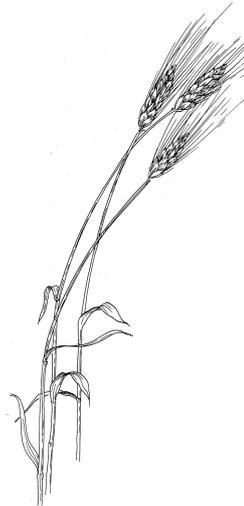


Botanisches Institut
Biologie der Pflanzenzelle

Das seneszenzassoziierte Gen *HvS40* der Gerste

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



vorgelegt von
Mirl Trösch

Kiel
Juni 2016

Erste Gutachterin: Prof. Karin Krupinska, Universität Kiel

Zweiter Gutachter: Prof. Klaus Humbeck, Universität Halle

Tag der mündlichen Prüfung: 12.09.2016

Zum Druck genehmigt: 12.09.2016

Der Dekan

„Jede Blüte will zur Frucht, jeder Morgen Abend werden,
Ewiges ist nicht auf Erden als der Wandel, als die Flucht.
Auch der schönste Sommer will einmal Herbst und Welke spüren.
Halte, Blatt, geduldig still, wenn der Wind dich will entführen.“
Hermann Hesse, *Welkes Blatt*, 1933

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	7
1.1 Der Seneszenzprozess in Pflanzen	7
1.1.1 Strukturelle Veränderungen im Chloroplasten während der Seneszenz . .	10
1.2 Regulatoren der Blattseneszenz	11
1.2.1 Phytohormone	11
1.2.1.1 Abscisinsäure (ABA)	11
1.2.1.2 Jasmonsäure (JA)	12
1.2.1.3 Salicylsäure (SA)	13
1.2.2 Zucker	14
1.2.3 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	14
1.2.4 Stressfaktoren	16
1.2.4.1 Durch hohe Lichteinstrahlung induzierte Seneszenz	16
1.2.4.2 Durch Dunkelheit induzierte Seneszenz	17
1.2.4.3 Durch Pathogenbefall induzierte Seneszenz	17
1.2.5 Seneszenzspezifische Genexpression	18
1.2.6 Das seneszenzassoziierte Gen <i>HvS40</i> der Gerste	19
1.3 Zielsetzung	23
2 Material und Methoden	24
2.1 Chemikalien und Enzyme	24
2.2 Plasmide und Antibiotika	24
2.3 Pflanzenmaterial	25
2.3.1 Anzucht von Gerstenpflanzen	25
2.3.2 Anzucht von Weizenpflanzen	25
2.3.3 Behandlung von Primärblättern der Gerste mit Phytohormonen	25
2.3.4 <i>HvS40</i> -RNAi-Linien	26
2.3.5 <i>HvS40</i> -Überexpressionslinien	27
2.3.6 Blattmaterial für die Analyse der Blattseneszenz	29
2.3.6.1 Durch Dunkelheit induzierte Blattseneszenz	29
2.3.6.2 Analyse der natürlichen Blattseneszenz	29
2.3.7 Bestimmung der maximalen Effizienz des PSII	29
2.3.8 Nachweis des Zelltods mit dem Farbstoff Evans Blau	30
2.4 Allgemeine molekularbiologische Methoden	31
2.4.1 Lösungen und Puffer	31

2.4.2	Anzucht, Lagerung und Transformation von Bakterien	32
2.4.2.1	Bakterienstämme	32
2.4.2.2	Anzucht von Bakterienkulturen	32
2.4.2.3	Herstellung von Gefrierkulturen	32
2.4.2.4	Herstellung kompetenter Zellen	32
2.4.2.5	Transformation kompetenter Bakterienzellen	32
2.4.2.6	Gewinnung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	33
2.4.3	Gewinnung von genomischer DNA aus Gersten- und Weizenpflanzen . . .	33
2.4.4	Klonierung von DNA-Fragmenten	34
2.4.4.1	pGEM-T-Vektorsystem zur Klonierung von PCR-Produkten . .	34
2.4.4.2	Gateway-Klonierungstechnik	34
2.4.5	Restriktion von DNA mit Endonukleasen	35
2.4.6	DNA-Agarosegelelektrophorese	35
2.4.7	Elution von DNA aus Agarosegelen	35
2.4.8	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	35
2.4.9	Sequenzierung von DNA-Fragmenten	35
2.4.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
2.4.11	Isolierung von Gesamt-RNA	37
2.4.12	Quantitative Echtzeit-PCR	38
2.4.13	DNA-Blot Analysen (Southern-Blot)	39
2.4.14	Denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese und Northern-Blot	40
2.5	Allgemeine proteinbiochemische Analysen	42
2.5.1	Heterologe Überexpression von <i>HvS40</i> in <i>E.coli</i> BL21	42
2.5.2	Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie an Nickel-NTA . .	42
2.5.3	Isolierung von Gesamtprotein aus Primärblättern der Gerste	43
2.5.4	Isolierung von Zellkernen aus Gerstenblättern	43
2.5.5	Bestimmung der Proteinkonzentration	44
2.5.6	Isolierung von Chloroplasten aus Primärblättern der Gerste	44
2.5.7	Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen	45
2.5.8	Färbung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen	46
2.5.9	Protein-Blot Analysen (Western-Blot)	46
2.5.10	Entfernen von gebundenen Antikörpern von der Proteinblot-Membran . .	47
2.6	Transiente Transformation von pflanzlichen Geweben	48
2.6.1	Biolistische Transformation von Zwiebelepidermiszellen	48
2.6.2	Transiente Transformation von Gerstenprotoplasten	49
2.6.2.1	Protoplastierung von Gerstenblättern	49
2.6.2.2	Transformation von Gerstenprotoplasten mit PEG	50
2.6.2.3	Behandlung von Gerstenprotoplasten mit Abscisinsäure	50
2.7	Konfokale Laser-Raster Mikroskopie (CLSM)	51
2.8	Verwendete Programme, Datenbanken und Internetseiten	52

3 Ergebnisse	54
3.1 Sequenzanalyse des <i>HvS40</i> -Promotors	54
3.2 Untersuchungen zur Expression des <i>HvS40</i> -Gens	61
3.3 <i>Alt-HvS40</i> : Der alternative Leserahmen des <i>S40</i> -Gens der Gerste	62
3.4 Charakterisierung des Alt-HvS40- und des HvS40-Proteins	63
3.4.1 <i>In silico</i> -Analysen der Aminosäuresequenzen	63
3.4.2 Der alternative <i>S40</i> -Leserahmen in weiteren monokotylen Arten	67
3.4.3 Vorhersagen zur subzellulären Lokalisation und zur Funktion der S40-Proteine	68
3.4.3.1 Vorhersagen zur subzellulären Lokalisation von weiteren DUF584-Proteinen	70
3.5 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der HvS40- und TdS40-Proteine .	71
3.5.1 Isolierung und Sequenzierung der <i>S40</i> -Leserahmen von <i>Triticum durum</i> .	71
3.5.2 Transiente Expression von <i>HvS40:GFP</i> in Zwiebelepidermiszellen	71
3.5.3 Untersuchungen zur Ko-Lokalisation mit dem PEND-Protein	73
3.5.4 Transiente Expression von <i>HvS40+1:GFP</i> in Gerstenprotoplasten	75
3.5.4.1 Gerstenprotoplasten aus grünem Blattgewebe	75
3.5.4.2 Gerstenprotoplasten aus seneszierendem Blattgewebe	75
3.5.4.3 Einfluss von seneszenzfördernden Phytohormonen auf die subzelluläre Lokalisation von Alt-HvS40	77
3.5.5 Transiente Expression von <i>HvS40+3:GFP</i> in Gerstenprotoplasten	79
3.6 Untersuchungen an Gerstenlinien mit verändertem <i>S40</i> -Transkriptgehalt	81
3.6.1 RNAi- <i>S40</i> -Linien der Gerste	81
3.6.2 DNA-Blot Analysen (Southern-Blot)	81
3.6.3 Expressionsniveau	83
3.6.3.1 Untersuchungen zur Expression des <i>Ubiquitin</i> -Genes	83
3.6.3.2 Expressionsniveau von <i>HvS40</i> in den RNAi-Pflanzen	83
3.6.4 Charakterisierung des Phänotyps	85
3.6.4.1 Dunkelinduzierte Seneszenz	85
3.6.4.2 Natürliche Seneszenz	87
3.6.4.3 Durch hohe Lichtintensität induzierte Seneszenz	87
3.6.5 <i>S40</i> -Überexpressionslinien der Gerste	90
3.6.6 Expressionsniveau	91
3.6.6.1 Untersuchungen zur Expression des <i>Fruktosebisphosphatase</i> -Gens	91
3.6.6.2 <i>S40</i> -Expressionsniveau in den ÜE-Linien	92
3.6.7 Charakterisierung des Phänotyps	93
3.6.7.1 Dunkelinduzierte Seneszenz	93
3.6.7.2 Natürliche Seneszenz	94
3.6.8 Zusammenfassung der Phänotypisierung	96
3.7 Versuche zum Nachweis der HvS40-Proteine	97

3.7.1	Der gegen HvS40 gerichtete Antikörper	97
3.7.2	Charakterisierung eines gegen Alt-HvS40 gerichteten Antikörpers	101
3.7.3	Versuche zum immunologischen Nachweis des Alt-HvS40-Proteins	102
4	Diskussion	107
4.1	Regulation der <i>HvS40</i> -Genexpression	107
4.1.1	ROS	107
4.1.2	Lichtregulierte Genexpression	110
4.1.3	Gewebespezifische Expression	110
4.1.4	Retrograde Signale aus den Plastiden	110
4.1.5	WHIRLY1 als Bindefaktor?	111
4.2	Das Phänomen der dual kodierenden Gensequenzen	112
4.2.1	Funktionelle Vorteile dual kodierender Gene in Eukaryoten	114
4.2.2	Alternative Translation von Leserastern: Der <i>Leaky Scanning</i> -Mechanismus	115
4.2.3	Regulation des <i>Leaky Scanning</i> -Mechanismus'	117
4.3	Subzelluläre Lokalisation von Alt-HvS40 und HvS40	119
4.3.1	Subzelluläre Lokalisation von Alt-HvS40 in seneszierenden Plastiden . . .	119
4.3.2	Duale Lokalisation von DNA-Bindeproteinen	120
4.3.3	Mögliche Umverteilung von Alt-HvS40 aus den Plastiden in den Zellkern	121
4.3.4	<i>Shuttle</i> -Proteine: Pendeln zwischen Cytoplasma und Zellkern	124
4.4	Charakterisierung von Gersten-Transformanten mit verändertem <i>S40</i> -Transkriptgehalt	126
4.4.1	RNAi- <i>S40</i> -Linien	126
4.4.2	ÜE- <i>S40</i> -Linien	126
4.5	Phänotypisierung der Transformanten	127
4.5.1	Antagonistische Funktionen der S40-Proteine der Gerste	129
4.5.2	Seneszieren: eine Frage der Balance	130
4.6	Ausblick	131
5	Zusammenfassung / Summary	134
	Literaturverzeichnis	137
	Anhang	153

Abkürzungsverzeichnis

A: Adenosin

ABA: Abscisinsäure

Acc.Nr.: *Accession Number*

AK: Antikörper

APS: Ammoniumperoxodisulfat

AS: Aminosäure(n)

ATP: Adenosintriphosphat

bp: Basenpaare

BSA: Bovines Serumalbumin

cDNA: komplementäre DNA

cpm: Zerfälle pro Minute

CTP: Cytosintriphosphat

CaMV: *Cauliflower Mosaic Virus*

DNA : Desoxyribonukleinsäure

dNTP: Desoxyribonukleosidtriphosphat

DTT: Dithiothreitol

ECL: verstärkte Lumineszenz (*Enhanced Chemiluminescence*)

EtOH: Ethanol

g: Fallbeschleunigung (9,81 m x s⁻²)

G: Guanin

GUS: β -Glucuronidase

HEPES: Hydroxyethylpiperazinyl-Ethansulfonsäure

JA: Jasmonsäure

kDa: Kilodalton

LHC(P) II: Lichtsammelkomplex(proteine) des Photosystems II

M: Mol (6,023 x 10²³ Teilchen)

min: Minute(n)

MOPS: 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure

Ni-NTA: Nickel-Nitrilotriessigsäure

OD: optische Dichte

PCR: Polymerasekettenreaktion

pH: negativer Logarithmus des Wasserstoff-Atoms

PS II: Photosystem II

psi: Druck pro Quadrat Zoll

RLF: relative Luftfeuchte

RNA: Ribonukleinsäure

RNase: Ribonuklease

RT: Raumtemperatur

RuBisCO: Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase

SA: Salicylsäure

SDS: Natriumdodecylsulfat

sek: Sekunde(n)

T: Thymidin

TEMED: Tetramethylethyldiamin

TIC/TOC: *Translocon at the inner/outer membrane of chloroplasts*

Tm: Schmelztemperatur

Tris: Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan

TSE: Transmissible spongiforme Enzephalopathie

U: Weiss-Einheit/ μ l

UTR: Untranslatierte Region

v/v: Volumenprozent

Vol: Volumen

w/v: Gewicht pro Volumen

1 | Einleitung

1.1 Der Seneszenzprozess in Pflanzen

Die Seneszenz ist eine komplexe, hoch regulierte Phase im Leben einer Pflanze, die zu einem kontrollierten und koordinierten Absterben einzelner Zellen bis hin zur ganzen Pflanze führen kann. Die letzte Phase des genetisch kontrollierten Seneszenzprozesses wird daher auch als eine Form des programmierten Zelltods angesehen. Während des Seneszenzprozesses wird der Abbau von zellulären Bestandteilen eingeleitet und die daraus gewonnenen Nährstoffe, vor allem Phosphor und Stickstoff, werden remobilisiert. Die remobilisierten Nährstoffe dienen dann dem Aufbau sich neu entwickelnder und wachsender Organe wie zum Beispiel Blätter, Blüten und Samen.

Im Pflanzenreich unterscheidet man zwischen zwei Formen der Seneszenz. Die polykarpische Seneszenz zeichnet sich durch das Absterben einzelner Organe aus und ist charakteristisch für mehrjährige Pflanzen. Ein Beispiel für einen polykarpischen Seneszenzprozess ist die Laubfärbung im Herbst, deren augenscheinliches Merkmal auf den Abbau des Makromoleküls Chlorophyll zurück zu führen ist. Neben dem Chlorophyll werden noch weitere Zellbestandteile abgebaut, bis das Blatt schlussendlich stirbt und abgeworfen wird. Die zuvor aus den Blättern remobilisierten Assimilate werden in geeignete Transportformen überführt, über das Phloem transportiert und in die Speicherparenchyme von Wurzel und Stamm eingelagert. In der darauf folgenden Vegetationsperiode werden sie zum Aufbau von Biomasse erneut verwendet. Man geht davon aus, dass die polykarpische Blattseneszenz durch die sich verkürzenden Tageslänge und die sinkenden Temperaturen eingeleitet wird (Krupinska, 2014).

Während der monokarpischen Seneszenz hingegen stirbt der gesamte Organismus. Dies geht oft einher mit der reproduktiven Phase, in der die remobilisierten Nährstoffe für den Aufbau der Fortpflanzungsorgane verwendet werden. In vielen einjährigen Getreidearten wie der Gerste wird daher die Blattseneszenz durch den Entwicklungszustand der reproduktiven Organe, also der Blüten und der Karyopsen, kontrolliert (Noodén, 1988). Bei den meisten unserer Getreidearten ist die Remobilisierung von Nährstoffen während der Blattseneszenz für den größten Anteil der Kornfüllung verantwortlich und ist deshalb von großer Bedeutung für die Landwirtschaft (Gregersen *et al.*, 2013).

Die Einleitung der monokarpischen Blattseneszenz wird nicht nur durch den Entwicklungszustand der reproduktiven Organe, sondern auch durch den Entwicklungszustand und das Alter des Blattes kontrolliert. Dass die Seneszenz in Abhängigkeit vom Blattalter eingeleitet wird, kann nach Schippers (2015) mit dem sogenannten Fenster-Konzept, wonach die Lebensspanne eines Blattes in drei Phasen oder Fenster eingeteilt wird, erklärt werden (Abb. 1 A). Die erste Phase ist gekennzeichnet durch Zellvermehrung und durch starkes Wachstum, während der das Blatt externen, Seneszenz auslösenden Signalstoffen gegenüber insensitiv ist (Graham *et al.*, 2012). Während der zweiten Phase, der sogenannten Reifephase, unterliegt das Blatt den Einflüssen zahlreicher Umweltfaktoren und den physiologischen Signalen anderer Organe. Erst die so hervorgerufenen altersbedingten Veränderungen (***Age-Related Changes***, ARCs) verleihen dem Blatt die „Fähigkeit“, zu seneszenzieren (Schippers, 2015). Die altersbedingte Seneszenz, die letzte Phase im Leben eines Blattes, kann dann selbst bei optimalen Wachstumsbedingungen eingeleitet werden. In Getreidepflanzen ist der altersbedingte Seneszenzprozess in jedem Blatt

individuell reguliert (Gregersen *et al.*, 2008). Nährstoffe werden von älteren Blättern zu jüngeren Blättern und schließlich bis ins Fahnenblatt transportiert, welches wiederum für die Versorgung der Ähre mit Nährstoffen und Assimilaten verantwortlich ist (Stamp and Herzog, 1976).

Auch der eigentliche Seneszenzprozess kann in drei Phasen eingeteilt werden, nämlich in eine Initiationsphase, eine degenerative Phase und in eine terminale Phase (Abb. 1 B) (Noodén *et al.*, 1997).

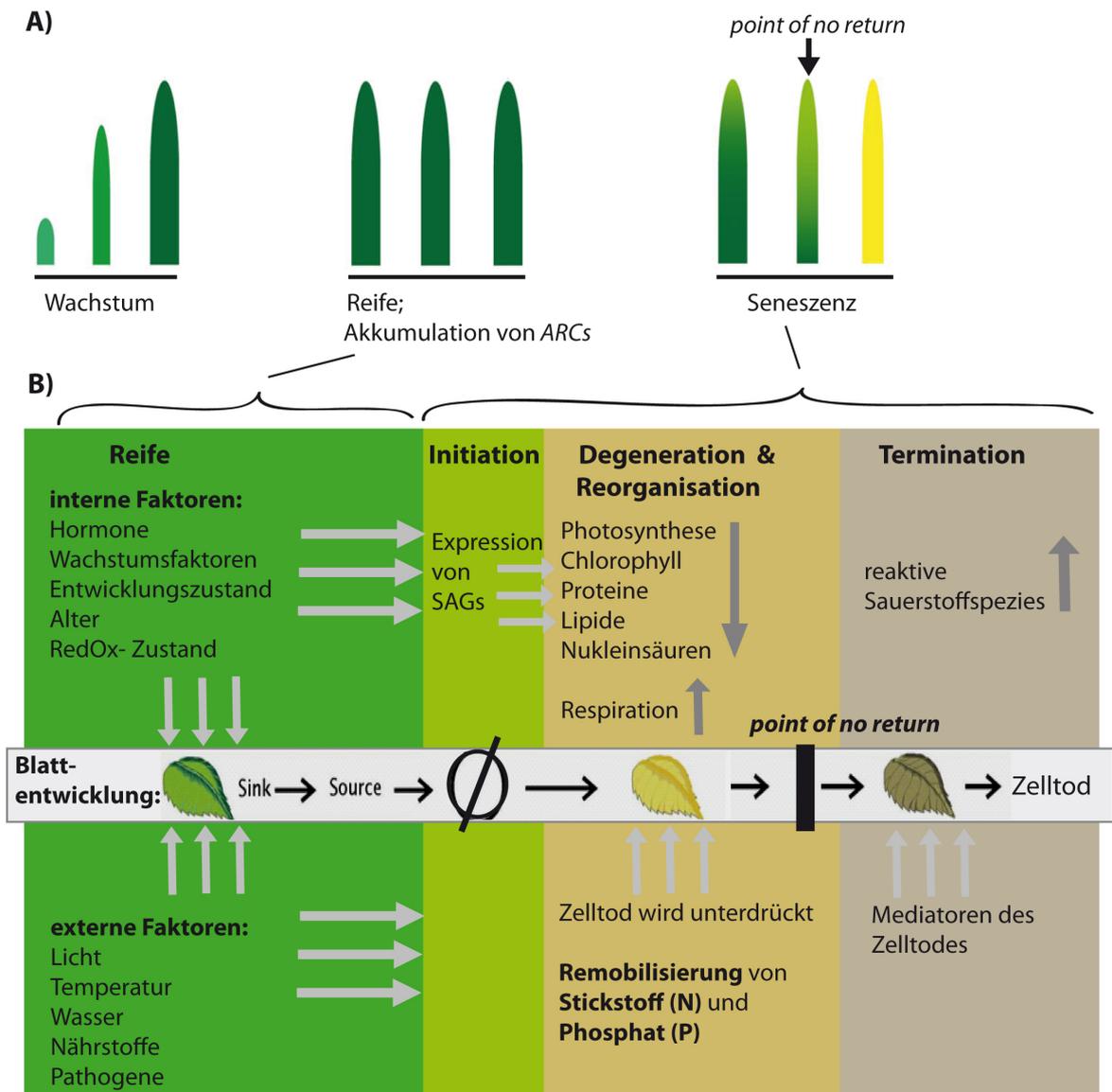


Abbildung (1) A) Schematische Darstellung der Lebensspanne eines Gerstenblattes in Anlehnung an das Fenster-Konzept, die nach Gregersen *et al.* (2013) verändert wurde. ARC: *Age-Related Changes*. B) Schematische Darstellung des Seneszenzverlaufes, auf den viele verschiedene externe und interne Faktoren einwirken. Diese Faktoren üben Signalfunktionen aus und beeinflussen die Aktivität von Genen in den verschiedenen Phasen der Seneszenz (Initiation, Reorganisation & Degeneration, Termination). Im Verlauf der Seneszenz wandelt sich das Blatt von einem Organ, das Nährstoffe für seine Entwicklung braucht (*sink*) zu einem Organ, aus dem Nährstoffe remobilisiert und abtransportiert werden (*source*), um neue sich entwickelnde Organe damit zu versorgen. Der Seneszenzprozess bleibt bis zu einem bestimmten Punkt (*point of no return*) reversibel. In der Abbildung kennzeichnet der schwarze Kasten, dass der Prozess nach Überschreiten dieses Punktes nun nicht mehr reversibel ist. SAG: seneszenzassoziiertes Gen. Die Abbildung wurde in Anlehnung an Noodén *et al.* (1997) von K. Krupinska angefertigt.

Großes Interesse gilt den exo- und endogenen Faktoren, regulatorischen Mechanismen und Genen, die die Blattseneszenz einleiten. Phytohormone wie Ethylen, Abscisinsäure oder Jasmonsäure, der Redox-Zustand des Photosyntheseapparates und das Alter der Zelle sind endogene Faktoren, die im Zusammenspiel mit exogenen Faktoren die Blattseneszenz fördern. Zu den exogenen Faktoren zählen Nährstoff- und Wassermangel, extreme Temperatur- und Lichtverhältnisse, Befall durch Pathogene sowie UV-Strahlung und Ozon (Abb. 1 B). Der Prozess der Seneszenz bleibt bis zu einem bestimmten Punkt reversibel. So besitzen Gerontoplasten von seneszierenden Tabakblättern die Fähigkeit, sich wieder in grüne, zur Photosynthese fähige Chloroplasten zurück zu differenzieren (Zavaleta-Mancera *et al.*, 1999). Die Umkehrbarkeit des Seneszenzprozesses lässt die Autoren von Guiboileau *et al.* (2010) annehmen, dass es sich während der Initiations- und der Reorganisationsphase um adaptive Formen der Seneszenz handelt. Während dieser Phasen üben sowohl seneszenzfördernde als auch -hemmende Faktoren ihren Einfluss auf die Zelle aus und so wechseln sich Seneszenzsymptome mit dem Wiedererlangen von Zellfunktionen ab. Der Seneszenzprozess ist also nicht von vornherein determiniert oder programmiert. Vielmehr zeigt der starke Einfluss von Umweltfaktoren auf den Verlauf der Seneszenz, dass ihre Regulation stark verbunden ist mit anderen regulativen Netzwerken zum Beispiel mit denen von Stresssignalen. Dies könnte der Pflanze erlauben, sich schnell an wandelnde Umweltbedingungen anzupassen und so eine optimale Verwertung der remobilisierten Nährstoffe zu erreichen (Guiboileau *et al.*, 2010).

Obwohl der Seneszenzprozess reversibel ist, gibt es starke Hinweise darauf, dass es einen generellen Regulationsmechanismus der Seneszenz gibt. Verschiedene Genexpressionsstudien zeigten, dass diese Mechanismen bei mono- und dikotylen Arten konserviert sind (Breeze *et al.*, 2011; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Gregersen *et al.*, 2008). Während der degenerativen Phase der Blattseneszenz kommt es zu einem kontrollierten Abbau von Makromolekülen und zellulären Komponenten (Abb. 1 B). Diese Prozesse werden durch seneszenzassoziierte Gene reguliert, die hauptsächlich für Transkriptionsfaktoren und für katabolische Enzyme kodieren.

Die Abbauprozesse haben enorme strukturelle und biochemische Veränderungen in der seneszierenden Zelle zur Folge. Der Abbau von Makromolekülen, Proteinen, Lipiden und Ribonukleinsäuren findet vor allem im Chloroplasten als Organell mit den höchsten Stickstoff- und Kohlenstoffgehalten der Zelle statt (Krupinska and Humbeck, 2004) (siehe auch 1.1.1). Die Verfärbung des Laubes von mehrjährigen Bäumen und holzigen Sträuchern im Herbst ist eine Konsequenz des Chlorophyllabbaus.

Das endoplasmatische Reticulum (ER) und auch der Golgi-Apparat werden zeitgleich mit den Chloroplasten zu Beginn der Seneszenz abgebaut (Thomson and Platt-Aloia, 1987). Auch Nukleinsäuren, vor allem ribosomale RNA und Transkripte für Proteine der Photosyntheseapparate sowie für Proteine des katabolen Stoffwechsels, werden durch RNAsen und Nukleasen abgebaut (Humbeck *et al.*, 1996).

Während es in den Mesophyllzellen relativ früh zum Abbau der Chloroplasten kommt, bleiben die Mitochondrien lange Zeit intakt. Sie versorgen die Zelle mit der Energie, die die oben genannten Abbauprozesse benötigen. In seneszierenden Zellen kann im Vergleich zu nicht-seneszierenden Zellen eine erhöhte Respiration gemessen werden (Gan and Amasino, 1997).

Da der Seneszenzprozess unter der Kontrolle des Zellkerns steht, zeigt der Zellkern erst kurz vor und in der terminalen Phase erste Anzeichen von strukturellen Veränderungen. Zunächst

lässt sich eine stärkere Kondensation des Chromatins beobachten, danach kommt es zur Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen (Inada *et al.*, 1998). Währenddessen entstehen an der Kernmembran blasenförmige Ausstülpungen, in denen Abbauprodukte wie DNA-Fragmente eingeschlossen sind. Der Zellkern schrumpft darauf folgend immer weiter, bis er sich letztendlich komplett auflöst (Dangl *et al.*, 2000).

Schließlich sind die strukturellen Veränderungen und der Abbau der Zellkomponenten soweit fortgeschritten, dass der Seneszenzprozess nicht mehr reversibel ist. Der sogenannte *point of no return* ist erreicht, der den Eintritt der Zelle in die terminale Phase der Seneszenz zur Folge hat (Abb. 1 B). Diese Phase der Seneszenz ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies in der Zelle. Erst nach der DNA-Fragmentierung und Kernkondensierung zerreißt der Tonoplast, und die in der Vakuole gespeicherten Hydrolasen vermischen sich mit dem Cytosol. Durch den Verlust der Zellkompartimentierung verliert die Zelle ihre Integrität und stirbt ab.

1.1.1 Strukturelle Veränderungen im Chloroplasten während der degenerativen Phase der Blattseneszenz

Chloroplasten enthalten 70-80% des zu remobilisierenden Gesamtstickstoffs einer pflanzlichen Mesophyllzelle (Mae *et al.*, 1993). Der Großteil des plastidären Stickstoffs kommt dabei in dem Enzym RuBisCO und in den Apoproteinen des Chlorophylls vor (Matile, 1992). Solange die Apoproteine jedoch gebunden an Chlorophyll vorliegen, wird ihr Abbau nicht eingeleitet. Denn freies, ungebundenes Chlorophyll ist extrem reaktiv und kann zu photooxidativen Schäden in der Zelle führen. Erst nachdem das Chlorophyll über spezifische den Porphyrin-Ring öffnende Enzyme zu nicht-fluoreszierenden Chlorophyll-Kataboliten abgebaut ist, wird der Abbau der Apoproteine eingeleitet (Hörtensteiner and Feller, 2002). Die Abbauprodukte des Chlorophylls werden schließlich in der Vakuole eingelagert (Hörtensteiner, 1999).

Die Abnahme der Photosyntheseleistung ist eng mit dem Abbau der Chlorophylle und der Apoproteine verbunden. Während Chlorophyllgehalt und Photosyntheseleistung sinken, bleibt die Effizienz, mit der das Photosystem II (PS II) arbeitet, jedoch lange Zeit auf einem hohen Niveau (Miersch *et al.*, 2000; Krupinska and Humbeck, 2004). Erst zu einem Zeitpunkt, an dem der Chlorophyllverlust bereits weit vorangeschritten ist, beginnt auch die Effizienz des PS II zu sinken. Dies kann über den Chlorophyll-Fluoreszenzparameter F_v/F_m gemessen werden (siehe auch 2.3.7).

Während der Seneszenz kommt es zu großen Struktur-Veränderungen in den Thylakoid-Membranen der Chloroplasten. Die Thylakoide der Chloroplasten sind organisiert in Grana- und Stroma-Thylakoide, wobei die Grana-Thylakoide das PS II und den Lichtsammelkomplex II (LHC II) und die Stroma-Thylakoide das PS I und die ATP-Synthase enthalten. In Chloroplasten seneszierender Mesophyllzellen, den Gerontoplasten, konnte nachgewiesen werden, dass die Grana-Thylakoide später abgebaut werden als die Stroma-Thylakoide (Miersch *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2005). Diese strukturellen Veränderungen spiegeln sich auch in einem niedrigeren Chlorophyll a zu Chlorophyll b Verhältnis wieder, das in den meisten Arten während der Seneszenz nachgewiesen werden konnte (Miersch *et al.*, 2000; Mulisch and Krupinska, 2013). Es wird angenommen, dass die Stroma-Thylakoide deshalb vor den Grana-Thylakoiden abgebaut werden, da sie für die proteolytischen Enzyme besser zugänglich sein könnten (Hörtensteiner and Feller, 2002).

Bedingt durch den fortschreitenden Abbau der Stroma-Membranen, die die Grana-Thylakoide miteinander verbinden, wird auch der Kontakt zwischen den einzelnen Grana-Stapel n langsam gelöst und die Membranen und die in ihnen enthaltenden Proteine werden remobilisiert (Noodén, 1988). Gerontoplasten weisen zudem eine erhöhte Anzahl von Plastoglobuli auf (Harris and Schaefer, 1981). Diese sind ein Reservoir für Lipide, die nach dem Abbau der Thylakoidmembranen nicht weiter verwertet wurden. Daneben können die Plastoglobuli aber auch Xantophyllester aus dem Carotinoidabbau oder Tocopherole enthalten (Mulisch and Krupinska, 2013). Zusätzlich zeichnen sich Gerontoplasten durch eine Schwellung des intrathylakoidalen Raums, eine Verringerung der Größe (Kura-Hotta *et al.*, 1990) und eine zirkuläre Gestalt aus (Inada *et al.*, 1998; Pleijel *et al.*, 1997).

1.2 Regulatoren der Blattseneszenz

Viele Faktoren nehmen Einfluss auf die Seneszenz, bestimmen ihren Beginn und regulieren ihren Verlauf. Im folgenden Abschnitt wird auf einige dieser internen und externen Faktoren näher eingegangen.

1.2.1 Phytohormone

Phytohormone regulieren pflanzliche Wachstums- und Entwicklungsprozesse und sind in nahezu alle physiologischen Prozesse involviert. So steuern sie auch die Reaktion der Pflanze auf verschiedene Stressfaktoren. Stress kann die verfrühte Einleitung der Seneszenz zur Folge haben. Die Stressreaktion der Pflanze beinhaltet neben der Expression von stressassoziierten Genen auch die von seneszenzassoziierten Genen, welches einen verfrüht eingeleiteten Seneszenzprozess zur Folge haben kann. Die Phytohormone Salicylsäure, Jasmonsäure, Ethylen und Abscisinsäure übernehmen während der altersbedingten Seneszenz und während der durch Stressfaktoren ausgelösten Seneszenz Schlüsselfunktionen. Dabei sind ihre Signaltransduktionswege fein aufeinander abgestimmt und beeinflussen sich gegenseitig stark. Man spricht von einem *Cross-Talk* der Hormone (Derksen *et al.*, 2013). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Phytohormone Abscisinsäure und Methyljasmonat verwendet, um die Blattseneszenz zu induzieren. In natürlich seneszierenden Pflanzen, die in dieser Arbeit ebenfalls charakterisiert wurden, spielt das Phytohormon Salicylsäure eine wichtige Rolle. Im Folgenden wird daher die Rolle dieser Hormone als Regulatoren von seneszenzassoziierten Genen beschrieben.

1.2.1.1 Abscisinsäure (ABA) Abscisinsäure ist ein Apocarotinoid und wird in Gefäßpflanzen aus Violaxanthin gebildet. Die Synthese von ABA beginnt in den Plastiden, die letzten Syntheseschritte finden im Cytoplasma statt. Die Synthese von ABA ist eine der schnellsten Reaktionen von Pflanzen auf das Auftreten von abiotischem Stress, insbesondere auf das Auftreten von Wassermangel. Durch die Expression von ABA-sensitiven Genen und die Synthese ihrer Genprodukte wird ein Verschluss der Stomata erreicht. In Folge verringert sich die Transpirationsrate und der Wasserverlust der Pflanze wird reduziert (Peleg and Blumwald, 2011).

Auch in seneszierenden Blättern konnte ein erhöhter ABA-Gehalt gemessen werden (Gepstein and Thimann, 1980). Die exogene Zugabe von ABA zu Blattmaterial führt zum vorzeitigen Einsetzen des Seneszenzprozesses, weshalb für ABA eine seneszenzfördernde Wirkung beschrieben

wurde (Yang *et al.*, 2003). Dem *NCED*-Gen, das für das Schlüsselenzym der ABA-Biosynthese kodiert, konnte eine erhöhte Expression während der Seneszenz nachgewiesen werden (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). Da einige Gene der ABA-Biosynthese und der ABA-Signaltransduktion sowohl während der entwicklungsabhängigen als auch während der dunkelinduzierten Seneszenz eine verstärkte Expression zeigten, geht man davon aus, dass die ABA-Signalfunktion in beiden Seneszenzformen wichtig ist (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005).

Die Expression vieler seneszenzassoziierter Gene kann durch die Zugabe von ABA eingeleitet oder verstärkt werden (Weaver *et al.*, 1998). Zu den *SAGs*, die eine verstärkte Expression nach Behandlung von Blättern mit ABA zeigten, gehören unter anderem *SAG12*, das für eine Cystein-Proteinase kodiert, *SAG13*, welches für eine Alkohol-Dehydrogenase kodiert, *SAG17* kodiert für ein Protein mit bislang unbekannter Funktion, *ERD1* bzw. *SAG15*, das für eine Clp-Protease kodiert und *RD21*, das für eine Vorstufen-ähnliche Cystein-Proteinase kodiert (Weaver *et al.*, 1998).

In seneszierenden Blättern wird die ABA-Synthese über die Ubiquitylierung der Aldehyd-Oxidase 3 (AAO3), einem zentralen Enzym der ABA-Biosynthese, reguliert. In Arabidopsis-Mutanten, die die seneszenzassoziierte E3 Ubiquitin-Ligase (SAUL1) nicht synthetisieren können, ist die Konzentration der AAO3 stark erhöht. Dies hat eine verstärkte ABA-Biosynthese und einen frühzeitig einsetzenden Seneszenzprozess der Arabidopsis-Pflanzen zur Folge (Raab *et al.*, 2009).

Zudem scheint es eine Verbindung zwischen ABA- und Zucker-Signaltransduktion zu geben, da von einigen *aba*- und *abi*-Mutanten gezeigt werden konnte, dass sie gegenüber Glukose insensitive sind (Arenas-Huertero *et al.*, 2000). Zucker spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des Seneszenzprozesses. Vor allem wird ihnen eine Funktion für die Initiation der Seneszenz zugeschrieben, wenn das Stickstoff- zu Kohlenstoffverhältnis niedrig ist (Parrott *et al.*, 2010; Winkler *et al.*, 2004). Im Abschnitt 1.2.2 wird auf die Rolle der Zucker während der Seneszenz näher eingegangen.

1.2.1.2 Jasmonsäure (JA) Jasmonsäure wird in Pflanzen aus α -Linolensäure gebildet. Die Synthese erfolgt in den Chloroplasten und in den Peroxisomen. Zum ersten Mal wurde Methyljasmonat als seneszenzförderndes Phytohormon in Wermut beschrieben. Es übernimmt ebenfalls eine wichtige regulatorische Funktion während der allgemeinen Stressantwort, der Abwehr von Pathogenen und während Wachstums- und Entwicklungsprozessen. Die Funktion von JA während der Blattseneszenz ist nicht leicht aufzuklären, da einige Gene der JA-Biosynthese während der Seneszenz herunterreguliert, andere hingegen verstärkt exprimiert werden (He *et al.*, 2002). Analysen mit Arabidopsis-Mutanten, die entweder in ihrer JA-Biosynthese gestört oder JA gegenüber insensitive sind, weisen jedoch auf eine Funktion von JA während der Seneszenz hin. In diesen Mutanten ist der Vergilbungsprozess während der entwicklungsabhängigen und auch während der dunkelinduzierten Seneszenz verzögert (He *et al.*, 2002). In Übereinstimmung damit führt die äußerliche Behandlung von Blättern mit JA zu einer verfrüht einsetzenden Seneszenz (He *et al.*, 2002).

Zu den seneszenzassozierten Genen, deren Expression durch JA verstärkt wird, gehören Gene, die für zellwandabbauende Enzyme und Nukleasen kodieren (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). Auch das Gen, das für den Transkriptionsfaktor NAC3 kodiert, zeigt eine durch JA verstärkte

Expression während der Seneszenz. Ein Großteil der Gene, die über den JA-Signalweg kontrolliert werden, werden sowohl während der entwicklungsabhängigen als auch während der dunkelinduzierten Seneszenz exprimiert (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005).

Studien mit den oben genannten Mutanten zeigten ebenfalls, dass JA ähnlich wie Ethylen vor allem den zeitlichen Ablauf (*Timing*) des Seneszenzprozesses koordiniert. Dabei werden durch JA und Ethylen zum einen dieselben Signalnetzwerke aktiviert, zum anderen beeinflussen sich die jeweils durch JA oder Ethylen regulierten miRNAs, Enzyme, Wachstums- und Transkriptionsfaktoren gegenseitig (Kim *et al.*, 2015). Innerhalb der Signalkaskade, die durch JA ausgelöst wird, spielen zum Beispiel JAZ-Proteine (Jasmonat-ZIM-Domäne) eine zentrale Rolle. Von den JAZ1, 3 und 9 Regulatoren konnte gezeigt werden, dass sie während der biotischen Stressantwort die durch Ethylen regulierten Transkriptionsfaktoren EIN3 und EIL1 in ihrer Aktivität hemmen (Kim *et al.*, 2015). Viele weitere Beispiele gegenseitiger Regulation sind für Ethylen und JA bereits untersucht und zeigen ein komplexes Netzwerk, in das auch noch weitere Phytohormone sowie interne und externe Signale involviert sind.

1.2.1.3 Salicylsäure (SA) Salicylsäure ist eine phenolische Verbindung und wird in den Plastiden aus Phenylalanin synthetisiert. SA wurde als Hauptregulator der Zellreaktion auf abiotischen Stress charakterisiert. Es spielt ebenfalls eine Schlüsselrolle während der hypersensitiven Reaktion bei Pathogenbefall und reguliert damit zusammenhängend den programmierten Zelltod (Lim, 2007).

