-Gens von der Entwicklung, aber nicht vom Licht abhängt. Mit Northern-„Blot“-Analysen bzw. der semiquantitativen RT-PCR wurde die größte Menge an Transkript in teilungsaktivem Gewebe nachgewiesen. Die Menge an HvWhy1-Protein nimmt während der Zelldifferenzierung zu und im Verlauf der Blattseneszenz ab. Dies deutet auf eine Funktion des Proteins im photosynthetisch aktiven Gewebe hin. Im Vorfeld dieser Arbeit konnte mit GFP-Fusionskonstrukten gezeigt werden, dass das Whirly1-Protein aus *Arabidopsis thaliana* *in vitro* in die Plastiden importiert wird. Dies steht im Widerspruch zur beschriebenen Funktion als Transkriptionsfaktor im Zellkern. Durch immunologische Analysen von Kern- und Plastidenfraktionen wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass das Protein gleichzeitig in beiden Kompartimenten vorliegt. Immunogoldmarkierungen (Maria Mulisch, Zentrale Mikroskopie) zeigten außerdem, dass das HvWhy1-Protein gleichzeitig im Zellkern und in den Plastiden derselben Zelle vorkommt. Durch native Polyacrylamidgelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass Whirly1 in beiden Kompartimenten in unterschiedlichen Komplexen vorliegt. Obwohl der größte Teil des HvWhy1-Proteins in den Plastiden vorliegt, ist die Funktion in den Chloroplasten noch unklar. Die größte Menge an HvWhy1-Protein wurde im Stroma der Plastiden nachgewiesen. Da das Protein im Kern und in den Plastiden dasselbe Molekulargewicht hat, könnte es sein, dass die Whirly1-Proteine aus den Organellen in den Zellkern verlagert werden. Dies könnte ein völlig neuer Weg der retrograden Kommunikation zwischen Plastiden und Zellkern sein. Aufbauend auf den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen wurde ein Modell zur Relokalisierung des HvWhy1-Proteins aus den Plastiden in den Zellkern mit Hilfe von Stromules entwickelt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die angenommene Funktion von HvWhy1 als Repressor des seneszenzassoziierten *HvS40*-Gens im Zellkern zu untersuchen. Mit Hilfe von HvWhy1-RNAi-Linien konnte die Funktion als Repressor von *HvS40* im jungen Blattgewebe bestätigt werden. Bei allen Linien, die sich durch eine verringerte *Hvwhy1*-Transkript- bzw. HvWhy1-Proteinmenge auszeichneten, wurde im jungen Blattgewebe eine erhöhte Menge an *HvS40*-mRNA im Vergleich zum Wildtyp festgestellt.

Parallele Untersuchungen zur Expression des *Hvwhy2*-Gens zeigten eine starke Akkumulation der mRNA sowohl im teilungsaktiven Gewebe als auch im seneszenten Gewebe. Mit Hilfe des spezifischen Antikörpers wurde das HvWhy2-Protein in einer Organellenfraktion, aber nicht im Zellkern nachgewiesen.

## 5 Summary

The family of Whirly proteins was described quite recently. Generally plants contain two Whirly proteins with distinct sequence homology. The present study displays the results of the analysis that have been made due to characterize the *whirly* genes and Whirly proteins in barley. This work is focused on the Whirly1 protein that was primarily described in potato as a transcription factor of the gene *PR10a*. In barley the Whirly1 protein was found as a putative repressor of the senescence associated gene *HvS40*. In order to start research on the Whirly proteins specific antibodies were produced and characterized. Surveys concerning the regulation of *whirly1* gene expression revealed that the expression of this gene depends on plant development but not on the light. By means of northern blot analysis and semiquantitative RT-PCR the highest level of the transcript was detected in meristematic tissue. The amount of HvWhy1 protein increases during cell differentiation and decreases during leaf senescence.

This suggests a function for this protein in photosynthetic tissue. Previous *in vitro* import assays and studies on the localization of a Whirly1-GFP fusion protein from *Arabidopsis thaliana* showed that Whirly1 is imported into plastids. This is a contradiction to its formerly described function as a transcription factor in the nucleus. Via immunological analysis of protein extracts prepared from isolated nuclei and plastids the concurrent localization of the protein in both compartments was shown. Immunogold labelling (Maria Mulisch, Zentrale Mikroskopie) demonstrated the concurrent existence in the nuclei and the plastids of the same cell. By native polyacrylamid gel electrophoresis Whirly1 was shown to exist in different complexes in both compartments. Though the largest part of the HvWhy1 protein is localized in the plastids its function there is still unknown. Most of HvWhy1 protein was found in the stroma of the plastids. The fact, that the molecular mass of the protein in the nucleus and in the plastids, respectively, is the same, suggests that the Whirly protein can be translocated from the organelles to the nucleus. This could be a completely new way of retrograde communication between plastids and nuclei. Based on these results a new model of relocation of HvWhy1 protein out of the plastids into the nucleus by means of stromules was created. A further intention of this work was to examine the putative function of HvWhy1 as a repressor of the senescence associated *HvS40* gene in the nucleus. Using HvWhy1-RNAi-lines the function as a repressor of *HvS40* in young leaf tissue could be confirmed. All lines with decreased levels of Whirly1 transcripts and protein showed an increased level of *HvS40* mRNA in young leaf tissue.

Additional analysis of gene expression of the *Hvwhy2* gene revealed that mRNA accumulated both in the meristematic and in senescent tissue.

By means of a specific antibody the HvWhy2 protein was detected in the fraction of organelles but not in the nucleus.

## 6 Literaturverzeichnis

Adamska I, Kruse E, Kloppstech K (2001). Stable insertion of early light-induced proteins into etioplast membranes requires chlorophyll a. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 8582-8587.

Andersson MX, Goksör M, Sandelius AS (2007). Optical manipulation reveals strong attracting forces at membrane contact site between endoplasmic reticulum and chloroplasts. *The Journal of Biological Chemistry* 282 (2): 1170-1174.

Apel K, Hirt H (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.

Austin J, Frost E, Vidi PA, Kessler F, Staehelin L (2006). Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. *The Plant Cell* 18: 1693-1703.

Balazadeh S, Riaño-Pachón DM, Mueller-Roeber B (2008). Transcription factors regulating leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology* 10: 63-75.

Batschauer A, Möisinger E, Kreuz K, Dörr I, Apel K (1986). The implication of a plastid-derived factor in the transcriptional control of nuclear genes encoding the light-harvesting chlorophyll a/b protein. *European Journal of Biochemistry* 154: 625-634.

Bauer J, Hiltbrunner A, Kessler F (2001). Molecular biology of chloroplast biogenesis: gene expression, protein import and intraorganellar sorting. *Cellular and molecular life sciences* 58 (3): 420-433.

Baumgartner BJ, Rapp JC, Mullet JE (1989). Plastid transcription activity and DNA copy number increase early in barley chloroplast development. *Plant Physiology* 89: 1011-1018.

Baumgartner BJ, Rapp JC, Mullet JE (1993). Plastid genes encoding the transcription/translation apparatus are differentially transcribed early in barley (*Hordeum vulgare*) chloroplast development. *Plant Physiology* 101: 781-791.

Beck CF (2005). Signaling pathways from the chloroplast to the nucleus. *Planta* 222: 743-756.

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

Birnboim HC, Doly J (1979). A rapid extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research* 7: 1513-1523.

Boyle B, Brisson N (2001). Repression of the defence gene PR-10a by the single-stranded DNA binding protein SEBF. *The Plant Cell* 13: 2525-2537.

- Bradford M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim PO, Nam HG, Lin JF, Wu SH, Swidzinski J, Ishizaki K, Leaver CJ (2005). Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signaling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 42: 567-85.
- Butler W, Simon EW (1971). Ultrastructural aspects of senescence in plants. *Advances in Gerontological Research* 3: 73-129.
- Butow R, Avadhani NG (2004). Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Molecular Cell* 14: 1-15.
- Chaly N und Possingham JV (1981). Structure of constricted proplastids in meristematic plant tissues. *Biologie Cellulaire* 41: 203-210.
- Chen W, Provarnt NJ, Glazebrook J, Katagiri F, Chang HS, Euglem T, Mauch F, Luan S, Zou G, Whitham SA, Budworth PR, Tao Y, Xie Z, Chen X, Lam S, Kreps JA, Harper JF, Si-Ammour A, Mauch-Mani B, Heinlein M, Kobayashi K, Hohn T, Dangl JL, Wang X, Zhu T (2002). Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *The Plant Cell* 14: 559-574.
- Chirgwin JM, Przybula RJ, MacDonald RJ, Rutter WJ (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294-5299.
- Cohen SN, Chang ACY, Hsu L (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *E. coli* by R-factor-DNA. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA* 69: 2110-2114.
- Creissen G, Reynolds H, Xue Y, Mullineaux P (1995). Simultaneous targeting of pea glutathione reductase and of a bacterial fusion protein to chloroplasts and mitochondria in transgenic tobacco. *The Plant Journal* 8 (2): 167-75.
- Dähnhardt D (2003). Untersuchungen zur Regulation der seneszenzabhängig exprimierten Gene *hpd* und *HvS40* der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und subzelluläre Lokalisierung des HvS40-Proteins. Dissertation, Kiel.
- Dangl JI, Dietrich RA, Thomas H (2000). Senescence and programmed cell death. In: Buchanan B, Gruissem W, Jones R, eds. *Biochemistry and Molecular Biology of plants*. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologist, pp. 1044-1100.
- Després C, Subramaniam R, Matton DP, Brisson N (1995). The activation of the potato *PR10a* gene requires the phosphorylation of the nuclear factor PBF-1. *The Plant Cell* 7: 589-598.

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

Desveaux D, Després C, Joyeux A, Subramaniam R, Brisson N (2000). PBF-2 is a novel single-stranded DNA binding factor implicated in the *PR10a* gene activation in potato. *The Plant Cell* 12: 1477-1489.

Desveaux D, Maréchal A, Brisson N (2005). Whirly transcription factors: defense gene regulation and beyond. *Trends in Plant Science* 10: 95-102.

Desveaux D, Subramaniam R, Després C, Mess JN, Lévesque C, Fobert PR, Dangl JL (2004). A Whirly transcription factor is required for salicylic acid-dependent disease resistance in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* 6: 229-240.

Ehara T, Osafune T, Hase E (1990). Interactions between the nucleus and cytoplasmic organelles during the cell cycle of *Euglena gracilis* in synchronized cultures. *Experimental Cell Research* 190: 104-112.

Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science* 5 (5): 199-206.

Federoff NV (2002). RNA-binding proteins in plants: the tip of an iceberg? *Current Opinion in Plant Biology* 5: 452-459.

Fling SP, Gregerson DS (1986). Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high molarity tris buffer system without urea. *Analytical Biochemistry* 155: 83-88.

Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat J, Scott I (1998). Parallel changes in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and catalases during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiology* 116: 1351-1357.

Gan S, Amasino RM (1997). Making sense of senescence-molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiology*. 113: 313-319.

Gepstein S (1988). Photosynthesis. In: Noodén LD, Leopold AC, eds. *Senescence and aging in plants*. San Diego: Academic Press Inc.: 85-109.

Grabowski E, Miao Y, Mulisch M, Krupinska K (2008). Single-stranded DNA-binding protein Whirly1 in barley leaves is located in plastids and the nucleus of the same cell. *Plant physiology* 147 (4): 1800-1804.

Gray JC, Sullivan JA, Hibberd JM, Hanson MR (2001). Stromules: Mobile protrusions and interconnections between plastids. *Plant Biology*. 3: 223-233.

Gray M (1998). The evolutionary origins of organelles. *Trends in Genetics* 5: 294-299.