SA übernimmt jedoch auch eine wichtige regulatorische Funktion während der altersbedingten, entwicklungspezifischen Seneszenz. In seneszierenden Blättern konnte eine erhöhte Konzentration an SA nachgewiesen werden, die nachweislich für die verstärkte Expression von seneszenzspezifischen Genen wichtig ist (Morris *et al.*, 2000). Morris *et al.* (2000) konnten zeigen, dass die Expression von *SAG12* während der Seneszenz vom SA-Signalweg abhängig ist. Sie benutzten dafür transgene Pflanzen, die kein SA akkumulieren können (*NahG*) bzw. solche, die in der SA-Signalübertragung gestört sind (*npr1* und *pad4*). Diese Pflanzen zeigten im Vergleich zum Wildtyp einen verzögerten Seneszenzprozess mit einer stark verlängerten Reorganisationsphase. Über die Analyse der *NahG*-Mutanten konnten noch weitere Gene identifiziert werden, deren Expression während der Seneszenz spezifisch von SA abhängt (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). Dazu zählen viele Resistenzgene und Gene, die für Hydrolasen und Transkriptionsfaktoren kodieren. Auch Genen, die für AAA-Proteine kodieren (*ATPases associated with different activities*), konnte eine SA-abhängige Expression während der Seneszenz nachgewiesen werden. AAA-Proteine üben ihre Funktion in einer Vielzahl zellulärer Prozesse aus. Dazu gehören die Kontrolle des Zellzyklus, Proteinabbau, die Biogenese von Organellen und vesikuläre Transportprozesse. Interessanterweise zeigten viele der durch SA kontrollierten Gene wie *SAG12* keine erhöhte Expression während der dunkelinduzierten Seneszenz (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). Frühere Untersuchungen zum Pathogenbefall zeigten bereits, dass die effiziente Aktivierung des SA-Signalwegs vom Licht abhängig ist. Im Dunkeln ist sowohl die SA-abhängige Genexpression von *pathogen related*-(*PR*)-Genen als auch damit zusammenhängend die hypersensitive Reaktion der Pflanze vermindert (Genoud *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass SA ausschließlich die entwicklungsabhängige, jedoch nicht die dunkelinduzierte Seneszenz reguliert.

1.2.2 Zucker

Zucker dienen nicht nur der pflanzlichen Ernährung und dem Aufbau von Biomasse, sondern üben auch eine Signalfunktion aus. Während der Wachstumsperiode kommt es in verschiedenen Pflanzenarten zu einer Anreicherung von Hexosen in den Blättern, vor allem von Glukose und Fruktose (Noodén *et al.*, 1997). Warum und wo genau in der Zelle es zu einer Anhäufung der Zucker während der Seneszenz kommt, ist bis heute noch nicht vollständig geklärt (Lawlor and Paul, 2014). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine hohe Glukosekonzentration die Blattseneszenz fördert, wenn zur gleichen Zeit die Stickstoffkonzentration im Blatt niedrig ist (Parrott *et al.*, 2010; Wingler *et al.*, 2004). Ein niedriges C:N Verhältnis liegt in älteren Blättern vor, die sich von nährstoffverbrauchenden Organen (*sink*) zu solchen entwickeln, die Nährstoffe an junge, noch wachsende Organe weiterleiten (*source*). Ein hohes C:N-Verhältnis kann in diesen Blättern die Seneszenz fördern und zu einer verstärkten Remobilisierung von Stickstoff und weiteren Nährstoffen führen (Pourtau *et al.*, 2006).

Trehalose-6-Phosphat (T6P), der Vorläufer des Dissaccharids Trehalose, wird eine Signalfunktion während der pflanzlichen Reaktion auf Stress zugeschrieben. Eine Signalfunktion während der Seneszenz wird für T6P ebenfalls diskutiert (Wingler and Paul, 2013). Analysen mit Arabidopsis-Transformanten zeigten, dass T6P während der Stressreaktion und während der Seneszenz als ein Signalmolekül fungiert, das Auskunft über die Saccharosekonzentration in der Zelle gibt. Die *sweetie*-Mutante von Arabidopsis, welche eine erhöhte Konzentration an T6P aufweist, zeigt eine vorzeitig einsetzende Seneszenz (Veyres *et al.*, 2008). Neben Trehalose ist in diesen Pflanzen auch die Konzentration weiterer Zucker, z.Bsp. die von Glukose, Fruktose und Saccharose, erhöht. Es ließ sich daher nicht ganz klären, ob es die erhöhte Konzentration von T6P oder die der anderen gemessenen Zucker war, die die frühzeitig einsetzende Seneszenz verursachte (Wingler and Paul, 2013).

T6P ist auch an der Stärkebildung beteiligt, indem es Informationen über die Verfügbarkeit von Saccharose im Cytosol an die Chloroplasten weitergibt (Wingler and Paul, 2013). Dabei ist noch nicht geklärt, ob T6P über einen bis jetzt noch nicht identifizierten Transporter in die Chloroplasten importiert wird oder ob es an die äußere Hüllmembran bindet und dort eine Signalkaskade auslöst.

1.2.3 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Unabhängig davon, ob die Seneszenz altersbedingt oder durch Umwelt- und Stressfaktoren ausgelöst wird, treten in seneszierenden Zellen vermehrt Reaktive Sauerstoffspezies auf (Khanna-Chopra, 2012). Die freie Radikal-Theorie vertritt die Annahme, dass die Ursache des Alterns in der Anhäufung von altersbedingten Zellveränderungen begründet liegt und dass diese Zellveränderungen durch ROS hervorgerufen werden (Harman, 1981; Munné-Bosch and Alegre, 2002). Zu den reaktiven Sauerstoffspezies zählen Radikale wie das Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) und das Hydroxyl-Radikal (OH^{\cdot}), stabile molekulare Oxidantien wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) sowie das angeregte Sauerstoffmolekül Singulett-Sauerstoff (1O_2). ROS besitzen zum einen stark oxidierende Eigenschaften, sie sind daher in hohen Konzentrationen für die Zelle toxisch und werden durch das Antioxidanssystem schnell abgebaut. Zum anderen konnte ihnen eine wichtige Signalfunktion nachgewiesen werden. Wie genau ROS als Signalmoleküle funktionieren und

welche Mechanismen eine spezifische Reaktion der Zelle auf das ROS-Signal ermöglichen, ist bis heute nicht vollständig geklärt (Munné-Bosch *et al.*, 2013). Es wird jedoch seit längerem angenommen, dass ROS eine Schlüsselrolle bei der Einleitung des pflanzlichen Seneszenzprozesses spielen.

Chloroplasten sind die Hauptproduzenten von ROS in der pflanzlichen Zelle. Während der Photosynthese wird Lichtenergie absorbiert und über mehrere Redoxreaktionen den Zentren der Photosysteme zugeführt. Überschüssige Lichtenergie wird entweder in Form von Wärme abgegeben oder auf den alternativen Elektronenakzeptor Sauerstoff übertragen. Dies führt zur Bildung von Superoxidradikalen und Wasserstoffperoxid am PS I. Über Chlorophyll im Tripletzustand kann außerdem am Photosystem II Singulett-Sauerstoff entstehen. Unter normalen Wachstumsbedingungen werden die permanent gebildeten ROS über ein Netzwerk aus verschiedenen Antioxidantien abgefangen und so „unschädlich“ gemacht.

Unter oxidativem Stress versteht man das stark vermehrte Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies, die nicht mehr ausreichend entgiftet werden können. Munné-Bosch und Alegre (2002) konnten in ihrer Studie zeigen, dass oxidativer Stress progressiv mit dem Altern zunimmt. Die Autoren gehen davon aus, dass der Hauptanteil der während der Seneszenz entstehenden ROS in den Chloroplasten gebildet wird.

Während mit fortschreitendem Alter der oxidative Stress in den Chloroplasten zunimmt, verringert sich gleichzeitig die Aktivität und die Effizienz des antioxidativen Systems. So kommt es zum Beispiel zu einer geringeren Biosyntheserate und Konzentration von Ascorbat (Vitamin C) in der Zelle (Queval and Noctor, 2007). Oft geht der Seneszenzprozess ebenfalls mit einer verringerten Aktivität einiger antioxidativer Enzyme einher. So zeigt zum Beispiel die Katalase 3 von *Arabidopsis thaliana*, die Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser umsetzt, eine verringerte Aktivität während der Seneszenz (Orendi *et al.*, 2001). Die verringerte Effizienz des antioxidativen Systems könnte wichtig sein, um seneszenzassoziierte Proteasen zu aktivieren. Cystein-Proteasen werden zum Beispiel durch das Antioxidans Glutathion gehemmt (Groten *et al.*, 2006). Eine erhöhte ROS-Konzentration in der Zelle könnte auch die Expression der seneszenzassoziierten Transkriptionsfaktoren WRKY6 und WRKY53 regulieren, die wichtig sind für eine koordinierte Genexpression zu Beginn der Seneszenz (Foyer and Noctor, 2009). Auch das in dieser Arbeit untersuchte seneszenzassoziierte Gen *HvS40* zeigte unter dem Einfluss von H₂O₂ eine verstärkte Expression (Dähnhardt, 2003).

Das vermehrte Auftreten von ROS und die damit einhergehenden Redoxprozesse sind wichtig für die Einleitung der Seneszenz, aber auch für die Koordinierung der verschiedenen, während der Seneszenz ablaufenden Prozesse. Das verstärkte Auftreten von ROS während der ersten Phase der Seneszenz ist dabei nicht mit einer unkontrollierten oder chaotischen Oxidation von Zellbestandteilen verbunden (Foyer and Noctor, 2009). Eine unkontrollierte Oxidation würde den Remobilisierungsprozess unmöglich machen. Zudem ist der Prozess der Seneszenz bis zum Eintreten in die letzten Phase reversibel. Obwohl eine zu hohe ROS-Konzentration den Zelltod zur Folge haben kann, üben ROS in niedrigen Konzentrationen wichtige Signalfunktionen aus und regulieren sowohl die pflanzliche Stressantwort als auch den Seneszenzprozess (Li *et al.*, 2009; Apel and Hirt, 2004).

1.2.4 Stressfaktoren

Die meisten Pflanzen besitzen nicht die Fähigkeit, ihren Aufenthaltsort zu wechseln. Sie sind in ihrer Umwelt deshalb einer Reihe von abiotischen und biotischen Stressfaktoren ausgesetzt, denen sie nur schwer ausweichen können. Die vorzeitige Einleitung des Seneszenzprozesses ist daher eine Strategie, Stress zu vermeiden und gleichzeitig so viele Nährstoffe wie möglich für die nachfolgende Generation zu bewahren.

Für den Anbau von Getreidepflanzen wie Gerste bedeutet der frühzeitige Beginn der Seneszenz oft einen Verlust im Ertrag (Produktmasse/Fläche), da die Zeitperiode, in der Assimilate durch Photosynthese gewonnen und im Korn eingelagert werden können, stark verkürzt ist (Distelfeld *et al.*, 2014). Auf Ebene der Genexpression unterscheiden sich die stressinduzierte Seneszenz, die eine sofortige Reaktion der Pflanze auf den auftretenden Stress fordert, und die entwicklungsabhängige Seneszenz zu Beginn voneinander. Jedoch konnte mittels Microarray-Analysen gezeigt werden, dass mit dem Fortschreiten des Seneszenzsyndroms die unterschiedlichen Stresseinflüsse zur Expression derselben Gene führen, die auch bei der entwicklungsabhängigen Seneszenz exprimiert werden (Guo and Gan, 2012). Die Signalwege, die von einer stressspezifischen zu einer seneszenzspezifischen Genexpression führen, sind bis heute noch nicht vollständig verstanden. Es ist anzunehmen, dass Phytohormone wie ABA, JA und SA eine vernetzende Rolle spielen, da sie sowohl während der Stressantwort als auch während der Seneszenz synthetisiert werden (Gregersen *et al.*, 2013).

Viele Umweltfaktoren können einen stressbedingten vorzeitigen Beginn der Seneszenz auslösen. Dazu zählen hohe Lichtintensitäten (Überschuss an Anregungsenergie), Dunkelheit und Beschattung, Pathogenbefall, Trockenheit und Hitze, Nährstoffmangel sowie oxidativer Stress, der durch UVB-Strahlung und Ozon hervorgerufen wird. Auf einige der genannten Faktoren wird im Folgenden näher eingegangen.

1.2.4.1 Durch hohe Lichteinstrahlung induzierte Seneszenz Hohe Lichtintensitäten können den Seneszenzprozess verfrüht einleiten. Dies geschieht vermutlich durch die vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, die bei einem Überschuss an Anregungsenergie des Lichtes am Photosyntheseapparat entstehen. Bei hohen Lichtverhältnissen kann es zu einer starken Anregung der Pigmentsysteme des Photosyntheseapparates kommen, ohne dass genügend Elektronen weitergeleitet werden. Dadurch kommt es am PS II zur vermehrten Bildung von Triplettchlorophyll und schließlich zur Bildung des hochreaktiven Singulett-Sauerstoffs. Normalerweise überführen Carotinoide und α -Tocopherol Triplettchlorophylle und Singulett-Sauerstoff wieder in den Grundzustand. Bei zu hohen Lichtintensitäten reicht dieser Schutz jedoch nicht mehr aus und es kommt zu irreparablen Schäden, vor allem am D1-Proteins des PS II. Dieser Prozess wird auch Photoinhibierung genannt und zieht die Bildung weiterer ROS nach sich (Apel and Hirt, 2004). Diese können indirekt ($^1\text{O}_2$) oder direkt (H_2O_2) über retrograde Signalwege und im Zusammenspiel mit Phytohormonen die Expression seneszenzspezifischer Gene im Zellkern einleiten, sodass die Zelle in die Seneszenzphase eintritt (Bartoli *et al.*, 2013).

1.2.4.2 Durch Dunkelheit induzierte Seneszenz In einem seneszierendem Blatt befinden sich die einzelnen Zellen normalerweise in unterschiedlichen Stadien der Seneszenz. So beginnen Zellen der Blattperipherie früher zu seneszieren, während Zellen in der Nähe von Blattvenen länger intakt bleiben und den Transport von Nährstoffen gewährleisten. Um einen koordinierten synchronen Entwicklungsstand aller Zellen in einem Blatt zu erreichen, wird für wissenschaftliche Untersuchungen die Seneszenz oft künstlich durch Dunkelheit induziert. Durch das Verdunkeln setzt der Seneszenzprozess in allen Zellen gleichzeitig ein, welches wissenschaftliche Analysen erleichtert. Jedoch zeigten verschiedene Studien, dass es signifikante Unterschiede zwischen der Genexpression der dunkelinduzierten und der entwicklungsabhängigen Seneszenz gibt (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). Die Daten legen den Schluss nahe, dass die Seneszenz in dunkelgestellten Blättern wegen des schnellen Abfalls des Zuckergehalts eingeleitet wird. Diese Situation wird daher auch als „Hungersituation“ für die Pflanze beschrieben.

Während der entwicklungsabhängigen Seneszenz kann die Zelle, wenn auch in reduzierten Maßen, weiterhin Photosynthese betreiben und das seneszierende Blatt mit benötigter Energie versorgen. Da jedoch bei einer wenig effektiven PS vermehrt ROS auftreten, ist in belichteten seneszierenden Zellen die Genexpression für Schutzpigmente höher als in den bei Dunkelheit seneszierenden Zellen (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005).

Die Phytohormone SA, JA und Ethylen sind für eine spezifische Genexpression während der altersbedingten Seneszenz unabdingbar und spielen eine wichtige regulatorische Rolle während dieser Entwicklungsphase. Während die JA- und Ethylen-Signalwege auch für eine spezifische Genexpression während der dunkelinduzierten Seneszenz verantwortlich sind, spielt der SA-Signalweg hier keine Rolle (Genoud *et al.*, 2002; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005).

1.2.4.3 Durch Pathogenbefall induzierte Seneszenz Photoautotrophe Pflanzen dienen einer Vielzahl anderer Organismen als Nahrungsquelle. Organismen, die dabei erhebliche Schäden an der Pflanze anrichten, werden als Pathogene bezeichnet. Die Pflanze kann auf Pathogenbefall mit einer starken als hypersensitiv bezeichneten Abwehrreaktion reagieren. Während dieser wird dem Pathogen durch lokal absterbende Pflanzenzellen die Nahrungsgrundlage entzogen, so dass es mit abstirbt. Die Hypersensitivitätsreaktion der Pflanze wird eingeleitet mit einer raschen und massiven Bildung von Toxinen und einer Freisetzung von ROS, insbesondere von Hyperoxid-Anionen (O_2^-) und Wasserstoffperoxiden (H_2O_2). Die Bildung von ROS führt schließlich zur Einleitung des programmierten Zelltodes.

Daneben kann die Pflanze auch mit einer systemisch erworbenen Abwehrreaktion reagieren. Bei den Prozessen der systemischen Resistenz spielt das Phytohormon Salicylsäure eine entscheidende Rolle (Linthorst and Van Loon, 1991; Derksen *et al.*, 2013). Die Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren durch SA führt zur Expression von pathogenresponsiven Genen (*PR*-Gene), die für Proteine mit antimikrobiellen Funktionen kodieren. Diese werden entweder sekretiert oder in die Vakuole eingelagert (Fu and Dong, 2013). *PR1*, *PR2* und *PR5* werden in *Arabidopsis thaliana* als Markergene der SA-abhängigen, systemisch erworbenen Resistenz angesehen (Fu and Dong, 2013). Die genannten *PR*-Gene kodieren jeweils für ein Protein mit unbekannter Funktion, für eine β -1,3-Glukanase und für ein Thaumatin-ähnliches Protein.

Nicht nur SA ist an der Regulation der Abwehrreaktion der Pflanze beteiligt. Vielmehr reguliert ein ganzes Hormon-Signalnetzwerk, zu dem neben SA auch die Phytohormone JA und Ethylen

gehören, die Stressantwort der Pflanze (Derksen *et al.*, 2013). Dies sind die gleichen Phytohormone, die auch während des Seneszenzprozesses eine regulierende Funktion ausüben. Daher ist es nicht verwunderlich, dass viele Gene, die vermehrt während der Seneszenz exprimiert werden, auch während der Abwehrreaktion der pflanzlichen Zelle stark exprimiert werden. So zeigt zum Beispiel das PR-Gen *WRKY6* nicht nur während des Pathogenbefalls, sondern auch während des Seneszenzprozesses eine verstärkte Expression (Robatzek and Somssich, 2001). Das seneszenzassoziierte Gen *SAG12* kodiert für eine Cystein-Protease und wird sowohl während der Seneszenz als auch während der Pathogenabwehr verstärkt exprimiert (Butt *et al.*, 1998). Auch das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte *HvS40*-Gen der Gerste zeigte in früheren Untersuchungen eine verstärkte Expression sowohl während der Seneszenz als auch während des Befalls der Pflanze mit dem pathogenen Pilz *Pyrenophora teres* (Krupinska *et al.*, 2002).

Obwohl schon länger bekannt ist, dass Abwehrgene in seneszierenden Blättern verstärkt exprimiert werden, ist der Grund hierfür noch nicht vollends geklärt. Die zusätzliche Expression der *PR*-Gene und die de-novo Synthese der PR-Proteine kostet Energie, die dem Remobilisierungsprozess zugute kommen könnte. Jedoch könnte gerade die durch die Remobilisierung erreichte Anhäufung von Nährstoffen die treibende Kraft für Pathogene sein, die Pflanze zu befallen. Ein Pathogenbefall wäre jedoch für den Seneszenzprozess und damit für die Reproduktion der Pflanze fatal. Die Expression von *PR*-Genen während der Seneszenz könnte eine in Bezug auf die Energie zwar kostspielige, dennoch notwendige Maßnahme zum Schutz vor Pathogenen darstellen, um die Remobilisierung von Nährstoffen zu gewährleisten (Wu *et al.*, 2012b).

1.2.5 Seneszenzspezifische Genexpression

Während es in der Zelle zum einen zu einer verminderten Transkription von Genen und zur Abnahme in der Menge bestimmter Transkripte kommt (zum Beispiel mit der Photosynthese assoziierte Gene), findet zum anderen eine verstärkte Translation spezifischer seneszenzassoziiierter Gene (SAG) statt. Bereits 1972 konnten Martin und Thimann zeigen, dass für das Fortschreiten des Seneszenzprozesses eine seneszenzspezifische Transkription notwendig ist. Die Identifizierung und Charakterisierung der zugehörigen Gene schritt unter Anwendung neuer molekularbiologischer Methoden in den 90er Jahren weiter fort. Zu diesen Methoden gehörte unter anderem das differentielle Durchmustern (*differential screening*) von cDNA-Bibliotheken (Lohman *et al.*, 1994). Die Grundlage dieser Methode beruht auf dem Vergleich von RNA-Zusammensetzungen verschiedenen Pflanzenmaterials, zum Beispiel RNA aus nicht-seneszierendem und seneszierendem Pflanzenmaterial. Mit Hilfe dieser Technik wurde auch das in dieser Arbeit beschriebene SAG *HvS40* der Gerste erstmals identifiziert (siehe 1.2.6).

Arabidopsis thaliana ist im Hinblick auf die Blattseneszenz die am besten untersuchte Pflanze. Guo und Gan (2012) identifizierten durch Datenanalyse von publizierten Genexpressionsdaten über 13300 Gene, die in *Arabidopsis* während der Seneszenz exprimiert werden. Davon zeigen 1204 Gene, verglichen mit ihrem Expressionsniveau in nicht-seneszierenden Blättern, eine stark erhöhte Expression während der Seneszenz (dreifach oder höher) (Guo and Gan, 2012). Zu diesen SAGs, die speziell während der entwicklungsabhängigen Seneszenz verstärkt exprimiert werden, gehören Gene, die für Transkriptionsfaktoren (148), für Transporter (102), für Komponenten der Signalübertragung (185), für Enzyme des Makromolekülabbau wie Protein- (98), Lipid- (21), Nukleinsäure- (6) und Zellwandabbau (24), für metabolische Enzyme (257), für Proteine

der Pathogenabwehr (*PR*-Gene, 93) und für weitere Proteine mit bisher unbekannter Funktion (270) kodieren (Guo and Gan, 2012).

In *Arabidopsis* gehören die meisten Transkriptionsfaktoren, die durch seneszenzassoziierte Gene kodiert sind, zu den Familien der NAC-Domänen- (26), der Zink-Finger- (19), der MYB-Domänen- (17), der WRKY- (11), der Homeobox- (8) und der bZIP-Proteine (7), sowie der CCAAT-Bindeproteine (7) und der AP2-Domänen-Proteine (6) (Guo and Gan, 2012). Viele dieser Transkriptionsfaktoren regulieren auch Änderungen in der Genexpression, die als Folge eines Pathogenbefalls auftreten.

463 der SAGs werden ausschließlich mit Beginn der Blattseneszenz exprimiert. Dazu zählt auch das Seneszenzmarker-Gen *SAG12* (Guo and Gan, 2012). Aufgrund der differentiellen Expression der SAGs unterscheiden Gan und Amasino 1997 zwei Klassen von SAGs: zur Klasse I gehören Gene, die ausschließlich während der Seneszenz exprimiert werden. Zur Klasse II gehören Gene, die bereits vor Eintritt der Seneszenz exprimiert werden, aber während der Seneszenz eine verstärkte Expression aufweisen.

Zu den Genen, die spezifisch während der Seneszenz herunterreguliert werden, gehören Zellteilungs-, Wachstums- und Photosynthesegene. Gene, die für Proteine mit Funktion in der Aufrechterhaltung der Zellstruktur und der Genexpression kodieren, sind ebenfalls stark herunterreguliert. Obwohl die Behandlung von Pflanzen mit Phytohormonen (zum Beispiel ABA, JA, SA) und das Auftreten weiterer Stressfaktoren wie Kälte, Hitze, Wassermangel, Salz, UV-Strahlung und Verwundung die Seneszenz induzieren können, gibt es auf Ebene der Genexpression zunächst große Unterschiede zwischen der entwicklungsabhängigen und der stressinduzierten Seneszenz. Zu Beginn der stressinduzierten Seneszenz sind weniger als 10% der Gene, die auch zu Beginn der natürlichen Seneszenz verstärkt exprimiert werden, hochreguliert (Guo and Gan, 2012). Mit dem fortschreitenden stressinduzierten Seneszenzprozess kommt es jedoch mehr und mehr zu der gleichen Genexpression wie bei der natürlichen Seneszenz, die im späten Stadium zur Hochregulation derselben Gene führt. Man nimmt an, dass unterschiedliche interne und externe Faktoren die Seneszenz zwar über verschiedene Signalwege induzieren, diese aber schlussendlich zu den gleichen, die Seneszenz ausführenden Prozessen, die mit derselben Genexpression einhergehen, führen (Guo and Gan, 2012). So werden zum Beispiel Gene, die für Enzyme des Chlorophyll-, Protein-, Lipid- und Kohlenhydratabbaus kodieren, in der späten Phase aller Seneszenzformen gleichermaßen exprimiert (Guo and Gan, 2012).

1.2.6 Das seneszenzassoziierte Gen *HvS40* der Gerste

HvS40 wurde erstmals mit Hilfe der *differential screening* Methode in seneszierenden Primärblättern der Gerste als SAG identifiziert (Becker and Apel, 1993). In diesen Primärblättern wurde die Seneszenz dadurch induziert, dass sie von der Pflanze abgeschnitten und für mehrere Tage dunkel gestellt wurden. Feldversuche mit Gerste zeigten, dass das Gen ebenfalls eine stark erhöhte Expression in natürlich seneszierenden Fahnenblättern aufweist (Humbeck *et al.*, 1996; Kleber-Janke and Krupinska, 1997). Die verstärkte Expression von *HvS40* korreliert dabei mit einer Abnahme in der Effizienz des PS II und mit dem fortschreitendem Abbau des Photosyntheseapparats (Humbeck *et al.*, 1996).

Das *HvS40*-Gen gehört, wie die meisten der in dieser Arbeit beschriebenen *S40*-Gene von Monokotylen, der Gruppe der intronlosen Genen an. Genomanalysen zeigten, dass 20% der Gene von Reis und *Arabidopsis* keine Intronen aufweisen (Jain *et al.*, 2008). Auch 13 der 15 *S40*-Gene von *Arabidopsis thaliana*, die von Fischer-Kilbienski *et al.* (2010) beschrieben worden sind, sind intronlos. Intronlose Gene können sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten gefunden werden. In Eukaryoten könnten sie durch die Retrotransposition von bereits prozessierter RNA in die genomische DNA entstanden sein (Grzybowska, 2012). Intronlose Gene bieten den Vorteil einer schnellen Expression, da der Prozessierungsschritt des Spleißens entfällt (Jeffares *et al.*, 2008).

Die Expression von *HvS40* wird durch eine Vielzahl seneszenzauslösender Faktoren eingeleitet. Unter anderem zeigten Versuche mit pflanzenpathogenen Pilzen, dass *HvS40* in den infizierten Bereichen verstärkt exprimiert wird (Krupinska *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse zeigten auch, dass die *HvS40*-Expression weniger mit der Regulation der hypersensitiven Reaktion (schneller Zelltod) in Verbindung steht, sondern mehr mit der Regulation des seneszenzähnlichen Prozesses, der in dem den Infektionsherd umgebenden Gewebe stattfindet (Krupinska *et al.*, 2002). Daneben kann die *S40*-Expression durch Behandlung mit Phytohormonen (SA, Ethylen, MeJA, BAP), durch Verwundung, Trockenheit und Hitze und durch das vermehrte Auftreten von ROS induziert werden (Hausstühl, 1998; Krupinska *et al.*, 2002; Dähnhardt, 2003).

In *Arabidopsis thaliana* konnten mehrere *S40*-Gene identifiziert werden, von denen das Gen *AtS40-3* die höchste Ähnlichkeit zu dem *HvS40*-Gen aufzeigt (Fischer-Kilbienski *et al.*, 2010). Wie das *S40*-Gen der Gerste zeigt auch *AtS40-3* eine verstärkte Expression während der natürlichen und während der durch Dunkelheit induzierten Seneszenz. Die Expression von *AtS40-3* wird ebenfalls durch den Befall mit Pathogenen und durch Behandlung der Pflanze mit Phytohormonen wie ABA oder SA induziert (Fischer-Kilbienski *et al.*, 2010).

Das *HvS40*-Gen kodiert für ein Protein mit einer vorhergesagten Größe von 15,4 kDa, dessen Funktion unbekannt ist. In Fusion mit Reporter-Proteinen (GUS, GFP) zeigten die potentiellen *S40*-Proteine von Gerste und *Arabidopsis* eine subzelluläre Lokalisation im Zellkern, welches ein erster Hinweis auf eine mögliche regulatorische Funktion ist (Krupinska *et al.*, 2002; Fischer-Kilbienski *et al.*, 2010). In *Arabidopsis* konnte dem *AtS40-3*-Protein bereits eine seneszenz-regulierende Funktion nachgewiesen werden. Hierfür wurden Versuche mit einer T-DNA-Insertionslinie durchgeführt, die das *AtS40-3*-Gen - bedingt durch eine Insertion im Promotorbereich des Gens - bereits in jungen, nicht-seneszierenden Rosettenblättern exprimiert. Die Mutante zeigte außerdem keine spezifisch durch die Seneszenz verstärkte *S40*-Expression. Vielmehr blieb die *S40*-Expression während der gesamten Wachstumsperiode auf einem gleichen Niveau. Verglichen mit dem *AtS40-3*-Expressionsniveau im Wildtyp war dieses Expressionsniveau während der Seneszenz zudem um ein Vielfaches niedriger. Dieses in der T-DNA-Insertionslinie beobachtete Expressionsmuster von *AtS40-3* führte zu einem verzögerten Seneszenz- und Vergilbungsprozess unter natürlichen Wachstumsbedingungen (Fischer-Kilbienski *et al.*, 2010). Die Expression der Seneszenzmarkergene *AtWRKY53* und *AtSAG12* ist in dieser Mutante im Vergleich zum Wildtyp stark herunterreguliert. Die Autoren schließen daraus, dass *AtS40-3* in *Arabidopsis* ein positiver Regulator der altersbedingten Seneszenz ist (Fischer-Kilbienski *et al.*, 2010). Allerdings könnte der verzögerte Seneszenzprozess auch darauf zurück zu führen sein, dass *AtS40-3* den Seneszenzprozess reprimiert, wenn es in jungen Blättern gebildet wird.

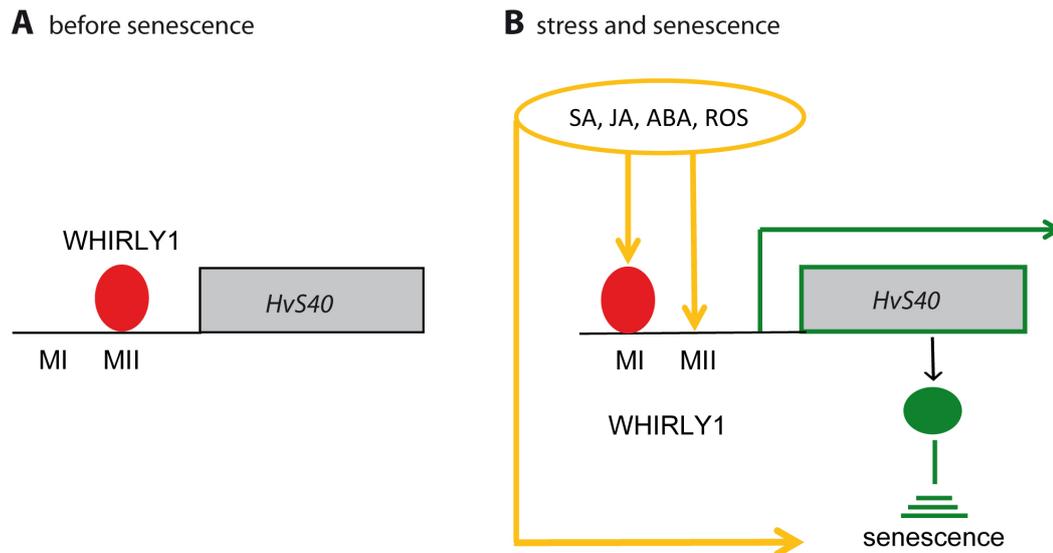


Abbildung (2) Modell zur Regulation der *HvS40*-Genexpression unter Stressbedingungen und während der Seneszenz. A) In jungen Blättern bindet WHIRLY1 an das Motiv MII des *HvS40*-Promotors. B) Während der Entwicklung aber auch als Reaktion auf Stressfaktoren verschiebt sich die WHIRLY1-Bindung von MII hin zu MI. Dies könnte das Promotormotiv MII für andere Transkriptionsfaktoren, die z.Bsp. durch Hormone oder ROS reguliert werden, zugänglich machen. Die Abbildung ist aus Krupinska *et al.* (2014a) entnommen.

Ein 840 bp großer Bereich, der strangaufwärts vor dem Translationsstart von *HvS40* liegt, konnte als Promotorregion von *HvS40* identifiziert werden (Dähnhardt, 2003). Zwei Sequenzmotive des Promotors (MI und MII) waren dabei von besonderem Interesse (Abb. 2). Diese Motive gleichen dem *elicitor response* Element (ERE) des *PR10a*-Gens (*pathogenesis related gene*) der Kartoffel und bestehen aus einer WRKY-Box und einem *Inverted Repeat* Motiv bzw. aus zwei WRKY-Boxen (Krupinska *et al.*, 2014a). Von WHIRLY1 konnte gezeigt werden, dass es *in vitro* an das Sequenzmotiv MII des *HvS40*-Promotors bindet (Dähnhardt, 2003; Kilbienski, 2007; Krupinska *et al.*, 2014a). Es wird postuliert, dass es während der Seneszenz zu einer Verschiebung der WHIRLY1-Bindung von Motiv II zu Motiv I kommt (Abb. 2). Es wird angenommen, dass WHIRLY1 vor Beginn der Seneszenz als negativer Regulator der *HvS40*-Expression fungiert. Die Verschiebung der WHIRLY1-Bindung von einem Motiv zum anderen könnte zudem die Bindung weiterer Transkriptionsfaktoren an diese Promotorregionen beeinflussen (Krupinska *et al.*, 2014a).

Für das *HvS40*-Gen der Gerste konnte kürzlich gezeigt werden, dass es unter epigenetischer Kontrolle steht (Ay *et al.*, 2015). In den letzten Jahren wurde der Einfluss der Epigenetik auf pflanzliche Entwicklungsprozesse wie Blütenbildung, Samenentwicklung, Keimung und Seneszenz zunehmend anerkannt. Allgemein versteht man unter Epigenetik Veränderungen in der Funktion von Genen, die vererbbar sind und die nicht durch Veränderungen in der DNA-Sequenz zu erklären sind (Russo *et al.*, 1996). Acetylierte Lysine des Histon-3 Proteins (Histon 3, Lysin 9; H3K9ac) sind ein Marker für transkriptionsaktives Euchromatin, während methylierte Lysine desselben Proteins (H3K9me2) Marker für heterochromatische, dicht gepackte DNA-Strukturen sind. In jungen Blättern der Gerste ist die *S40*-Expression nur sehr niedrig. Dies geht einher mit einem hohen Gehalt an H3K9me2 und einem niedrigen an H3K9ac, die in der Gensequenz von *HvS40* und im Promotorbereich detektiert werden konnten (Ay *et al.*, 2015). Mit Beginn der Seneszenz hingegen wird der Gehalt an H3K9me2 deutlich reduziert, während es zu einem Anstieg

von H3K9ac kommt. Dies wiederum korreliert mit der verstärkten Expression des *HvS40*-Gens zu Beginn der Seneszenz (Ay *et al.*, 2015).

1.3 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit soll die Regulation des seneszenzassoziierten *HvS40*-Gens der Gerste und die Funktion des zugehörigen Proteins geklärt werden. Um neue Faktoren zu identifizieren, die die *S40*-Expression beeinflussen können, soll eine umfassende Promotoranalyse mit dem Programm PLACE durchgeführt werden.

Die T-DNA-Insertionslinie *AtS40-3b* von *Arabidopsis thaliana*, in der das *AtS40-3*-Gen in einer stets gleichbleibenden Weise exprimiert wird, zeigte einen verzögerten Seneszenzprozess. Um den Einfluss des *HvS40*-Gens der Gerste auf den Verlauf der Seneszenz zu zeigen, sollen im Rahmen dieser Arbeit stabil transformierte Gerstenlinien charakterisiert werden. Die Auswirkung einer verminderten *HvS40*-Expression, die durch einen RNA-Interferenz Effekt in den Gerstenpflanzen erreicht wird, soll mit der Auswirkung einer verstärkten *HvS40*-Expression verglichen werden. Dafür stehen Gerstenpflanzen zur Verfügung, die das *HvS40*-Gen sowohl unter der Kontrolle des *Ubiquitin*- als auch des *Fruktosebisphosphatase*-Promotors überexprimieren. Um zu überprüfen, ob es zu verschiedenen Ausprägungen des Seneszenzsyndroms in den Transformanten kommt, soll die Anzucht der Pflanzen unter verschiedenen, stress- und seneszenzinduzierenden Bedingungen erfolgen.

Für HvS40 wurde aufgrund seiner Lokalisation im Zellkern eine regulatorische Funktion postuliert. Um diese Hypothese zu bekräftigen, soll die subzelluläre Lokalisation von S40-Proteinen weiterer monokotyler Arten untersucht werden. Dazu sollen GFP-Fusionskonstrukte unter zu Hilfe nahme der genomischen Sequenz erstellt werden. Mit diesen erfolgt dann die transiente Transformation von Zwiebelepidermiszellen und Gerstenprotoplasten.

Unter Verwendung eines 2002 hergestellten Antikörpers, der gegen das in *E. coli* überexprimierte HvS40-Protein gerichtet ist, soll das HvS40-Protein in Zellkernextrakten der Gerste nachgewiesen werden. Dabei soll auch geprüft werden, ob es im Laufe der Seneszenz zu einer Akkumulation des Proteins im Zellkern kommt.

2 | Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad „p.a.“ und wurden von den Firmen Amersham GE Healthcare (Freiburg), Bio-Rad (München), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Thermo Scientific (Düsseldorf), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (München) erworben. Von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) stammten die Taq-DNA-Polymerase, die Restriktionsendonukleasen sowie die DNA- und Protein-Größenstandards (GeneRuler™ 1 kb DNA-Ladder und Prestained-Protein-Ladder 10-170 kDa). Alle weiteren zum Einsatz gebrachten Enzyme wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe) und Promega (Mannheim) bezogen. Das in den Lösungen eingesetzte Wasser wurde zuvor über eine Millipore-Anlage deionisiert (Seradest SD 2000, USF Elga Seral, Ransbach-Baumbach). Alle Lösungen und Laborutensilien, die Verwendung beim Arbeiten mit Nukleinsäuren fanden, wurden stets für 20 min bei 120°C autoklaviert. Die Radionukleotide α -³²P-dCTP und γ -³²P-ATP stammten von der Firma Hartmann Analytic (Braunschweig).

2.2 Plasmide und Antibiotika

Der Klonierungsvektor pJET1.2 stammte von der Firma Thermo Scientific (Düsseldorf) und wurde zur Sequenzierung von DNA-Fragmenten eingesetzt (siehe 2.4.9). Die Vektoren pENTR/D-TOPO (Eintrittsvektor; Invitrogen, Karlsruhe) und pBatTL-GFP2 (Expressionsvektor; K.Fischer, Tromsø, Norwegen) fanden Einsatz in der Gateway-Klonierung. Das Gateway-System beruht auf dem Prinzip der homologen Rekombination, bei dem die spezifischen Rekombinationsstellen der eingesetzten Vektoren einen gezielten Austausch gewünschter Sequenzen erlauben (siehe auch 2.4.4).

Zur transienten Transformation von Zwiebelepidermiszellen wurde u.a. der Transformationsvektor pUbi:dsRed verwendet, in dem das *AtPEND*-Gen in Fusion mit dem Gen für das rot fluoreszierende Protein (RFP) vorliegt. Das Fusionskonstrukt wurde von Joanna Melonek in der Arbeitsgruppe Krupinska erstellt und stand schon zur Verfügung.

Antibiotika wurden zur Selektion von erfolgreich mit Plasmiden transformierten *E.coli*-Zellen eingesetzt und stammten von der Firma Duchefa (Haarlem, Niederlande). Sie sind in Tabelle 1 mit ihrem Lösungsmittel aufgelistet.

Tabelle (1) Zur Selektion von erfolgreich transformierten Bakterien verwendete Antibiotika

Antibiotika	Stammlösung (mg/ml)	Verdünnung	Lösungsmittel
Ampicillin	100	1:1000	H ₂ O
Kanamycin	25	1:1000	H ₂ O
Spectinomycin	82	1:1640	H ₂ O

2.3 Pflanzenmaterial

2.3.1 Anzucht von Gerstenpflanzen

Die Sommergerste *Hordeum vulgare* cv. *Golden Promise* wurde für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente verwendet und wird im Folgenden als Wildtyp bezeichnet. *Golden Promise* ist zweizeilig und entstand 1969 durch γ -Bestrahlung der Gerstensorte *Maythorpe* (Sigurbjornsson, 1969). Die Sorte lässt sich effizient mit *Agrobacterium tumefaciens* transformieren und ist als ertragreiche Gerstensorte ein Modellorganismus für kleinkörnige Getreidearten (Marthe *et al.*, 2015). Die Anzucht der Karyopsen geschah in ausreichend befeuchteter Erde (Einheitserde Classic, Einheitserde Werkverband e.V., Sinntal-Altengronau) oder in Vermiculit (Rieck, Rendsburg). Nach Aussaat der Karyopsen erfolgte eine dreitägige Stratifikation im Kühlraum bei 4°C und im Dunkeln. Dies gewährleistete eine gleichmäßige Keimung der jungen Pflanzen. Nach drei Tagen im Dunkeln erfolgte der Transfer der Anzuchtstöpfle in das Gewächshaus oder in die Klimakammer. In der Klimakammer herrschte, wenn nicht anders beschrieben, ein Licht-/Dunkelrhythmus von 16h/21°C bei 150 μ E und 8h/18°C.

2.3.2 Anzucht von Weizenpflanzen

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Weizenpflanzen handelte es sich um Hartweizen (*Triticum durum*). Die biologisch produzierten Karyopsen wurden von der Firma Ketex (Delbrück) bezogen. Im Gegensatz zum hexaploiden Brotweizen (*Triticum aestivum*) ist *Triticum durum* tetraploid und ermöglicht daher vergleichende Untersuchungen zur Gerste. Die Anzucht von Weizenpflanzen erfolgte auf gut befeuchteter Einheitserde in der Klimakammer oder im Gewächshaus (siehe 2.3.1).

2.3.3 Behandlung von Primärblättern der Gerste mit Phytohormonen

Siebe Tage alte Primärblättern des Wildtyps, der auf Erde oder auf Vermiculit angezogen wurde, wurden die Blattbasis und die Blattspitze abgeschnitten. Dies geschah in Leitungswasser, damit keine Luft in die Leitungsbahnen der Blätter gelangte. Die so präparierten Blätter wurden in mit Parafilm abgedichtete Petrischalen überführt, die die in der Tabelle 2 beschriebenen Phytohormone in der jeweils angegebenen Konzentration enthielten. Die Inkubation erfolgte im Dauerlicht, um eine permanente Öffnung der Schließzellen zu erreichen. Nach 6 - bzw. 24-stündiger Inkubation wurden die Primärblätter an Basis und Spitze wiederum um 0,5 cm gekürzt, bevor sie in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Die Lagerung des pflanzlichen Gewebes erfolgte bei -80°C.

Tabelle (2) Phytohormone, die zur Behandlung von Gerstenprimärblättern eingesetzt wurden.

Phytohormon	verwendete Konzentration	Lösungsmittel
Abscisinsäure	100 μ M	1% EtOH (v/v) in Leitungswasser
Methyljasmonat	100 μ M, 40 μ M	Leitungswasser
EtOH (Kontrolle)	1% (v/v)	Leitungswasser

2.3.4 *HvS40*-RNAi-Linien

Durch RNA-Interferenz (RNAi) lassen sich gezielt die Transkriptmengen bestimmter Gene herunter regulieren. Dafür ist eine stabile Transformation der Pflanzen mit einem RNAi-Konstrukt notwendig. Das zur stabilen Transformation von Gerste verwendete RNAi-Konstrukt wurde in der AG Krupinska hergestellt. Die kodierende Sequenz des *HvS40+3*-Leserahmens liegt in dem binären Vektor pGH234 in *sense*- und darauf folgend in *antisense*-Richtung vor (Abb. 3 A). Durch eine Intron-Sequenz werden die beiden Sequenzen getrennt, so dass nach erfolgter Transkription das RNA-Palindrom (Haarnadelstruktur) entsteht (Abb. 3 B). Diese Palindrom-Sequenz steht in dem Vektor unter der Kontrolle des *Ubiquitin*-Promotors von *Zea mays*. Die stabile Transformation wurde im Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* durchgeführt. Die hierbei verwendete Gerstensorte war *Golden Promise* (siehe 2.3.1). Unreife Embryonen dieser Sorte wurden mit *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen, die das RNAi-*S40*-Konstrukt trugen, ko-kultiviert. Über die vektorkodierten Grenzsequenzen (*right border*, *left border*) erfolgte die durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Insertion der Palindrom-Sequenz in die genomische DNA der pflanzlichen Zelle (Abb. 3 B) (Hensel *et al.*, 2008; Marthe *et al.*, 2015).

Da der Vektor auch die Sequenz der Hygromycin-Phosphotransferase beinhaltet und so eine Hygromycin-Resistenz vermittelt, ließen sich erfolgreich transformierte Pflanzen über eine Hygromycin-Behandlung identifizieren. Noch am IPK wurde mittels PCR überprüft, ob beide *HvS40*-Sequenzen („sense“ und „antisense“) in die genomische DNA eingefügt worden waren. Die vom IPK erhaltenen Transformanten wurden auf Homozygotie hin selektiert. Die in dieser Arbeit analysierten RNAi-*HvS40*-Linien sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle (3) Analytierte RNAi-*HvS40*-Linien der Gerste mit der Bestätigung der erfolgreichen Insertion von beiden (++) Sequenzen des *HvS40*-Gens ins Pflanzengenom. T2/3: Angabe der Tochtergeneration.

Linie	Generation	Insertion der <i>S40</i> -Sequenzen	Hygromycintest
01-25-6	T3	++	homozygot
02-12-1	T3	++	homozygot
07-38-7	T3	++	homozygot
09-2-17	T3	++	homozygot
10-24-10	T3	++	homozygot
11-1	T2	++	homozygot

A)

```

1- ATGGATCATCAGGAGCTCCAAGAAGCCGACGTCCTCTGGCCACACTACAACCTCCGAGCAC-
CGCCGCGACGGCGACGACGGCAGCAACGTCGACGGAGACATCGCCAAGGTGTCCCCGCGGAGCTGTCTGC
CCCCGGTCTCGTGCTCTCCGGAAGCGGGCTCGATCCTGGACGGCGTGTCCGACGGGAGCGGCAGTG
GCAACGACGACTGCAGCGACGGCGACGTCGATGTACCAACGACGCGAAGAGGAACGTGCCGCCACGTC
CTGGCCGAGCGACGGCGGAGGCTCGCCGGGAGGTCGACGGCGGCTACTCCATGTGCACCGGCAAAGGGA
GGACGCTCAAAGGGCGGGACCTCCGCAATATCAGGAACCTCGTCCTCAGGATGACCGGATTCATCGAGAAG -411

```

B)

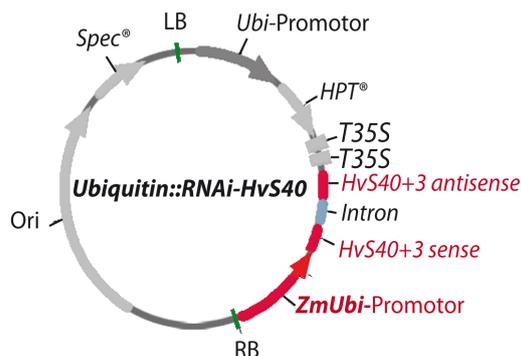


Abbildung (3) A) Sequenz des *HvS40+3*-Leserahmens, der zur Erstellung der Haarnadelstruktur-Sequenz verwendet wurde. Es handelt sich dabei um den Leserahmen, der für das kernlokalisierte S40-Protein kodiert. B) Schematische Darstellung des Transformationskonstruktes für *Hordeum vulgare*. Unter Kontrolle des *ZmUbiquitin*-Promotors liegt die Sequenz der Haarnadelstruktur (*S40*-Sequenzen in *sense* und *antisense*-Richtung, getrennt durch eine Intron-Sequenz). *HPT*: Gen, das Resistenz gegenüber Hygromycin vermittelt (Hygromycin-Phosphotransferase); *Ori*: Replikationsursprung für die Vermehrung in *E.coli*; *RB*: rechte Grenzsequenz, *LB*: linke Grenzsequenz; *T35S*: Terminator; *Spec*: Gen, das Resistenz gegenüber Spectinomycin vermittelt (Spectinomycin-Adenyltransferase). Die Vektorkarte wurde mit dem Programm Serial-Cloner erstellt.

2.3.5 *HvS40*-Überexpressionslinien

Ebenfalls im IPK Gatersleben wurden Pflanzen erstellt, die den *HvS40*-Leserahmen überexprimieren. Dies wurde über eine stabile Transformation von Gerstenpflanzen mit Überexpressionskonstrukten erreicht. Zwei unterschiedliche Konstrukte wurden angefertigt. Das erste Konstrukt wurde von Isabell Fischer-Kilbienski angefertigt und ist in (Kilbienski, 2007) beschrieben. Dabei handelt es sich um den binären Vektor p6d35S, in dem die *HvS40+3*-Sequenz unter der Kontrolle des *Ubiquitin*-Promotors von *Zea mays* steht (Abb. 4 B). In dem zweiten, in der AG Krupinska angefertigten Konstrukt (binärer Vektor pGH234) steht die *S40+3*-Sequenz hingegen unter der Kontrolle des *Fruktosebiphosphatase*-Promotors der Gerste (Abb. 4 C), von dem angenommen wird, dass er im reifen Blatt aktiver ist als in den Keimblättern. Dies bietet den Vorteil, einen möglicherweise durch die *HvS40*-Überexpression verursachten Effekt auf die Keimung eher gering zu halten. Da es sich bei den zur stabilen Transformation verwendeten Ausgangspflanzen um den Wildtyp (cv. *Golden Promise*) handelte, wird neben der künstlich eingebrachten *S40*-Sequenz auch das endogene *HvS40*-Gen in den Transformanten exprimiert. Über Ko-Kultivierung von Embryonen mit *Agrobacterium tumefaciens* konnten die Überexpressions-Konstrukte in das pflanzliche Genom stabil eingebracht werden (Hensel *et al.*, 2008; Marthe *et al.*, 2015). Die Selektion erfolgreich transformierter Pflanzen erfolgte über eine Behandlung mit Hygromycin. Die in dieser Arbeit untersuchten *HvS40*-Überexpressionslinien sind in Tabelle 4 aufgeführt.

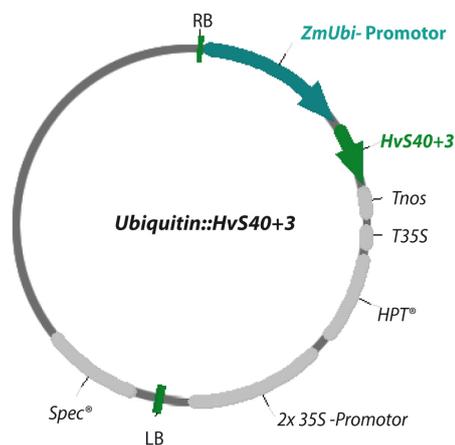
Tabelle (4) Analytierte *HvS40*-Überexpressionslinien der Gerste mit der Bestätigung der erfolgreichen Insertion der *HPT*-Sequenz (+) ins Pflanzengenom. T2/3: Angabe der Tochtergeneration.

Linie	Generation	Insertion der <i>HPT</i> -Sequenz	Hygromycintest
<i>pUbi::HvS40</i>			
9-44-4	T3	+	homozygot
10-4-10	T3	+	homozygot
11-3-5	T3	+	homozygot
<i>pFBP::HvS40</i>			
02-01	T2	+	homozygot
04-02	T2	+	heterozygot
10-02	T2	+	heterozygot
14-1	T2	+	homozygot

A)

1- ATGGATCATCAGGAGCTCCAAGAAGCCGACGTCTCTGGCCACACTACAACCTCCGAGCAC-
CGCCGCGACGGCGACGACGGCAGCAACGTCGACGGAGACATCGCCAAGGTGTCCCGCCGGAGCTGTCTGC
CCCGTCTCGTGCTCTCCGGAAGCGGGTCTCGATCCTGGACGGCGTCCGACGGGAGCGGAGTG
GCAACGACGACTGCAGCGACGGCGACGTCCGATGTACCAACGACGCGAAGAGGAACGTGCCGCCACGTC
CTGGCCGAGCGACGGCGGAGGCTCGCCGGGAGGTCGACGGCGGCCTACTCCATGTGCACCGCAAAGGGA
GGACGCTCAAAGGGCGGGACCTCCGCAATATCAGGAACCTCGTCTCAGGATGACCGGATTCATCGAGAAG - 411

B)



C)

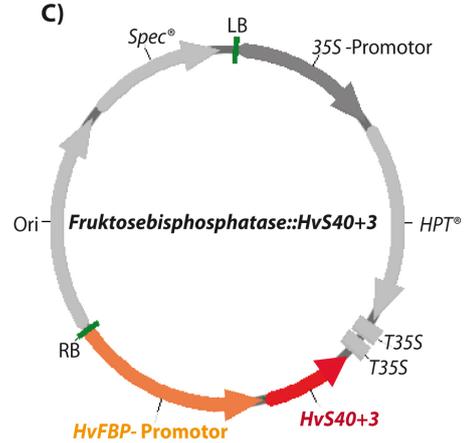


Abbildung (4) A) Sequenz des *HvS40+3*-Leserahmens, der für das kernlokalisierte S40-Protein kodiert und der zur Erstellung der Überexpressionskonstrukte verwendet wurde. B-C) Schematische Darstellung der Transformationskonstrukte für *Hordeum vulgare* (für B siehe auch (Kilbiński, 2007)). *HvS40+3*: Leserahmen, der für das kernlokalisierte S40-Protein kodiert; *ZmUbi*: Ubiquitin-Promotor aus *Zea mays*; *HvFBP*: Fruktosebisphosphatase-Promotor aus *Hordeum vulgare*; *HPT*: Gen, das Resistenz gegenüber Hygromycin vermittelt (Hygromycin-Phosphotransferase); Ori: Replikationsursprung für die Vermehrung in *E.coli*; Tnos & T35S: Terminatoren; RB: rechte Grenzsequenz, LB: linke Grenzsequenz; *Spec*: Gen, das Resistenz gegenüber Spectinomycin vermittelt (Spectinomycin-Adenyltransferase). Die Vektorkarten wurden mit dem Programm Serial-Cloner erstellt.

2.3.6 Blattmaterial für die Analyse der Blattseneszenz

2.3.6.1 Durch Dunkelheit induzierte Blattseneszenz Um die Seneszenz künstlich zu induzieren, wurden sieben Tage alte Primärblätter des Wildtyps, der RNAi-*S40*-Linien und der ÜE-*S40*-Linien für 72 h dunkel gestellt. Zunächst wurde den Blättern unter Wasser die Blattbasis abgeschnitten. Jedes Blatt wurde daraufhin in ein mit Leitungswasser gefülltes 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und für drei Tage in eine lichtundurchlässige Box gestellt. Nach der Dunkelinkubation erfolgte die Bestimmung der maximalen Effizienz des Photosystems II (siehe 2.3.7). Die Blätter wurden danach mit einem Scan-Gerät dokumentiert.

2.3.6.2 Analyse der natürlichen Blattseneszenz Um die natürliche Blattseneszenz zu beobachten, wurden Wildtyppflanzen und Pflanzen der Transformantenlinien in der Klimakammer oder im Gewächshaus über längere Zeiträume angezogen (21 bis 70 d). Die Anzucht in der Klimakammer erfolgte entweder in Multitopfplatten oder in kleinen Töpfen mit einem Durchmesser von 12 cm, in denen immer 25 Pflanzen zusammen angezogen wurden. Die Lichtintensität betrug dabei die ersten 10 Tage 150 μE , und wurde danach auf 300 μE erhöht. Im Gewächshaus erfolgte die Anzucht wie beschrieben zu mehreren Pflanzen in einem Topf. Zur Analyse der Seneszenz wurde zu mehreren Zeitpunkten die maximale Effizienz des PSII von Primärblättern bestimmt (siehe 2.3.7). Exemplarisch wurden nach der Messung einige Primärblätter eingescannt.

2.3.7 Bestimmung der maximalen Effizienz des PSII über chlorophyllspezifische Fluoreszenz (F_v/F_m)

Die Bestimmung der maximalen Quanteneffizienz des Photosystems II (F_v/F_m) wurde mit Hilfe des Imaging-PAM (Puls-Amplituden-Modulation)-Chlorophyllfluorometer der Firma Walz GmbH (Effeltrich) durchgeführt. Die Messung beruht auf der von Schreiber *et al.* (1986) beschriebenen Methode.

Die zu messenden Blattproben wurden zunächst 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 kurzen 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 wiederum ergibt sich aus der Variablen Fluoreszenz (F_v) über der Maximalen Fluoreszenz (F_m):

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$$

Die Daten wurden mit der dazugehörigen ImagingWin-Software ausgewertet. Es wurde jeweils der F_v/F_m -Mittelwert über die gesamte Blattfläche von fünf bis acht Primärblättern berechnet. Der Fehler des Mittelwertes wurde aus der Standardabweichung berechnet.

2.3.8 Nachweis des Zelltods mit dem Farbstoff Evans Blau

Primärblätter der Gerste wurden an der Basis und der Spitze um 0,5 cm gekürzt und daraufhin wurde jedes einzelne Blatt in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, das 0,5 ml der Färbelösung enthielt. Die so vorbereiteten Blätter wurden in ein Unterdruckgefäß gestellt und über eine Pumpe (Heto Master Jet, Jouan Inc., Virginia, USA) wurde der Luftdruck im Gefäß auf 200 mbar reduziert (Vakuum-Infiltration). Dadurch wurde gewährleistet, dass der Farbstoff in das Blattmaterial eindringt. Nach 10 minütiger Vakuum-Infiltration wurden die Primärblätter zweimal in 1 x PBS für 5 min gewaschen. Färbelösung: 1% Evans Blau [w/v] in dH₂O .

2.4 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.4.1 Lösungen und Puffer

Luria & Bertoni-Medium (LB-Medium)

10 g NaCl

10 g Pepton aus Casein

5 g Hefeextrakt

Das Medium wurde vor Gebrauch autoklaviert. Für die Herstellung von LB-Platten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1 % (w/v) Agar zugesetzt.

10 x TAE

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.

1 x TE-Puffer

10 mM Tris/HCl, pH8

1 mM EDTA

PBS

8,1 mM Na₂HPO₄

1,5 mM NaH₂PO₄

150 mM NaCl

pH 7,4

10 x Bromphenolblau

50 % (v/v) Glycerin

0,1 % Bromphenolblau

RNase-Stammlösung: 10 mg/ml

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 für die Vervielfältigung rekombinanter Plasmide wurde der Bakterienstamm *E.coli* DH5 α verwendet. Zur gezielten Synthese und zur Gewinnung größerer Mengen des HvS40-Proteins wurde der *E.coli*-Stamm BL21 eingesetzt.

2.4.2.2 Anzucht von Bakterienkulturen Bakterienzellen der Stämme *E.coli* DH5 α und BL21 wurden in flüssigem LB-Medium oder auf LB-Agarplatten (siehe 2.4.1) mit entsprechenden Antibiotika zur Selektion angezogen (siehe 2.2). Die Anzucht erfolgte über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator (Labshaker, InnovaTM4400) oder bei ebenfalls 37°C im Brutschrank (WTB Binder).

2.4.2.3 Herstellung von Gefrierkulturen Zur langzeitigen Lagerung von Bakterienkulturen wurden Gefrierkulturen angelegt. Es wurden 500 μ l einer frisch gewachsenen Übernachtskultur mit 250 μ l 80% -igem (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 CaCl₂-Methode nach Cohen *et al.* (1972) durchgeführt. Nach dieser Methode werden 1,2 ml einer Übernachtskultur 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 wird am Spektralphotometer (Shimadzu, UV-2501PC, Spectrophotometer, Duisburg) bei einer Wellenlänge von 450 nm durchgeführt. Dabei dient reines LB-Medium als Blindwert. Die Bakteriensuspension wird für 30-45 Minuten geschwenkt und auf Eis gekühlt. Die Bakterienzellen werden anschließend durch eine Zentrifugation bei 3000 x g für 10 Minuten und 4°C sedimentiert, in 50 ml kalter 100 mM MgCl₂-Lösung resuspendiert und nach weiterer Zentrifugation in 50 ml kalter 100 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen. Die Kultur wird danach für 30 Minuten auf Eis geschwenkt. Nach erneuter Zentrifugation werden die Bakterienzellen in 10 ml 100 mM CaCl₂-Lösung und 1,8 ml 100% [v/v] Glycerin aufgenommen. Diese Suspension wird aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C.

2.4.2.5 Transformation kompetenter Bakterienzellen Kompetente *E.coli* DH5 α - bzw. BL21-Zellen (siehe 2.4.2.4) wurden mittels Hitzeschock transformiert. Dabei werden 8 - 10 μ l des gewünschten Vektors zu 100 μ l Bakterienkultur gegeben. Um die Aufnahme der Vektor-DNA durch die Zellmembran zu ermöglichen, folgt nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis eine Hitzeschock-Behandlung für 45 sek bei 42°C. Die Bakterienzellen werden daraufhin für 2 min auf Eis gekühlt und mit 250 μ l LB-Medium (siehe 2.4.1) versetzt, das keine Antibiotika enthält. Nach einstündiger Inkubation auf dem Schüttelinkubator (180 rpm, 37°C) werden die Bakterienzellen auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C angezogen.

2.4.2.6 Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E.coli* Plasmid-DNA wurde entweder mit dem Plasmid-Aufreinigungssatz von Roth („Mini Kit“, Carl Roth, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers oder nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) isoliert.

Nach **Birnboim und Doly** werden zur Sedimentierung 1,5 ml einer über Nacht angezogenen Flüssigkultur von *E.coli* für 2 min bei 13 100 x g zentrifugiert (Zentrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg). Die sedimentierten Bakterien werden in 100 μ l der Lösung I vollständig gelöst, um die alkalische Lyse der Bakterienzellen zu bewirken und anschließend auf Eis für 5 min gekühlt. Durch Zusatz von 200 μ l der Lösung II und vorsichtiges Invertieren des Reaktionsgefäßes werden anschließend die in der Lösung vorhandenen Proteine denaturiert. Es erfolgt erneut eine fünfminütige Inkubation auf Eis. Die genomische DNA wird anschließend mit 150 μ l 3M NaAc (pH 4,8-6,0) gefällt. Es folgt eine Zentrifugation für 10 min bei 16 100 x g. Der gewonnene Überstand wird daraufhin in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,7 x Vol. Isopropanol versetzt, um die Fällung der Plasmid-DNA zu bewirken. Diese wird für 10 min bei 16 100 x g sedimentiert, mit 70% EtOH gewaschen, daraufhin getrocknet und in 20 μ l 1 x TE-Puffer (siehe 2.4.1) aufgenommen. Um eventuell noch vorhandene RNA zu entfernen, erfolgt eine Behandlung der Plasmid-Probe mit 10 μ g RNase A für 30 min bei 37 °C.

Lösung I

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

Lösung II

0,2 M NaOH
1% (w/v) SDS
erst direkt vor Gebrauch ansetzen

2.4.3 Gewinnung von genomischer DNA aus Gersten- und Weizenpflanzen

Genomische DNA wurde aus Wildtyppflanzen der Gerste, den transgenen Gerstenpflanzen und aus Wildtyppflanzen des Weizens (*Triticum durum*) gewonnen. Dazu wurden 4 g Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 6 ml Extraktionspuffer versetzt und gut durchmischt. Danach erfolgte eine Zugabe von 3 ml Phenol und weiteren 3 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24+1, [v/v]). Die Probe wurde daraufhin für 15 Minuten im Überkopfschüttler auf Stufe 1 inkubiert, worauf eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 5000 x g und Raumtemperatur stattfand (Zentrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg). Die obere Phase, in der sich nach Zentrifugation die genomische DNA befand, wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut mit 3 ml Phenol und 3 ml Chloroform/Isoamylalkohol versetzt. Die Probe wurde daraufhin im Überkopfschüttler auf Stufe 1 für 10 Minuten inkubiert und abermals für 10 min bei 5000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde danach zu bereits in einem neuen Reaktionsgefäß vorgelegten 6 ml Chloroform/Isoamylalkohol hinzugegeben, im Überkopfschüttler auf Stufe 1 für 10 Minuten inkubiert und anschließend zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde erneut in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 600 μ l 3M Natriumacetat (pH 4,8) versetzt. Daraufhin wurden 6 ml Isopropanol zur Fällung der genomischen DNA dem Gemisch zugegeben. Das erhaltene DNA-Knäuel wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zweimal mit 80% EtOH über eine Zentrifugation bei 13000 x g für 3 min gewaschen. Die Trocknung der DNA erfolgte unter dem Abzug an der Luft. Das getrocknete Pellet wurde in 500 μ l 5

mM Tris-Puffer aufgenommen, mit 2 μ l RNaseA versetzt und bei 4°C gelagert.

1x Extraktionspuffer
100 mM Tris/HCl pH8,0
100 mM NaCl
10 mM EDTA pH8,0
1% [v/v] N-Lauroylsarcosin

2.4.4 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.4.4.1 pGEM-T-Vektorsystem zur Klonierung von PCR-Produkten Über PCR erhaltene DNA-Fragmente (siehe 2.4.10) wurden zur Analyse mit dem Vektor pGEM-T Easy ligiert (Promega, Mannheim). PCR-Fragment und Vektor wurden dabei in einem Verhältnis von 3:1 eingesetzt. Daneben bestand der 5 μ l Reaktionsansatz noch aus 2,5 μ l Ligationspuffer und 1,5 U T4-DNA-Ligase. Die Ligation fand bei Raumtemperatur mit einer Inkubationszeit von 1 h statt. Kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen wurden danach mittels Hitzeschock mit dem Konstrukt transformiert (siehe 2.4.2.5).

2.4.4.2 Gateway-Klonierungstechnik GFP-Fusionskonstrukte zur transienten Transformation von pflanzlichen Zellen (siehe 2.6) wurden über die Gateway-Klonierungstechnik erstellt (Invitrogen, Karlsruhe). Die Gateway-Technologie basiert auf dem Rekombinations-System des Bakteriophagen Lambda. In der Natur ermöglicht es die Integration der Phagen-DNA in das *E. coli*-Chromosom. Die Rekombination erfolgt an spezifischen Bindestellen (*attachment sites*) des *E. coli*-Chromosoms und der Lambda-DNA und wird durch eine ganze Reihe von Enzymen katalysiert. Diese binden spezifisch an die Bindestellen, führen die Zielsequenzen zueinander und verbinden sie schließlich. Die Zusammensetzung der Rekombinationsenzyme ist unterschiedlich und hängt davon ab, ob der Bakteriophage den lytischen oder den lysogenen Vermehrungszyklus einschlägt. Der lysogene Zyklus wird von der bakteriophagen λ -Integrase (Int) und den *Integration Host Factor* Proteinen (IHF) von *E. coli* katalysiert, während der lytische Zyklus von der λ -Integrase, der Excisionase (Xis) und den IHFs vermittelt wird. In dieser Arbeit wurde der Enzym-Mix verwendet, der aus der λ -Integrase, der Excisionase und den IHFs besteht (Invitrogen, Gateway LR Clonase II Enzyme Mix).

Die über PCR gewonnenen Sequenzen der Leserahmen *HvS40+1*, *HvS40+3*, *TdS40+1* und *TdS40+3* (siehe 2.4.10) wurden im Zuge der Gateway-Klonierung zunächst in den Eintrittsvektor pENTR/D-TOPO kloniert. Dazu war es nötig, den Sequenzen vor dem Start-Codon einen CACC-Überhang anzufügen. Dies geschah mittels PCR (siehe 2.4.10). Über diese Basenabfolge konnten die DNA-Fragmente direkt in den pENTR/D-TOPO-Vektor eingefügt werden, der eine dazu komplementäre, überständige Sequenz besitzt (GTGG). Die Topoisomerase I katalysiert diese Reaktion und ist bei diesem System über eine Phospho-Verbindung direkt an den Vektor gebunden. Die Klonierung erfolgte nach Herstellerangaben. Bei dem Expressionsvektor handelte es sich um den pBatTL-GFP2-Vektor (K. Krause, Tromsø, Norwegen). Der Ansatz wurde 2 h bei 25°C inkubiert. Danach erfolgte eine 10-minütige Inkubation mit 0,5 μ g ProteinkinaseK bei 37°C. Mit den erhaltenen Expressionsvektoren wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α transformiert (siehe 2.4.2.5).

LR-Rekombinations-Ansatz

50-150 ng Eintrittsvektor (pENTR/D-TOPO+*S40*-Sequenz)

100 ng Zielvektor (pBatTL-GFP2)

6,5 μ l 1x TE-Puffer pH 8,0

2,0 μ l LR-Klonase-Enzymmix

2.4.5 Restriktion von DNA mit Endonukleasen

Zur Fragmentierung von DNA wurden sequenzspezifische Restriktionsendonukleasen (MBI Fermentas) verwendet. Dabei wurden pro μ g zu restringierender DNA 3-5 Units Enzym eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Brutschrank für eine für das jeweilige Enzym geeignete Zeitspanne.

2.4.6 DNA-Agarosegelelektrophorese

Zur Konzentrations- und Größenbestimmung sowie zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurde die Agarosegelelektrophorese verwendet. Bei diesem Verfahren werden die DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld nach Größe und Form aufgetrennt. Als Matrix dient dabei ein 0,75% [w/v] Agarosegel, als Laufpuffer 1 x TAE (siehe 2.4.1). Den DNA-Proben wird 0,1 Vol. 10 x BPB- Auftragspuffer hinzugefügt (siehe 2.4.1). Die Zugabe von 5% [v/v] Ethidiumbromid zum Auftragspuffer dient der Visualisierung der DNA-Fragmente unter UV-Licht.

2.4.7 Elution von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente, die nach ihrer Analyse durch die Gelelektrophorese weiter verwendet werden sollten, wurden mit einem sterilen Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten. Mit Hilfe eines Elutionssystems (Machery & Nagel, „NucleoSpin Extract II“) konnte daraufhin die DNA aus dem Agarosegel gelöst werden.

2.4.8 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Mit dem Spektrophotometer NanoDrop-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) wurde die Konzentration von gelösten Nucleinsäuren bestimmt. Die Wellenlängen betragen bei diesen photometrischen Messungen 280 nm und 260 nm. Eine Extinktion von 1 entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 50 μ g/ml und einer RNA-Konzentration von 40 μ g/ml.

2.4.9 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte nach Sanger *et al.* (1977) und wurde durch das Institut für Klinische Molekularbiologie (IKMB) der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt.

2.4.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente wurden spezifisch über die Polymerase-Kettenreaktion angereichert. Als Matrix diente Plasmid-DNA für die Vervielfältigung der *S40*-Sequenzen der Gerste („Walter“-Klon, W. Becker, 1991) oder genomische DNA für die Vervielfältigung der *S40*-Sequenzen des Weizens

(*Triticum durum*) (siehe 2.4.3). Als DNA-Polymerasen fanden die Taq-DNA-Polymerase für die TA-Klonierung (siehe 2.4.4.1) (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) und die Phusion-DNA-Polymerase Verwendung (Thermo Scientific, Düsseldorf). Die Hybridisierungstemperatur wurde an die physikalische Schmelztemperatur der jeweils eingesetzten Oligonukleotide angepasst (siehe Tab. 5). Die angesetzte Zyklenzahl variierte abhängig von den verwendeten Oligonukleotid-Paaren. Die PCR-Reaktion erfolgte in einem 20 μ l-Ansatz und bestand aus folgenden Komponenten:

Ansatz mit Taq-DNA-Polymerase

30 ng Matrize (gDNA, Vektor-DNA)
 2 μ l 10xPCR-Puffer + (NH₄)₂SO₄
 2 μ l 2 mM dNTPs
 0,5 μ l Primer forward (10 pmol/ μ l)
 0,5 μ l Primer reverse (10 pmol/ μ l)
 1,2 μ l 25 mM MgCl₂
 0,1 μ l Taq-DNA-Polymerase (3 U/ μ l)
 ad 20 μ l mit dH₂O

Ansatz mit Phusion-DNA-Polymerase

30 ng Matrize (gDNA, Vektor-DNA)
 4 μ l 5xHF-Puffer
 1 μ l 10 mM dNTPs
 0,5 μ l Primer forward (10 pmol/ μ l)
 0,5 μ l Primer reverse (10 pmol/ μ l)
 0,2 μ l Phusion-DNA-Polymerase (2 U/ μ l)
 ad 20 μ l mit dH₂O

Temperaturprofile

	Taq-DNA-Polymerase:	Phusion-DNA-Polymerase:
Initialdenaturierung	95°C, 3 min	98°C, 30 sec
Denaturierung	95°C, 30 sec	98°C, 15 sec
Hybridisierung	T _m s. Tab.5, 30 sec	T _m s. Tab.5, 25 sec
Elongation	72°C, 30 sec	72°C, 40 sec

Anschließend wurde der Reaktionsansatz über ein Agarosegel aufgetrennt und das amplifizierte PCR-Fragment wurde aus dem Gel eluiert (siehe 2.4.6, 2.4.7). Mit Hilfe des Spektralphotometers konnten die aufgereinigten Amplifikate quantifiziert werden (siehe 2.4.8).

Die in Tabelle 5 aufgeführten Oligonukleotide fanden Verwendung in der Polymerasenketten-Reaktion zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten sowie in der Sequenzierung von klonierten Produkten. Alle Oligonukleotide wurden selbst konstruiert unter Zuhilfenahme der kodierenden Sequenz des jeweiligen Gens. Dabei berechnete sich die Hybridisierungstemperatur aus der Schmelztemperatur der einzelnen Primer wie folgt:

$$[2(G+C) + (A+T)] \times 1,46 + 22 = \text{Schmelztemperatur in } ^\circ\text{C}$$

G, C, A und T entsprechen in dieser Formel der Anzahl der Guanin-, Cytosin-, Adenin- und Thyminbasen. Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma Sigma (München).

Tabelle (5) Für die PCR verwendete Oligonukleotide. Es sind die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide in 5'-3' Richtung angegeben und die erforderliche Hybridisierungs-Temperatur. UTR: Untranslatierte Region. PT: Phosphotransferase. Die Oligonukleotide HvS40-UTR sind nach einer von Becker (1991) beschriebenen Sequenz in der 3'-UTR von *HvS40* konzipiert worden.

Primer	Matrize	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Tm
HvS40+1 for	<i>Alt-HvS40</i>	CACCATGGCAGCCCCAGC	63°C
HvS40+1 rev	<i>Alt-HvS40</i>	TCCTGAGGACGAGGTTCT	63°C
HvS40+3 for	<i>HvS40</i>	CACCATGGATCATCAGGAGC	63°C
HvS40+3 rev	<i>HvS40</i>	CTTCTCGATGAATCCGGTCAT	63°C
TdS40-gDNA for	5'UTR <i>TdS40</i>	GCCAGCTTCTCCTTCTTCCT	62°C
TdS40+1 for	<i>Alt-TdS40</i>	CACCATGGCAGCCCCAGC	63°C
TdS40+1 rev	<i>Alt-TdS40</i>	GCCAGGACGTGCGGCGG	62°C
TdS40+3 for	<i>TdS40</i>	CACCATGGATCAGGAACTCC	63°C
TdS40+3 rightRev	<i>TdS40</i>	TTTCTCGATGAATCCGGTCATC	63°C
GH-Hyg-F1	<i>Hygromycin-PT</i>	GATCGGACGATTGCGTCGCA	65°C
GH-Hyg-R2	<i>Hygromycin-PT</i>	TATCGGCACTTTGCATCGGC	63°C
HvS40-UTR for	3' UTR <i>HvS40</i>	TATCAGGAACCTCGTCCTCA	65,8°C
HvS40-UTR rev	3' UTR <i>HvS40</i>	CAAGCTTTCACACACATCCA	64°C

2.4.11 Isolierung von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA, die anschließend zur cDNA-Synthese eingesetzt (siehe 2.4.12) oder über eine Gelelektrophorese (Northern Blot, siehe 2.4.14) quantifiziert werden sollte, wurde mit Hilfe des TriFast-Reagenz von Peqlab Biotechnologie (Erlangen) nach Angaben des Herstellers extrahiert. Dazu wurden ca. 100 mg Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 700 μ l Trifast-Reagenz aufgeschlossen, danach gründlich durchmischt und noch einmal mit 300 μ l Trifast-Reagenz versetzt und durchmischt. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Daraufhin wurden 200 μ l Chloroform vermischt mit Isoamylalkohol (24+1, [v/v]) hinzugefügt, worauf eine Inkubation für drei Minuten bei Raumtemperatur stattfand. Es erfolgte nach Zentrifugation bei 12000 x g für 10 min (Zentrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg) eine Trennung in drei Phasen. Die oberste Phase, in der die RNA angereichert vorliegt, wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 500 μ l [v/v] Isopropanol vermischt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA durch Zentrifugation (10 min, 12000 x g, RT) sedimentiert. Die gefällte RNA wurde zweimal mit 1 ml kaltem 70 % [v/v] Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet, zur Lagerung in DEPC-H₂O resuspendiert und bei -80°C gelagert.

2.4.12 Quantitative Echtzeit-PCR

Tabelle (6) Zur quantitativen Echtzeit-PCR verwendete Oligonukleotide. Es sind die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide in 5' - 3' Richtung angegeben sowie die erforderliche Hybridisierungs-Temperatur. UTR: Untranslatierte Region. Die Oligonukleotide S40-UTR1 sind nach einer von Becker (1991) beschriebenen Sequenz in der 3'-UTR von *HvS40* konzipiert worden.

Primer	cDNA Matrize	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Tm
S40 for01	<i>HvS40</i>	CGACGGCGACGTCCGATGTA	58°C
S40 rev01	<i>HvS40</i>	CTTTGAGCGTCCCTTTGC	58°C
S40-UTR1 for	3' UTR <i>HvS40</i>	ATCAGGAACCTCGTCCTCAG	58°C
S40-UTR1 rev	3' UTR <i>HvS40</i>	TCTGCTCTCACCGAAAATC	58°C
FBP1 for	<i>Fruktosebisphosphatase</i>	ACTGGGAATGGTGTGAATGG	58°C
FBP1 rev	<i>Fruktosebisphosphatase</i>	AGTTTCTGGCATTCCCTTCG	58°C
Ubi1 for	<i>Ubiquitin</i>	GGCTGACTACAACATCCA	58°C
Ubi1 rev	<i>Ubiquitin</i>	CTCCACCTCAAGAGTGATAG	58°C
SPF2 for	<i>Splicing Factor 2 like</i>	ATGAGAAAGGCTGGTGTATGT	58°C
SPF2 rev	<i>Splicing Factor 2 like</i>	CTTTTGCCAGCATACTCCTT	58°C

Die quantitative Echtzeit-PCR, auch *Real-Time* PCR genannt, wurde zur Bestimmung der relativen Transkriptmenge ausgesuchter Gene angewandt. Die dazu erforderliche Synthese von komplementärer DNA (cDNA) erfolgte mit dem QuantiTect Reverse Transcription System der Firma Qiagen (Hilden). Die gewonnene cDNA wurde im Verhältnis 1:7 mit dH₂O verdünnt. Die Expression verschiedener Gene konnte jetzt mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden ermittelt werden (siehe Tab. 6). Dazu wurden 2 µl der verdünnten cDNA mit den gewünschten Oligonukleotiden und einem SYBR-*Green*-Gemisch vermengt, das neben dem Farbstoff SYBR-*Green* die Taq-Polymerase, Reaktionspuffer und dNTPS enthielt. Die Zusammensetzung von cDNA, Oligonukleotiden und SYBR-*Green* erfolgte nach Herstellerangaben („QuantiFast SYBR *Green* PCR“, Qiagen, Hilden). Zur Analyse der Fluoreszenzen wurde das Rotor-Gene Q Gerät der Firma Qiagen verwendet. Als interner Standard der Reaktion diente die Expression des *HvSPF2*-Gens (*Splicing Factor 2 like*).

Der erste Schritt der quantitativen Echtzeit-PCR bestand aus einer Denaturierungsphase bei 95°C für 5 min. Dieser Phase folgten 45 Zyklen, die jeweils aus einer kurzen Denaturierungsphase von 95°C für 5 sec und einer Hybridisierungs- und Elongationsphase von 58°C für 10 sec bestanden. Um die Spezifität der durchgeführten PCR-Reaktionen zu überprüfen, erfolgte im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurven-Analyse. Während dieser erhöhte sich die Temperatur schrittweise von 50°C bis auf 99°C. Für jede Reaktion wurden mindestens drei technische Replikate erstellt.

Die Daten wurden mit der Rotor-Gene Q Series Software unter Zuhilfenahme der $\Delta\Delta$ CT-Methode ausgewertet, die eine relative Quantifizierung der Transkriptmengen ermöglicht (Livak and Schmittgen, 2001).

Die für die quantitativen Echtzeit-PCR verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 6 auf-

geführt. Sie wurden basierend auf Sequenzinformationen mit Hilfe des Programms Primer 3 erstellt und von der Firma Sigma (München) hergestellt. Alle Oligonukleotide wurden einem Effizienztest unterzogen. Dabei wurde eine maximale Abweichung von 0,02 vom Effizienzwert 1,0 (entspricht einer 100-prozentigen Effizienz) toleriert.

2.4.13 DNA-Blot Analysen (Southern-Blot)

Mittels DNA-Blot wurde die Anzahl der Insertionen des RNAi-Konstruktes (siehe 2.3.4) in die genomische DNA von Gerstenpflanzen und die Orte der Insertionsereignisse in der genomischen DNA ermittelt. Dies lieferte wichtige Informationen darüber, ob es sich bei den untersuchten Linien um verschiedene Einzelllinien handelt oder ob untersuchte Linien aufgrund ihres Genotyps zu einer Linie zusammengefasst werden müssen.

Für den DNA-Blot wurde genomische DNA aus den transgenen Pflanzen und dem Wildtyp gewonnen (siehe 2.4.3). 25 μg der isolierten genomischen DNA wurden mit den Restriktionsenzymen HindIII, EcoRV und EcoRI hydrolysiert (siehe 2.4.5) und in einem 0,75%-Agarosegel aufgetrennt (siehe 2.4.6). Anschließend wurde die DNA durch Kapillartransfer auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond XL, Amersham GE Healthcare, Freiburg) überführt. Dies geschah nach dem Standardprotokoll von Southern (1975). Als Transferlösung diente 20 x SSC. Die Fixierung der DNA-Moleküle auf die Nylonmembran erfolgte durch Bestrahlung mit UV-Licht (UV-Stratalinker 1800, Stratagene, La Jolla, USA).