- Greenberg BM, Gaba V, Canaani O, Malkin S, Mattoo AK, Edelman M (1989). Separate photosensitizers mediate degradation of the 32-kDa photosystem II reaction center protein in the visible and UV spectral regions. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA* 86: 6617-6620.
- Greenberg JT (1997). Programmed cell death in plant-pathogen interaction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 525-545.
- Gregersen PL, Holm PB, Krupinska K (2008). Leaf senescence and nutrient remobilisation in barley and wheat. *Plant Biology* 10: 37-49.
- Gruissem W, Greenberg BM, Zurawski G, Hallick RB (1986). Chloroplast gene expression and promoter identification in chloroplast extracts. *Methods in Enzymology* 118: 253-270.
- Guan LM, Zhao J, Scandalios JG (2000). Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize Cat1 antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is the likely intermediary signaling molecule for the response. *The Plant Journal* 22 (2): 87-95.
- Gunning BE (2005). Plastid stromules: video microscopy of their outgrowth, retraction, tensioning, anchoring, branching, bridging and tip-shedding. *Protoplasma* 225: 33-42.
- Hanson MR, Sattarzadeh A (2008). Dynamik morphology of plastids and stromules in angiosperm plants. *Plant, Cell and Environment* 31: 646-657.
- Harley CB (1991). Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutation Research* 256: 271-281.
- Haußühl K (1998). Charakterisierung der Blattseneszenz von *Hordeum vulgare* L. unter besonderer Berücksichtigung des Gens *HvS40*. Dissertation, Köln.
- 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, Fukushige H, Hildebrand DF, Gan S (2002). Evidence supporting a role of jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Physiology* 128: 876-884.
- Hensel G, Kumlehn J (2004). Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) by coculture of immature embryos with agrobacteria. In: Curtis IS ed, *Transgenic crops of the World - Essential Protocols*. Kluwer Academic Publishers: 35-43.
- Hensel G, Valkov V, Middlefell-Williams J, Kumlehn J (2008). Efficient generation of transgenic barley: the way forward to modulate plant microbe interactions. *Journal of Plant Physiology* 165 (1): 71-82.

Hensel LL, Grbic V, Baumgarten DA, Bleeker AB (1993). Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 5: 553-564.

Hörman F, Soll J, Bölter B (2007). The Chloroplast protein import machinery: a review. *Methods in Molecular Biology* 390: 179-93.

Hörtensteiner S (1999). Chlorophyll breakdown in higher plants and algae. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56: 330-347.

Hörtensteiner S, Feller U (2002). Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *Journal of Experimental Botany* 53: 927-937.

Humbeck K, Kloppstech K, Krupinska K (1994). Expression of early light-inducible proteins in flag leaves of field-grown barley. *Plant Physiology* 4: 1217-1222.

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.

Hutin C, Nussaume L, Moise N, Moya I, Kloppstech K, Havaux M (2003). Early light-induced proteins protect *Arabidopsis* from photooxidative stress. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA* 100 (8): 4921-4926.

Inada N, Sakai A, Kuroiwa H, Kuroiwa T (1998). Three-dimensional analysis of the senescence program in rice (*Oryza sativa L.*) coleoptiles. Investigations by fluorescence microscopy and electron microscopy. *Planta* 206: 585-597.

Isemer R (2007). Entwicklungsabhängige Regulation der Whirly-Proteine von *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Kiel.

Jarvis P, Robinson C (2004). Mechanisms of protein import and routing in chloroplasts. *Current Biology* 14 (24): 1064-1077.

Jiang M, Zhang J (2001). Effects of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant and Cell Physiology* 42 (11): 1265-1273.

Kanazawa A, Dell MO, Hellens RP, Hitchin E, Metzlaff M (2000). Miniscale method for nuclear run-on transcription assay in plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 18: 377-383.

Kilbienski I (2007). Untersuchungen zur Funktion und Regulation des seneszenzassoziierten *HvS40*-Genes der Gerste (*Hordeum vulgare L.*) und *HvS40* verwandter Gene von *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, Kiel.



Kleber-Jahnke T, 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 RR und Mullet JE (1986). Regulation of chloroplast-encoded chlorophyll-binding protein translation during higher plant chloroplast biogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 261 (24): 11138-11145.

Klein RR und Mullet JE (1987). Control of gene expression during higher plant chloroplast biogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 262: 4341-4348.

Köhler RH und Hanson MR (2000). Plastid tubules of higher plants are tissue-specific and developmentally regulated. *Journal of Cell Science* 113: 81-89.

Köhler RH, Cao J, Zipfel WR, Webb WW, Hanson MR (1997). Exchange of protein molecules through connections between higher plant plastids. *Science* 276: 2039-2042.

Kolodziejek I, Koziol I, Waleza M, Mostowska A (2003). Ultrastructure of mesophyll cells and pigment content in senescing leaves of maize and barley. *Journal of Plant Growth Regulators* 22: 217-227.

Koussevitzky S, Nott A, Mockler TC, Hong F, Sachetto-Martins G, Surpin M, Lim J, Mittler R, Chory J (2007). Signals from chloroplast converge to regulate nuclear gene expression. *Science* 316: 715-719.

Krause K, Kilbiński I, Mulisch M, Rödiger A, Schäfer A, Krupinska K (2005). DNA-binding proteins of the Whirly family in *Arabidopsis thaliana* are targeted to the organelles. *FEBS Letters* 579: 3707-3712.

Kropat J, Oster U, Rüdiger W, Beck CF (2000). Chloroplast signaling in the light induction of nuclear *HSP70* genes requires the accumulation of chlorophyll precursors and their accessibility to cytoplasm/nucleus. *The Plant Journal* 24: 523-531.

Krupinska K (2006). Fate and activities of plastids during leaf senescence. Vol. 22. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Krupinska K, Falk J (1994). Changes in RNA polymerase activity during biogenesis, maturation and senescence of barley chloroplast. Comparative analysis of transcripts synthesized either in run-on assays or by transcriptionally active chromosomes. *Journal of Plant Physiology* 143: 298-305.

Krupinska K, Falk J, Humbeck K (2003). Genetic, metabolic and environmental factors associated with aging in plant. In: Osiewacz HD, ed. Aging of organisms. Kluwer Academic Publishers, 55-78.

- Krupinska K, Haußühl K, Schäfer A, van der Kooij TA, Leckband G, Lörz H, 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 (2004). Photosynthesis and chloroplast breakdown. *Plant Cell Death Processes*: 169-187.
- Kuhlmann M, Nellen W (2004). RNAinterferenz. *Biologie in unserer Zeit* 3: 142-150.
- Kuhn JM, Schroeder JI (2003). Impacts of altered RNA metabolism on abscisic acid signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 463-469.
- Kura-Hotta M, Hashimoto H, Satoh K, Katoh S (1990). Quantitative determination of changes in the number and size of chloroplasts in naturally senescing leaves of rice seedlings. *Plant and Cell Physiology* 31: 33-38.
- Kurepa J, Walker JM, Smalle J, Gosink MM, Davis SJ, Durham TL, Sung DY, Vierstra RD (2003). The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 278: 6862-6872.
- Kwok EY und Hanson MR (2004a). GFP-labelled Rubisco and aspartate aminotransferase are present in plastid stromules and traffic between plastids. *Journal of Experimental Botany* 55: 595-604.
- Kwok EY und Hanson MR (2004b). Plastids and stromules interact with the nucleus and cell membrane in vascular plants. *Plant Cell Reports* 23: 188-195.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lazo GR, Stein PA, Ludwig RA (1991). A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Journal of Biotechnology* 9: 963-967.
- Lee KP, Kim C, Landgraf F, Apel K (2007). Executer1- and Executer2-dependent transfer of stress-related signals from the plastid to the nucleus of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA* 104: 10270-10275.
- Lichtenthaler HK (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- Liu Z, Butow RA (2006). Mitochondriale retrograde signaling. *Annual Review of Genetics* 40: 159-185.
- Lopez-Juez E und Pyke KA (2005). Plastids unleashed: their development and their integration in plant development. *International Journal of Developmental Biology* 49: 557-577

- Mahajan Rohit, Delphin C, Guan T, Gerace L, Melchior F (1997). A Small Ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88: 97-107.
- Maréchal A, Parent JS, Sabar M, Véronneau-Lafortune F, Abou-Rached C, Brisson N (2008). Overexpression of mtDNA-associated AtWhy2 compromises mitochondrial function. *BMC Plant Biology* 8: 42.
- Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Hasegawa M, Penny D (2002). Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA* 99: 12246-12251.
- Martínez DE, Costa ML, Guamet JJ (2008). Senescence-associated degradation of chloroplast proteins inside and outside the organell. *Plant Biology* 10 (1): 15-22.
- Marton RF, Thömmes P, Cotterill S (1994). Purification and characterization of dRP-A: a single-stranded DNA binding protein from *Drosophila melanogaster*. *FEBS Letters* 342: 139-144.
- Matile P (1997). The vacuole and cell senescence. *Advances in Botanical Research* 25: 87-112.
- Meyer W, Spiteller G (1997). Oxidized phytosterols increase by ageing in photoautoautotropic cell cultures of *Chenopodium rubrum*. *Phytochemistry* 45: 297-302.
- Mittler R (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Sciences* 7: 405-410.
- Morris K, MacKerness SA, Page T, John CF, Murphy AM, Carr JP, Buchanan-Wollaston V (2000). Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *The Plant Journal* 23 (5): 677-685.
- Mullet JE (1988). Chloroplast development and gene expression. *Annual Reviews of Plant Physiogyl* 39: 475-502.
- Mullet JE (1993). Dynamic regulation of chloroplast transcription. *Plant Physiology* 103: 309-313.
- Mullet JE und Klein RR (1987). Transkription and RNA stability are important determinants of higher plant chloroplast RNA levels. *EMBO Journal* 6: 1571-1579.
- Murzin AG (1993). OB (oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. *EMBO Journal* 12 (3): 861-867.
- Nam HG (1997). The molecular genetic analysis of leaf senescence. *Current Opinion in Biotechnology* 8: 200-207.

- Natesan SK, Sullivan JA, Gray JC (2005). Stromules: a characteristic cell-specific feature of plastid morphology. *Journal of Experimental Botany* 56: 787-797.
- Neill S, Desikan R, Hancock J (2002). Hydrogen peroxide signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 388-395.
- Newton K (1994). Procedures for isolating mitochondria and mitochondrial DNA and RNA. In: Freeling M, Walbot V, eds. *The maize handbook*. Springer, New York: 549-556.
- Niyogi KK (1999). Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annual Reviews of Plant Biology* 50: 333-359.
- Noodén L.D. (2004). Introduction. In: *Plant Cell Death Processes*. Academic Press, San Diego, CA: 1-18.
- Noodén LD (1988). The phenomena of senescence and aging. In: Noodén LD, Leopold AC, eds. *Senescence and Aging in Plants*. San Diego: Academic Press Inc: 1-50.
- Noodén LD, Guimmet JJ, John I (1997). Senescence mechanisms. *Physiologia Plantarum* 101: 746-753.
- Nott A, Jung HS, Koussevitzky S, Chory J (2006). Plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Annual Reviews of Plant Biology* 57: 739-759.
- Novatchkova M, Budhiraja R, Coupland G, Eisenhaber F, Bachmair A (2004). SUMO conjugation in plants. *Planta* 220: 1-8.
- Oelmüller R, Levitan I, Bergfeld R, Rajasekhar VK, Mohr H (1986). Expression of nuclear genes as affected by treatments acting on the plastids. *Planta* 168: 482-492.
- Oelmüller R, Mohr H (1986). Photooxidative destruction of chloroplast and its consequences for expression of nuclear genes. *Planta* 167: 106-113.
- Ono K, Hashimoto H, Katoh S (1995). Changes in the number and size of chloroplasts during senescence of primary leaves of wheat grown under different conditions. *Plant and Cell Physiology* 36: 9-17.
- Palancade B, Doye V (2008). Sumoylating and desumoylating enzymes at nuclear pores: underpinning their unexpected duties? *Trends in Cell Biology* 18 (4): 174-183.
- Parthier B (1990). Jasmonates: hormonal regulators or stress factors in leaf senescence. *Journal of Plant Growth Regulation* 9: 445-454.
- Peng Y, Lin W, Wei H, Krebs S, Arora R (2008). Phylogenetic analysis and seasonal cold acclimation-associated expression of early light-induced protein genes of *Rhododendron catawbiense*. *Physiologia Plantarum* 132: 44-52.
- Pennell RI, Lamb C (1997). Programmed cell death in plants. *The Plant Cell* 9: 1157-1168.