Für die Ermittlung der Insertionsanzahl und die Insertionsorte der RNAi-Kassette in das Gerstengenom wurde eine DNA-Sonde erstellt, die Teile des *Hygromycin-Phosphotransferase*-Gens umfasst (siehe 2.3.4). Die Sonde wurde über PCR mit Hilfe der Oligonukleotide GH-Hyg-F1 und GH-Hyg-R2 amplifiziert (siehe 2.4.10). Anschließend erfolgte die Markierung der Sonde mit radioaktivem γ - ^{32}P -dATP (Hartmann Analytic, Braunschweig) unter Verwendung des „Deca Label DNA Labeling“ Systems (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers. Danach werden zunächst vor Verwendung der Sonde freie Nukleotide mit Hilfe einer kleinen Sephadex-Zentrifugationssäule von der radioaktiv markierten Sonde getrennt.

Vor der eigentlichen Hybridisierung mit der radioaktiv-markierten Sonde wird die Membran über Nacht in Prähybridisierungs-Lösung bei 65°C äquilibriert und am darauf folgenden Tag mit ungefähr 1 Mio. cpm markierter DNA-Sonde pro ml Hybridisierungslösung bei 65°C für 16 h inkubiert. Nach der Inkubation werden nicht spezifisch gebundene Sonden-Fragmente durch wiederholte Behandlung der Membran mit SSC- und SDS-haltigen Lösungen entfernt. Dies geschah ebenfalls nach Angaben des Herstellers (Amersham GE Healthcare, Freiburg).

Die mit der DNA-Sonde hybridisierte Membran wurde luftblasenfrei in Frischhaltefolie eingeschlagen und in eine Autoradiographiekassette mit Verstärkerfolie (Trimax Regular 16, Imation, Rochester, NY, USA) gelegt. Ein Röntgenfilm (Amersham GE Healthcare, Freiburg) wurde zuoberst auf die Membran gelegt und die Kassette wurde für eine Woche bei -80°C aufbewahrt. Danach wurde der durch die β -Strahlung belichtete Röntgen-Film in Entwickler-Lösung 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 mit Wasser abgespült und schließlich getrocknet. Die für die Herstellung von Entwickler- und Fixier-Lösung notwendigen Chemikalien stammten von der Firma Tetenal (Norderstedt).

<u>20 x SSC</u>	<u>Prähybridisierungs-/Hybridisierungslösung</u>
3 M NaCl	250 ml 20 x SSC
300 mM Na-Citrat	50 ml 100 x Denhardt
	25 ml 20 % SDS
	Hybridisierungslösung:
	+ 1 mg DNA aus Heringssperma /l
<u>Entwicklerlösung</u>	<u>Fixierlösung</u>
25% [v/v] Roentoroll HC	20% [v/v] Superfix Lösung 1
2,5% [v/v] Röntgenentwickler Lösung 1	5% [v/v] Superfix Lösung 2
2,5 % [v/v] Röntgenentwickler Lösung 2	

2.4.14 Denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese und Northern-Blot

Die Auftrennung von RNA (siehe 2.4.11) erfolgte durch eine denaturierende Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese. 20 μ g mit Auftragspuffer (ohne Ethidiumbromid) vermischte RNA wurden auf das 1,5-prozentige Gel aufgetragen. Die Auftrennung geschah bei 1,4 V/cm über Nacht. Als Laufpuffer diente dabei 1 x MOPS-Puffer.

Nach Auftrennung der RNA erfolgte anschließend ein Kapillar-Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran (Hybond XL, Amersham Pharmacia, Braunschweig). Wie beim Southern-Blot wurde dabei 20 x SSC als Transferpuffer verwendet. Durch Erhitzen der Membran bei 80°C für 2 Stunden wurden die Nukleinsäuren kovalent an die Membran gebunden. Daraufhin wurde durch Anfärbung mit 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 der Membran wurde durch Waschen in DEPC-H₂O erreicht. 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 mit immobilisierter mRNA wurden α -³²P-dCTP markierte DNA-Fragmente verwendet. Diese wurden durch PCR mit Hilfe der Oligonukleotide HvS40-UTR for/rev synthetisiert (siehe 2.4.10). Für die radioaktive Markierung wurde das „Deca Label DNA Labeling“ System nach Angaben des Herstellers (MBI Fermentas) verwendet. Freie Nukleotide wurden von der radioaktiv-markierten DNA-Sonde getrennt, indem der Ansatz über eine Sephadex-Säule gegeben wurde.

Vor der Hybridisierung mit der markierten Sonde wurde die Nylonmembran über Nacht bei 65°C in einer Prähybridisierungslösung äquilibriert. Die darauf folgende Hybridisierung mit ca. 750 000 cpm markierter DNA pro ml Hybridisierungslösung wurde ebenfalls bei 65°C über Nacht durchgeführt. Nach der Inkubation wurden nicht spezifisch gebundene Sonden-Fragmente durch wiederholte Behandlung der Membran mit SSC- und SDS-haltigen Lösungen entfernt. Dies geschah nach Angaben des Herstellers (Amersham GE Healthcare, Freiburg). Die Membran wurde daraufhin luftblasenfrei in Frischhaltefolie eingeschlagen und in eine Autoradiographiekassette mit Verstärkerfolie (Trimax Regular 16, Imation, Rochester, NY, USA) gelegt. Ein Röntgenfilm (Amersham GE Healthcare, Freiburg) wurde auf die Membran gelegt und die Kassette für eine Woche bei -80°C aufbewahrt. Danach wurde der durch die β -Strahlung belichtete Röntgen-Film in Entwickler-Lösung 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 mit Wasser abgespült und dann getrocknet. Die für die Herstellung von Entwickler- und Fixier-Lösung notwendigen Chemikalien stammten von der Firma Tetenal (Norderstedt) (siehe 2.4.13).

Formaldehyd-Agarosegel

1,5% [w/v] Agarose
20% [v/v] Formaldehyd
in 1 x MOPS-Puffer

10 x MOPS

400 mM MOPS
100 mM Natriumacetat
10 mM EDTA

Prähybridisierung-/Hybridisierungslösung

5 % [w/v] Dextransulfat
1 % [w/v] SDS
0,75 M NaCl
Hybridisierungslösung:
+ 1 mg DNA aus Heringssperma /l

RNA-Auftragspuffer

40% [v/v] Formamid, deionisiert
20% [v/v] 10 x BPB-Farblösung
in 1 x MOPS-Puffer

Methylenblaulösung

500 mM NaAc/NaOH pH 5,2
0,004 % [w/v] Methylenblau

2.5 Allgemeine proteinbiochemische Analysen

2.5.1 Heterologe Überexpression von *HvS40* in *E.coli* BL21

Die Klonierung der *HvS40*-Sequenz in den Überexpressionsvektor pET14b wurde 2002 von Anke Schäfer durchgeführt. Dieses Konstrukt wurde mittels Hitzeschock in die Bakterienzellen eingebracht (siehe 2.4.2.5). Klone, die die gewünschten Vektoren enthielten, wurden mit entsprechenden Antibiotika selektiert (siehe 2.2, Tabelle 1). Mit Hilfe von Restriktionsenzymen wurde überprüft, ob die aus den Klonen gewonnene Plasmid-DNA die *S40*-Sequenz in gewünschter Orientierung enthielt (siehe 2.4.5). Der so ausgewählte Klon wurde zur Protein-Synthese eingesetzt.

Dazu wurden 250 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angesetzt und mit einer über Nacht angezogenen Vorkultur des rekombinanten Klons beimpft. Die Bakterienzellen wurden bis zu einer optischen Dichte von $0,6_{OD600}$ im Schüttelinkubator angezogen (siehe 2.4.2.2). Durch Zugabe von 1 mM IPTG konnte am T7-Promotor des pET14b-Vektors die erhöhte Expression des heterologen Gens induziert werden. Denn IPTG bindet an das Repressorprotein, welches die Transkription des zu überexprimierenden Gens inhibiert. Die Bakterien wurden nach Zugabe von IPTG bis zu einer optischen Dichte von $1,7_{OD600}$ weiter kultiviert und anschließend durch Zentrifugation von 15 Minuten bei 4°C und 3500 x g (Zentrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg) sedimentiert und bei -20°C gelagert.

2.5.2 Native Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie an Nickel-NTA

Nach Synthese in *E.coli* (siehe 2.5.1) besitzt das rekombinante *HvS40*-Protein am N-Terminus eine Abfolge von sechs Histidinen. Die metallbindenden Eigenschaften von solchen *His-Tags* macht man sich zu Nutze, um Proteine mit Hilfe von Ni-NTA und Imidazol aus Bakterienlysaten zu gewinnen.

Das nach der in 2.5.1 beschriebenen Methode gewonnene Bakteriensediment wurde auf Eis aufgetaut. Zu dem Pellet wurden 10 ml Lysispuffer und Lysozym mit einer Endkonzentration von 1 mg/ml hinzugefügt gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation auf Eis. Es erfolgte eine Zentrifugation für 25 min, 8300 x g (Zentrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg). Der gewonnene klare Überstand wurde abgenommen und vor der Zugabe von 2,4 ml 50%-Ni-NTA wurde ein Aliquot entnommen und eingefroren. Diese Probe diente später zur Kontrolle der erfolgten Fällung (siehe 3.7, Abb. 37). Nach einstündiger Inkubation des Ni-NTA-Lysat-Gemisches bei 4°C auf dem Schüttelinkubator erfolgte die Aufteilung des Lysats à 1,5 ml auf 2 ml-Reaktionsgefäße und eine Zentrifugation bei 14 000 x g für 1 min bei 4°C. Es folgte die fünfmalige Wiederholung eines Waschschrittes, während dem dem Reaktionsgefäß jeweils 1 ml Waschpuffer zugegeben wurde. Abschließend folgte eine Zentrifugation für 2 min bei 14 000 x g.

Die Elution des rekombinanten Proteins erfolgte durch die Erhöhung der Imidazol-Konzentration im Elutionspuffer. Imidazol verdrängt aufgrund seiner hohen Metallaffinität das rekombinante Protein vom Ni-NTA, und das Protein geht daraufhin in Lösung. Für die Elution wurde den gewaschenen Proteinpellets jeweils 200 µl Elutionspuffer hinzugegeben. Nach Zentrifugation (2 min, 14 000 x g, 4°C) enthielt der Überstand das gelöste rekombinante Protein.

<u>Lysis-Puffer</u>	<u>Waschpuffer</u>	<u>Elutionspuffer</u>
50 mM NaH ₂ PO ₄	50 mM NaH ₂ PO ₄	50 mM NaH ₂ PO ₄
300 mM NaCl	300 mM NaCl	300 mM NaCl
10 mM Imidazol	20 mM Imidazol	250 mM Imidazol

2.5.3 Isolierung von Gesamtprotein aus Primärblättern der Gerste

Primärblätter der Gerste, aus denen Proteine extrahiert werden sollten, wurden in flüssigem Stickstoff fein gemörsert. Das pulverisierte Gewebe wurde daraufhin in ein Reaktionsgefäß überführt, welches bis zur 500 μ l-Markierung mit dem Pulver aufgefüllt wurde. Es folgte eine Zugabe von 750 μ l Extraktionspuffer, in dem das Gewebe homogenisiert wurde. Nachdem die Probe für 5 min bei 95°C inkubierte, wurden vorhandene Zelltrümmer durch einen Zentrifugationsschritt von 15 Minuten bei 12000 x g von der Lösung abgetrennt. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und erneut für fünf Minuten bei 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich nun die gelösten Proteine befanden, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

<u>Extraktionspuffer</u>
62,5 mM Tris pH 6,8
10% [v/v] Glycerin
1 % [w/v] SDS
5 % [v/v] β -Mercaptoethanol

2.5.4 Isolierung von Zellkernen aus Gerstenblättern

Die Gewinnung von Zellkernen aus Primärblättern der Gerste erfolgte leicht verändert nach der von Pilartz and Jeske (2003) aufgestellten Methode. Dazu wurden 15 g Blattmaterial mit 100 ml 1 x Homogenisierungspuffer vermengt und im Standmixer auf niedrigster Stufe zerkleinert (3 x 2 sek). Um grobe Gewebereste und größere Zellverbände abzufangen, wurde das zerkleinerte Gewebe daraufhin durch eine Lage Miracloth-Gewebestoff (Merck, Darmstadt) filtriert. Das gewonnene Filtrat wurde auf 50 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt und mit 375 μ l 30% Brij23 versetzt. Es folgte eine Inkubation im Überkopfschüttler für 1 min, bevor eine erneute Zugabe von 375 μ l 30% Brij23 durchgeführt wurde (Endkonzentration Brij23 im Filtrat entsprach 0,45% [v/v]). Abermals wurde das Filtrat für 5 min im Überkopfschüttler inkubiert. Danach erfolgte eine erneute Filtration durch Nylongaze bestehend aus jeweils 2 Lagen mit 80 μ M und 40 μ M Porengröße. Das Filtrat wurde bei 4°C für 30 min bei 620 x g im Ausschwenkrotor zentrifugiert (Zentrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg). Die sedimentierten Zellbestandteile wurden in 20 ml 1 x Gradientenpuffer resuspendiert und daraufhin auf einen Percollgradienten gegeben, der aus drei Prozentstufen bestand (6 ml einer 90%-igen Percolllösung, 8 ml einer 60%-igen Percolllösung und 5 ml einer 30%-igen Percolllösung). Es erfolgte eine Zentrifugation des Gradienten bei 4°C für 30 min bei 1120 x g im Ausschwenkrotor (Zentrifuge 5804 R, Eppendorf). Nach dieser befanden sich die Zellkerne in der Phase zwischen der 60%-igen und der 90%-igen Percollstufe und wurden vorsichtig abgenommen und in ein neues 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 50 ml 1 x Gradientenpuffer wurden die Zellkerne bei 4°C für 30 min bei 1120 x g im Ausschwenkrotor zentrifugiert. Den sedimentierten Zellkernen wurden 40 ml des 1 x Gradi-

entpuffers zugegeben und über eine letzte Zentrifugation gereinigt (4°C für 30 min bei 620 x g im Ausschwenkrotor). Die Zellkerne wurden schließlich in 50 μ l 1 x Gradientenpuffer, der kein β -Mercaptoethanol enthielt, aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

<u>1 x Homogenisierungspuffer</u>	<u>10 x Gradientenpuffer (GP)</u>
1 M Hexylenglykol-(2-Methyl-2,4-Pentandiol)	5 M Hexylenglykol-(2-Methyl-2,4-Pentandiol)
10 mM MOPS	0,1 M MOPS
10 mM MgCl ₂ x6H ₂ O	0,1 M MgCl ₂ x6H ₂ O
0,01% PVP [w/v]	3% Brij23 [v/v]
5 mM β -Mercaptoethanol	50 mM β -Mercaptoethanol
pH-Wert 7,0	pH-Wert 7,0

Percollstufe	Percoll	10 x GP-Puffer	dH ₂ O
30%	7,5 ml	2,5 ml	15 ml
60%	15 ml	2,5 ml	7,5 ml
90%	22,5 ml	2,5 ml	0 ml

2.5.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinen erfolgte nach der von Bradford (1976) beschriebenen Methode. Nach dieser werden 2 μ l , 5 μ l , 10 μ l und 15 μ l der Proteinlösung mit 200 μ l Bradford-Reagenz vermischt (BioRad, München), auf 800 μ l mit dH₂O aufgefüllt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgt die photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 595 nm (Spektralphotometer UV-2501 PC, Shimadzu, Kyoto, Japan). Auf die gleiche Weise wird eine BSA-Verdünnungsreihe erstellt und ausgewertet, deren ermittelte Standardkurve dann zur Berechnung der Proteinkonzentration herangezogen werden kann.

2.5.6 Isolierung von Chloroplasten aus Primärblättern der Gerste

Die Gewinnung von Chloroplasten aus Primärblättern der Gerste erfolgte nach Gruissem *et al.* (1986). Bei dieser Methode werden 40 g Blattmaterial mit 200 ml GM-Puffer vermengt und im Mixer zerkleinert (1 x 4 sek langsame Stufe, 3 x 2 sek schnelle Stufe). Danach können größere Zellbestandteile über eine Filtration durch vier Lagen Miracloth-Gewebestoff (Merck, Darmstadt) abgetrennt werden. Es erfolgt eine Zentrifugation des Filtrates bei 3500 x g für zwei Minuten bei 4°C (Centricon T-124, Kontron Instruments, Rossdorf). Der Überstand wird verworfen und die sedimentierten Zellbestandteile werden mit Hilfe eines kleinen Pinsels in einem kleinem Volumen GM-Puffer wieder resuspendiert.

<u>1 x GM-Puffer</u>
0,33 M Sorbitol
0,05 M HEPES
2,55 mM EDTA
0,2 mM MgCl ₂ x 6H ₂ O
0,2 mM MnCl ₂ x 2H ₂ O
1,68 mM Natriumpyrophosphat
1 M DTT

Zur Chlorophyllbestimmung wurden zu zwei μl der gewonnenen Plastidensuspension zwei ml 80%-iges Aceton hinzugefügt und für eine Minute bei 14000 x g kurz zentrifugiert (Zentrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde in eine Glasküvette überführt und im Spektralphotometer (UV-2501 PC, Shimadzu, Kyoto, Japan) erfolgte die photometrische Analyse über drei verschiedene Wellenlängen. Die Chlorophyll-Konzentration ergab sich dabei aus der Verrechnung der optischen Dichten, die bei der jeweiligen Wellenlänge erhalten wurden:

$$7,15 \times (\text{OD}_{663,2} - \text{OD}_{750}) + 18,71 \times (\text{OD}_{646,8} - \text{OD}_{750}) = \mu\text{g Chlorophyll/ml}$$

2.5.7 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen

Die denaturierende Auftrennung von Proteinen in einem SDS-Polyacrylamidgel erfolgte nach Laemmli (1970). Dazu wurden Trenngele verwendet, die einen Acrylamid-Anteil von 14 % aufwiesen [w/v]. Diese Gele besaßen im oberen Bereich einen Sammelgelabschnitt mit einem Acrylamid-Anteil von 5 % [w/v].

Die Proteine werden mit 20 μl 2 x PSB versetzt und vor dem Auftragen für 10 min bei 95°C erhitzt. Die Auftrennung erfolgt entweder über Nacht bei 4°C und 5-10 mA oder bei Raumtemperatur und 30-45 mA. Dabei fanden selbst hergestellte Midigele mit einer Größe von 120 x 75 x 1 mm Verwendung. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde als Marker entweder der *Prestained-Protein-Ladder* (10-180 kDa, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) oder der Protein Marker P7702 (6,5-212 kDa, New England BioLabs, Ipswich, USA) herangezogen.

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 Laemmlipuffer

250 mM Tris/HCl pH 6,8
1,9 M Glycin
1% [w/v] SDS

Stammlösung	Sammelgel	Trenngel
30% Acrylamid	1,1 ml	7 ml
dH ₂ O	4,6 ml	2,2 ml
1 M Tris pH 6,8	2 ml	-
1 M Tris pH 8,8	-	5,7 ml
20% SDS [w/v]	38 μl	75 μl
10% APS [w/v]	75 μl	75 μl
TEMED	12 μl	8 μl

2.5.8 Färbung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen

Gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine können durch den Farbstoff Coomassie Brilliantblau angefärbt werden. Die Gele wurden dafür in der Färbelösung für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde das Proteingel in Entfärberlösung, die sich nur aus Isopropanol und Essigsäure zusammensetzt, so lange inkubiert, bis sich der Hintergrund entfärbte.

Coomassie-Färbelösung

5% [v/v] Isopropanol

10% [v/v] Essigsäure

0,1% [w/v] Coomassie Brilliantblau R250

2.5.9 Protein-Blot Analysen (Western-Blot)

Die nach Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine (siehe 2.5.7) wurden auf eine Nitrocellulosemembran (Roti NC, Porengröße 0,2 μm , Roth, Karlsruhe) übertragen. Dafür wurden sechs Whatman-Filterpapiere (Schleicher und Schuell, Dassel) sowie die Membran auf die Größe des Gels zurecht geschnitten. Die Filterpapiere, die Membran und das Gel wurden vor dem Blot für 10 min in Transferpuffer äquilibriert. Nacheinander wurden auf die Anode der Blotapparatur (Fastblot B44, Biometra, Göttingen) zuerst drei Lagen Filterpapier, dann die Nitrocellulose-Membran, das Polyacrylamidgel mit den aufgetrennten Proteinen und abschließend noch einmal drei Lagen Filterpapier geschichtet. Für den elektrischen Proteintransfer wurde für 70 Minuten eine Stromstärke von 0,8 mA/cm² Gel angelegt. Der Transfer wurde bei einer Temperatur von 4°C durchgeführt.

Um einen erfolgreichen Transfer der Proteine zu überprüfen, wurde die Membran nach nach Immobilisierung der Proteine kurz in TBS-Puffer geschwenkt und mit Ponceau-Lösung angefärbt. Die Höhe der Markerbanden wurde mit einem Bleistift nachgezogen und so auf der Membran gekennzeichnet. Die Membran wurde mit dH₂O wieder entfärbt.

Vor der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurde zur Blockierung unspezifischer Bindestellen die Membran für eine h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit Blockierlösung inkubiert (siehe Tab. 7). Danach erfolgten drei Waschschritte, während denen die Membran in 1 x TBST geschwenkt wurde (2 x kurz, 1 x 15 min). Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, der gegen das gesuchte Protein gerichtet ist (siehe Tab. 7). Die Membran wurde danach erneut in TBST geschwenkt (2 x kurz, 1 x 15 min). Der Nachweis des ersten Antikörpers und somit des zu untersuchenden Proteins erfolgte nach einstündiger Inkubation mit dem Sekundärantikörper, an den eine Peroxidase gebunden ist (siehe Tab. 7). Danach wurde die Membran mit 1 x TBST gewaschen (2 x kurz, 1 x 30 min).

Anschließend erfolgte der Nachweis des Protein-Antikörper-Komplexes mit Hilfe der Lumino-gen TMTMA-6-Lösungen (Amersham GE Healthcare, UK) nach Angaben des Herstellers. Die Membran, auf der die Detektionslösung gleichmäßig verteilt wurde, wurde luftblasenfrei in eine Folie gelegt und die Peroxidaseaktivität in einer ECL-Kassette durch Auflegen eines Films (HyperfilmTMECL *High performance chemiluminescence film*, Amersham Bio Sciences, Buckinghamshire, England) detektiert. Der Film wurde unter Rotlicht in Entwicklerlösung inkubiert, bis deutlich erkennbare Banden erschienen. Daraufhin wurde der Film kurz in Leitungswasser geschwenkt und dann für 10 bis 20 min fixiert. Anschließend wurde der Film für 20 min

gewässert, mit destilliertem Wasser abgespült und getrocknet. Die Lösungen zur Herstellung der Entwickler- und Fixierlösung stammten von der Firma Tetenal (Norderstedt).

<u>Transferpuffer</u>	<u>10 x TBS(T)</u>
2,93 g Glycin	12,1 g/l Tris
5,81 g Tris	87,66 g/l
0,375 g SDS	(5 g/l Tween 20)
200 ml Methanol	
auf 500 ml mit dH ₂ O auffüllen	

<u>Ponceau-Färbelösung</u>
0,2% [w/v] Ponceau S
3 % [v/v] Trichloressigsäure

<u>Entwicklerlösung</u>	<u>Fixierlösung</u>
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 (7) Auflistung der verwendeten Antikörper sowie der dazugehörigen Blockierungs-, Wasch- und Sekundärantikörperlösungen. Der Sekundär-Antikörper *Goat anti-Rabbit IgG (H&L), Horseradish Peroxidase conjugated* wurde von der Firma Agrisera bezogen (Vännäs, Schweden).

Lösung zur Blockierung	verwendeter Primärantikörper	Waschen der Membran in	verwendeter Sekundärantikörper
2% BSA in 1 x TBST	Anti-HvS40: Antikörper, gerichtet gegen das in <i>E.coli</i> überexprimierte HvS40- Protein. Verd.: 1:1000, Über Nacht bei 4°C	1 x TBST	Anti-Kaninchen (Anti-rabbit IgG, Agrisera) 1:100000 in 1 xTBST / 2% Milchpulver
4% Milchpulver in 1 x TBST	Anti-AltHvS40: Peptidantikörper, gerichtet gegen Peptidsequenz des Alternativen S40-Proteins. Verd.: 1: 1000, über Nacht bei 4°C	1 x TBST	Anti-Kaninchen (Anti-rabbit IgG, Agrisera) 1:100000 in 1 xTBST / 2% Milchpulver

2.5.10 Entfernen von gebundenen Antikörpern von der Proteinblot-Membran

Sollte die verwendete Membran für weitere Analysen mit Antikörpern verwendet werden, müssen die gebundenen Antikörper sowie die Detektionslösung von der Membran gelöst werden. Zu diesem Zweck wurde sie für 3 min in einer Waschlösung geschwenkt, die aus 0,4 M NaOH mit 0,1% [w/v] SDS bestand.

2.6 Transiente Transformation von pflanzlichen Geweben

2.6.1 Biolistische Transformation von Zwiebelepidermiszellen

Für eine erfolgreiche transiente Transformation von Zwiebelepidermiszellen mit der biolistischen Methode (*Particle Gun*) ist es notwendig, möglichst frische Zwiebeln (*Allium fistulosum*) zu verwenden. Die Frühlingszwiebeln wurden daher immer frisch auf dem lokalen Markt erworben, dies garantierte eine hohe Vitalität der zu transformierenden Zellen. Die Zwiebelzellen wurden durch einfaches Abziehen der Epidermis gewonnen. Zur Transformation wurde die biolistische Anlage von BioRad (Modell PDS-1000/He, München) verwendet.

Im ersten Schritt wurde die Plasmid-DNA an die Oberfläche von Goldmikropartikeln gebunden, die einen Durchmesser von 1,5 - 3 μm besaßen. Dazu wurden zu 50 μl der Goldlösung (40 mg Gold/ ml) in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß 5 μg Plasmid- DNA gegeben und mit 50 μl 2,5 M CaCl_2 und 20 μl 0,1 M Spermidin vermischt. Sollte eine gleichzeitige Transformation der Zellen mit zwei unterschiedlichen Konstrukten stattfinden, so wurden pro Konstrukt 5 μg eingesetzt. Es folgte eine gründliche Mischung der Lösung für 1 - 2 min mit Hilfe des Vortex-Gerätes, um die Goldpartikel wieder zu dispergieren. Die Verteilung der Goldpartikel durch Vortexen ist zudem für eine gleichmäßige Bedeckung der Goldpartikel mit Plasmid-DNA notwendig. Es folgte eine Zentrifugation für 30 sek bei 2300 x g bei RT (Zentrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment in 250 μl 100% Ethanol resuspendiert. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt und das letztlich gewonnene Sediment wurde in 50 μl 100% Ethanol aufgenommen und für die transiente Transformation eingesetzt.

Der sedimentierte Goldpartikelansatz wurde auf fünf Makroträger verteilt (10 μl Goldpartikellösung pro Träger). Unter der Sterilbank wurde der Träger solange aufbewahrt, bis das in der Goldpartikellösung enthaltene Ethanol vollständig verflüchtigt war. Der Träger wurde daraufhin in der biolistischen Anlage auf der obersten Ebene eingesetzt. Die Zwiebelepidermiszellen, die auf MS-Platten gebettet waren, befanden sich zwei Stufen unter dem Makroträger. Der Beschuss der Zwiebelepidermiszellen erfolgte mit einem Heliumdruck von 1100 psi. Nach dem Beschuss wurden die Zwiebelzellen für 24 h im Dunkeln bei einer Temperatur von 26°C inkubiert.

Die Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgte entweder an einem Epifluoreszenz-Mikroskop (Zeiss, Jena) oder mit Hilfe eines Konfokalen Laser-Raster-Mikroskops (siehe 2.7).

Goldlösung

40 mg Goldpartikel in 100% Ethanol

MS Platten

4,4 g/l Murashige-Skoog-Medium (M0245, Duchefa)
1,5% (w/v) Phytoagar
pH 5,8

2.6.2 Transiente Transformation von Gerstenprotoplasten

2.6.2.1 Protoplastierung von Gerstenblättern Gerstenpflanzen des Kultivars *Golden Promise* wurden für 7 Tage (nicht-seneszentes Blattmaterial) oder für 21 Tage (seneszendes Blattmaterial) auf Einheitserde in der Klimakammer angezogen (siehe 2.3.1). Den Primärblättern wurde mit Hilfe einer Rasierklinge die untere Epidermisschicht abgezogen, um das darunter befindliche Mesophyllgewebe freizulegen. Die so präparierten Gerstenprimärblätter wurden mit der unteren Blattseite auf eine Lösung gelegt, die Enzyme zum Abbau der pflanzlichen Zellwand enthielt (Cellulasen, Hemi-Cellulasen, Pektinasen). Es erfolgte eine einstündige Inkubation in Dunkelheit bei Raumtemperatur. Danach wurden die Blätter vorsichtig geschwenkt und mit Hilfe eines Laborspatels wurden Protoplasten gelöst, die sich noch im Gewebeverband befanden. Bei allen nun im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritten wurde nur mit abgeschnittenen 5 ml Pipettenspitzen gearbeitet, um vorhandene Scherkräfte so gering wie möglich zu halten. Die Lösung mit den gewonnenen Protoplasten wurde über eine Nylongaze mit einer Porengröße von $80\mu\text{m}$ filtriert und in einem 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Das Filtrat wurde im Ausschwing-Rotor für 5 min bei $63 \times g$ unter Verwendung der niedrigsten Beschleunigungs- und Abbremsstufen zentrifugiert (Zentrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg). Daraufhin wurde der Überstand vorsichtig abgenommen. Unter die sedimentierten Protoplasten wurden nun 10 ml Aufschwimmpuffer so pipettiert, dass sich das Sediment langsam vom Gefäßboden ablöste. Über die aufschwimmenden Protoplasten wurden nun noch 5 ml W5-Lösung pipettiert. Es erfolgte eine Zentrifugation im Ausschwing-Rotor für 10 min bei $80 \times g$ bei niedriger Beschleunigungs- und Abbremsgeschwindigkeit (Zentrifuge 5804 R, Eppendorf). Durch diesen Zentrifugationsschritt ließen sich intakte von defekten Protoplasten trennen: die intakten Zellen befanden sich zwischen der W5- und der Aufschwimmlösung, während die defekten Protoplasten nach der Zentrifugation sedimentiert vorlagen.

Die intakten Protoplasten wurden vorsichtig abgenommen und in frische W5-Lösung überführt (2-5 ml W5-Lösung, je nach Dichte der Protoplasten). Die Konzentration der gelösten Protoplasten wurde mikroskopisch mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ermittelt.

2 x Stammlösung

1 M Sorbit
 0,001 M KH_2PO_4
 0,002 M KNO_3
 0,002 M $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
 0,002 M $\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O} \text{ } 2\text{Na}^+$
 0,05% BSA
 pH 5,7

W5-Lösung

0,154 M NaCl
 0,125 M CaCl_2
 0,005 M KCl
 0,005 M Glukose
 pH 5,8

Enzymlösung

1 % [w/v] Cellulase R10
 0,3% [w/v] Mazerozym R10
 20 mM Succinat
 in 1 x Stammlösung

Aufschwimm-Puffer

0,001 M CaCl_2
 0,001 M Saccharose
 0,1 M Sorbit
 0,025 M MES
 pH 5,8

2.6.2.2 Transformation von Gerstenprotoplasten mit PEG Die transiente Transformation von Protoplasten, die aus Blattgewebe der Gerste gewonnen wurden, erfolgte mit Hilfe von Polyethylenglykol 1500 (PEG 1500). Der Polyether PEG wirkt perforierend auf die pflanzliche Zellmembran. Durch die zusätzliche Anwesenheit von CaCl_2 -Ionen wird die Aufnahmefähigkeit für freie DNA erhöht, die dann in die Chromosomen der Protoplasten eingebaut wird.

Für die Transformation wurde eine Menge von 4 Mio. Protoplasten (siehe 2.6.2.1) in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 70 x g zentrifugiert (Zentrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Protoplasten wurden in 500 μl 1 x MaMg-Lösung aufgenommen. Zu den Protoplasten wurden 20-50 μg Plasmid-DNA und 500 μl PEG-Lösung gegeben. Alles wurde vorsichtig, aber sorgfältig vermischt. Die PEG-vermittelte Transformation erfolgte bei Raumtemperatur für 20-30 min im Dunkeln, während der die Lösung immer wieder vorsichtig geschwenkt wurde.

Nach der Inkubation wurden die Protoplasten nacheinander mit 1 ml und 2 x 2 ml W5-Lösung versetzt und daraufhin für 10 min bei 70 x g im Ausschwing-Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Protoplasten wurden in dem Volumen W5-Lösung aufgenommen, bei dem sie eine Konzentration von 4 Mio. Protoplasten pro ml besaßen. Die transformierten Protoplasten wurden über Nacht bei 22°C im Dunkeln inkubiert. Am Tag darauf folgte die Auswertung am Konfokalen-Laser-Raster Mikroskop (siehe 2.7).

<u>2x MaMg-Lösung</u>	<u>PEG-Lösung</u>
0,8 M Mannitol	40% [w/v] PEG 1500
0,03 M $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	in 1 x MaMg-Lösung
0,2% [w/v] MES	pH 5,6 - 7,0
pH 6,5	

2.6.2.3 Behandlung von Gerstenprotoplasten mit Abscisinsäure Zur Behandlung von Gerstenprotoplasten mit Abscisinsäure wurden zwei Ansätze verfolgt:

Ansatz 1: Zuvor aus 7 d alten Gerstenpflanzen isolierte Protoplasten (siehe 2.6.2.1) wurden mit dem Fusionskonstrukt *Alt-HvS40:GFP* (Vektor: pBatTL-BG, siehe 2.4.4.2) transient transformiert. Nach durchgeführter PEG-Inkubation und Aufnahme der Protoplasten in frischer W5-Lösung, wurde den Protoplasten 20 μM Abscisinsäure zugefügt. Die Inkubation erfolgte für 16 h wie in 2.6.2.2 beschrieben.

Ansatz 2: Sieben Tage alten Primärblättern des Wildtyps, angezogen auf Erde unter Dauerlicht, wurden die Blattbasis und die Blattspitze abgeschnitten. Dies geschah in Leitungswasser, damit keine Luft in die Leitungsbahnen der Blätter gelangte. Die so präparierten Blätter wurden in eine mit Parafilm abgedichtete Petrischale überführt, die eine 20 μM ABA-Lösung enthielt (siehe Tab. 2). Als Kontrolle wurden auf die gleiche Weise präparierte Primärblätter in Petrischalen mit Leitungswasser überführt. Die Inkubation erfolgte im Dauerlicht, um eine permanente Öffnung der Schließzellen zu erreichen. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Primärblätter an Basis und Spitze wiederum um 0,5 cm gekürzt. Aus den mit ABA behandelten Primärblättern und den in Leitungswasser inkubierten Blättern wurden nun Protoplasten gewonnen (siehe 2.6.2.1) und mit den Fusionskonstrukten *HvS40+1:GFP* und *HvS40+3:GFP* mit Hilfe von PEG 1500 transient transformiert (siehe 2.6.2.2). Die Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgte am konfokalen

Laser-Raster Mikroskop (siehe 2.7).

2.7 Konfokale Laser-Raster Mikroskopie (CLSM)

Die Fluoreszenzsignale der transient transformierten Zwiebelepidermiszellen (siehe 2.6.1, 2.6.2) sowie der transformierten Protoplasten wurden mit der konfokalen Laser-Raster Mikroskopie ausgewertet (CLS Mikroskop TCS SP5, Leica, Wetzlar). Diese zeichnet sich gegenüber der konventionellen Epifluoreszenzmikroskopie durch eine erhöhte optische Schärfe aus. Diese mikroskopische Methode bietet die Möglichkeit, optische Schnitte mit definiertem Abstand durch ein Präparat zu legen (z.B. x-y- Ebenen, bei einer Tiefenschärfe von 0,5 μm). Die Erstellung dieser optischen Serienschnitte, sogenannter *stacks*, ermöglicht die dreidimensionale Rekonstruktion aus einem zweidimensionalen Datensatz. Als Lichtquelle wird ein Argon-Laser verwendet, über dessen linienförmiges Spektrum eine spezifisch benötigte Anregungswellenlänge besser definiert werden kann. Im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie, in der das Objektfeld als ganzes ausgeleuchtet wird, wird bei der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie durch Einbringen einer Illuminationslochblende nur ein scheibenförmiger Objektbereich beleuchtet und das Objektfeld Punkt für Punkt und Zeile für Zeile mit dem Laser abgetastet. Dies führt zu weniger Streulicht aus benachbarten Objektbereichen und erhöht somit die Schärfe und den Kontrast des resultierenden Bildes. Das Einbringen einer zweiten Lochblende, die in dieselbe Objektebene fokussiert wie die beleuchtende Optik (Prinzip der Konfokalität), bewirkt, dass das Licht aus tieferen und höheren Objektebenen als der Fokusebene nicht zur CCD-Kamera gelangt. Dies führt zu einer erheblichen Erhöhung der Bildschärfe durch Reduktion des sogenannten *out of focus blur* (Streulicht aus Ebenen, die nicht im Fokus liegen) und ist die Voraussetzung für die Erstellung von optischen Serienschnitten durch ein Präparat. Des Weiteren stehen mindestens zwei Kanäle zur Verfügung, so dass zwei Fluoreszenzsignale im selben Präparat simultan gescannt und anschließend digital zu einem Bild rekonstruiert werden können. So können GFP und RFP bzw. das Chlorophyll der Chloroplasten in einer Zelle simultan angeregt werden.

<u>Anregung von</u>	<u>Absorption bei λ</u>	<u>Emission bei λ</u>
GFP	488 nm	500 - 556 nm
RFP	543 nm	555 - 624 nm
Chlorophyll	488 nm	650 - 730 nm

2.8 Verwendete Programme, Datenbanken und Internetseiten

- Serial Cloner

Programm zur Erstellung von Vektorkarten und zur Analyse von Vektorsequenzen

- Geneious

Programm, das der Erstellung von DNA- und Protein-Alignments sowie der Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen dient

- ImagingWin

Software der Firma Walz (Effeltrich) zur Auswertung von Chlorophyll-Fluoreszenzdaten

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Seite des *National Center for Biotechnology Information* der USA

<http://www.cerealsdb.uk.net/cerealgenomics>

Studie über das Weizen genom, Universität Bristol, UK

<http://www.bioinformatics.org/SMS>

Analyse von DNA-Sequenzen und Proteinen

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

The European Bioinformatics Institute

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

Sequenzvergleiche von Nukleinsäuren und Proteinen

http://web.expasy.org/compute_pi

Berechnung des Molekulargewichts und des isoelektrischen Punktes von Proteinen

<http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus>

Vorhersage zu NLS-Motiven in Proteinen

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

Vorhersage zu NES-Motiven in Proteinen

<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/pepfind>

Vorhersage zu PEST-Motiven in Proteinen

http://www.geneinfinity.org/sp/sp_proteinptmodifs

Vorhersagen zu posttranslationalen Modifikationen von Proteinen

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

Vorhersagen zur Phosphorylierung von Proteinen

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

Vorhersagen zur Sumoysierung von Proteinen

<http://www.softberry.com/berry>

Vorhersagen zu Exon-Intron-DNA-Abschnitten

<http://psort.hgc.jp/form.html>

Vorhersagen zur subzellulären Lokalisation von Proteinen

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

Vorhersagen zur subzellulären Lokalisation von Proteinen

<http://iprort.hgc.jp/predict.cgi>

Vorhersagen zur subzellulären Lokalisation von Proteinen

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

Vorhersagen zur subzellulären Lokalisation von Proteinen

<http://frodo.wi.mit.edu/>

Primer 3: Erstellung und Überprüfung von Oligonukleotid-Sequenzen

<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE>

Datenbank zur Identifizierung von *cis*-Elementen in Pflanzen

3 | Ergebnisse

3.1 Sequenzanalyse des *HvS40*-Promotors

Während der Seneszenz kommt es zu einem Zusammenspiel vieler abiotischer und biotischer Faktoren, die die seneszenz-spezifische Genexpression und somit den Verlauf der Seneszenz regulieren. Um mehr über die Faktoren zu erfahren, die die *S40*-Genexpression regulieren, wurde eine Sequenzanalyse des Promotors unter Zuhilfenahme der Datenbank PLACE durchgeführt. Des Weiteren wurde der Promotor auf *cis*-regulatorische Elemente hin untersucht, die erst kürzlich beschrieben wurden und nicht in der Datenbank verfügbar waren. Dadurch ließen sich mögliche Bindestellen für diverse Transkriptionsfaktoren identifizieren, die sich in mehrere Kategorien einteilen lassen.

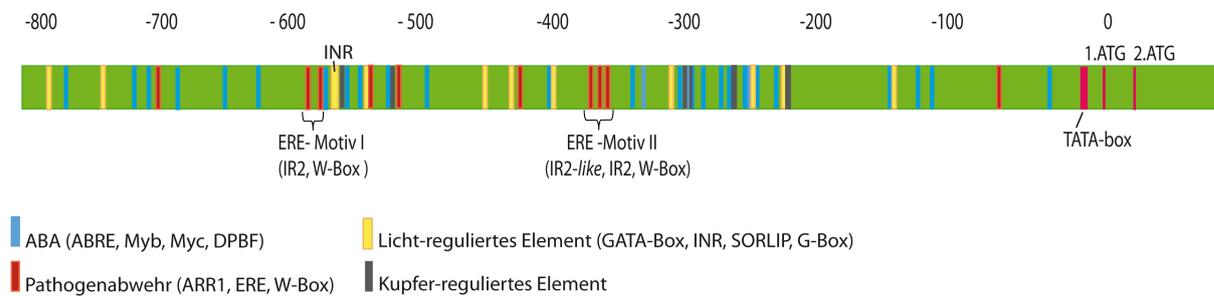


Abbildung (5) Schematische Darstellung möglicher *cis*-Elemente in der Promotorsequenz von *HvS40*. Ein 840 bp großer vor dem Transkriptionsstartpunkt gelegener Bereich wurde mit Hilfe der PLACE Datenbank auf bekannte *cis*-Elemente hin analysiert (Higo et al.1999). Auch sind Promotor-Elemente in der Analyse berücksichtigt worden, die erst nach dem Jahr 2007 beschrieben wurden. Die Positionen, an denen durch ABA, Licht sowie durch Kupfer regulierte Transkriptionsfaktoren binden können, sind angegeben. Auch die Positionen von *Elicitor Response* - Elementen (ERE) sind gezeigt. An diese binden Transkriptionsfaktoren, die die Genexpression während der Pathogen-Abwehr regulieren. W-Box= Bindestelle der WRKY-Transkriptionsfaktoren. IR= *Inverted Repeat*.

3.1.1 *cis*-Elemente, an die WHIRLY1 bindet

Ein 840bp-großer, vor dem ersten Translations-Startpunkt gelegener Bereich wurde als Promotor-Region beschrieben. Für das WHIRLY1-Protein konnte bereits experimentell eine Bindung an diesen Bereich nachgewiesen werden (Dähnhardt, 2003; Kilbienski, 2007; Krupinska *et al.*, 2014a). WHIRLY1 bindet dabei an Promotor-Elemente, die in der Kartoffel als *Elicitor Response* Elemente (ERE) beschrieben worden sind (Eulgem *et al.*, 2000; Desveaux *et al.*, 2000). Es gibt derer zwei im *S40*-Promotor: das erste Motiv (-613 bis -631 bp) besteht aus einer IR2-Box und einer W-Box, während das zweite Motiv (-401 bis -420 bp) aus einer IR1-ähnlichen, einer IR2-Box und einer W-Box besteht (Abb. 5) (Krupinska *et al.*, 2014a). WHIRLY1 bindet während der Wachstumsphase an das Motiv II, während es während der Seneszenz an das Motiv I bindet. Es könnte in beiden Entwicklungsabschnitten eine wichtige regulierende Funktion innehaben (Dähnhardt, 2003; Kilbienski, 2007; Krupinska *et al.*, 2014a). Erste Hinweise darauf liefern Gerstenpflanzen, in denen *WHIRLY1* durch einen RNAi-Effekt vermindert exprimiert wird (Grabowski, 2008). Nicht-seneszierende, 7 d alte Primärblätter dieser Linien wiesen eine höhere relative *S40*-Transkriptmenge auf als Primärblätter des Wildtyps (Abb. 6). Das bedeutet, dass WHIRLY1 ein negativer Regulator der *S40*-Genexpression ist.

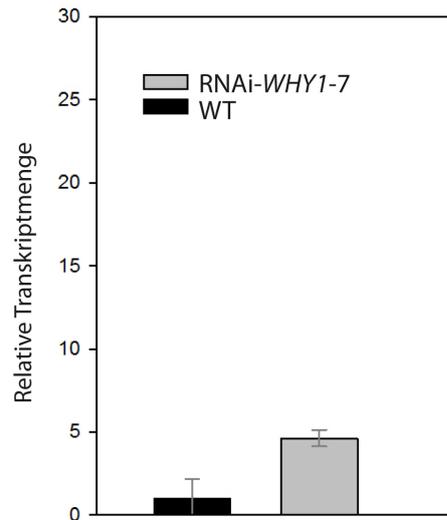


Abbildung (6) Relative Transkriptmenge von *HvS40* in nicht-seneszenten Primärblättern des Wildtyps und der RNAi-*WHY1-7* Linie.

3.1.2 *cis*-Elemente der seneszenzspezifischen Genexpression

Globale Genexpressionsstudien sowohl während der natürlichen als auch der stressinduzierten Seneszenz zeigten, dass der Übergang vom reifen zum seneszierenden Blatt einhergeht mit einer stark veränderten Genexpression (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Breeze *et al.*, 2011; Guo and Gan, 2012). Dabei wurden ca. 100 Transkriptionsfaktoren identifiziert, die eine verstärkte Expression während der Blattseneszenz zeigen. Diese gehören zu 20 verschiedenen Familien von Transkriptionsfaktoren, insbesondere zu WRKY-, NAC-, MYB-, C2H2-Zink-Finger- und AP2-EREBP-Proteinen (Guo *et al.*, 2004; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Balazadeh *et al.*, 2008). Sowohl WRKY- als auch NAC- und MYB-Bindestellen lassen sich auf dem Promotor von *S40* identifizieren (Abb. 5, Tab. 8). Ebenfalls auf dem *S40*-Promotor zu finden sind drei GTCC-Boxen, die als Bindestellen von C2H2-Zink-Finger Transkriptionsfaktoren beschrieben sind (Balazadeh *et al.*, 2008), (Tab. 8). Auch ließen sich Bindestellen für AP2-EREBP-Proteine charakterisieren. Die Gene dieser großen Transkriptionsfaktoren-Familie werden verstärkt während der Seneszenz exprimiert. Phytohormone wie JA, SA und Ethylen induzieren dabei häufig die Expression der *AP2-EREBP*-Gene (Breeze *et al.*, 2011).

Der SR1-Transkriptionsfaktor ist ein negativer Regulator der Ethylen-induzierten Seneszenz (Nie *et al.*, 2012). Für den *AUXIN RESPONSE FACTOR 2* konnte gezeigt werden, dass er ein positiver Regulator der Blattseneszenz ist. Mutanten mit verminderter *ARF2*-Expression zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine verzögert einsetzende Blatt-Seneszenz (Lim *et al.*, 2010). Der *HvS40*-Promotor besitzt also eine Vielzahl an regulatorischen *cis*-Elementen, die für eine spezifische und hochkontrollierte Expression dieses Gens während der Seneszenz sprechen (Abb. 5, Tab. 8).

3.1.3 *cis*-Elemente der ABA-Signalwirkung

Viele der durch die PLACE-Analyse identifizierten *cis*-Elemente des *S40*-Promotors sind involviert in die Signalwirkung der Abscisinsäure (ABA). Zu ihnen gehören das ABA-regulierte Element (ABRE), MYB- und MYC-Boxen und DPBF-*Core*-Bindestellen für den bZIP-Transkriptionsfaktor

ABI5 (Abb. 5, Tab. 8). ABRE ist ein *cis*-Element, das für die spezifische Genexpression in Folge von Dehydration und hohen Salzgehalten wichtig ist (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006) und an das Transkriptionsfaktoren der Familie ABF binden (Kang *et al.*, 2002). Myb- und Myc-Transkriptionsfaktoren regulieren die Zellantwort auf Trocken- und Kältestress (Abe *et al.*, 2003). Von *abi5*-Mutanten konnte gezeigt werden, dass sie gegenüber ABA insensitiv sind (Lopez-Molina, 2000). Insgesamt ließen sich auf dem *S40*-Promotor 32 durch ABA regulierte *cis*-Elemente vorhersagen (Abb. 5, Tab. 8).

3.1.4 *cis*-Elemente der Licht-Signalwirkung

Zu den *cis*-Elementen von *S40*, die in die Signaltransduktion des Lichtes involviert sind, gehören die GATA-Box, SORLIP1 und die G-Box (Abb. 5, Tab. 8).

Von GATA –Elementen konnte gezeigt werden, dass sie in der lichtabhängigen Regulation von *RBCS*-, *CAB*- und *GAP*-Genen eine wichtige Rolle spielen (Reyes *et al.*, 2004). SORLIP1-Elemente sind durch Phytochrom A reguliert (Hudson and Quail, 2003).

Bei der G-Box handelt es sich um ein lichtreguliertes Element, das in den Promotoren der *CHS-1* und *RBCS*-Gene identifiziert wurde und das in vielen lichtinduzierbaren Promotoren konserviert ist (Terzaghi and Cashmore, 1995). Auch das INR-Element wird durch Lichtsignale reguliert und ersetzt die TATA-Box in den Promotoren, in denen diese fehlt. So wird die lichtabhängige Transkription des kernkodierten *PsaD*-Gens durch dieses Element induziert (Burke and Kadonaga, 1996; Nakamura *et al.*, 2002). 22 *cis*-Elemente ließen sich identifizieren, die eine Rolle in der lichtabhängigen Genexpression des *HvS40*-Gens spielen könnten (Abb.5, Tab. 8).

3.1.5 *cis*-Elemente der Pathogen- und Stressantwort

Wie eingangs erwähnt, besitzt der *HvS40*-Promotor mehrere W-Boxen, die in den geformten Palindromen dem *Elicitor Response*-Element (ERE) des *PR-10*-Gens entsprechen (Desveaux *et al.*, 2000; Eulgem *et al.*, 2000). An W-Boxen binden Transkriptionsfaktoren der WRKY-Familie, die diverse physiologische Abläufe wie die Pathogen-Abwehr, die Seneszenz und die Bildung von Trichomen regulieren (Eulgem *et al.*, 2000).

Hitzeschock-Elemente (HSE) kommen in den Promotoren von Hitzeschock-Genen vor, deren Transkription durch das Auftreten suboptimaler Temperaturen, aber auch durch andere Arten von abiotischem Stress induziert wird. Die HSE des *S40*-Promotors ähneln solchen, die im Promotor des *HSP90*-Gens von *A.thaliana* identifiziert wurden. Dieses Gen reagiert auch auf die exogene Applikation von ABA mit einer erhöhten Expression (Haralampidis *et al.*, 2002).

Das CuRE Element wird durch Kupfer reguliert und aktiviert sowohl unter Kupfer- als auch Sauerstoffmangel die Genexpression (Quinn *et al.*, 2002). Die CGCG-Box ist die Bindestelle der SR1-6 Transkriptionsfaktoren, die Calcium binden. Sie sind involviert in die Regulation vieler Stress-induzierter Gene (Yang and Poovaiah, 2002). 31 *cis*-Elemente des *S40*-Promotors könnten eine Rolle bei der Regulation der stressinduzierten Genexpression des *HvS40*-Gens übernehmen (Abb.5, Tab. 8).

3.1.6 *cis*-Elemente der organ-, gewebe- und entwicklungsspezifischen Expression

Im *S40*-Promotor konnten zudem folgende Motive identifiziert werden: ARR1, CAAT, MEM1, DOF, E-Box, GTGA, POLLEN1-ELAT und RHE/NAC. All diese Motive sind involviert in die organ-, gewebe- und entwicklungsspezifische Expression von Genen.

Der Transkriptionsfaktor ARR1 wird durch Cytokinin reguliert und bindet an Motive in Promotoren von Genen, die nach Behandlung mit Cytokinin verstärkt exprimiert werden (Ross *et al.*, 2004). Das Phytohormon Cytokinin ist ein negativer Regulator der Seneszenz. Das CAAT-Motiv wurde im Promotor des *LegA*-Gens identifiziert (Shirsat *et al.*, 1989). Im Allgemeinen scheint es die Expression von Genen zu verstärken.

Das MEM1-Element ist dafür verantwortlich, dass Gene spezifisch im Mesophyllgewebe exprimiert werden und unterdrückt gleichzeitig deren Expression in Bündelscheidenzellen und den Leitbündeln (Gowik *et al.*, 2004; Akyildiz *et al.*, 2007).

DOF-Transkriptionsfaktoren spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Genen, die in die C4-Photosynthese involviert sind. Die Expression dieser Gene wird durch das Licht und das Gewebe kontrolliert und man nimmt an, dass die DOF-Transkriptionsfaktoren erheblich dazu beitragen (Cavalar *et al.*, 2003).

Das E-Box-Motiv wird von verschiedenen Transkriptionsfaktoren der Klassen R2R3-MYB, bZIP und BHLH erkannt. Durch deren Zusammenspiel wird eine lichtabhängige und gewebespezifische Expression des *NapinA*-Gens gewährleistet (Hartmann *et al.*, 2005).

Das GTGA- und das POLLEN1-Motiv sind beides *cis*-Elemente, die in Promotoren von Genen identifiziert wurden, die für die Entwicklung von Pollen verantwortlich sind (Rogers *et al.*, 2001; Filichkin *et al.*, 2004).

Das Element RHE wurde erstmals als ein *cis*-Element der spezifischen Genexpression in Wurzelhaaren beschrieben (Kim *et al.*, 2006), entspricht aber ebenfalls der Konsensus-DNA-Bindesequenz der NAC-Transkriptionsfaktoren. Diese stellen eine der größten Familien von pflanzenspezifischen Transkriptionsfaktoren dar, die in eine Vielzahl von Prozessen involviert sind. Dazu gehören entwicklungsspezifische Prozesse, Pathogenabwehr und die Antwort auf abiotischen Stress (Olsen *et al.*, 2005). 51 *cis*-Elemente dieser Gruppe ließen sich auf dem *HvS40*-Promotor identifizieren (Abb.5, Tab. 8).

Tabelle (8) *cis*-Elemente des *HvS40*-Promotors. Aufschlüsselung der IUPAC-Kodierung: B = C oder G oder T; D = A oder G oder T; H = A oder C oder T; K = G oder T; M = A oder C; N = A oder C oder G oder T; R = A oder G; S = C oder G; V = A oder C oder G; W = A oder C; Y = C oder T

<i>cis</i> -Element	Beschreibung	Anzahl	Motiv	Referenz
<i>Cis</i>-Elemente der seneszenzspezifischen Genexpression				
AP2-EREBP	Im Fall von <i>S40</i> Bindestelle der seneszenzassoziierten Transkriptionsfaktoren AP2 und DRE	4	ATCTA CCCAC GCCGAC	Breeze <i>et al.</i> (2011)
CCAAT	Hitzeschock-Element: Transkriptionsfaktoren, die an die CCAAT-Box binden, sind hochreguliert während der Seneszenz	7	CCAAT	Breeze <i>et al.</i> (2011)
CGCG-BOX	Bindestelle von SR1-6-Transkriptionsfaktoren, die involviert sind in die Regulation der Ethylen-induzierten Seneszenz	3	VCGCGB	Nie <i>et al.</i> (2012)
GTCC-Box	Bindestelle der seneszenz-assoziierten C2H2-Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren	3	GTCCT	Balazadeh <i>et al.</i> (2008)
MYB	Bindestelle für MYB-Transkriptionsfaktoren, die in den ABA-Signalweg involviert sind	9	WAACCA	Balazadeh <i>et al.</i> (2008)
NAC	Bindestelle von Nac-Transkriptionsfaktoren, die die Seneszenz regulieren	5	KCACGW	Breeze <i>et al.</i> (2011)
W-BOX	Bindestelle von WRKY-Transkriptionsfaktoren, die einen erheblichen Einfluss auf die Genexpression während der Seneszenz haben	5	TTGAC	Balazadeh <i>et al.</i> (2008); Breeze <i>et al.</i> (2011)
ABA-regulierte <i>cis</i>-Elemente				
ABRE	ABA-reguliertes Element, an das Transkriptionsfaktoren der ABF-Familie binden	9	YACGTGGC	Kang <i>et al.</i> (2002)
DPBF-CORE	Bindestelle für den bZIP-Transkriptionsfaktor ABI5. ABI5-Mutanten sind ABA-insensitiv	3	ACACNNG	Lopez-Molina (2000)

MYB	Bindestelle für MYB-Transkriptionsfaktoren, die in den ABA-Signalweg involviert sind	9	WAACCA	Abe <i>et al.</i> (2003)
MYC (siehe auch E-BOX)	Bindestelle von MYC-Transkriptionsfaktoren, ABA-Signalwirkung während Trocken- und Kältestress	3	CANNTG	Abe <i>et al.</i> (2003)
weitere Elemente	ABA-DESI1, proxB, RY <i>repeat</i> , EMBP1, LCR1, PRE, -10PE	8		

Licht-regulierte *cis*-Elemente

GATA-Box	verantwortlich für licht-regulierte und gewebespezifische Expression von <i>cab</i> -Genen	6	GATA	Reyes <i>et al.</i> (2004)
G-BOX/BOXII	Licht-reguliertes Element in den Promotoren der Gene <i>CHS-1</i> und <i>RBCS</i> . Konservierte Sequenz in verschiedenen licht-induzierbaren Promotoren	4	(TCC)ACGTGGC	Terzaghi and Cashmore (1995)
INR	Element, das die lichtabhängige Transkription des <i>psaDb</i> -Gens induziert	1	YTCANTYY	Nakamura <i>et al.</i> (2002)
SORLIP1	Phytochrom-A reguliertes Element	4	GCCAC	Hudson and Quail (2003)
weitere Elemente	LREN-P-CABE,I-Box, RE-alpha, T-box, GT-1	7		

cis-Elemente der Pathogen-und Stressantwort

ERE siehe auch W-Box	<i>Elicitor Response Element</i> des <i>PR1</i> -Genes, besteht aus einem W-Box Palindrom (s.u.)	2	TTGACC	Desveaux <i>et al.</i> (2000); Krupinska <i>et al.</i> (2014a)
CGCG-BOX	Bindestelle von SR1-6-Transkriptionsfaktoren, die in die Regulation vieler stressinduzierter Gene involviert sind	3	VCGCGB	Yang and Poo-vaiah (2002)
HSE	Hitze-Schock-Element	7	CCAAT	Haralampidis <i>et al.</i> (2002)

W-BOX	Bindestelle von WRKY-Transkriptionsfaktoren, das W-Box-Palindrom IR2 + IR2-ähnlich wurde im Promotor des <i>PR-10</i> -Genes identifiziert	5	TTGAC	Eulgem <i>et al.</i> (2000)
weitere Elemente	OSE, BIHD1, PRE, UPR	5		
<i>cis</i>-Elemente der organ-, gewebe- und entwicklungsspezifischen Genexpression				
ARR1	Bindestelle des ARR1-Transkriptionsfaktors, Cytokinin-reguliert	5	NGATT	Ross <i>et al.</i> (2004)
CAAT	<i>cis</i> -Element, das für die gewebespezifische Expression des <i>legA</i> -Gens verantwortlich ist	11	CAAT	Shirsat <i>et al.</i> (1989)
CuRE	Kupfer-reguliertes Element	6	GTAC	Quinn <i>et al.</i> (2002)
DOF	Bindestelle der Dof-Transkriptionsfaktoren, die u.a. involviert sind in die Regulation des Kohlenstoff-Metabolismus'	5	AAAG	Yanagisawa (2000)
GTGA	Element im Promotor des Pollenentwicklungs-Gens <i>g10</i>	3	GTGA	Rogers <i>et al.</i> (2001)
MEM1	Element für eine spezifische Expression im Mesophyll	9	YACT	Gowik <i>et al.</i> (2004)
POLLEN1-ELAT	pollenspezifische Expression des <i>lat52</i> -Genes	3	AGAAA	Filichkin <i>et al.</i> (2004)
RHE/NAC	spezifische Expression in Wurzelhaaren, Konsensus-Element der NAC-Transkriptionsfaktoren	5	KCACGW	Kim <i>et al.</i> (2006); Olsen <i>et al.</i> (2005)
weitere Elemente	AACA, A-Box, (CA) _n , CARE, RY repeat, SPBF, IR-O2, SURE	13		

3.2 Untersuchungen zur Expression des *HvS40*-Gens

Der *S40*-Promotor weist viele *cis*-Elemente auf, die auf eine Regulation des Genes durch seneszenzfördernde Phytohormone hinweisen (siehe 3.1). Abbildung 7 zeigt die mit Hilfe einer radioaktiven *S40*-DNA-Sonde sichtbar gemachte, über eine Gelelektrophorese aufgetrennte *S40*-mRNA (siehe 2.4.14), die aus mit Phytohormonen behandelten Primärblättern der Gerste gewonnen wurde (siehe 2.3.3).

Phytohormone wie Abscisinsäure (ABA) oder Methyljasmonat (MeJA) verstärkten in der Tat die Expression des *S40*-Genes in Primärblättern der Gerste. Dabei war die Stärke der Expression abhängig von der Inkubationszeit und davon, ob die Anzucht der Pflanzen auf Erde oder auf Vermiculit erfolgte. Im Unterschied zu ABA, hatte MeJA kaum einen Effekt auf die *S40*-Expression in Pflanzen, die auf Erde angezogen wurden. Pflanzen, die auf Vermiculit angezogen wurden, zeigten jedoch sowohl nach Behandlung mit ABA als auch mit MeJA eine hohe *S40*-Genexpression.

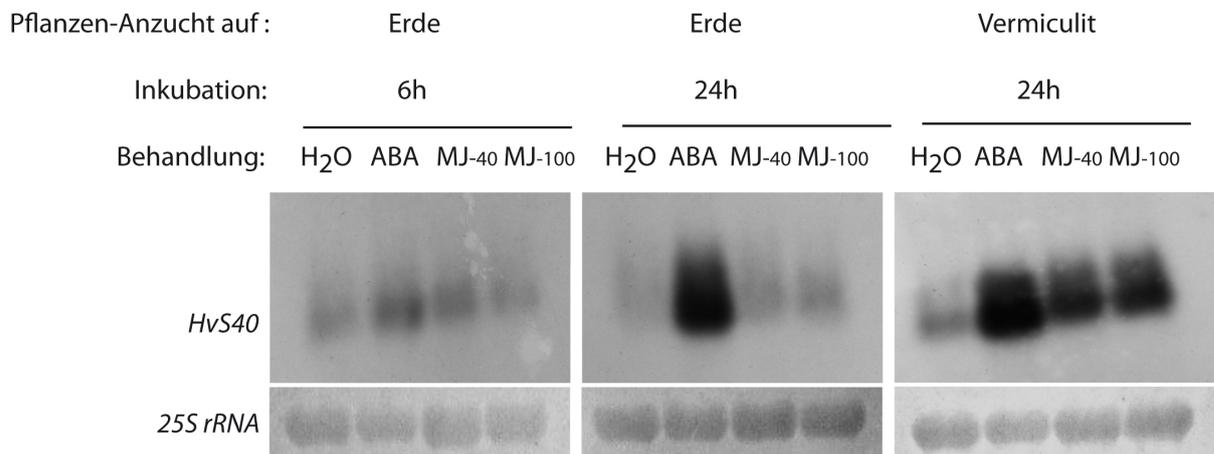


Abbildung (7) Expression von *HvS40* unter dem Einfluss von seneszenzfördernden Phytohormonen. ABA= 100 μ M Abscisinsäure, MJ-40= 40 μ M Methyljasmonat, MJ-100= 100 μ M Methyljasmonat. Je 20 μ g RNA wurden über ein Agarose-Formaldehyd-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Der Nachweis des *S40*-Transkriptes erfolgte mit einer mit P³²-dCTP markierten Sonde. Gezeigt sind Autoradiogramme, die durch P³² geschwärzt wurden. Zur Ladungskontrolle diente die mit Methylenblau gefärbte *25S rRNA*.

3.3 *Alt-HvS40*: Der alternative Leserahmen des *S40*-Gens der Gerste

Das Gen *S40* liegt im Gerstengenom in nur einer Kopie vor und besitzt keine Intronen. Es lassen sich in der genomischen Sequenz von *S40* mehrere potentielle offene Leserahmen identifizieren, die alle auf den drei positiven Leserastern verteilt vorliegen (Abb. 8). Die Benennung der Leseraster erfolgte nach dem in der genomischen Sequenz zuerst auftretenden ATG-Triplett. Die in dieser Arbeit näher untersuchten potentiellen offenen Leserahmen sind *HvS40+1* und *HvS40+3*, die jeweils auf dem ersten und dem dritten Leseraster liegen. Alle bis heute durchgeführten Untersuchungen bezogen sich auf den 417 bp langen Leserahmen *HvS40+3*. Der neu identifizierte, alternative Leserahmen *Alt-HvS40+1* ist 444 bp lang und überlappt zu großen Teilen mit dem *HvS40+3*-Leserahmen (Abb. 8). Der Translationsstartpunkt von *HvS40+1* befindet sich gegenüber dem von *HvS40+3* um 47 bp weiter strangaufwärts .

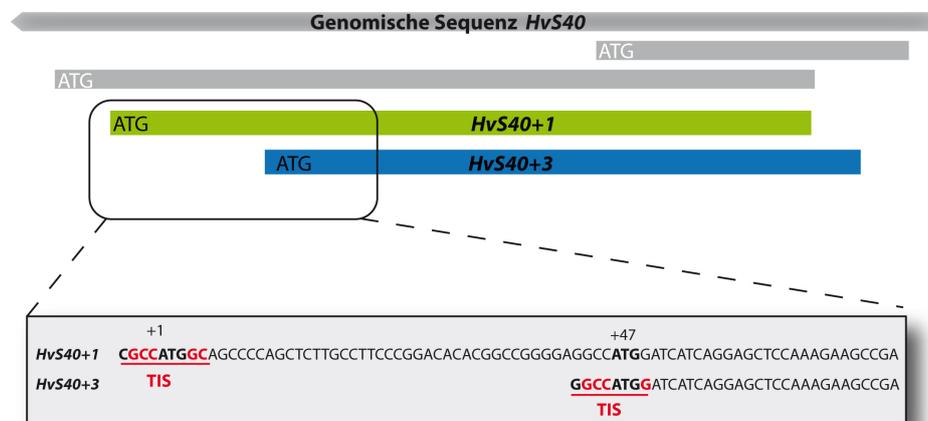


Abbildung (8) Das Gen *HvS40* der Gerste. Gezeigt sind alle potentiellen offenen Leserahmen, die sich in der genomischen Sequenz auf dem positiven Strang identifizieren lassen. Der Translations-Startpunkt des alternativen *S40*-Leserahmens (*HvS40+1*) liegt 47 bp vor dem des ursprünglich beschriebenen *S40*-Leserahmens (*HvS40+3*). Rot dargestellt sind die Translations-Initiationssequenzen (TIS), die jeweils das ATG von *HvS40+1* und *HvS40+3* umgeben.

Der Sequenzbereich, in dem das ATG liegt, wird als AUG-Kontext bezeichnet und spielt eine wichtige Rolle bei der Initiation der Translation. Der von Lukaszewicz *et al.* 2000 beschriebene Konsensus-AUG-Kontext für Monokotyle, AGCC AUG GC, lässt sich sowohl in der Sequenz von *HvS40+1* als auch in der von *HvS40+3* wiederfinden (Abb. 8). In Mais konnte dieser Translations-Initiationssequenz (TIS) höchste Effizienz nachgewiesen werden. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass beide Leserahmen abgelesen und ihre RNA translatiert wird. Die Wahrscheinlichkeit, dass *HvS40+1* translatiert wird, liegt demnach bei 89% (CGCC AUG GC) und für *HvS40+3* bei 78% (GGCC AUG GA).

Neben *HvS40+1* und *HvS40+3* ließen sich noch zwei weitere potentielle offene Leserahmen identifizieren. Diese Leserahmen wiesen jedoch keine Konsensus-Sequenz für eine TIS auf und wurden daher in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

3.4 Charakterisierung des Alt-HvS40- und des HvS40-Proteins

3.4.1 *In silico*-Analysen der Aminosäuresequenzen

Durch die Verschiebung des Leserasters um zwei Basen kodieren die überlappenden Leserahmen für zwei potentielle Proteine, die sich in ihrer Primärstruktur stark unterscheiden (Abb. 9 A). In ihren molekularen Eigenschaften und vorhergesagten Motiven weisen beide Proteine jedoch Gemeinsamkeiten auf. Der alternative Leserahmen *HvS40+1* kodiert für ein Protein, das im Folgenden als Alt-HvS40 bezeichnet wird. Alt-HvS40 besitzt 147 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 14,63 kDa. Der theoretische isoelektrische Punkt liegt bei 11,75, es handelt sich also um ein stark basisches Protein. Das HvS40-Protein, das von dem Leserahmen *HvS40+3* kodiert wird, besteht aus 138 Aminosäuren und weist ein Molekulargewicht von 15,4 kDa auf. Der vorhergesagte isoelektrische Punkt von HvS40 liegt mit 9,2 ebenfalls im basischen Bereich. Da beide Proteine keine Transmembrandomänen besitzen, wird davon ausgegangen, dass es sich um lösliche Proteine handelt.

Obwohl beide Proteine ein sehr geringes Molekulargewicht besitzen und somit klein genug sind, um ohne Zusatzsignal in den Zellkern zu gelangen, werden ihnen jeweils zwei Kernlokalisierungssignale (NLS) vorhergesagt (Abb. 9 B, Abb. 48). Die beiden NLS des HvS40-Proteins gehören zur Klasse der SV40-ähnlichen Lokalisationssignale (RRKR) und zur Klasse der zweigeteilten Lokalisationssignale (KRNVPPhVLAERRLA) (Krupinska *et al.*, 2002). Die NLS des Alt-HvS40-Proteins gehören hingegen beide der Klasse der SV40-ähnlichen Motive (RRRP) an.

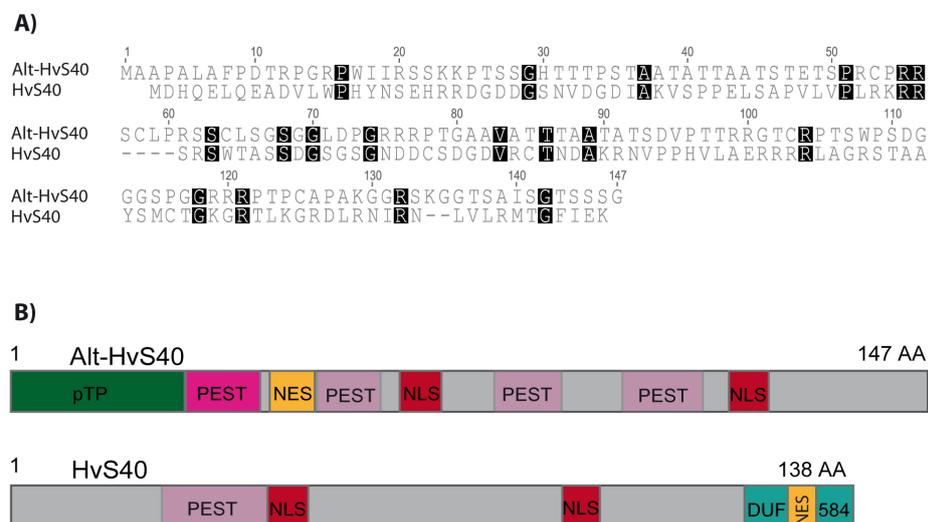


Abbildung (9) A) Vergleich der Aminosäuresequenzen von Alt-HvS40 und HvS40. Identische Aminosäuren sind dunkel-grau unterlegt. B) Schematische Darstellung der Proteinmotive von Alt-HvS40 und HvS40. pTP= plastidäres Transitpeptid, NLS= Kern-Lokalisationssequenz, NES= Kern-Exportsequenz, PEST= Sequenz, reich an den Aminosäuren Prolin, Glutaminsäure, Serin und Threonin, DUF584= Domäne mit unbekannter Funktion 584.

Interessant ist, dass für beide Proteine eine Kernexportsequenz vorausgesagt wird (*Nuclear Export Sequence*, NES). Diese Sequenz dirigiert die Proteine wieder aus dem Zellkern heraus und ist in Kombination mit der NLS charakteristisch für sogenannte *Shuttle*-Proteine, die zwischen dem Zellkern und dem Cytoplasma hin und her wandern (Yagisawa, 2006; Lange *et al.*, 2007). Auffällig ist, dass für das Alt-HvS40-Protein im Gegensatz zu HvS40 ein plastidäres Transitpeptid (pTP) vorhergesagt wird. Diese N-terminal gelegene Peptidsequenz ermöglicht den Transport

durch den Importapparat der Plastide, der aus dem TOC und dem TIC besteht, hinein in das Organell. Alt-HvS40 könnte somit ein dual in Zellkern und Plastiden lokalisiertes Protein sein, während für das HvS40-Protein bereits eine subzelluläre Lokalisation im Zellkern nachgewiesen werden konnte (Krupinska *et al.*, 2002).

Mit dem Programm epestFind von EMBOSS lassen sich Vorhersagen für mögliche PEST-Sequenzen treffen. Eine PEST-Sequenz ist gekennzeichnet durch ein häufiges Vorkommen der Aminosäuren Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T). Diese Sequenz ist charakteristisch für Proteine mit kurzer Lebensdauer, denn sie ermöglicht eine schnelle, von Ubiquitin abhängige Proteolyse (Rechsteiner, 1996). HvS40 besitzt mit einer geringen Wahrscheinlichkeit eine PEST-Sequenz, die die Aminosäuren 36-51 umfasst (Kilbiński, 2007; Abb. 9 B, Abb. 48). Für Alt-HvS40 ließen sich hingegen vier Bereiche vorhersagen, die möglicherweise eine PEST-Sequenz darstellen. Der Bereich zwischen der 30. und 52. Aminosäure stellt dabei mit hoher Wahrscheinlichkeit eine PEST-Sequenz dar (Abb. 9 B, Abb. 48).

HvS40 kann aufgrund von Sequenzhomologien der pflanzenspezifischen Proteinfamilie DUF584 zugeordnet werden, die auch unter dem Pfam-Eintrag PF04520 zu finden ist. Der Name DUF leitet sich ab von dem Begriff „Domäne mit unbekannter Funktion“, die allen Proteinen dieser Familie gemein ist. In der Datenbank NCBI sind insgesamt 926 Proteinsequenzen als putative DUF584-Proteine annotiert. Von 419 ist die gesamte Proteinsequenz bekannt. Mit diesen 419 Proteinen wurde mit Hilfe des Programms Geneious ein Alignment erstellt, um hoch konservierte Bereiche zu ermitteln. DUF584 ist eine C-terminal gelegene, konservierte Domäne, die die Aminosäuren SV-X(2)-G-X-GRTLKGRDL-X(2)-VRN-X(5)-TGF umfasst (Abb. 10). Aufgrund neuer DUF584-Proteinsequenzen von Arten, die erst in den letzten zwei Jahren sequenziert wurden, weicht diese Konsensussequenz von der ursprünglich beschriebenen leicht ab (Fischer-Kilbiński *et al.*, 2010; Krupinska *et al.*, 2014a). In den konservierten Bereichen des Konsensus stimmen alle untersuchten DUF584-Proteine zu 85% miteinander überein. Hierbei zeigte sich, dass zwischen einigen DUF584-Proteinen noch zwei weitere Sequenzbereiche hoch konserviert vorliegen. Diese konservierten Abschnitte umfassen zum einen die Aminosäuren (V)PPH(V), die im Abstand von 15 bis 33 AS vor der DUF-Domäne liegen, und zum anderen einen Bereich in der Mitte der Proteinsequenz, der die Aminosäuren (S)PV/I-X-V/I beinhaltet (Abb. 10).

Die DUF584 Proteine kommen verteilt über alle Gruppen des Pflanzenreichs vor. Sie finden sich in einzelligen Algen wie *Coccomyxa subellipsoidea* oder *Micromonas spec.*, in Farnen und Moosen wie *Selaginella moellendorfi* und *Physcomitrella patens* sowie in monokotylen Pflanzen wie Gräsern und Palmen und in dikotylen Arten wie *Arabidopsis thaliana*. Bis auf die konservierten Bereiche unterscheiden sich die Proteine der unterschiedlichen Arten meist stark in ihrer Aminosäuresequenz (Abb. 10). Der ungerichtete Stammbaum zeigt die DUF584-Proteine monokotyler Arten. Die Proteine können dabei, basierend auf einem ClustalW-Sequenz-Alignment, in sieben Gruppen eingeteilt werden (Abb. 11 A). Dies sind zwei Gruppen mehr als ursprünglich beschrieben (Fischer-Kilbiński *et al.*, 2010; Krupinska *et al.*, 2014a). Sie entstehen dadurch, dass neue Sequenzdaten verfügbar sind, die die Verwandtschaftsverhältnisse der bereits untersuchten Proteine zueinander neu ordnen. In der Gerste lassen sich 12 Proteine mit einer DUF584-Domäne identifizieren (Anhang, Abb. 47). Da nur von acht dieser Proteine die vollständige Proteinsequenz bekannt ist, sind nicht alle 12 Proteine in den Stammbaum eingefügt worden. Das zweite DUF584-Protein (*Hordeum 2*) wurde bereits von Krupinska *et al.* (2002) beschrieben, es befindet

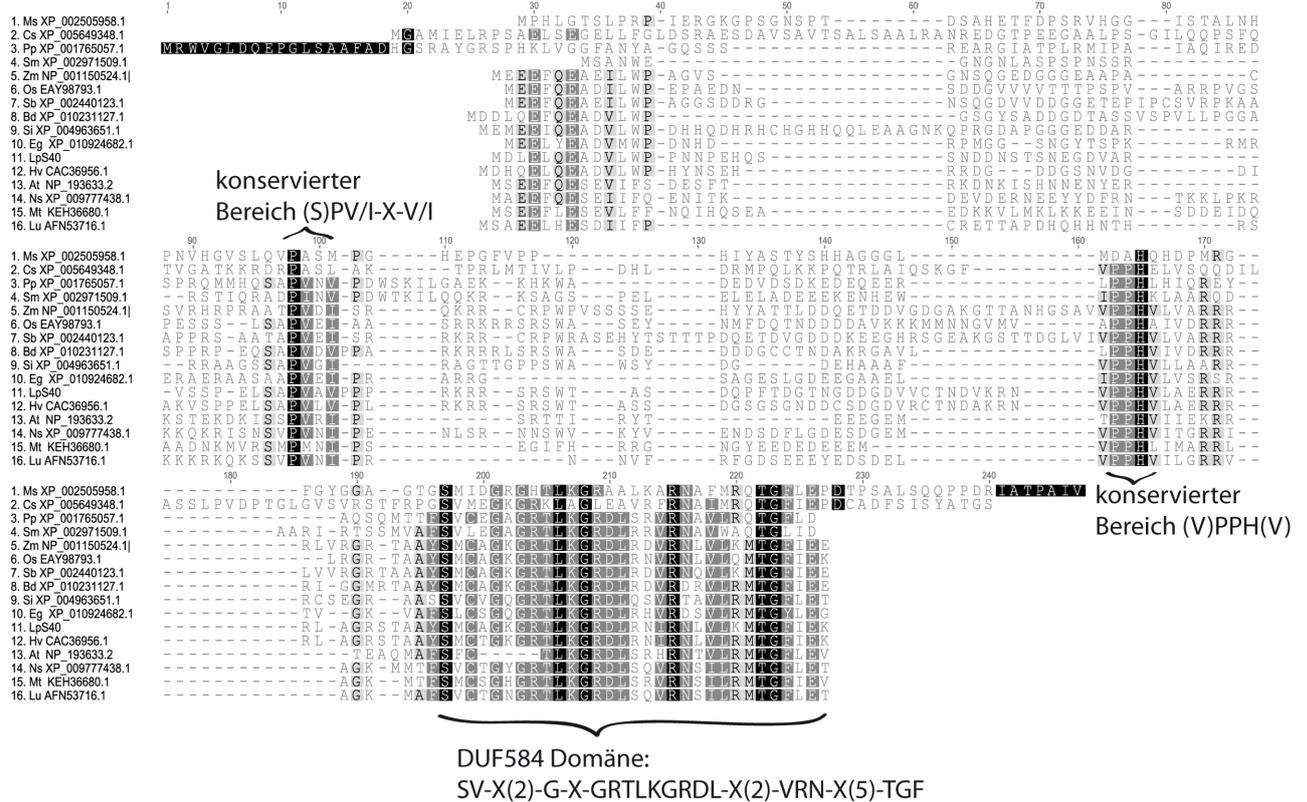


Abbildung (10) Sequenzvergleich von DUF584-Proteinen ausgewählter Arten. Identische Aminosäuren sind dunkelgrau, einander ähnliche Aminosäuren sind hellgrau unterlegt. Ms: *Micromonas sp.*, Cs: *Coccomyxa subellipsoidea*, Pp: *Physcomitrella patens*, Sm: *Selaginella moellendorffii*, Zm: *Zea mays*, Os: *Oryza sativa*, Sb: *Sorghum bicolor*, Bd: *Brachypodium dystachion*, Si: *Setaria italica*, Eg: *Elaeis guineensis*, Lp: *Lolium perenne*, Hv: *Hordeum vulgare*, At: *Arabidopsis thaliana* (AtS40-3), Ns: *Nicotiana sylvestris*, Mt: *Medicago truncatula*, Lu: *Linum usitatissimum*.

sich im Stammbaum zusammen mit dem dritten DUF584-Protein der Gerste in Gruppe VII. Die weiteren DUF584-Proteine der Gerste befinden sich in den Gruppen VI, V und IV (Abb. 11 A).