- Peoples M, Dalling M (1988). The interplay between proteolysis and amino acid metabolism during senescence and nitrogen reallocation. In: Noodén LD, Leopold AC, eds. Senescence and Aging in Plants. San Diego: Academic Press Inc: 181–217.
- Pfalz J, Liere K, Kandlbinder A, Dietz KJ, Oelmüller R (2006). pTAC2, -6, and -12 are components of the transcriptionally active plastid chromosome that are required for plastid gene expression. *The Plant Cell* 18 (1): 176-197.
- Pfannschmidt T, Nilsson A, Allen JF (1999). Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* 397: 625-628.
- Pleijel H, Ojanpera K, Danielsson H, Sild E, Gelang J, Wallin G, Skarby L, Sellden G (1997). Effects of leaf senescence in spring wheat-possible consequences for grain yield. *Phyton Annales Rei Botanicae* 37: 227-232.
- Pötter E, Kloppstech K (1993). Effects of light stress on the expression of early light-inducible proteins in barley. *European Journal of Biochemistry* 214 (3): 779-786.
- Poulsen C (1983). The barley chloroplast genome: physical structure and transcriptional activity *in vivo*. *Carlsberg Research Communications* 48: 57-80.
- Prikryl J, Watkins K, Friso G, van Wijk KJ, Barkan A (2008). A member of the Whirly family is a multifunctional RNA- and DNA-binding protein that is essential for chloroplast biogenesis. *Nucleic Acids Research*: 36 (16): 5152 -5165.
- Richards EJ, Ausubel FM (1988). Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 53 (1): 127-136.
- Robertson D und Laetsch WM (1974). Structure and function of developing barley plastids. *Plant Physiology* 54: 148-159.
- Roelfsema MR, Levchenko V, Hedrich R (2004). ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S- type anion channels. *The Plant Journal* 37: 578-588.
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD (1996). Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8: 1809-1819.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Second edition. New York, Cold Spring Harbor Press.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 74: 5463-5467.
- Scharrenberg C (2001). Untersuchungen zur transkriptionellen Kontrolle der Genexpression während der Blattseneszenz der Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Dissertation, Kiel.

Scharrenberg C, Falk J, Quast S, Haußühl K, Humbeck K, Krupinska K (2003). Isolation of senescence-related cDNAs from flag leaves of field grown barley plants. *Physiologia plantarum* 118: 278-288.

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.

Schumacher MA, Karamooz E, Zíková A, Trantírek L, Lukeš J (2006). Crystal structures of *T. brucei* MRP1/MRP2 guide-RNA binding complex reveal RNA matchmaking mechanism. *Cell* 126: 701-711.

Schwacke R, Fischer K, Ketelsen B, Krupinska K, Krause K (2007). Comparative survey of plastid and mitochondrial targeting properties of transcription factors in *Arabidopsis* and rice. *Molecular Genetics and Genomics* 277: 631-646.

Sharman BC (1942). Developmental anatomy of the shoot of *Zea mays* L. *Annals of Botany* 1: 245-282.

Sigal N, Delius H, Kornberg T, Gefter ML, Alberts B (1972). A DNA-unwinding protein isolated from *Escherichia coli*: its interaction with DNA and with DNA polymerases. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA* 69 (12): 3537-3541.

Singh B, Gupta RS (2006). Mitochondrial import of human and yeast fumarase in live mammalian cells: retrograde translocation of the yeast enzyme is mainly caused by its poor targeting sequence. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 346 (3): 911-918.

Stamp P, Herzog H (1976). Untersuchungen zur Fahnenblattalterung und zum Kornwachstum einiger deutscher Sommerweizensorten (*Triticum aestivum* L.). *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung* 77: 330-338.

Sullivan J A, Gray J C (2002). Multiple plastid signals regulate the expression of the pea plastocyanin gene in pea and transgenic tobacco plants. *The Plant Journal* 32: 763-774.

Sullivan J. A., Gray J.C. (1999). Plastid translation is required for the expression of nuclear photosynthesis genes in the dark and roots of the pea *lip1* mutant. *The Plant Cell* 11: 901-910.

Sunderland PA, West CE, Waterworth WM, Bray CM (2006). An evolutionarily conserved translation initiation mechanism regulates nuclear or mitochondrial targeting of DNA ligase 1 in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 47 (3): 356-367.

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.

- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Thompson JE, Froese CD, Madey E, Smith MD, Hong Y (1998). Lipid metabolism during plant senescence. *Progress in Lipid Research* 37: 119-141.
- Thomson WW, Plat-Aloia KA (1987). Ultrastructure and senescence in plants. In: Thomson WW, Nothnagai EA, Huffaker RC, eds. *Plant Senescence: Its Biochemistry and Physiology*. Rockville: American Society of Plant Physiology: 20-30.
- Tingay S, McElroy D, Kalla R, Fieg S, Wang M, Thornton S, Brettel R (1997). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *The Plant Journal* 11: 1369-1376.
- Toledo-Ortiz G, Hug E, Quail PH (2003). The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *The Plant Cell* 15 (11): 2497-2502.
- Turner JG, Ellis C, Devoto A (2002). The jasmonate signal pathway. *The Plant Cell, Supplement* 14, S153-S164.
- Ungermann C, Neupert W, Cyr DM (1994). The role of Hsp70 in conferring unidirectionality on protein translocation into mitochondria. *Science* 266: 1250-1253.
- Valgardsdottir R, Brede G, Eide LG, Frengen E, Prydz H (2001). Cloning and characterization of MDDX28, a putative dead-box helicase with mitochondrial and nuclear localization. *Journal of Biological Chemistry* 276 (34): 32056-32063.
- Van Dyck E, Foury F, Stillman B, Brill SJ (1992). A single-stranded DNA binding protein required for mitochondrial DNA replication in *S. cerevisiae* is homologous to *E. coli* SSB. *EMBO Journal* 11 (9): 3421-3430.
- Vertegaal ACO (2007). Small ubiquitin-related modifiers in chains. *Biochemical Society Transactions* 35 (6): 1422-1423.
- Vothknecht UC, Soll J (2005). The protein import pathway into chloroplasts: a single tune or variations on a common theme? In: Simon Geir Møller, ed. *Plastids*. *Annual Plant Reviews* 13: 157-179.
- Wadsworth RI, White MF (2001). Identification and properties of the crenarchaeal single-stranded DNA binding protein from *Sulfolobus solfataricus*. *Nucleic Acid Res.* 29 (4): 914-920.
- Wagner R, Pfannschmidt T (2006). Eukaryotic transcription factors in plastids-bioinformatic assessment and implications for the evolution of gene expression machineries in plants. *Gene* 381: 62-70.
- Wanner G (2005). *Mikroskopisch-Botanisches Praktikum*. Georg Thieme Verlag.