HvS40 bildet mit den DUF584-Proteinen von *Zea mays*, *Setaria italica*, *Triticum durum*, *Triticum aestivum*, *Lolium perenne*, *Lolium temulentum* und *Oryza brachyantha* eine eigene monophyletische Gruppe innerhalb der Proteingruppe II. Diese Proteine werden daher als S40-ähnliche Proteine bezeichnet. Die Gruppe II ist in Abbildung 11 B als Ausschnitt noch einmal gezeigt. Dabei steht der an jedem Knotenpunkt angegebene *Bootstrap*-Wert für die Wahrscheinlichkeit, mit der eine Gruppierung oder Verzweigung im phylogenetischen Baum auftritt. Die Proteine, in deren kodierender Sequenz ein alternativer *S40*-Leserahmen identifiziert werden konnte, sind unterstrichen. Diese Proteine befinden sich entweder direkt in der Untergruppe, in der auch HvS40 liegt, oder in unmittelbarer Nähe zu ihr. Diese Proteinsequenzen sind einander sehr ähnlich und unterlagen während der Evolution möglicherweise einem ähnlichen Selektionsdruck. Es ist jedoch zu beachten, dass beide Stammbäume nur Auskunft über den Verwandtschaftsgrad der untersuchten Proteine geben, nicht jedoch über die Richtung der Evolution.

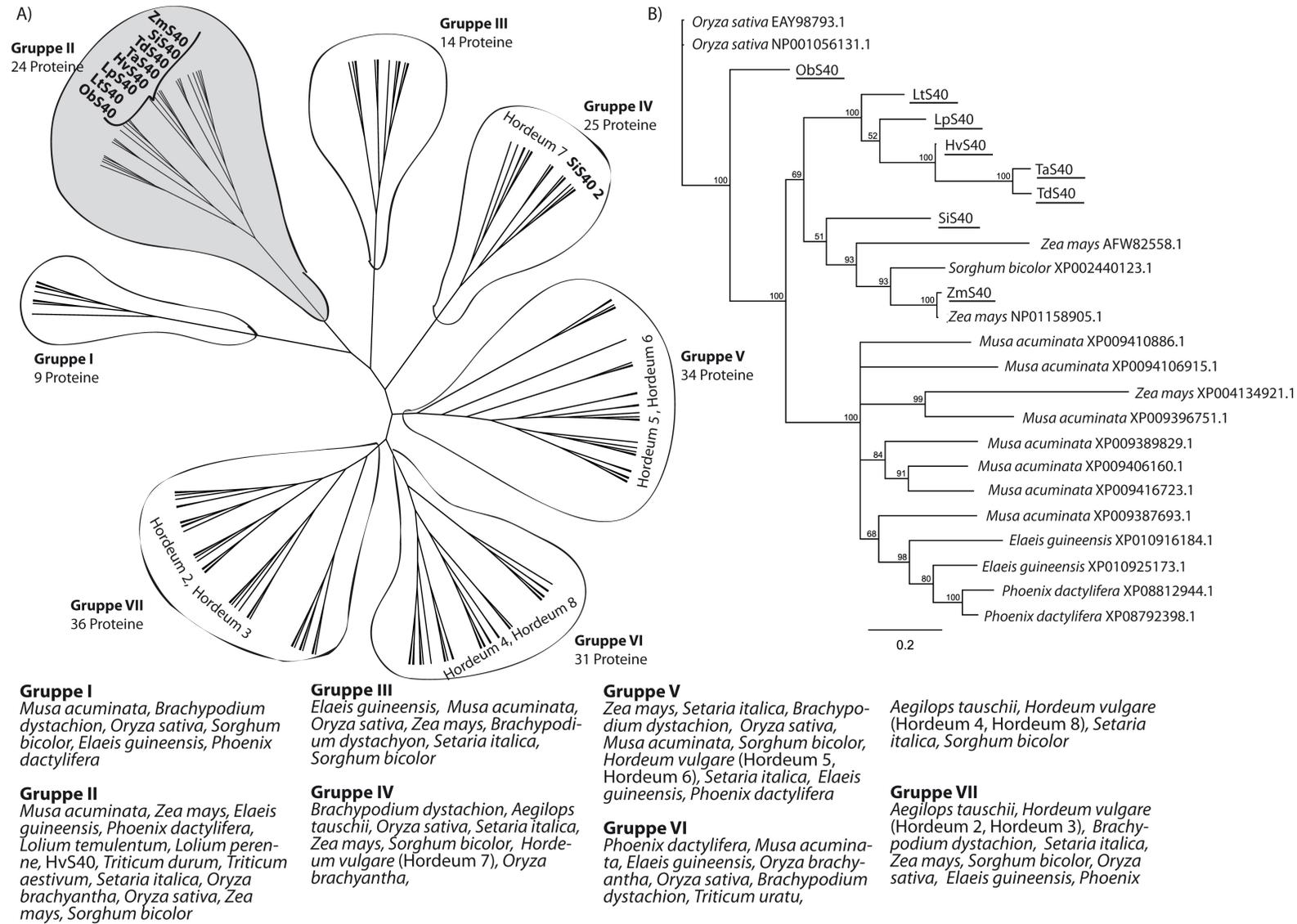


Abbildung (11) A) Phylogenetischer Stammbaum der DUF584-Proteine monokotyler Arten. Die Proteine können, basierend auf einem ClustalW-Alignment, in sieben Gruppen eingeteilt werden. Die zugrunde liegende genetische Distanzmatrix wurde mit Hilfe der Jukes-Cantor Methode berechnet und beide phylogenetischen Bäume wurden mit der distanzbasierten Neighbour-Joining Methode unter Zuhilfenahme des Programms „Geneious“ erstellt. Der Messbalken bzw. die Astlängen entsprechen der Anzahl der Aminosäure-Substitutionen pro Zeiteinheit. Die Arten, die einen alternativen *S40*-Leserahmen besitzen, befinden sich in Gruppe II. B) Ungerichteter phylogenetischer Baum der Gruppe II mit *Bootstrap*-Werten. Proteine, die in ihrer kodierenden Sequenz einen alternativen Leserahmen aufweisen, sind unterstrichen.

3.4.2 Der alternative *S40*-Leserahmen in weiteren monokotylen Arten

```

                Alt-S40 TIS                                S40 TIS
HvS40 GCCATGGCAGCCCCAGCTCTTGCCCTTCCCGGACACACGGCCGGGGAGGCCATGGATCATC 60
TdS40 GCCATGGCAGCCCCAGCCCTTGCCCTTCCCGGACACACGGCCGGGGAGGCCATGGATCA-- 58
      *****

HvS40 AGGAGCTCCAAGAAGCCGACGTCTCTGGCCACACTACAACCTCCGAGCACCGCCCGCGACG 120
TdS40 -GGAACCTCCAAGAAGCCGACGTCTCTGGCCACAGAACAACCTCCGACCACCGCCCGCGACG 117
      ***

HvS40 GCG---ACGACGGCAGC-----AACGTCGACGGAGACATCGCCAAGGTGTCCCCGCCCG 171
TdS40 GCGGCCACGACGACAGCGTCATCAACGTCGACGGAGACATGGCAAAGCTATCCTCGCCCG 177
      ***

HvS40 AGCTGTCTGCCCCGGTCTCGTGCCTTCCGGAAGCGGCGGTCTCGATCCTGGACGGCGT 231
TdS40 AGCTGTCTGCCCCGGTCTCGTGCCTCACC GGAAGCGGCGGT CACGCTCTGGACCACGT 237
      *****

HvS40 CGTCCGACGGGAGCGGCAGTGGCAACGACGACTGCAGCGACGGCGACGTCCGATGTACCA 291
TdS40 CG---GACGGGAGCGGCAGCGGCAACGACGACTGCAGCGATGGCGACGTTTCGATGCACCA 294
      **

HvS40 ACGACGCGAAGAGGAACGTGCCGCCCCACGTCTGGCCGAGCGACGGCGGAGGCTCGCCG 351
TdS40 ACGACGCAAAGAGGAACGTGCCGCCCGCACGTCTGGCTGAGCGACGCCGGAGGCTCGCCG 354
      *****

HvS40 GGAGGTCGACGGCGGCCTACTCCATGTGCACCGGCAAAGGGAGGACGCTCAAAGGGCGGG 411
TdS40 GAAGGTCGACGGCGGCCTACTCCATGTGCAGCGGAAAGGGAGGACGCTCAAAGGGCGGG 414
      *

HvS40 ACCTCCGCAATATCAGGAACCTCGTCCTCAGGATGACC GGATTTCATCGAGAAGTGA 467
TdS40 ACCTCCGCAACATCAGGAACCTCGTCCTCAGGATGACC GGATTTCATCGAGAAATGA 470
      *****

```

Abbildung (12) Vergleich der alternativen *S40*-Leserahmen von *Hordeum vulgare* (Hv) und *Triticum durum* (Td). TIS= Translations-Initiationssequenz.

Zu den Arten, die einen alternativen *S40*-Leserahmen besitzen, gehören *Lolium perenne* (Lp), *Lolium temulentum* (Lt), *Oryza brachyantha* (Ob), *Triticum durum* (Td), *Triticum aestivum* (Ta), *Setaria italica* (Si) und *Zea mays* (Zm). Sie sind in dem Stammbaum gekennzeichnet (Abb. 11). Interessant ist, dass bis jetzt nur in monokotylen Pflanzen ein alternativer *S40*-Leserahmen identifiziert werden konnte. In allen diesen Arten liegt der alternative *S40*-Leserahmen ca. 50 bp strangaufwärts vor dem *S40*-Leserahmen, wie am Beispiel der *S40*-Sequenz von *Triticum durum* in Abbildung 12 gezeigt ist. Die *S40*-Leserahmen der genannten Arten besitzen wie die der Gerste konservierte Sequenzen zur Initiation der Translation (Lukaszewicz *et al.*, 2000). Dies ist ebenfalls am Beispiel von TdS40 in Abb. 12 gezeigt.

Die potentiellen Alt-S40-Proteine von Weizen und Gerste stimmen in ihrer Primärsequenz zu 75 % überein (Abb. 12, Abb. 13). Sie unterscheiden sich jedoch deutlich gegenüber den Alt-S40-Proteinen von *Oryza brachyantha* (47% der AS stimmen überein), *Lolium perenne* und *Lolium temulentum* (13% der AS stimmen überein) und den beiden alternativen S40-Proteinen von *Setaria italica* (20,4% bzw. 12,2% der AS stimmen überein) (Abb. 13). Es ist zu beachten, dass *Lolium temulentum* zwar einen potentiellen alternativen *Alt-S40*-Leserahmen besitzt, jedoch innerhalb der Sequenz ein Stopcodon (TGA) aufweist, so dass es an dieser Stelle zu einem Abbruch der Translation kommen sollte. Diese Stelle ist in Abbildung 13 mit einem Sternchen markiert.

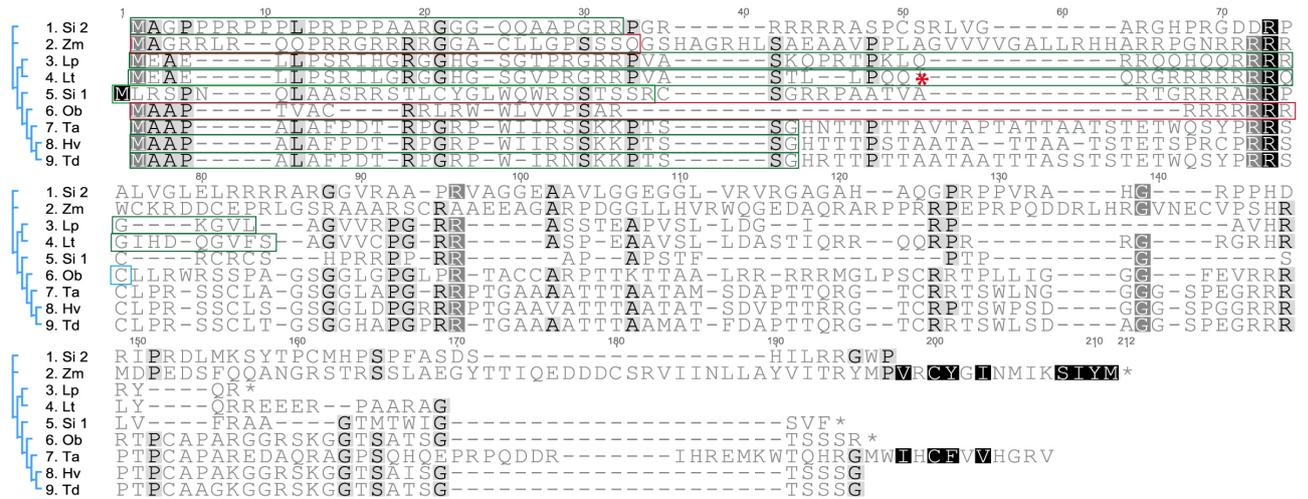


Abbildung (13) Vergleich der Aminosäuresequenzen der Alt-S40 Proteine von *Hordeum vulgare* (Hv), *Lolium perenne* (Lp), *Lolium temulentum* (Lt), *Oryza brachyantha* (Ob), *Triticum durum* (Td), *Triticum aestivum* (Ta), *Setaria italica* (Si) und *Zea mays* (Zm). Identische Aminosäuren sind dunkel-grau, einander ähnliche Aminosäuren sind hell-grau unterlegt. Grün eingrahmt: plastidäres Transitpeptid, rot eingrahmt: mitochondriales Transitpeptid. * = Translations-Abbruch

3.4.3 Vorhersagen zur subzellulären Lokalisation und zur Funktion der S40-Proteine

Die Alt-S40-Proteine besitzen, anders als die S40-Proteine, keine konservierte Domäne im C-Terminus. Dafür findet sich N-terminal bei allen Alt-S40-Proteinen ein plastidäres oder mitochondriales Transitpeptid (pTP bzw. mTP) (Abb. 13, Tab. 9).

Sowohl die meisten S40-Proteine als auch die meisten alternativen S40-Proteine weisen zwei Kernlokalisationssequenzen sowie eine Kernexportsequenz auf. Einige Proteine besitzen nur eine NLS und keine NES, in anderen ließen sich nur NES-Sequenzen vorhersagen (Tab. 9). Jedoch ist für alle Alt-S40-Proteine aufgrund ihrer molekularen Strukturen die Wahrscheinlichkeit hoch, dass es sich um dual im Zellkern und in Plastiden oder Mitochondrien lokalisierte Proteine handelt.

Die S40-Proteine sind kleine und stark basische Proteine. Alt-HvS40 und HvS40 zum Beispiel sind reich an den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin (15% und 17%). Dies deutet darauf hin, dass die Proteine eine DNA-Bindefunktion innehaben könnten. So besitzen zum Beispiel Histone zahlreiche Arginin- und Lysinreste und weisen einen IP von 12 auf (Strasburger, 2014). Um mehr über die möglichen Funktionen der S40-Proteine zu erfahren, wurden Sequenzanalysen mit dem Programm SVM-Prot durchgeführt (Cai *et al.*, 2003). Sowohl den Alt-S40- als auch den S40-Proteinen werden hauptsächlich Funktionen als Zink-Bindeproteine und als DNA- oder RNA-Bindeproteine vorhergesagt. Viele Proteine, die aus unterschiedlichen Gründen an die DNA binden, besitzen eine Zink-Domäne. Beispiele hierfür sind die Transkriptionsfaktoren aus der Familie der Zinkfinger-Proteine oder die poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), die in die Reparatur der DNA involviert ist (Pabo *et al.*, 2001; Briggs and Bent, 2011).

Die Funktion und die Lokalisation eines Proteins ist häufig abhängig von posttranslational durchgeführten Modifikationen seiner Aminosäuren. Bereits in Kilbiński (2007) wurden mögliche Phosphorylierungsstellen für HvS40 beschrieben. Vorhersagen zu weiteren posttranslationalen Modifizierungen wie Methylierung, Acetylierung, Ubiquitynylierung und Sumolierung wurden im Rahmen dieser Arbeit für alle identifizierten Alt-S40-Proteine und S40-Proteine durchgeführt.

Tabelle (9) Vergleich der Alt-S40- und S40-Proteine monokotyler Arten im Hinblick auf Proteinstrukturen, mögliche Proteinfunktionen und posttranslationale Modifikationen. A: Acetylierung, M: Methylierung, P: Phosphorylierung, S: Sumolierung, U: Ubiquitylierung

Protein	pTP	NLS	NES	PEST	kDa	IP	DUF	SVM-Prot	posttransl. Mod.
	mTP								
Alt-HvS40	1	1	1	5	14,6	11,8	x	pot.Transporter; Ko-,Zn-,Ca- und Metall-Bindefunktion	A, M, P, S
Alt-TaS40	1	2	1	1	11,5	11,1	x	rRNA-,DNA-, Zn-, Metall- und Lipidbindefunktion; DNA-Reparatur	A, M, P, U
Alt-TdS40	1	2	x	2	16,9	12,3	x	DNA-, RNA-Bindefunktion	A, M, P
Alt-LpS40	1	2	1	1	9,6	12,3	x	DNA-, Zn-Bindefunktion; Repressor	A, M, P
Alt-LtS40	1	2	1	2	12,3	12,2	x	DNA-Reparatur; RNA-Bindeprotein	A, M, P, U
Alt-ObS40	1	2	x	1	12,9	12,4	x	Zn-, Mg-, Metall-Bindefunktion; Pathogenabwehr	A,M,P
Alt-ZmS40	1	2	x	2	23,3	11,1	x	Zn-Bindefunktion; DNA-Reparatur	M, P
Alt-SiS40	1	2	x	x	13,22	12,6	x	tRNA-, Lipid-, Zn-, Metall-Bindefunktion	M, P
Alt-SiS40 2	1	1	x	x	16,1	12,2	x	Zn-,Cu-,Mg-Bindefunktion; Wachstumsfaktor	A, M, P, U
HvS40	x	2	1	1	15,36	9,21	584	Zn-, Metall-, DNA-, RNA-Bindefunktion, Kernrezeptor; Repressor	A, M, P, U
TaS40	x	2	1	1	14,19	6,9	584	Zn-, mRNA- Bindefunktion; Pathogenabwehr; Kernrezeptor	A, M, P, S, U
TdS40	x	2	1	2	14,6	7,78	584	Zn-,Metall-, RNA-Bindefunktion	A, M, P, U
LpS40	x	2	1	2	15,24	8,71	584	Zn-, Metall, DNA-, RNA-Bindefunktion	
LtS40	x	2	1	1	15,7	9,3	584	Zn-,Metall-, DNA-Bindefunktion	A, M, P, S, U
ObS40	x	x	1	3	15,7	7,8	584	Zn-Bindefunktion	A, M, P
ZmS40	x	x	1	1	15,9	8,5	584	Zn-, DNA-Bindefunktion; Repressor	A, M, P, U
SiS40	x	x	1	7	29,3	8,3	584	Zn-Bindefunktion	A, M, P, U
SiS40 2	x	x	x	1	15,8	6,5	584	Zn-Bindefunktion; Kernrezeptor	A, M, P, U

Dies geschah mit Hilfe von im Internet frei verfügbaren Programmen (siehe 2.8). Bis auf das S40-Protein von *Lolium perenne* wurden allen untersuchten Proteinen posttranslationale Modifizierungen vorhergesagt (siehe Tab. 9). Die 2007 beschriebenen Phosphorylierungsstellen für HvS40 ließen sich auch in den S40-Proteinen der anderer Arten identifizieren. Ebenso besitzen auch alle alternativen S40-Proteine Aminosäuren, die phosphoryliert werden könnten. Die reversible Phosphorylierung der Aminosäuren Serin, Threonin und Trysin, die durch Kinasen und Phosphatasen durchgeführt wird, ist eine der am besten untersuchten posttranslationalen Modifikationen in Eukaryoten. Sie ist von großer Bedeutung für nahezu alle zellulären Prozesse (Hunter, 2000).

Alle analysierten Proteine weisen zusätzlich Aminosäuren auf, die mit hoher Wahrscheinlichkeit methyliert werden. Methylierung spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Protein-Protein-Interaktionen sowie der Protein-DNA-Interaktion. Auch Acetylierungsstellen wurden bei einigen Proteinen identifiziert. Die Acetylierung von Aminosäuren eines Proteins kann Einfluss nehmen auf dessen Stabilität und die subzelluläre Lokalisation. Einigen der Alt-S40 und S40-Proteinen wurden Ubiquitinylierungs- oder Sumolierungsstellen vorhergesagt. Ubiquitin ist ein kleines Protein, das ubiquitär in allen eukaryotischen Zellen zu finden ist. Über eine Isopeptid-Bindung wird Ubiquitin an ein Protein gebunden. SUMO (*Small Ubiquitin like Modifier*) ist ebenfalls ein kleines Protein, das ähnlich wie Ubiquitin an ein Protein gebunden werden kann (Lehtimäki *et al.*, 2015; Rodriguez *et al.*, 2001). Die Bindung von Ubiquitin oder SUMO hat Einfluss auf die Proteinstabilität, den Transport von Proteinen zwischen Zellkern und Cytosol und auf Protein-Proteininteraktionen und Bindungspartner. In Abbildung 48 sind die Aminosäuresequenzen der beiden S40-Proteine der Gerste mit den möglichen posttranslationalen Modifizierungsstellen zur besseren Übersicht grafisch dargestellt.

3.4.3.1 Vorhersagen zur subzellulären Lokalisation von weiteren DUF584-Proteinen

Setaria italica besitzt insgesamt 14 Gene, die für ein potentielles DUF584-Protein kodieren. Davon besitzt das Gen mit der Acc.Nr. XM004977313.2 zwar keinen alternativen Leserahmen, jedoch kodiert es für ein Protein, das sowohl eine DUF584-Domäne als auch ein plastidäres Transitpeptid besitzt. Solche DUF584-Proteine, die zusätzlich zu der konservierten C-terminalen Domäne am N-Terminus ein plastidäres oder mitochondriales Transitpeptid aufweisen, konnten in fast allen untersuchten monokotylen Arten identifiziert werden. Sie sind ihren Gruppen im Stammbaum entsprechend in Abbildung 49 zusammengefasst worden. Auch Gerste besitzt solche Proteine, in denen die DUF584-Domäne und ein mitochondriales Transitpeptid vereint sind. Es handelt sich dabei um die Protein Hordeum-2, Hordeum-3 und Hordeum-5 (Acc.Nr. BAK04510.1, BAJ92790.1, BAJ96673.1), die im Stammbaum der Gruppe VII und der Gruppe V zugeordnet wurden (Abb. 11, Abb. 49). Die Aufklärung der subzellulären Lokalisation dieser Proteine dürfte in Zukunft ein neues Licht auf die Funktion der DUF584-Domäne werfen (Pfam-Familie 04520).

3.5 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der HvS40- und TdS40-Proteine

3.5.1 Isolierung und Sequenzierung der *S40*-Leserahmen von *Triticum durum*

Die vollständige *TdS40*-Sequenz, die beide *S40*-Leserahmen beinhaltet, wurde über eine PCR mit Hilfe von genomischer DNA als Matrize gewonnen (siehe 2.4.10) und zur Sequenzierung in den pJET1.2-Vektor kloniert (siehe 2.4.3 und 2.4.9). Nach erfolgreicher Sequenzierung zeigte sich, dass die selbst gewonnene und analysierte *TdS40*-Sequenz von der auf CerealsDB veröffentlichten Sequenz im 3'-Bereich und im 5' Bereich leicht abwich (Anhang, Abb. 50). Trotz der identifizierten Abweichungen weist die gewonnene *TdS40*-Sequenz jedoch weiterhin einen alternativen Leserahmen auf. Ein Abgleich der neu erhaltenen Sequenz mit einer weiteren, auf NCBI veröffentlichten *TdS40*-Sequenz (Acc.Nr. AM939937, bis dato nicht vollständig) zeigte zudem, dass diese zu 100% übereinstimmten (Abb. 50 A). Eine *In silico* Analyse der verschiedenen Sequenzen zeigte zudem, dass die Sequenzinformation der CerealsDB-Datenbank sich nicht korrekt in ein DUF584-Protein übersetzen ließ (Abb. 50 B). Es wird deshalb davon ausgegangen, dass die selbst sequenzierte Nukleotidabfolge des *TdS40*-Genes die richtige ist. Alle zuvor beschriebenen Analysen wurden bereits mit dieser korrigierten Sequenz durchgeführt (3.3, 3.4.2, 3.4.3). Beide Leserahmen wurden zur Aufklärung der subzellulären Lokalisation der TdS40-Proteine erfolgreich in den Expressionsvektor pBatTL-GFP2 kloniert und zusammen mit HvS40:GFP-Fusionsproteinen analysiert (siehe 2.4.4.2).

3.5.2 Transiente Expression von *HvS40:GFP*-Fusionskonstrukten in Zwiebelepidermiszellen

Die Aufklärung der subzellulären Lokalisation liefert wichtige erste Informationen über ein Protein mit unbekannter Funktion. Je nachdem, an welchen Ort der Zelle es gebracht wird, kann es unterschiedliche Aufgaben ausführen. Um die subzelluläre Lokalisation der S40-Proteine der Gerste und des Weizens (*Triticum durum*) zu überprüfen, wurden *GFP*-Fusionskonstrukte mit der jeweiligen vollständigen kodierenden Sequenz für *S40+1* oder *S40+3* erstellt und unter die Kontrolle des 35S-Promotors gebracht. Es wurden Zwiebelepidermiszellen mit diesen Konstrukten transient transformiert (siehe 2.6.1). Zur Überprüfung der beobachteten Lokalisation der Fusionsproteine wurden Zellen nur mit *GFP* transformiert. Das GFP weist mit einer Größe von 27 kDa eine subzelluläre Lokalisation im Zellkern und im Cytoplasma auf. Die Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgte unter dem Epifluoreszenz-Mikroskop.

In Zwiebelepidermiszellen, die Alt-HvS40:GFP oder Alt-TdS40:GFP synthetisierten, ließen sich GFP-Fluoreszenzsignale eindeutig im Zellkern, im Cytoplasma und auch in der Plasmamembran nachweisen. Zusätzlich fluoreszierten kleinere punktförmige Zellbestandteile, bei denen es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Leukoplasten handelt, die einzige Plastidenform in Zellen der inneren Zwiebelepidermis (Abb. 14). Charakteristisch für die Leukoplasten der Zwiebelepidermiszellen sind schlauchförmige Fortsätze, die von zwei Membranen umgeben sind und Stroma-proteine enthalten. Diese Ausstülpungen werden als Stromuli bezeichnet (Krupinska *et al.*, 2010). In den Detailaufnahmen der transient mit *HvS40+1:GFP* und *TdS40+1:GFP* transformierten Zwiebelepidermiszellen sind grün fluoreszierende Fortsätze an den punktförmigen Zellbestandteilen zu erkennen (Abb. 14, mit Pfeilen markiert). Dies unterstützt die Annahme, dass es sich

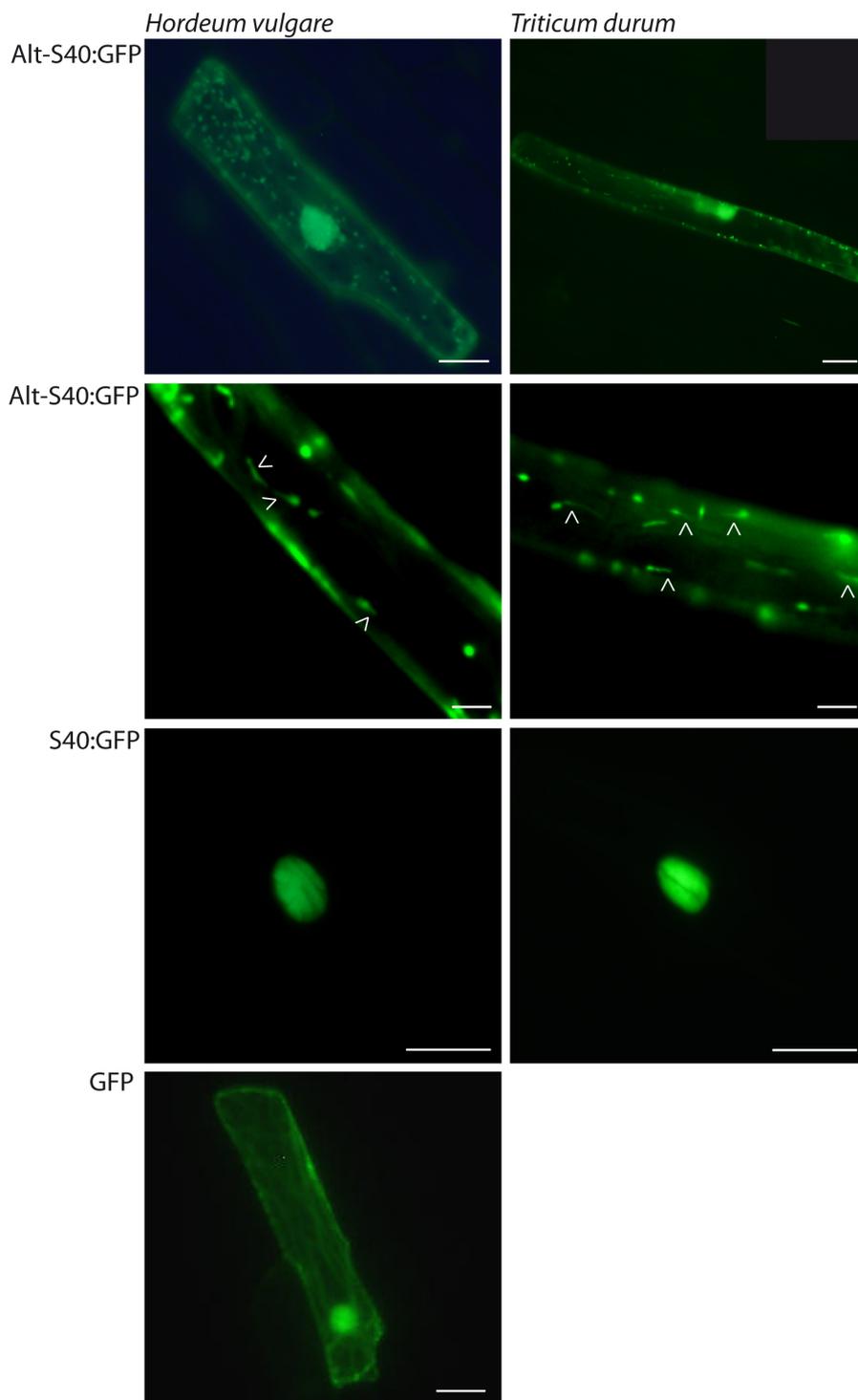


Abbildung (14) Epi-Fluoreszenzaufnahmen von Zwiebelepidermiszellen, die transient mit *HvS40+1:GFP*, *TdS40+1:GFP*, *HvS40+3:GFP* und *TdS40+3:GFP* transformiert wurden. Die Pfeile weisen auf Stromuli der Plastiden hin. Die Aufnahmen entstanden mit dem Axiophot (Zeiss). Anregung der GFP-Fluoreszenz bei 395 nm, Emission bei 508 nm. Der Messbalken entspricht 20 μm bzw. 5 μm in den Detailaufnahmen (zweite Reihe von oben).

bei den beobachteten Formen um die Leukoplasten handelte.

Die Fusionsproteine HvS40:GFP und TdS40:GFP zeigten eine eindeutige und ausschließliche Lokalisation im Zellkern (Abb. 14), während das GFP eine subzelluläre Lokalisation im Zellkern, in der Plasmamembran und im Cytoplasma aufwies (Abb. 14). Das Fusionsprotein Alt-HvS40:GFP

hat eine Größe von 41,63 kDa und könnte gerade so noch durch passiven Transport in den Zellkern gelangen. Die identifizierten NLS- und auch NES-Sequenzen sprechen aber für einen aktiven Im- und Export (siehe 3.4.3).

3.5.3 Untersuchungen zur Ko-Lokalisation mit dem PEND-Protein

Um zu überprüfen, ob Alt-HvS40 und Alt-TdS40 tatsächlich dual in den Plastiden und im Zellkern lokalisiert sind, wurde eine gleichzeitige Transformation von Zwiebelepidermiszellen mit den Konstrukten *HvS40+1:GFP* bzw. *TdS40+1:GFP* und *AtPEND:RFP* durchgeführt (siehe 2.6.1). Bei dem PEND-Protein handelt es sich um ein dual in den Chloroplasten und im Zellkern nachgewiesenes Protein (Terasawa and Sato, 2005; Melonek *et al.*, 2010). Der Name PEND (*Plastidal Envelope DNA binding Protein*) leitet sich von der Funktion des Proteins als plastidäres Hüllmembran- und DNA-Bindeprotein ab. Man nimmt an, dass es die ringförmige ptDNA in der inneren Hüllmembran der Plastide verankert. Es ist gleichzeitig im Zellkern lokalisiert, wo es ebenfalls eine Funktion als DNA-Bindeprotein ausüben kann. Sowohl Alt-HvS40:GFP als auch Alt-TdS40:GFP ko-lokalisierten mit AtPEND:RFP in den Plastiden und im Zellkern von transient transformierten Zwiebelepidermiszellen (Abb. 15). Die grünen bzw. roten Fluoreszenz-Signale aus den Plastiden überlagern sich dabei nur teilweise zu einer gelben Fluoreszenz. In den Detailaufnahmen ist zu erkennen, dass das Alt-HvS40:GFP-Fusionsprotein homogen in der ganzen Plastide verteilt vorkommt, während das AtPEND:RFP-Protein eine punktförmige Verteilung zeigt (Abb. 15 A1-A2: Alt-HvS40:GFP und AtPEND:RFP). Das Alt-TdS40:GFP-Fusionsprotein hingegen zeigte dieselbe Verteilung in den Leukoplasten wie AtPEND:RFP, welches zu einer Überlagerung der grünen und der roten Fluoreszenz führt. Aufgrund dieser Überlagerung wird mit der CCD-Kamera schließlich eine gelbe Fluoreszenz detektiert (Abb. 15 B1-B2: Alt-TdS40:GFP und AtPEND:RFP). Weiterhin ist zu erkennen, dass auch der Kern grün und rot fluoreszierte, während das Cytoplasma und die Cytoplasmamembran ausschließlich grün fluoreszierten (Abb. 15 A1, B1).

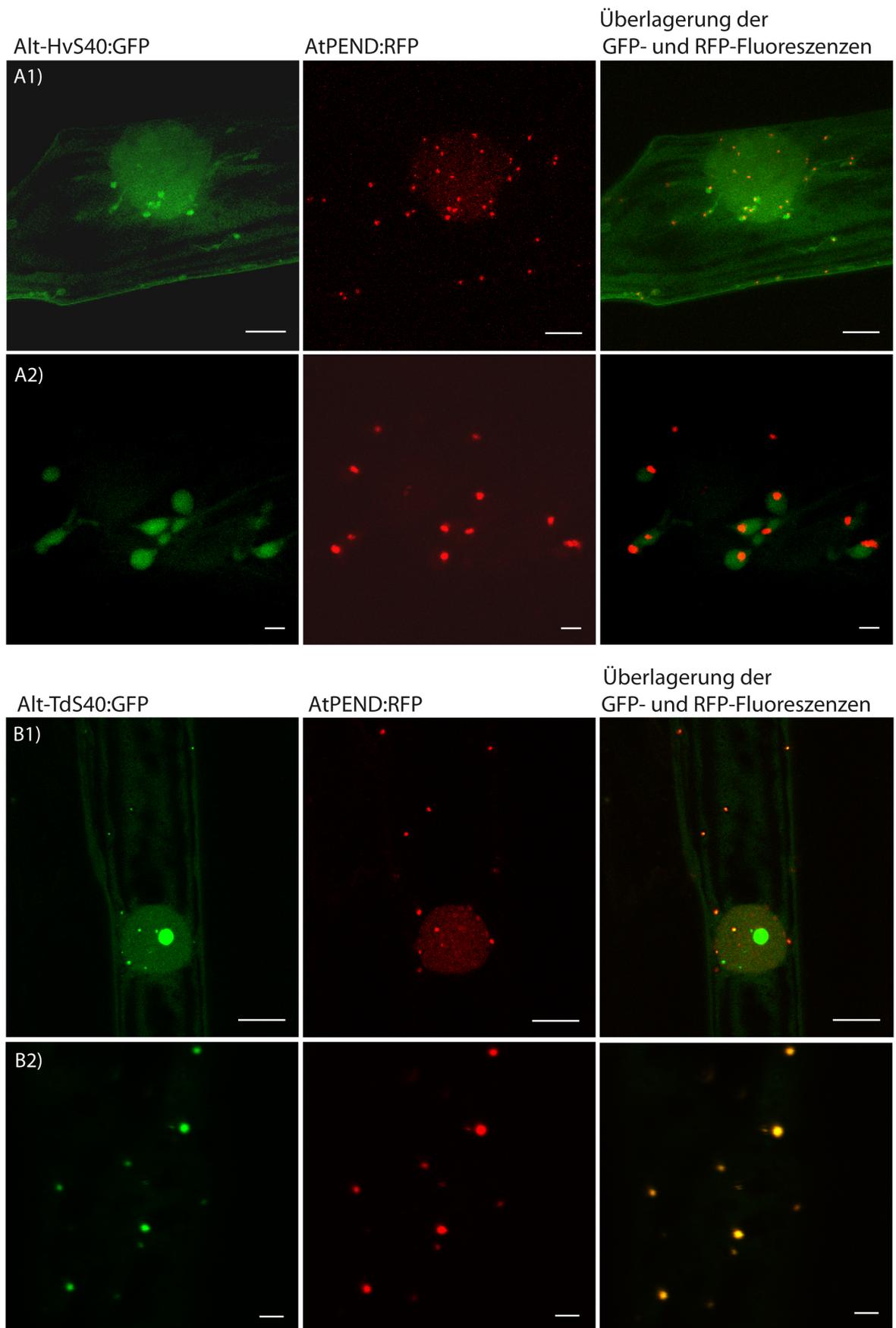


Abbildung (15) Fluoreszenzaufnahmen doppelt transformierter Zwiebelepidermiszellen. A1-A2) Mit *HvS40+1:GFP* und *AtPEND:RFP* transformierte Zellen. B1-B2) Mit *TdS40+1:GFP* und *AtPEND:RFP* transformierte Zellen. Die Aufnahmen entstanden mit Hilfe des Konfokalen Laser-Raster-Mikroskops. Die gezeigten Bilder bestehen aus fünf optischen Schnitten, die übereinander gelegt sind. Der Abstand zwischen ihnen beträgt 1 μm. Anregung der GFP-Fluoreszenz bei 395 nm, Emission bei 508 nm; Anregung der RFP-Fluoreszenz bei 532 nm, Emission bei 588 nm. Der Messbalken entspricht 20 μm (A1 und B1) bzw. 2 μm in den Detailaufnahmen (A2 und B2).

3.5.4 Transiente Expression von *HvS40+1:GFP*-Fusionskonstrukten in Gerstenprotoplasten

Wann und unter welchen Bedingungen kommt es zu einer Lokalisation des Alt-S40-Proteins in den Plastiden? Um diese Fragen beantworten zu können, wurden Gerstenprotoplasten sowohl aus grünem als auch aus seneszierendem Blattgewebe isoliert und anschließend mit dem Fusionskonstrukt *HvS40+1:GFP* transient transformiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der konfokalen Laser-Raster Mikroskopie (CLSM). Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse dieser Transformationen zusammen mit der dazugehörigen GFP-Kontrolle.

3.5.4.1 Gerstenprotoplasten aus grünem Blattgewebe Aus sieben Tage alten Primärblättern wurden Protoplasten gewonnen und mit *HvS40+1:GFP* transient transformiert (siehe 2.6.2). Als Kontrolle dienten mit der *GFP*-Sequenz transformierte Protoplasten aus derselben Isolierung. In Abbildung 16 A1 und A2 sind zwei erfolgreich mit *HvS40+1:GFP* transformierte Protoplasten gezeigt. In beiden Protoplasten waren deutliche und starke GFP-Fluoreszenzsignale im Zellkern zu erkennen. Anders als in den Zwiebelepidermiszellen war jedoch keine eindeutige Lokalisation des Alt-S40:GFP in den Plastiden zu erkennen. In einigen Fällen schien sich das Fusionsprotein von außen an die Chloroplastenhüllmembran anzulagern, wurde aber offensichtlich nicht in die Chloroplasten importiert. Es wäre sonst eine Überlagerung der Chlorophyll-Autofluoreszenz und der GFP-Fluoreszenz zu erkennen gewesen (Abb. 16 A1- A2, Abb. 17 A). Weiterhin bestand kein großer Unterschied zu den Protoplasten, die zur Kontrolle nur mit der *GFP*-Sequenz transformiert wurden. Auch sie zeigten GFP-Fluoreszenzsignale aus dem Cytoplasma und dem Zellkern (Anhang, Abb. 51). Das GFP-Protein hat eine Größe von 24 kDa und gelangt daher durch passiven Transport in den Zellkern.

Mit dem Bearbeitungsprogramm LAS AF Lite (Leica, Wetzlar) können digitale Quer- und Längsschnitte durch Fluoreszenzaufnahmen gelegt werden. So lassen sich Fluoreszenzüberlagerungen erkennen, die auf eine räumliche Nähe der zu untersuchenden, fluoreszierenden Proteine hindeuten. Der so durchgeführte Quer- und Längsschnitt durch einen Chloroplasten eines mit *HvS40+1:GFP* transformierten, nicht-seneszenten Protoplasten verdeutlicht, dass das Fusionsprotein nicht in die Chloroplasten hinein transportiert wird. Es sind keine gelben Fluoreszenzsignale zu erkennen, die auf eine Überlagerung der grünen GFP-Fluoreszenz und der roten Autofluoreszenz des Chlorophylls hinweisen (Abb. 17A). Es ist im Gegenteil deutlich eine Trennung zwischen der grünen von der roten Fluoreszenz zu erkennen.

3.5.4.2 Gerstenprotoplasten aus seneszierendem Blattgewebe Zur transienten Transformation wurden ebenfalls Protoplasten aus natürlich seneszierendem Blattgewebe eingesetzt (siehe 2.6.2). In diesen Protoplasten war das Fusionsprotein Alt-HvS40:GFP eindeutig in den Chloroplasten lokalisiert, der Import des Alt-S40-Proteins in das Organell ist also seneszenzbedingt (Abb. 16 B1-B2). Das GFP-Fluoreszenzsignal ließ sich daneben auch im Zellkern detektieren, es war jedoch um einiges schwächer als die Signale, die sich bei jungen Protoplasten im Zellkern beobachten ließen. Im Detailbild lässt sich erkennen, dass das Alt-HvS40:GFP-Protein gleichmäßig um die Thylakoidstapel des Chloroplasten herum verteilt vorlag. Zudem sind in der Aufschlüsselung der vom konfokalen Mikroskop aufgenommenen Fluoreszenzsignale (optischer Längs- und Querschnitt) eindeutig gelbe Fluoreszenzsignale zu erkennen (Abb. 17 B). Des Weiteren

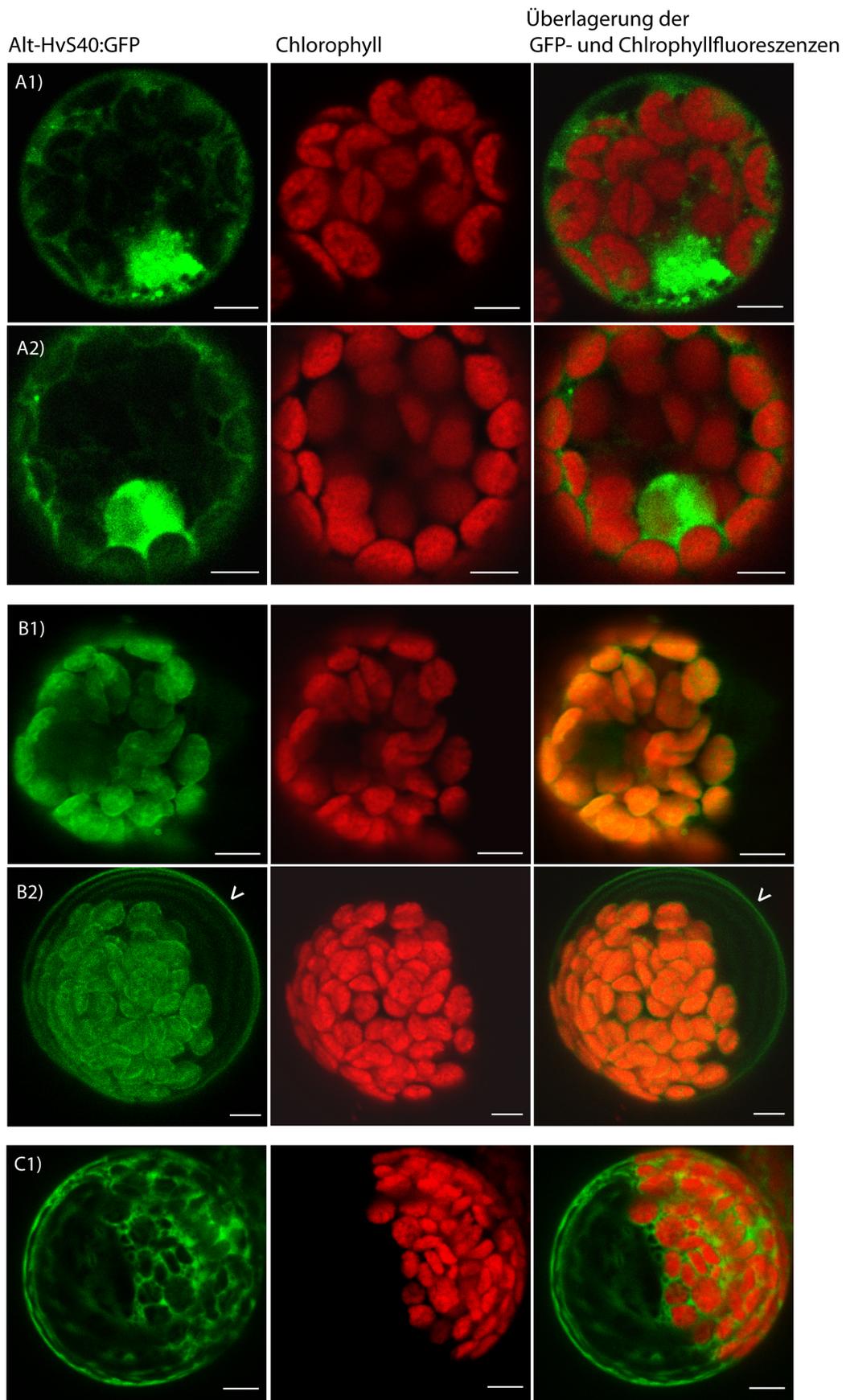


Abbildung (16) Fluoreszenzaufnahmen von Gerstenprotoplasten aus grünem Gewebe (A1-A2) und aus seneszierendem Gewebe (B1-B2), die mit *Alt-HvS40:GFP* transient transformiert wurden. C1) Protoplasten aus seneszierendem Gewebe nach Transformation mit dem *GFP*-Gen (Kontrolle). Die Einzelbild-Aufnahmen entstanden mit Hilfe des Konfokalen Laser-Raster-Mikroskops (CLSM). Anregung der GFP-Fluoreszenz erfolgte bei 395 nm, die Emission bei 508 nm; die Anregung der Chlorophyll-Autofluoreszenz erfolgte bei 395 nm, Emission bei 650 nm. Der Messbalken entspricht 5 μm .

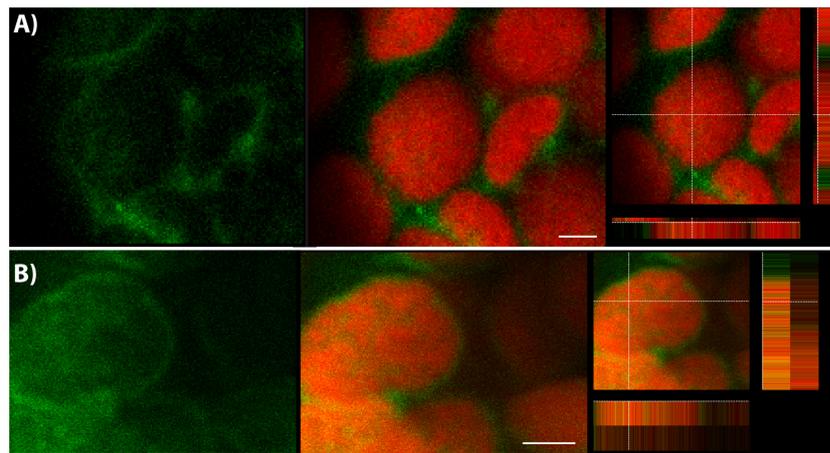


Abbildung (17) CLSM-Fluoreszenzaufnahmen von Gerstenprotoplasten aus grünem Gewebe (A) und aus seneszierendem Gewebe (B), die mit *Alt-HvS40:GFP* transient transformiert wurden. Die optischen Schnitte der Einzelbild-Aufnahmen wurden mit dem Programm LAS AF Lite durchgeführt. Die Anregung der GFP-Fluoreszenz erfolgte bei 395 nm, die Emission bei 508nm, Anregung der Chlorophyll-Autofluoreszenz erfolgte bei 395 nm, die Emission bei 650 nm. Der Messbalken entspricht $2\mu\text{m}$.

ren war das Alt-HvS40:GFP-Fusionsprotein in einigen Protoplasten auch in der Plasmamembran lokalisiert. In Abbildung 16 B2 ist diese mit einem Pfeil gekennzeichnet.

3.5.4.3 Einfluss von seneszenzfördernden Phytohormonen auf die subzelluläre Lokalisation von Alt-HvS40 Primärblätter der Gerste, die mit ABA behandelt wurden, zeigten eine verstärkte *S40*-Expression (siehe 3.2). Um zu überprüfen, ob ABA zudem einen Einfluss auf die subzelluläre Verteilung des Alt-S40-Proteins hat, wurden mit ABA behandelte und gleichzeitig mit *HvS40+1:GFP* transient transformierte Protoplasten untersucht. Hierfür wurden zwei Ansätze verfolgt: 1. Die Behandlung von isolierten Protoplasten mit ABA und 2. Die Behandlung von Primärblättern mit ABA, aus denen danach Protoplasten isoliert wurden. Ansatz 1: Die Protoplasten wurden aus 7 d alten Primärblättern isoliert, mit *HvS40+1:GFP* transient transformiert und für 16 h mit $20\ \mu\text{M}$ ABA inkubiert (siehe 2.6.2.3). Die Auswertung erfolgte am konfokalen Laser-Raster-Mikroskop. Wie in Abbildung 18 zu erkennen ist, führte die Behandlung von Protoplasten mit ABA jedoch nicht zu einer Lokalisation des Alt-HvS40-Proteins in den Chloroplasten. GFP-Fluoreszenzsignale des Fusionsproteins ließen sich in mit ABA behandelten wie in den unbehandelten Protoplasten hauptsächlich im Cytoplasma und im Zellkern detektieren (Abb. 18, Ansatz 1).

Ansatz 2: Anderes konnte beobachtet werden, wenn Protoplasten aus Primärblättern gewonnen wurden, die man zuvor für 24 h in $20\ \mu\text{M}$ ABA inkubierte (siehe 2.6.2.3). In diesen Protoplasten zeigte das transient eingebrachte Alt-HvS40:GFP-Fusionsprotein eine Lokalisation in den Chloroplasten und im Zellkern (Abb. 18 B). In einigen Protoplasten war das Alt-HvS40:GFP nicht homogen in den Chloroplasten verteilt. Vielmehr sah es so aus, als würde es in einem Ring um den Chloroplasten herum anliegen. Diese Strukturen sind in der Abbildung 18 B durch Pfeile gekennzeichnet. Es könnte sein, dass das Fusionsprotein in diesen Fällen in oder zwischen den plastidären Hüllmembranen lokalisiert ist oder dass es nicht in die Organellen importiert wird, aber mit der äußeren Hüllmembran assoziiert vorliegt.

Alt-HvS40:GFP zeigte jedoch auch eine subzelluläre Lokalisation in den Chloroplasten der Protoplasten, die aus mit Wasser behandelten Primärblättern gewonnen wurden (Kontrolle, Abb. 18

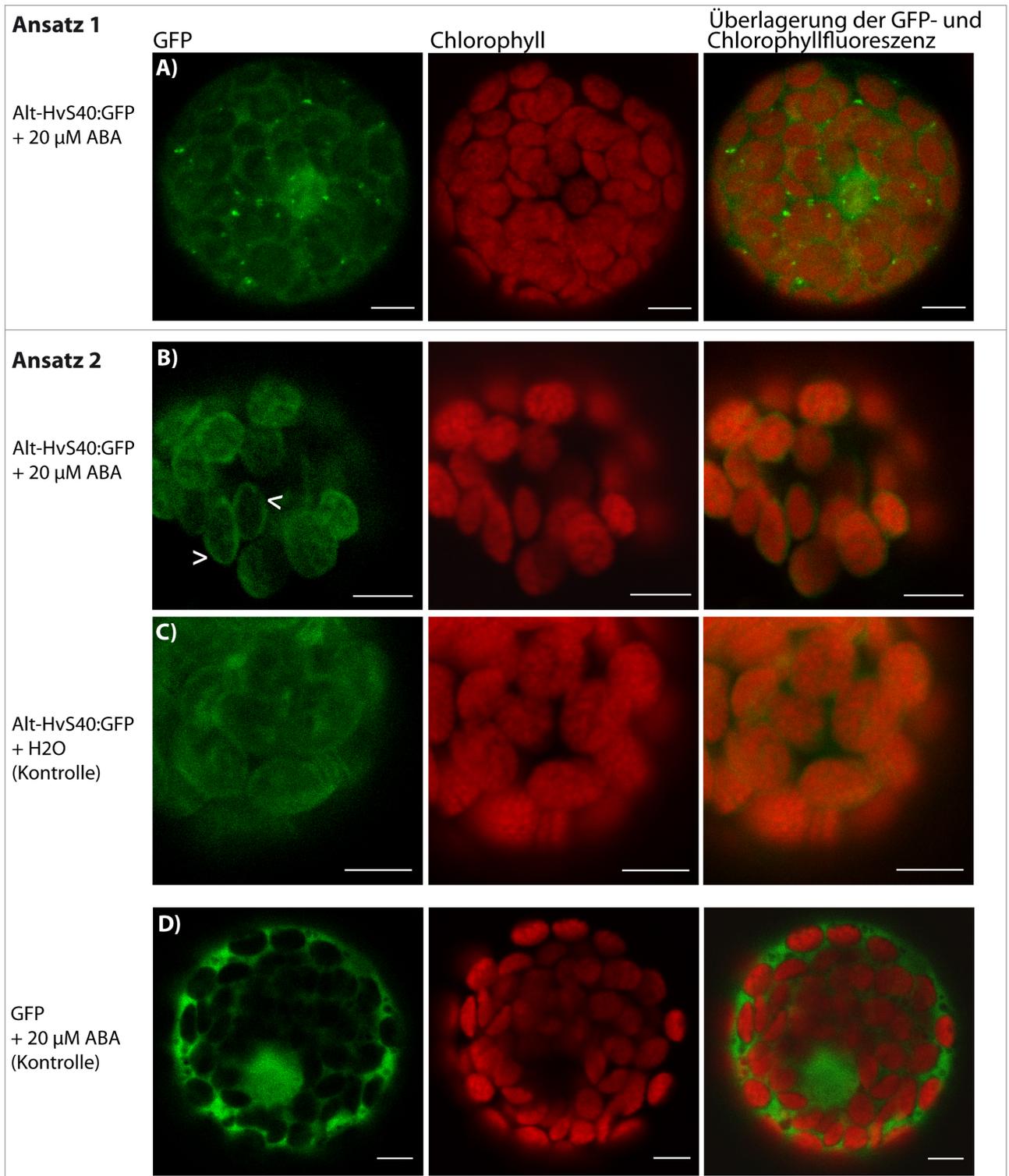


Abbildung (18) Ansatz 1, A: CLSM-Fluoreszenzaufnahmen von ABA-behandelten Gerstenprotoplasten aus grünem Blattgewebe. Die transiente Transformation erfolgte mit *HvS40+1:GFP*. **Ansatz 2, B:** CLSM-Fluoreszenzaufnahmen von Gerstenprotoplasten aus Primärblättern, die mit ABA behandelt und anschließend mit *HvS40+1:GFP* transient transformiert wurden. Als Kontrolle dienten Protoplasten aus Primärblättern, die mit Wasser inkubiert und mit *HvS40+1:GFP* transformiert wurden (C) und solche, die mit ABA behandelt und mit *GFP* transformiert wurden (D, GFP-Kontrolle). Die Aufnahmen B-C sind Maximalprojektionen von 8 optischen Abschnitten mit einem Abstand von jeweils 1,4 μ m zueinander. In A und D sind Einzelbildaufnahmen gezeigt. Die Anregung der GFP-Fluoreszenz erfolgte bei 395 nm, die Emission bei 508 nm; die Anregung der Chlorophyll-Autofluoreszenz erfolgte bei 395 nm, die Emission bei 650 nm. Der Messbalken entspricht 5 μ m.

C). Die beobachtete Lokalisation von Alt-HvS40:GFP in den Chloroplasten ist also nicht von der Zugabe von ABA, sondern vielmehr von der gewählten Versuchsdurchführung abhängig. Hierbei könnte Jasmonat eine wichtige Rolle spielen, das Phytohormon, das bei der Verwundung von pflanzlichem Gewebe gebildet wird.

Zur Kontrolle der beobachteten subzellulären Lokalisationen der S40:GFP-Fusionsproteine in den Chloroplasten und im Zellkern, wurden Protoplasten aus mit ABA-behandelten Primärblättern isoliert und mit dem *GFP*-Gen transformiert. Das GFP zeigte eine subzelluläre Lokalisation im Zellkern und im Cytoplasma, jedoch nicht in den Chloroplasten (Abb. 18 D).

3.5.5 Transiente Expression von *HvS40+3:GFP*-Fusionskonstrukten in Gerstenprotoplasten

Das Alternative S40-Protein zeigte in transient transformierten Gerstenprotoplasten, die aus jungem bzw. seneszierendem Blattgewebe gewonnen wurden, unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen (siehe 3.5.4). Um zu überprüfen, welche subzelluläre Lokalisation das HvS40-Protein in seneszierenden Zellen der Gerste aufweist, wurden Gerstenprotoplasten sowohl aus grünem als auch aus seneszierendem Blattgewebe isoliert und anschließend mit dem Fusionskonstrukt *HvS40+3:GFP* transient transformiert (siehe 2.6.2). Die Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgte mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie, die Ergebnisse sind in Abb. 19 dargestellt.

In transient transformierten Protoplasten, die aus grünem Blattgewebe der Gerste gewonnen wurden, zeigte das HvS40:GFP-Fusionsprotein wie bereits zuvor in Zwiebelepidermiszellen beobachtet eine subzelluläre Lokalisation im Zellkern (Abb. 19 A). Auch in Protoplasten, die aus seneszierendem Gewebe gewonnen wurden, ließen sich Fluoreszenzsignale des HvS40:GFP-Fusionsproteins ausschließlich im Zellkern detektieren (Abb. 19 B). Anders als bei Alt-HvS40:GFP hat das Alter der Zelle und ihr Entwicklungszustand keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation des HvS40-GFP-Proteins.

Als Kontrolle dienten auch bei diesem Versuch Protoplasten, die nur mit *GFP* transient transformiert wurden. Da das GFP-Protein mit 27 kDa klein genug ist, um durch passiven Transport in den Zellkern hinein zu gelangen, wurden in den Kontrollen GFP-Fluoreszenzen im Zellkern und im Cytoplasma detektiert (Abb. 19 C). In Fusion mit dem HvS40-Protein wurden GFP-Signale jedoch ausschließlich im Zellkern und nicht im Cytoplasma detektiert.

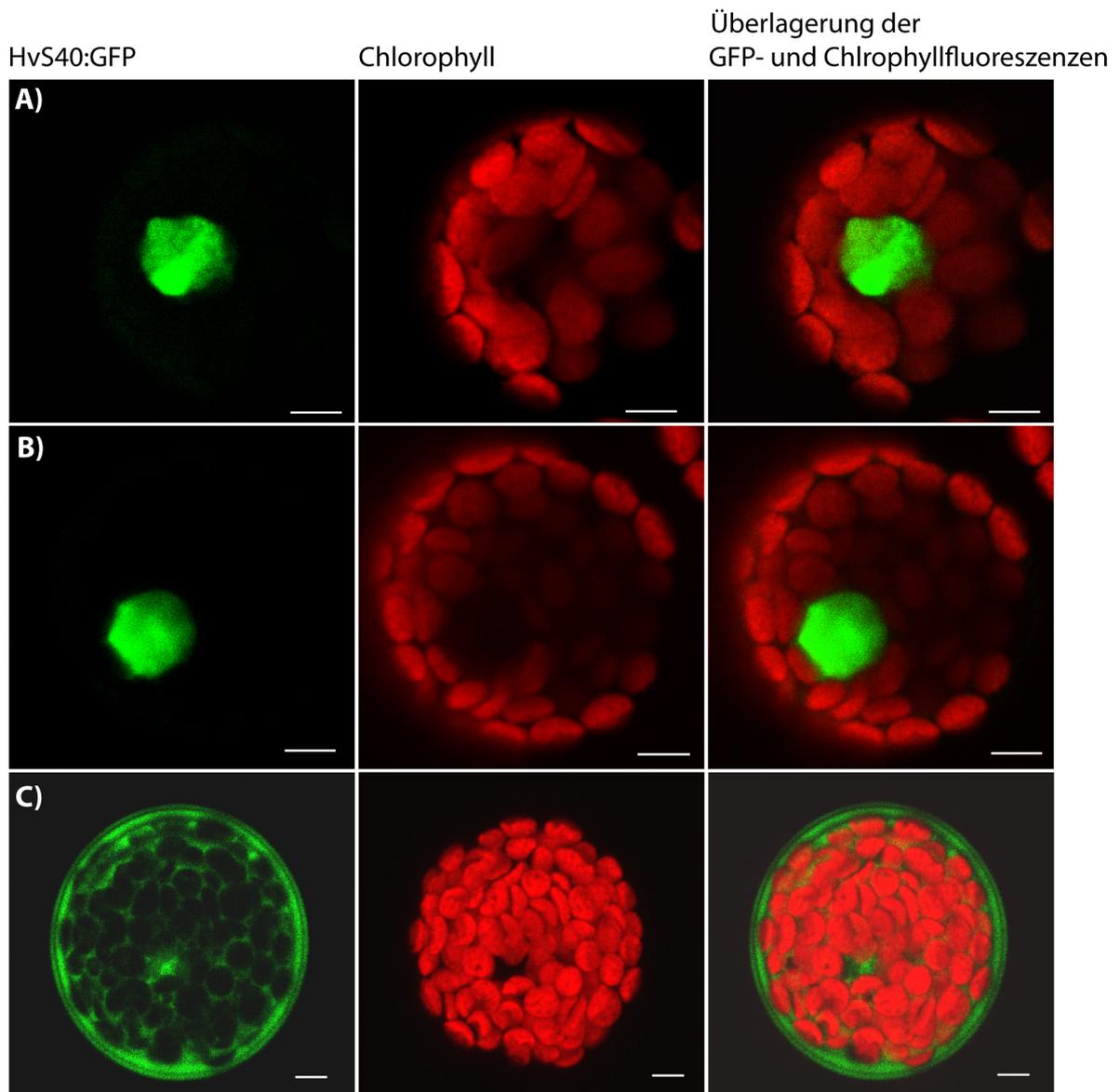


Abbildung (19) A) Fluoreszenzaufnahmen von Gerstenprotoplasten aus grünem Gewebe und B) aus seneszierendem Gewebe, die mit *HvS40+3:GFP* transient transformiert wurden. C) Aufnahmen von Protoplasten aus grünem Gewebe, die mit *GFP* transient transformiert wurden (Kontrolle). Die Einzelbild-Aufnahmen entstanden mit Hilfe des Konfokalen Laser-Raster-Mikroskops (CLSM). Anregung der GFP-Fluoreszenz bei 395 nm, Emission bei 508 nm, Anregung der Chlorophyll-Autofluoreszenz bei 395 nm, Emission bei 650 nm. Der Messbalken entspricht 5 μm .

3.6 Untersuchungen an Gerstenlinien mit verändertem *S40*-Transkriptgehalt

3.6.1 RNAi-*S40*-Linien der Gerste

Um die Funktion eines Proteins aufzuklären, werden in der Grundlagenforschung Pflanzen genutzt, die das zugehörige Gen vermindert oder verstärkt exprimieren. In der genetisch veränderten Pflanze liegt das zu untersuchende Protein dann entweder in einer geringeren oder höheren Menge als im Wildtyp vor. Phänotypische Vergleiche lassen dann Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion zu. Im Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben wurden Gerstenpflanzen erstellt, die durch einen RNA-Interferenz-Effekt eine verminderte *HvS40*-Expression aufweisen sollten. Das hierzu verwendete Konstrukt wurde von Anke Schäfer hergestellt und beinhaltete zwei antiparallel angeordnete *HvS40*-Sequenzen (siehe 2.3.4). Die Überprüfung der erfolgreichen Insertion in das Pflanzengenom fand zunächst mit Hilfe einer PCR und spezifischen Oligonukleotiden statt. Diese erste Überprüfung wurde bereits im IPK durchgeführt und es wurden insgesamt acht Linien als erfolgreich transformiert identifiziert und an die Arbeitsgruppe Krupinska übergeben. Alle Untersuchungen wurden mit Transformanten der T3-Generation durchgeführt.

Die Analyse der RNAi-Linien wird im Folgenden beschrieben. Dabei war von vorrangigem Interesse, den bereits für das *HvS40*-Gen postulierten Einfluss auf die Regulation des Seneszenzprozesses zu überprüfen.

3.6.2 DNA-Blot Analysen (Southern-Blot)

Mittels DNA-Blot wurde die Anzahl der Insertionen des RNAi-Konstruktes in die genomische DNA und die Orte der Insertionsereignisse in der genomischen DNA ermittelt. Dies liefert wichtige Informationen darüber, ob es sich bei den untersuchten Linien um verschiedene Einzelllinien handelt oder ob untersuchte Linien aufgrund ihres Genotyps zu einer Linie zusammengefasst werden müssen. Dies wäre der Fall, wenn in zwei untersuchten Linien die gleiche Anzahl von Insertionen des RNAi-Konstruktes an den gleichen Orten der genomischen DNA auftreten würde. Für den DNA-Blot wurde genomische DNA aus den transgenen Pflanzen gewonnen (siehe 2.4.3), mit Restriktionsenzymen hydrolysiert (siehe 2.4.5) und über alkalischen Transfer auf eine Membran übertragen (siehe 2.4.13). Die verwendete Sonde war gegen einen Abschnitt der durch den Transformationsvektor kodierten *Hygromycin-Phosphotransferase*-Sequenz gerichtet (Abb. 22 A).

Die Restriktionsenzyme HindIII und EcoRV hydrolysierten die RNAi-Sequenz an nur einem Punkt. Da die Stelle, an der das RNAi-Konstrukt in die genomische DNA eingefügt wird, beliebig ist, entstehen nach Hydrolyse mit HindIII oder EcoRV verschieden große gDNA-Fragmente. Die Anzahl der ermittelten Fragmente im Southern-Blot gibt somit Informationen über die Zahl der Insertionsereignisse des RNAi-Konstruktes in die genomische DNA. Für die RNAi-Linien 1, 2, 6, 7 und 8 ließ sich zeigen, dass das RNAi-Konstrukt jeweils einmal in die genomische DNA eingebracht ist. In den Linien 9 und 10 ist die RNAi-Sequenz zweimal, in der Linie 11 dreimal in die genomische DNA eingefügt (Abb. 20).

Das Enzym EcoRI besitzt zwei Restriktionsstellen nahe der linken und der rechten Grenze der RNAi-Sequenz. Durch Anwendung dieses Enzyms kann die RNAi-Kassette auf Vollständigkeit

und auf korrekte Insertion in die gDNA hin untersucht werden. Die Linien 1, 2, 7, 10 und 11 zeigten eine korrekte Insertion der RNAi-Kassette in ihr Genom, mit den verbleibenden Linien 6, 8 und 9 wurde aufgrund von unvollständigen und fragmentierten Insertionen der RNAi-Kassette nicht weitergearbeitet (Abb. 20).

Die RNAi-*S40*-Linien 1, 2, 7, 10 und 11 sind in Abbildung 21 in einem DNA-Blot dargestellt. Hier wird noch einmal deutlich, dass es sich bei den identifizierten Linien mit großer Wahrscheinlichkeit um verschiedene Einzellinien handelt.

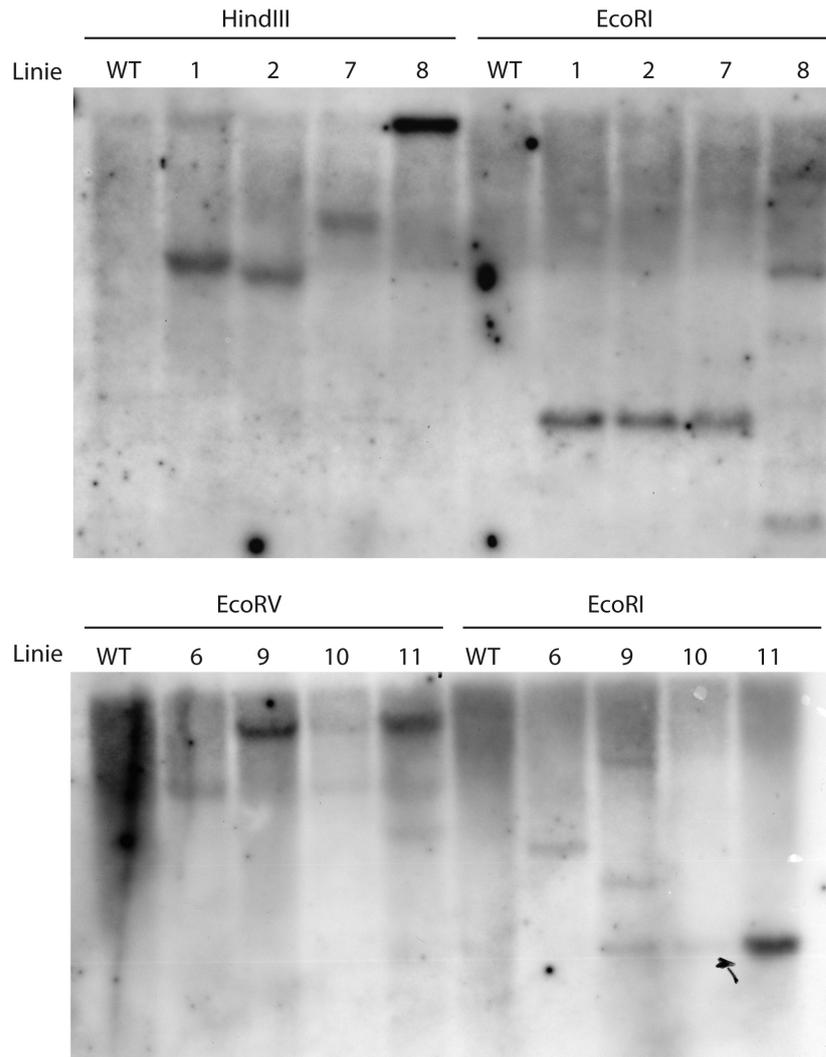


Abbildung (20) DNA-Blot-Analysen der RNAi-S40-Linien sowie des Wildtyps cv. *Golden Promise* (Southern-Blot). Genomische DNA wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII, EcoRI oder EcoRV hydrolysiert, über ein 0,75% Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran übertragen. Als Sonde wurde ein Teil der kodierenden Sequenz des *HPT*-Genes verwendet (siehe Abb. 22). Die Abbildungen sind durch P^{32} geschwärzte Autoradiogramme.

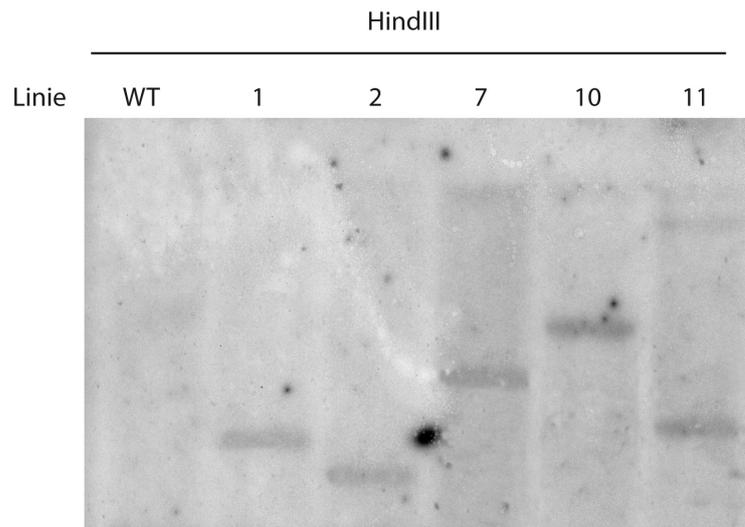


Abbildung (21) DNA-Blot-Analysen der RNAi-S40 Linien 1, 2, 7, 10 und 11 sowie des Wildtyps cv. *Golden Promise* (Southern-Blot). Die genomische DNA wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII hydrolysiert, über ein Agarosegel (0,75%) aufgetrennt und schließlich auf eine Nylonmembran übertragen. Als Sonde diente ein Abschnitt der kodierenden Sequenz des *HPT*-Genes (Abb. 22). Gezeigt ist ein durch P^{32} geschwärztes Autoradiogramm.

3.6.3 Expressionsniveau

3.6.3.1 Untersuchungen zur Expression des *Ubiquitin*-Genes In den Transformanten stehen die beiden antiparallel ausgerichteten *S40*-DNA-Sequenzen unter der Kontrolle des *Ubiquitin*-Promotors (Abb. 22 A). Um zu überprüfen, ob die Promotoraktivität auch während der Seneszenz nicht nachlässt, wurde die Expression des endogenen *Ubiquitin*-Genes während der Seneszenz mit Hilfe der quantitativen Echt-Zeit-PCR überprüft (qRT-PCR, siehe 2.4.12). Dafür wurde RNA aus sieben Tage alten nicht seneszenten Primärblättern des Wildtyps und der Linie RNAi-*S40-7* gewonnen sowie aus Primärblättern, die zur Einleitung der Seneszenz für 72 h dunkel gestellt wurden (siehe 2.4.11). Aus dieser RNA wurde cDNA synthetisiert, die zur Amplifizierung mit spezifischen Oligonukleotiden in der qRT-PCR eingesetzt wurde.

Es zeigte sich, dass *Ubiquitin* während der dunkelinduzierten Seneszenz leicht verstärkt exprimiert wurde. Außerdem gab es leichte Unterschiede in der *Ubiquitin*-Expression zwischen Wildtyp und den RNAi-Linien, die eine etwas höhere relative Menge an *Ubiquitin*-Transkripten aufwiesen (Abb. 22 B). Eine verstärkte Promotor-Aktivität ist in diesem Fall gleichbedeutend mit einem verstärkten RNAi-Effekt und ist somit für die beabsichtigte Herabregulation der Expression des *HvS40*-Genes nicht von Nachteil.

3.6.3.2 Expressionsniveau von *HvS40* in den RNAi-Pflanzen Während der Absenkung der Expressionsstärke eines endogenen Genes durch RNA-Interferenz macht man sich das pflanzeigene Abwehrsystem gegen Virusbefall zunutze. Doppelsträngige RNA wird in der Natur von pathogenen Viren in die Pflanzenzelle eingebracht und wird deshalb mit Hilfe der Enzymkomplexe RISC und DICER schnellstmöglich abgebaut. Das Ablesen der antiparallel ausgerichteten *S40*-Sequenzen führt zur Bildung einer doppelsträngigen RNA-Haarnadelstruktur in den Zellen der transformierten Pflanzen. Der RISC-Komplex hydrolysiert die dsRNA in 21-26 Nkt lange Teilabschnitte, sogenannte *small interfering RNAs* (siRNA). Diese doppelsträngigen

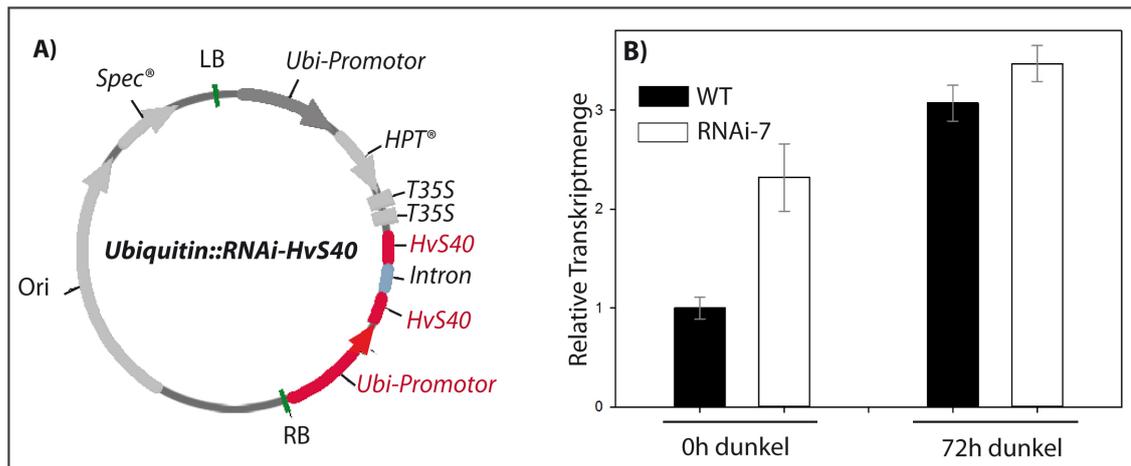


Abbildung (22) A) Schematische Darstellung des RNAi-Konstruktes, das zur stabilen Transformation von Gerste eingesetzt wurde. Die Expression der Haarnadelstruktur-Sequenz steht unter der Kontrolle des *Ubiquitin*-Promotors. B) Relative Transkriptmenge von *Ubiquitin* im Wildtyp *Golden Promise* und der Linie RNAi-*S40-7*. 0 h: Relative Transkriptmenge in sieben Tage alten Primärblättern. 72 h: Relative Transkriptmenge in für 72 h dunkel gestellten, sieben Tage alten Primärblättern. Standardabweichungen ergeben sich aus drei technischen Replikaten.

siRNAs wiederum initiieren den DICER-Komplex, der die Doppelstränge der siRNA unter ATP-Verbrauch entwindet. Der einzelsträngige siRNA-DICER-Komplex kann danach an die ursprüngliche mRNA binden, die zu einem kleinen Teil komplementär zu der siRNA ist. Anschließend wird der Abbau der mRNA durch die Endonukleaseaktivität des DICER-Komplexes durchgeführt. Da die *S40*-Leserahmen zu großen Teilen identisch sind, werden durch diesen Mechanismus sowohl die Transkripte des alternativen als auch des ursprünglichen Leserahmens herunterreguliert. Die durchgeführten Analysen zur Expression des *HvS40*-Genes legen den Schluss nahe, dass nach der Transkription des Genes ein gemeinsames Transkript mit zwei TIS vorliegt (siehe 3.2). Auch in diesem Fall würde der RNAi-Effekt beide Leserahmen betreffen.

Um den RNAi-Effekt in den Transformanten nachzuweisen, wurde ihre *S40*-Transkriptmenge mit Hilfe der qRT-PCR ermittelt und mit der des Wildtyps verglichen. Mit dieser Methode konnte nicht zwischen dem *HvS40+1*- und dem *HvS40+3*-Transkriptgehalt unterschieden werden. Denn über die Längen der sich überschneidenden 5'- und 3'-untranslatierten Regionen der Leserahmen, die auch in der cDNA wiederzufinden sind, liegen keine Informationen vor. Die eingesetzten Oligonukleotide hybridisierten mit einem DNA-Sequenzbereich, der in beiden Leserahmen zu finden ist. Daher wird im Folgenden zusammengefasst von einer *S40*-Transkriptmenge gesprochen.

Da während der dunkelinduzierten Seneszenz eine hohe *S40*-Transkriptmenge auftritt (Becker and Apel, 1993; Kleber-Janke and Krupinska, 1997), wurden RNA-Proben aus sieben Tage alten Primärblättern des Wildtyps und den RNAi-Linien 1, 2, 7, 10 und 11 gewonnen, die für 72 h dunkel gestellt worden waren (siehe 2.4.11). Aus diesen RNA-Proben wurde cDNA synthetisiert und diese wurde schließlich mit spezifischen Oligonukleotiden in einer quantitativen *Real Time*-PCR analysiert (siehe 2.4.12).

In jungen nicht seneszierenden Primärblättern des Wildtyps und der RNAi-Linien ist die *S40*-Transkriptmenge generell so gering, dass sich in diesem Stadium keine Aussage über eine Herunterregulation des *S40*-Transkriptes in den RNAi-Linien treffen ließ. Im Vergleich hierzu stieg die relative *S40*-Transkriptmenge jedoch in Primärblättern des Wildtyps, in denen die Senes-

zenz durch Dunkelinkubation induziert wurde, um das 50-fache an (Abb. 23). Die dunkelgestellten Primärblätter der RNAi-Linien 1, 2 und 10 zeigten wider Erwarten eine höhere *S40*-Transkriptmenge als die Primärblätter des Wildtyps (Abb. 23). Primärblätter der RNAi-Linien 7 und 11 hingegen zeigten während der dunkelinduzierten Seneszenz erwartungsgemäß einen niedrigeren relativen *S40*-Transkriptgehalt als die des Wildtyps (Abb. 23). Alle weiteren Untersuchungen wurden deshalb mit diesen beiden RNAi-Linien durchgeführt.