---

Weaver LM, Amasino RM (2001). Senescence is induced in individually darkened *Arabidopsis* leaves, but inhibited in whole darkened plants. *Plant Physiology* 127: 876-886.

Wiedemuth K, Müller J, Kahlau A, Amme S, Mock H, Grzam A, Hell R, Egle K, Beschow H, Humbeck K (2005). Successive maturation and senescence of individual leaves during barley whole plant ontogeny reveals temporal and spatial regulation of photosynthetic function in conjunction with C and N metabolism. *Journal of Plant Physiology* 162: 1226-1236.

Woodson J D, Chory J (2008). Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nature* 9: 383-395.

Yoo HH, Kwon C, Lee MM, Chung IK (2007). Single-stranded DNA binding factor AtWhy1 modulates telomere length homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 49: 442-451.

Zapata JM, Guéra A, Esteban-Carrasco A, Martín M, Sabater B (2005). Chloroplasts regulate leaf senescence: delayed senescence in transgenic *ndhF*-defective tobacco. *Cell Death and Differentiation*: 12 (10): 1277–1284.

Zimmermann P und Zentgraf U (2005). The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cellular and Molecular Biology Letters* 10 (3): 515-534.



## 7 Anhang

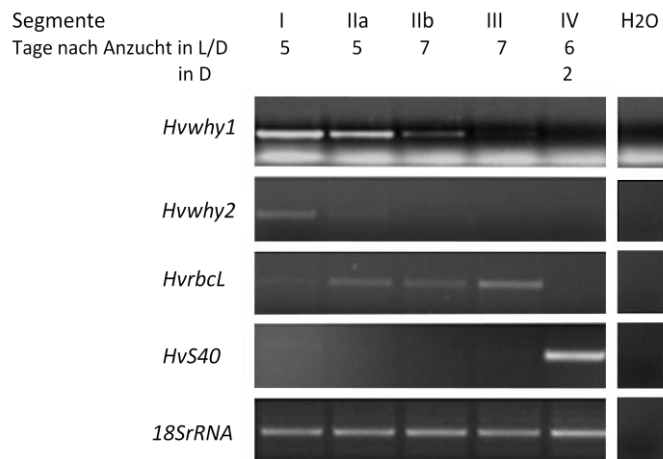


Abb. 7.1: Nachweis der Expression der *whirly*-Gene in Blättern der Gerste mittels semiquantitativer RT-PCR.

Die Gesamt-RNA wurde aus folgendem Blattmaterial isoliert:

Segment I: meristematisches Gewebe

Segment IIa und IIb: junges Gewebe

Segment III: ausdifferenziertes Gewebe

Segment IV: senescentes Gewebe nach einer Dunkelphase von zwei Tagen

Es wurde aus je 2 µg Gesamt-RNA cDNA synthetisiert und die relativen Transkriptmengen durch semiquantitative RT-PCR ermittelt. Es wurden die Gene *whirly1* und *whirly2* sowie *rbcl* und *S40* amplifiziert. Als Beladungskontrolle diente der Nachweis der 18S rRNA. H<sub>2</sub>O: Kontrolle des PCR-Ansatzes ohne Zugabe von cDNA.

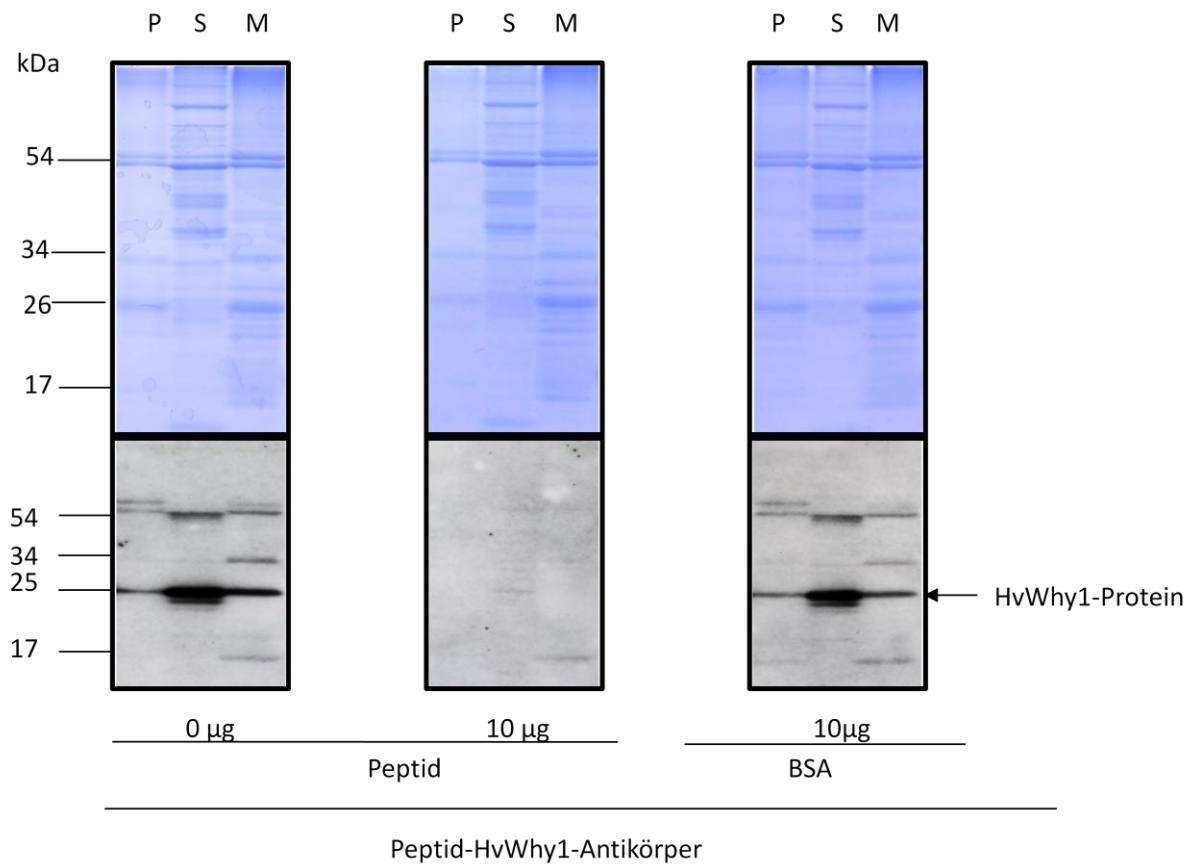


Abb. 7.2: Untersuchungen zur Spezifität der Immunreaktion des Antikörpers, der gegen eine Peptidsequenz des HvWhy1-Proteins gerichtet ist, in Chloroplastenfraktionen (P) aus fünf Tage alten Gerstenprimärblättern. Es wurden Proteine (10  $\mu$ g) aus isolierten Stroma- (S) und Membranfraktionen (M) gelelektrophoretisch aufgetrennt, immobilisiert und mit dem Peptid-HvWhy1-Antikörper (2.5.10) inkubiert. Eine Antikörperlösung wurde zusätzlich mit Peptid (10  $\mu$ g) und eine zweite mit BSA (10  $\mu$ g) vorbehandelt. Nachgewiesene Protein sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

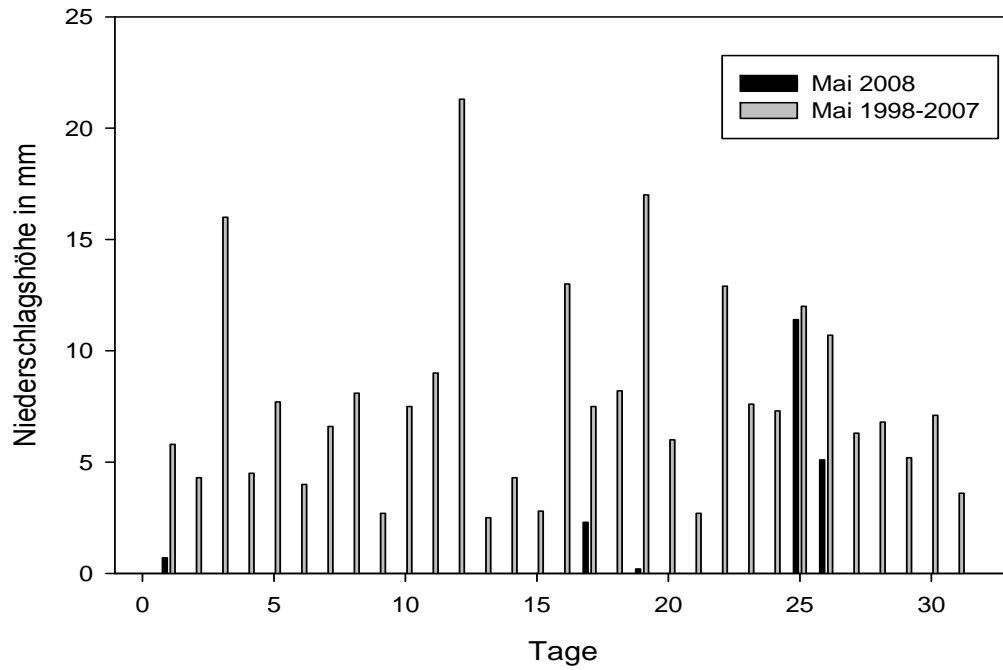
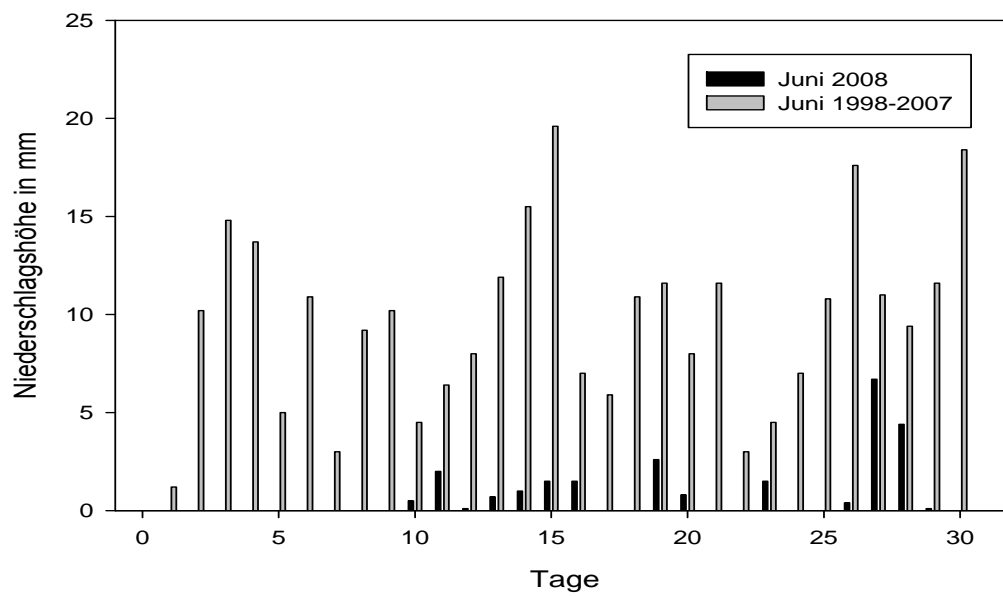
**A****B**

Abb. 7.3: Vergleich der Niederschlagshöhen der Monate Mai (A) und Juni (B) des Jahres 2008 mit vorhergegangenen Jahren (1998-2007). Quelle: DWD, Station Kiel-Holtenau.

---

-209 GTACATGGATTGATCATAGAATGTTAGATCCATGGATATGATGTCCTTTCTATCTTGTTTGTGTGAAATIR2  
GTCA  
-136 GGTTGTTGCCAATATACTGTCTAGTGGIR1TGACAAACTTAGAGAATATGCAAAAGGGGTTGAAAACAATCTAC  
-65 GCAAGGTTGAATTGGATTCAATCGAGGTTGTTATTCTCTACCTGTGCTACATTGTGGCACTTGTT |—————>

Abb. 7.4: 209 bp der genomischen DNA-Sequenz aus dem 5`Bereich vor dem Transkriptionsstart des *Atwhy2*-Gens. Abgebildet ist der codierende Strang der Promotorsequenz. Hervorgehoben sind die IR1- und IR2-Motive.

Tabelle 7.1: Behandlung von rekombinantem HvWhy1-Protein und plastidären Proteinextrakten mit folgenden Substanzen bzw. unter folgenden Bedingungen vor gelelektrophoretischer Auftrennung und Immobilisierung auf einer Membran. Die Immunodekoration erfolgte mit dem Peptid-HvWhy1-Antikörper. Untersucht wurde die Abnahme der möglichen Dimerbande im Vergleich zu einer unbehandelten Probe.

| Behandlung mit                      | Veränderung der Menge an 54 kDa Protein im Verhältnis zum Monomergehalt |
|-------------------------------------|---|
| pH Veränderung 6,0-6,8              | Nein  |
| pH Veränderung 8,0-8,5              | Nein  |
| 5 M Guanidinhydrochlorid            | Nein  |
| 50 mM und 150 mM KCl                | Nein  |
| 10 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol | Nein  |
| 10-50 $\mu$ M EDTA                  | Nein  |
| 1 M NaCl                            | Schwach   |
| 2 M NaI                             | Schwach   |
| 8 M Harnstoff                       | Nein  |
| 3 $\mu$ g RNase A (10 mg/ml)        | Nein  |
| 1 U DNase I                         | Nein  |
| 5 $\mu$ M und 50 $\mu$ M CuCl       | Nein  |

## Danksagung

Vor allen anderen will ich Frau Prof. Dr. Karin Krupinska für die Bereitstellung des Themas und das Ermöglichen dieser Arbeit danken. Dies ist umso höher zu bewerten, da ich mich zu Beginn dieser Arbeit in einer äußerst schwierigen persönlichen Situation befand. Sie hat nie den Glauben an mich verloren und mit ihren Ideen, Erfahrungen und vielen fruchtbaren Diskussionen diese Arbeit immer wieder vorangetrieben.

Darüberhinaus danke ich gern folgenden Menschen, deren Ermutigungen und Unterstützung mir, während ich diese Arbeit anfertigte, sehr viel bedeutete: Zu Dank verpflichtet bin ich den Postdocs Jon, Kirsten und Ying sowie Mario und Isabell für ihre Bereitschaft, mit mir über fachliche und praktische Probleme zu diskutieren. Besonders hervorheben möchte ich in diesem Zusammenhang Kirsten und Isabell, die mir nicht nur fachlich durch Inspiration, kluge Anregungen und aufschlussreiche Hinweise zur Seite standen, sondern auch menschlich mir eine große Unterstützung waren. Das wird mir immer in Erinnerung bleiben.

Danken möchte ich auch ganz herzlich Susanne, Anke, Ulrike und Annekatriin für die fachkundige und technische Unterstützung sowie die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre. Susanne danke ich vor allem für unsere lustigen Treffen am Küchentisch in geselliger Runde und Anke für ihre Hilfe im Labor (Danke Anke!).

Dank gebührt auch der Truppe vom Doktorandenzimmer: Joanna, Kathleen, Sascha und Rena, letzterer insbesondere für das blitzschnelle Korrekturlesen der vorgelegten Manuskripte. Vielen Dank für das herzliche Miteinander und Euren stetigen Humor. Ich werde gerne an unsere gemeinsamen Mittagessen zurück denken. Ich danke ferner Kristin und Katja sowie den Ehemaligen.

Von allen, die mir auf dem langen Weg Mut zugesprochen und mit Rat und Tat geholfen haben, möchte ich meinem Freund Björn besonderen Dank aussprechen, dessen Witz, wunderbare Ratschläge und unermüdliche Geduld für mich ein einziger Glücksfall sind.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich immer unterstützte und für mich da war.

## Lebenslauf

**Name:** Evelyn Grabowski

Geburtsdatum: 08.02.1978

Geburtsort: Berlin

### Schulausbildung:

Friedrich-Schiller-Oberschule Berlin 1984-1991

1. Gymnasium Berlin 1991-1997

Abschluss: Abitur

### Studium:

Freie Universität Berlin 1998-2000

Studiengang Biologie Diplom Vordiplom

Christian –Albrechts-Universität zu Kiel 2000-2003

Studiengang Biologie Diplom Abschluss: Diplom-Biologe

Hauptfach: Zellbiologie

Nebenfächer: Botanik und Meereschemie

Diplomarbeit im Fach Zellbiologie,

Betreuung Prof. Dr. K. Krupinska

### Berufserfahrung:

Arbeit am Botanischen Institut CAU September-Dezember 2003

### Promotion:

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel seit Januar 2004

Betreuung Prof. Dr. K. Krupinska

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit – abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer – nach Inhalt und Form meine Arbeit ist und unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis angefertigt wurde.

Diese Arbeit wurde bis jetzt weder vollständig noch in Teilen einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

### Teile der Arbeit sind in folgender Publikation enthalten:

Grabowski E, Miao Y, Mulisch M, Krupinska K (2008). Single-stranded DNA-binding protein Whirly1 in barley leaves is located in plastids and the nucleus of the same cell. *Plant physiology* 147 (4): 1800-1804.

### Beiträge in Mitteilungsbänden von Tagungen

Grabowski E, Miao Y, Mulisch M, Kilbienski I and Krupinska K (2007). Dual localization of the Whirly1 protein in plastids and nucleus. Botanikertagung, Hamburg.

Grabowski E, Mulisch M, Krupinska K (2007). Senescence associated change in the distribution of the Whirly1 protein between plastids and the nucleus. 20. Tagung zur Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen.

Kilbienski I, Grabowski E, Krupinska K (2007). The senescence marker gene *HvS40* is regulated by the Whirly1 transcription factor. Genetics of Aging, Jena.

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

Kiel, den

Evelyn Grabowski