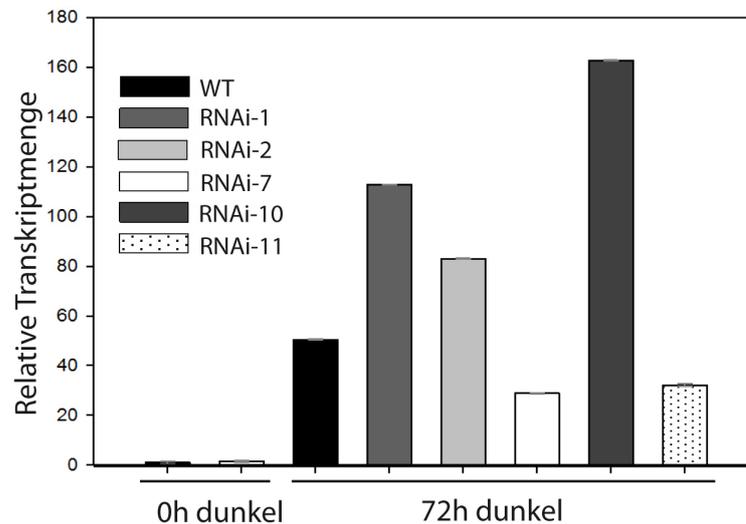


Abbildung (23) Relative Transkriptmenge von *HvS40* in den RNAi-Linien im Vergleich zum Wildtyp. 0 h: Relative Transkriptmenge in sieben Tage alten Primärblättern. 72 h: Relative Transkriptmenge in dunkelgestellten, sieben Tage alten Primärblättern. Standardabweichungen ergeben sich aus drei technischen Replikaten.

3.6.4 Charakterisierung des Phänotyps

3.6.4.1 Dunkelinduzierte Seneszenz Die Beobachtung eines bestimmten Phänotyps von transgenen Pflanzen kann wertvolle Hinweise auf mögliche Funktionen des zu untersuchenden Proteins geben. Da *HvS40* eine Rolle bei der Regulation der Seneszenz zugeschrieben wird, wurden sieben Tage alte Primärblätter des Wildtyps sowie der RNAi-Linien 7 und 11 für 72 h dunkel gestellt, um die Seneszenz zu induzieren. Die photochemische Effizienz des Photosystems II gilt als Parameter für den Fortschritt der Seneszenz und wurde nach der Dunkelinkubation mittels Imaging PAM gemessen (siehe 2.3.7). Im Vergleich zum Wildtyp zeigten die RNAi-Linien eine signifikant höhere Effizienz des PS II (Abb. 24 A). Daraus ließ sich schließen, dass ihre Seneszenz eindeutig verzögert war. Das Scan-Bild verdeutlicht, dass sich bereits mit bloßem Auge der höhere Chlorophyllgehalt in den Primärblättern der RNAi-Linien erkennen ließ (Abb. 24 B). Da das Photosystem II aktiv ist, handelt es sich bei dem beobachteten Phänotyp nicht um einen kosmetischen, sondern um einen funktionalen *Stay Green*-Phänotyp.

Die für mehrere Tage dunkel gestellten Primärblätter wurden mit dem Farbstoff Evans Blau gefärbt, um lebende von bereits abgestorbenen Zellen zu unterscheiden (siehe 2.3.8). Es zeigte sich, dass nach 72 h Dunkelheit an der Basis von Wildtyp-Blättern erste Zelltod-Ereignisse auftraten, während in RNAi-Blättern nur die Schnittkante blau gefärbt war. Nach 96 h Dunkelinkubation wurde der Unterschied noch deutlicher: in vielen Fällen war nahezu die gesamte Blattbasis der Wildtypblätter abgestorben, während weiterhin kaum Zelltod-Ereignisse in Primärblättern der RNAi-Linie stattgefunden hatten (Abb. 25).

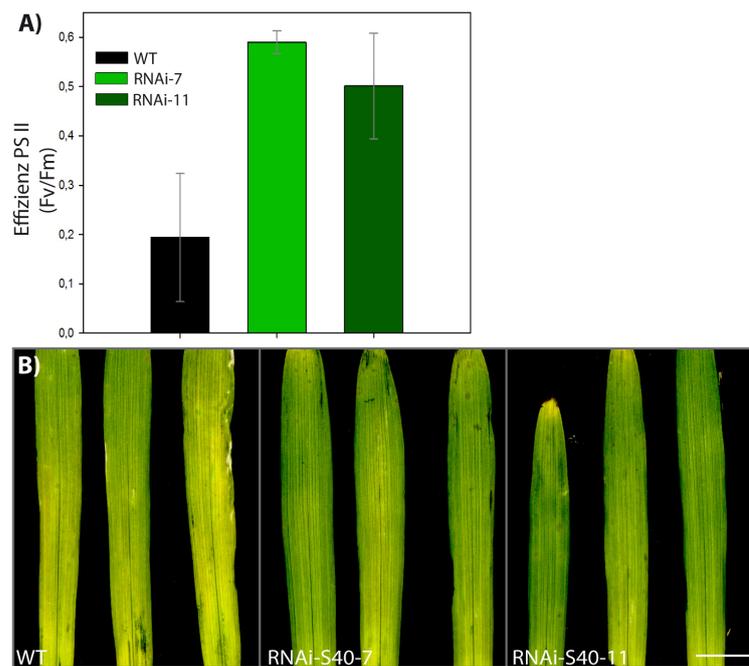


Abbildung (24) *Stay Green*-Phänotyp der RNAi-Linien während der durch Dunkelheit artifiziell induzierten Seneszenz. A) Messung der photochemischen Effizienz des Photosystems II in Wildtyp und RNAi-Linien nach 72 h Dunkelinkubation. Standardabweichungen ergeben sich aus vier Einzelmessungen. B) Scan-Bild von Primärblättern nach 72 h Dunkelheit. Messbalken= 1cm.



Abbildung (25) Evans Blau-Vitalfärbung von Primärblättern des Wildtyps und der Linie RNAi-S40-7 nach A) 72 h und B) 96 h Dunkelinkubation.

3.6.4.2 Natürliche Seneszenz Pflanzen der Linien RNAi-*S40-7* und -11 sowie des Wildtyps wurden im Gewächshaus sechs Wochen lang gezogen, um den Verlauf der natürlichen Seneszenz zu beobachten. Die Anzucht fand im März bei einer Lichtintensität von ca. 80-150 μE statt. Es zeigte sich kein Unterschied im Seneszenz-Verlauf zwischen RNAi- und Wildtyp-Pflanzen, wenn sie als Einzelpflanzen in großen Töpfen angezogen wurden (Anhang, Abb.52). Jedoch seneszierten die RNAi-Pflanzen deutlich schneller als der Wildtyp, wenn die Anzucht zu mehreren Individuen in einem Topf stattfand. Einzelne Pflanzen dieser Anzucht sind in Abbildung 26 gezeigt. In den Scan-Bildern ist deutlich die bereits starke Vergilbung der RNAi-Blätter zu erkennen, während der Wildtyp nur leichte Vergilbungen an der Blattspitze zeigte. Ungeachtet dessen war die Entwicklung der Ähre in Wildtyp- und RNAi-Pflanzen gleich weit fortgeschritten und zeigte in den RNAi-Pflanzen keinerlei Beeinträchtigungen. Dem schneller seneszierendem Phänotyp der RNAi-Pflanzen während der natürlichen Alterung steht der zuvor beobachtete *Stay Green*-Phänotyp während der durch Dunkelheit induzierten Seneszenz gegenüber. Um zu klären, welche Rolle die Intensität des Lichtes in der Ausprägung des Phänotyps spielen könnte, wurden Versuche in der Klimakammer unter kontinuierlichen Lichtverhältnissen durchgeführt.

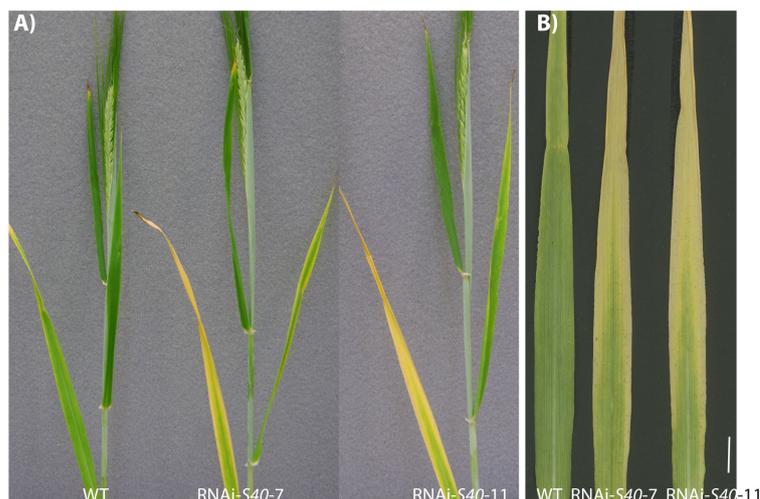


Abbildung (26) A) Sechs Wochen alte Pflanzen nach Anzucht im Gewächshaus unter natürlichen Bedingungen und B) Scanbild ihrer seneszierenden Blätter.

3.6.4.3 Durch hohe Lichtintensität induzierte Seneszenz Hohe Lichtintensitäten führen im Chloroplasten zu abiotischem Stress. Zunächst kommt es zu einer vermehrten Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die eine Reduzierung der Photosyntheseleistung zur Folge hat. Dieser Stress führt zu einer schnellen Einleitung der Blattseneszenz und in vielen Fällen zu einem Verlust im Kornertag (Pinto-Marijuan and Munne-Bosch, 2014). Pflanzen des Wildtyps, der RNAi-*S40-7*-Linie sowie der RNAi-*WHY1-7*-Linie wurden für vier Wochen in der Klimakammer unter Hochlicht-Bedingungen angezogen (siehe 2.3.1). Die RNAi-*WHY1-7*-Linie zeigte in früheren Versuchen eine später einsetzende Seneszenz und wurde zur Überprüfung der Versuchsbedingungen als Kontrolllinie mitgeführt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass WHIRLY1 an den Promotor von *S40* bindet (Krupinska *et al.*, 2014a) und einen negativen Einfluss auf dessen Genexpression hat (siehe 3.1). Deshalb war von Interesse, ob die RNAi-*S40*-Linien unter denselben Bedingungen einen anderen Phänotyp aufweisen als die RNAi-*WHY1*-Linien, in denen nach dieser Theorie ein höherer Transkriptgehalt von *HvS40* vorliegen muss.

Die Anzucht erfolgte in einem Licht-Dunkelrhythmus (16h/8h), die Lichtintensität betrug dabei die ersten zehn Tage $150 \mu\text{E}$ und die darauf folgenden Tage $300 \mu\text{E}$. Dabei wuchsen die Pflanzen auf Platten, die in einzelne Töpfe unterteilt waren (Multitopfplatten). Um eine Beschattung durch Nachbarpflanzen zu vermeiden, wurde dabei jede zweite Reihe freigelassen (Abb. 27 A). Die Ermittlung der photochemischen Effizienz des PS II (siehe 2.3.7) der verschiedenen Linien zeigte, dass es erst während der späten Phase der Seneszenz zu unterschiedlichen Ausprägungen des Phänotyps kommt (Abb. 27 B). Nach 28 d in der Klimakammer zeigte die RNAi-*S40*-7-Linie eine früher einsetzende Seneszenz als der Wildtyp, während die RNAi-*WHY1*-7 wie erwartet einen verzögerten Seneszenzprozess aufwies. Wie in der Abbildung zu erkennen ist, sind die Standardabweichungen der Messungen jedoch sehr hoch. Es ist daher schwierig, Aussagen über die Signifikanz des beobachteten Phänotyps zu treffen. Die Pflanzen zeigten zudem auch innerhalb der Linien eine unterschiedlich stark ausgeprägte Blattseneszenz. So seneszierten einige Primärblätter des Wildtyps und der RNAi-*S40*-Linie nach 28 d Anzucht bereits stark, während andere erst leichte Anzeichen von Seneszenz in der Blattspitze zeigten. Die RNAi-*WHY1*-Linie zeigte von allen drei Linien den gleichmäßigsten Phänotyp, welches sich auch in den niedrigen Standardabweichungen der (F_v/F_m) -Messungen widerspiegelt (Abb. 27 B, E).

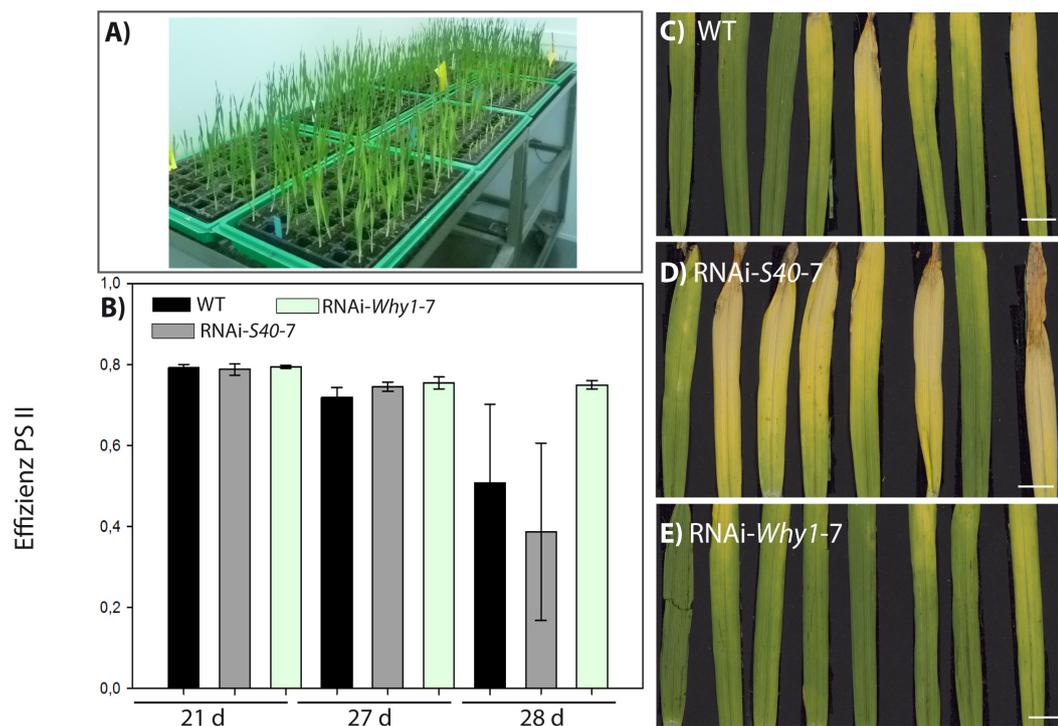


Abbildung (27) Charakterisierung der Blattseneszenz bei Anzucht unter hohen Lichtintensitäten. Pflanzen der RNAi-*S40*- und RNAi-*WHY1*-Linien wurden in der Klimakammer angezogen. A) Versuchsanordnung in Multitopfplatten. B) Photochemische Effizienz des Photosystems II (F_v/F_m) nach drei bis vier Wochen in der Klimakammer. Standardabweichungen ergeben sich aus acht Einzelmessungen. Scan-Bilder der Primärblätter nach 28 d Anzucht vom C) Wildtyp sowie der D) RNAi-*S40*-7-Linie und der E) RNAi-*WHY1*-7-Linie. Anzuchtbedingungen: 10d 16h Licht ($150 \mu\text{E}$), 60% RLF, $21^\circ\text{C}/18^\circ\text{C}$, danach Überführung in $300 \mu\text{E}$. Messbalcken= 1cm.

Auf dem Feld sind die Pflanzen neben hohen Lichtintensitäten auch dem Konkurrenzkampf mit Nachbarpflanzen um Nährstoffe ausgesetzt. Um diese Situation nachzustellen, wurden mehrere Pflanzen des Wildtyps und der RNAi-*S40*-Linie 7 zusammen in einem Topf angezogen (25 Pflanzen pro Linie und Topf). Die Anzucht fand in der Klimakammer bei einer Lichtintensität von 300 $\mu\text{E}/16\text{h}$ statt. Unter diesen Anzuchsbedingungen setzte die Seneszenz in der RNAi-Linie deutlich früher ein als im Wildtyp (Abb. 28). Zudem ließ sich erkennen, dass sowohl die Pflanzen des Wildtyps als auch der RNAi-Linie viel gleichmäßiger seneszierten als dies bei Anzucht in der Multitopfplatte der Fall war (vergl. Abb. 27 mit Abb. 28).

Das *HvS40*-Gen scheint demnach eine Signalwirkung während des durch hohe Lichtintensitäten verursachten Stress' innezuhaben, doch erst im Zusammenspiel mit weiteren Stressoren wie Nährstoffmangel führt eine verminderte Expression von *HvS40* zu einem deutlich schnellerem Seneszenzprozess.



Abbildung (28) Früher einsetzende Seneszenz in den RNAi-Linie während der Anzucht unter hoher Lichtintensität. A) Vier Wochen alte Wildtyp- und RNAi-Pflanzen nach Anzucht in der Klimakammer bei 16 h Licht (300 μE), 60% RLF, 21 °C/18 °C. 25 Pflanzen pro Topf. B) Scan von jeweils fünf Blättern dieser Pflanzen. Messbalken= 1cm

3.6.5 *S40*-Überexpressionslinien der Gerste

In Zusammenarbeit mit dem Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben wurden Gerstenpflanzen stabil mit einem Konstrukt transformiert, das zu einer Überexpression der *HvS40*-Sequenz in den Transformanten führt. Die eingebrachte *S40*-Sequenz steht dabei unter der Kontrolle des konstitutiven *Ubiquitin*-Promotors (Abb. 29 A). Vier der so erhaltenen Ubi:ÜE-*S40*-Linien wiesen in 9 d alten Primärblättern im Vergleich zu Primärblättern des Wildtyps eine deutlich erhöhte *S40*-Transkriptmenge auf (Kilbienski, 2007). Gerstenpflanzen mit einem verminderten *S40*-Transkriptgehalt seneszierten bei einer Anzucht unter natürlichen Bedingungen deutlich schneller als Pflanzen des Wildtyps (siehe 3.6.4.2). Um zu untersuchen, wie sich eine Überexpression des *S40*-Leserahmens auf den Verlauf der natürlichen Seneszenz auswirkt, wurden die Überexpressions-Linien Ubi:ÜE-*S40*-9 und Ubi:ÜE-*S40*-10 zusammen mit Pflanzen des Wildtyps für 30 d im Gewächshaus angezogen. Die Anzucht erfolgte dabei zu mehreren Individuen im Topf (15 Individuen pro Linie und Topf) bei einer Lichtintensität von 80-100 μE . Beide Ubi:ÜE-*S40*-Linien zeigten nach 30 d Anzucht einen deutlich verzögerten Seneszenzprozess im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 29 B). Wie in der Abbildung zu erkennen ist, seneszierten die Blätter des Wildtyps zu diesem Zeitpunkt schon stark. Die gelbe Verfärbung lässt auf einen bereits erfolgten Chlorophyll-Abbau zurückschließen. Die Blätter der Ubi:ÜE-*S40*-Linien hingegen sind überwiegend grün, es sind kaum gelbe Verfärbungen zu erkennen.

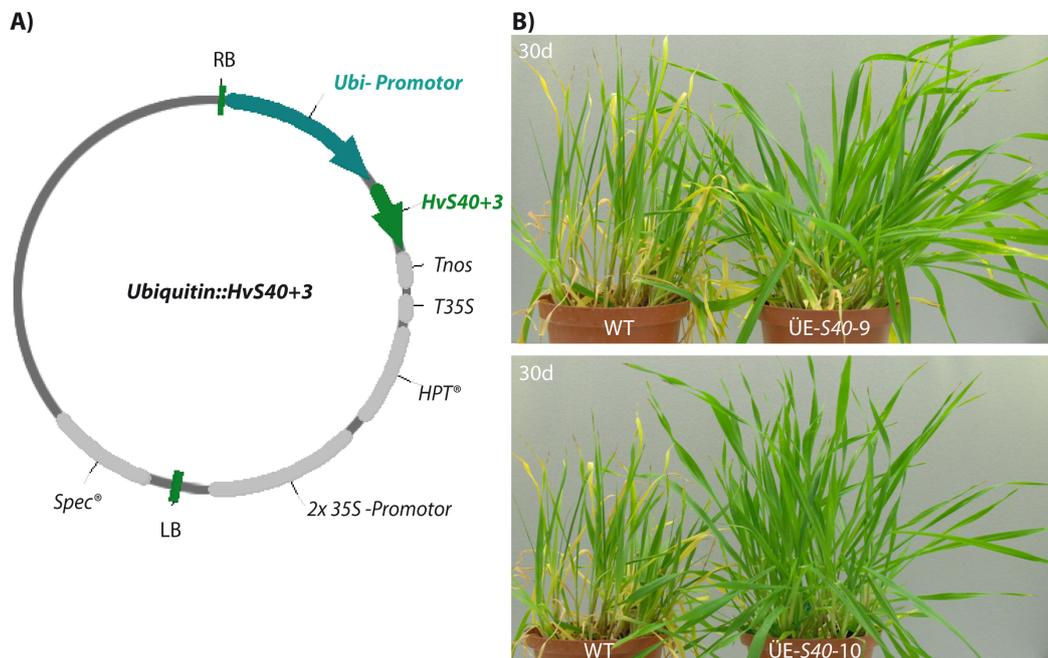


Abbildung (29) A) Schematische Darstellung des Überexpression-Konstruktes, das zur stabilen Transformation von Gerste eingesetzt wurde. Die kodierende Sequenz von *HvS40* steht hier unter der Kontrolle des konstitutiven *Ubiquitin*-Promotors. B) *Stay Green*-Phänotyp der ÜE-*S40*-Linien 9 und 10 nach 30 d Anzucht im Gewächshaus bei einer Lichtintensität von ca. 100 μE .

Ein Nachteil ergab sich bei der Verwendung des *Ubiquitin*-Promotors zur Überexpression von *HvS40*. *Ubiquitin* wird in fast allen Geweben der Gerste exprimiert, auch in der keimenden Karyopse. *S40* wird ebenfalls im Samen und während der Keimung exprimiert und an *S40*-Kosuppressionsmutanten konnte bereits eine gestörte Samenentwicklung beobachtet werden (We-

demeyer, 2005; Stoeldt, 2001). Eine frühe Überexpression des *HvS40*-Genes im Samen und in der keimenden Karyopse könnte die Entwicklung der Pflanze bereits vor der Entwicklungsphase der Blattseneszenz beeinflussen. Zudem traten bereits Probleme bei der Vermehrung der Transformanten auf, bei der man auf normal entwickelte Karyopsen angewiesen ist. Aus diesen Gründen wurde wieder in Zusammenarbeit mit dem IPK in Gatersleben ein neuer Ansatz zur Überexpression des *S40*-Genes durchgeführt.

Das hierzu verwendete Konstrukt wurde von Anke Schäfer hergestellt und beinhaltet die *HvS40*-Sequenz unter der Kontrolle des *Fruktosebisphosphatase*-Promotors (Abb. 30 A, siehe auch 2.3.5). Die Überprüfung der erfolgreichen Insertion des Konstruktes ins Pflanzengenom erfolgte im IPK mittels PCR. Es wurden insgesamt 22 Linien als erfolgreich transformiert identifiziert und an die Arbeitsgruppe übergeben. Die Untersuchungen wurden an Transformanten der T2-Generation durchgeführt.

3.6.6 Expressionsniveau

3.6.6.1 Untersuchungen zur Expression des *Fruktosebisphosphatase*-Genes In den Transformanten steht die eingebrachte *S40*-Sequenz unter der Kontrolle des *Fruktosebisphosphatase*-Promotors (Abb. 30 A). Um zu überprüfen, ob die Promotoraktivität auch während der Seneszenz nicht nachlässt, wurde die Expression des endogenen *FBP*-Genes während der Seneszenz mit Hilfe der quantitativen Echt-Zeit-PCR überprüft (siehe 2.4.12). Dafür wurden RNA-Proben aus sieben Tage alten, nichtseneszenten Primärblättern sowie aus dunkelgestellten Primärblättern des Wildtyps und der *FBP*:ÜE-*S40*-Linien gewonnen (siehe 2.4.11). Die RNA wurde in cDNA umgesetzt, die daraufhin mit spezifischen Oligonukleotiden in der qRT-PCR amplifiziert wurde.

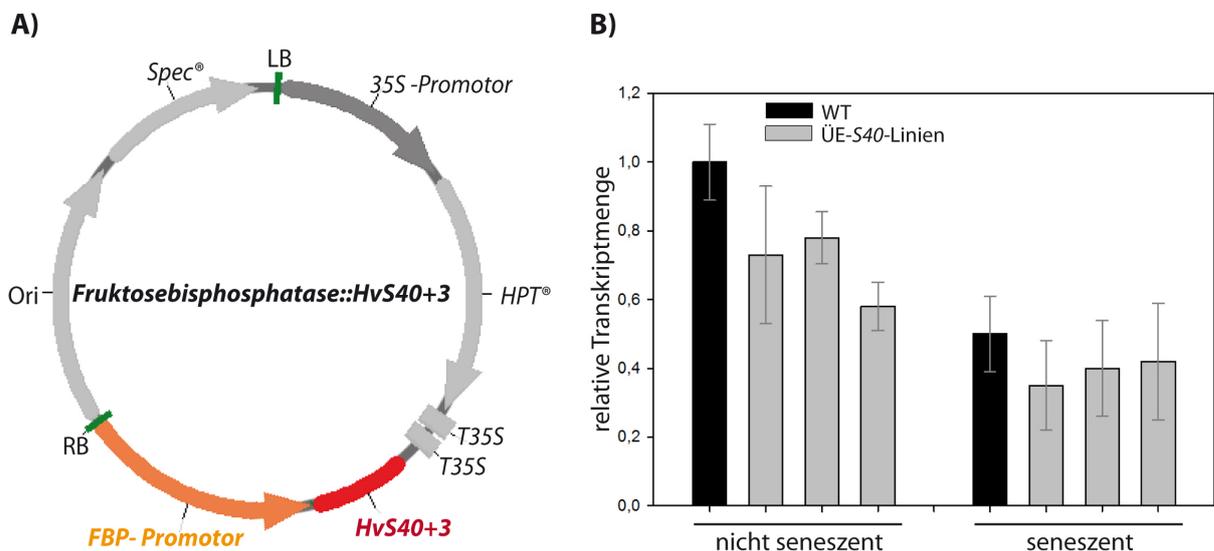


Abbildung (30) A) Schematische Darstellung des Überexpression-Konstruktes, das zur stabilen Transformation von Gerste eingesetzt wurde. Die kodierende Sequenz von *HvS40* steht hier unter der Kontrolle des *Fruktosebisphosphatase*-Promotors. B) Relative Transkriptmenge der *Fruktosebisphosphatase* im jungen und seneszierenden Wildtyp und in Überexpressions-Linien. Diese wurde mit Hilfe der quantitativen *Real Time*-PCR ermittelt. Die Standardabweichung ergibt sich aus drei technischen Replikaten.

Die relative Transkriptmenge der *FBP* reduzierte sich in seneszierenden Primärblättern des Wildtyps und der *FBP:ÜE-S40*-Linien im Vergleich zu nicht seneszenten Blättern um die Hälfte (Abb. 30 B). Dies bedeutet, dass die *FBP*-Promotoraktivität während der künstlich durch Dunkelheit induzierten Seneszenz abnahm. Dennoch war die Restaktivität ausreichend, um in den Transformanten eine größere Menge an *S40*-Transkripten zu erhalten, wie im nächsten Abschnitt beschrieben wird. Des Weiteren war zu beobachten, dass etwas weniger *FBP*-Transkripte in nichtseneszenten Primärblättern der *ÜE*-Linien enthalten waren als in nichtseneszenten Primärblättern des Wildtyps (Abb. 30 B).

3.6.6.2 *S40*-Expressionsniveau in den *ÜE*-Linien Der erhöhte relative *S40*-Transkriptgehalt wurde in sieben Tage alten Primärblättern der *FBP:ÜE-S40*-Linien mittels qRT-PCR überprüft (siehe 2.4.12). Durch den Einsatz von spezifischen Oligonukleotiden wurde dabei ein cDNA-Sequenzabschnitt amplifiziert, der in beiden Leserahmen wiederzufinden ist. Wie in 3.6.3.2 beschrieben, kann mit dieser Methode nicht zwischen der Expression der verschiedenen Leserahmen unterschieden werden. Deshalb wird im Folgenden zusammengefasst von einer *S40*-Transkriptmenge gesprochen. In den Überexpressions-Linien 2, 4, 10 und 14 konnte mit Hilfe der qRT-PCR im Vergleich zum Wildtyp ein erhöhter *S40*-Transkriptgehalt nachgewiesen werden, wobei die Linie 14 das stärkste und die Linie 2 das schwächste Überexpressions-Niveau zeigte (Abb. 31). Die relative Transkriptmenge von *S40* war dabei in der *ÜE-S40-2*-Linie um das 8-fache, in der Linie 4 um das 20-fache, in der Linie 10 um das 60-fache und in der Linie 14 um das 70-fache verstärkt (Abb. 31).

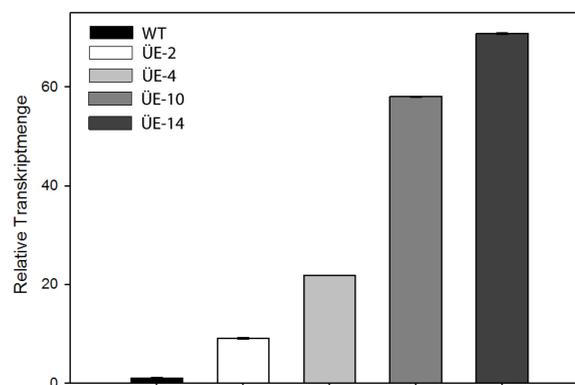


Abbildung (31) Relative *S40*-Transkriptmenge in sieben Tage alten *FBP:ÜE-S40*-Linien der Gerste. Standardabweichungen berechnen sich aus drei technischen Replikaten.

3.6.7 Charakterisierung des Phänotyps

3.6.7.1 Dunkelinduzierte Seneszenz Um zu überprüfen, welchen Phänotyp die neuen Überexpressionslinien während der durch Dunkelheit induzierten Seneszenz zeigen, wurden 7 d alte Primärblätter der FBP:ÜE-*S40*-Linien 2, 4, 10 und 14 sowie des Wildtyps für 72 h dunkel gestellt. Die photochemische Effizienz des Photosystems II gilt als Parameter der Seneszenz. Sie wurde mittels Imaging PAM gemessen (siehe 2.3.7) und ist in Abbildung 32 A als F_v/F_m -Wert angegeben. Es zeigte sich, dass die FBP:ÜE-*S40*-Linien ebenso wie die RNAi-*S40*-Linien einen funktionalen *Stay Green*-Phänotyp während der durch Dunkelheit induzierten Seneszenz aufwiesen (Abb. 32 A). Im Scan-Bild ist die bereits eingetretene Vergilbung des Wildtyps zu erkennen, während im Vergleich dazu die Primärblätter der ÜE-*S40*-Linien noch grün sind (Abb. 32 B).

Die dunkelgestellten Primärblätter der FBP:ÜE-*S40*-Linien und des Wildtyps wurden in Bezug auf ihre relative *S40*-Transkriptmenge untersucht. Dazu wurde RNA aus den Blättern gewonnen (siehe 2.4.11) und in cDNA umgewandelt, die dann mit den in 3.6.3.2 beschriebenen spezifischen Oligonukleotiden in einer quantitativen Echt-Zeit PCR amplifiziert wurde (siehe 2.4.12).

Die *S40*-Transkriptmenge stieg wie erwartet im Wildtyp nach 72 h Dunkelinkubation um ein Vielfaches an, im Vergleich zur Kontrolle liegt die relative *S40*-Transkriptmenge hier um ein 280-faches vor. Die für 72 h dunkel gestellten Primärblätter der FBP:ÜE-*S40*-Linien wiesen einen noch höheren *S40*-Transkriptgehalt auf als der Wildtyp (Abb. 32 C). Im Rahmen der Dunkelinkubation ist jedoch der Unterschied in der *S40*-Transkriptmenge zwischen Wildtyp- und ÜE-Linien nicht mehr so drastisch wie es zuvor bei den nicht seneszenten Primärblättern der Fall war (Abb. 31).

Dessen ungeachtet führt ein von Beginn an höherer Gehalt von *S40* zu einem verzögerten Seneszenzprozess. *S40* wirkt somit negativ regulierend auf den Verlauf der Seneszenz.

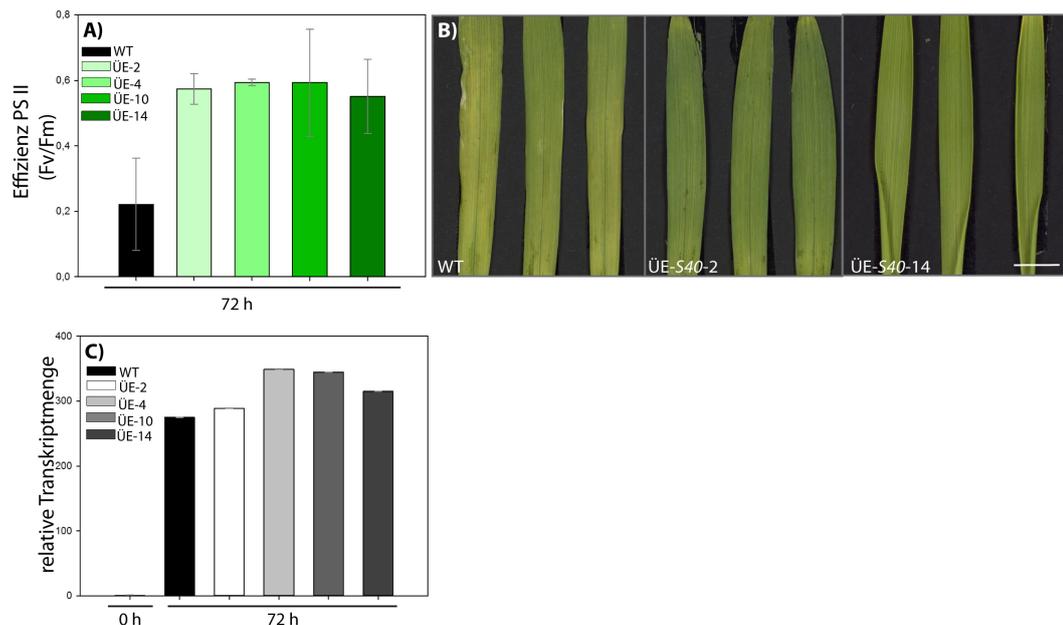


Abbildung (32) Dunkelinkubation der FBP:ÜE-*S40*-Linien. A) Photochemische Effizienz des PS II nach 72 h Dunkelinkubation (acht technische Replikate) und B) Scan der für 72h dunkelinkubierten Primärblätter von Wildtyp und der ÜE-*S40*-2 Linie. C) Bestimmung der relativen *S40*-Transkriptmenge nach 72 h Dunkelinkubation mit Hilfe der qRT-PCR. Standardabweichungen ergeben sich aus drei technischen Replikaten.

3.6.7.2 Natürliche Seneszenz Um den Seneszenzverlauf der FBP:ÜE-*S40*-Linien unter natürlichen Bedingungen beobachten zu können, wurden Pflanzen der Linien 2, 4, 10 und 14 für 50 d im Gewächshaus bei einer Lichtintensität von ca. 100 μ E angezogen. Nach 50 d Anzucht im Gewächshaus zeigten die ÜE-Linien im Vergleich zum Wildtyp eine deutliche Verzögerung des Seneszenzprozesses (Abb. 33 A). Von den vier ÜE-Linien wiesen die Linien 4 und 14 den ausgeprägtesten Phänotyp auf, wie sich deutlich im Scan-Bild der einzelnen Blätter erkennen lässt (Abb. 33 B). Der Chlorophyll-Verlust in den Blättern des Wildtyps ist deutlich vorangeschritten, während in den Blättern der ÜE-Linien nur erste Anzeichen des Chlorophyll-Abbaus zu erkennen sind. In dem untersuchten Blatt der Linie ÜE-*S40*-4 waren überhaupt keine seneszierenden Bereiche auszumachen. Die neuen FBP:ÜE-*S40*-Linien bestätigten damit den zuvor beobachteten *Stay Green*-Phänotyp der Ubi:ÜE-*S40*-Linien während der natürlichen Seneszenz (siehe 3.6.5).

Die Überexpression des *HvS40+3*-Leserahmens hatte auch Einfluss auf die Entwicklung der Ähre. Einhergehend mit dem verlangsamten Seneszenzverlauf war die Ährenentwicklung in den ÜE-Linien im Vergleich zum Wildtyp verzögert (Abb. 33 C). Auch hier zeigten die Linien 4 und 14 den stärksten Phänotyp.

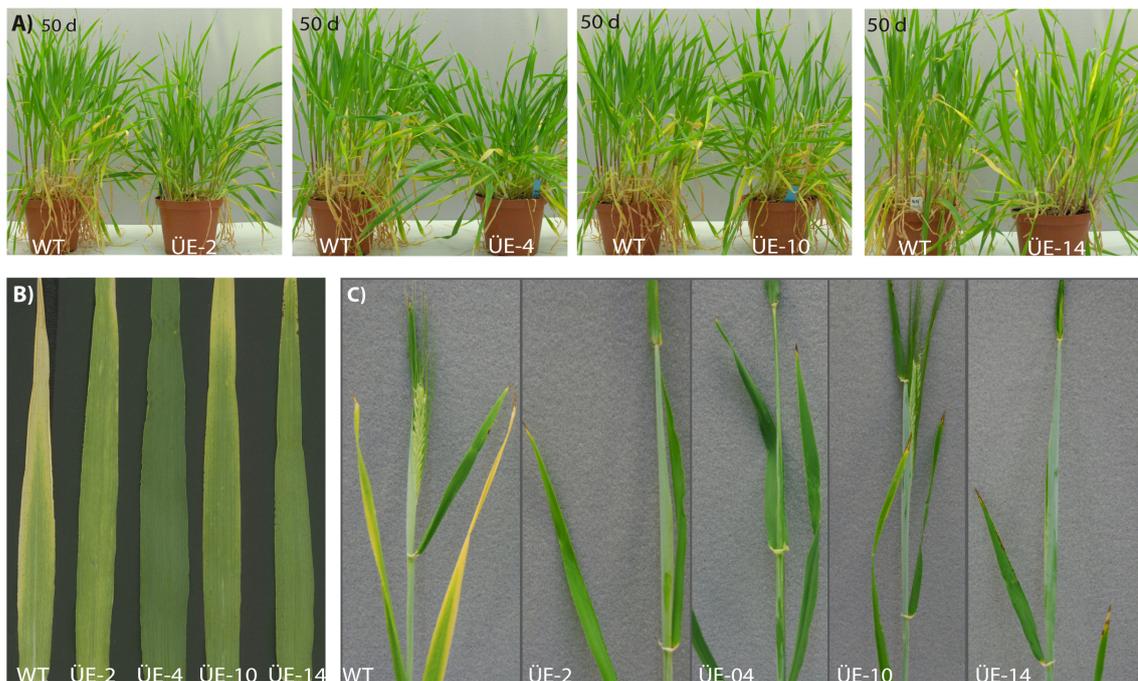


Abbildung (33) A) *Stay-Green*-Phänotyp der ÜE-*HvS40*-Linien während der Anzucht im Gewächshaus. Es wurden von jeder Linie jeweils 20 Pflanzen in einem Topf angezogen. B) Scan-Bilder des vierten Blattes (vom Fahnenblatt aus gezählt) von 50 d alten Pflanzen. C) Bei den ÜE-*HvS40*-Pflanzen beobachtete Verzögerung in der Ährenentwicklung.

Die seneszierenden Blätter des Wildtyps und der FBP:ÜE-*S40*-Linien wurden im Hinblick auf ihre *S40*-Transkriptmenge untersucht. Dafür wurde RNA aus ihnen gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Diese wurde mittels der spezifischen Oligonukleotide, die beide Leserahmen umfassen, in einer qRT-PCR amplifiziert (siehe 2.4.12). Wider Erwarten zeigte sich, dass in 50 d alten Blättern der Überexprimierer signifikant weniger bzw. in einem Fall etwa die gleiche relative Menge an *S40*-Transkripten vorlag wie im Wildtyp (Abb. 34 B). In 7 d alten Primärblättern der FBP:*S40*-ÜE-Linien hingegen ist die relative *S40*-Transkriptmenge im Ver-

gleich zu Primärblättern des Wildtyps deutlich erhöht (Abb. 34 B).

In den Transformanten wird neben der künstlich eingebrachten *S40*-Sequenz auch das endogene *S40* exprimiert, da der genetische Hintergrund dieser Pflanzen der Wildtyp *cv. Golden Promise* ist. Um zwischen der Expression der künstlich eingebrachten und der endogenen Sequenz unterscheiden zu können, wurde eine weitere qRT-PCR mit einem zweiten Paar spezifischer Oligonukleotide durchgeführt. Diese Oligonukleotide wurden so entworfen, dass sie einen Bereich zwischen der 3' untranslatierten Region (UTR) und der kodierenden *S40*-Sequenz amplifizieren (Abb. 34 A, Primer-Paar 2). Da das vektorkodierte *S40*-Transkript keine UTR besitzt, kann nur das endogene *S40* in einer qRT-PCR mit diesen Oligonukleotiden amplifiziert werden. Mit dieser Oligonukleotid-Kombination konnte für die 7 d alten Blätter der ÜE-Linien keine hohen *S40*-Transkriptmengen ermittelt werden, für seneszierende Blätter des Wildtyps hingegen schon (Abb. 34 C). Folglich amplifizierten die gewählten Oligonukleotide ausschließlich das endogene *S40*-Transkript.

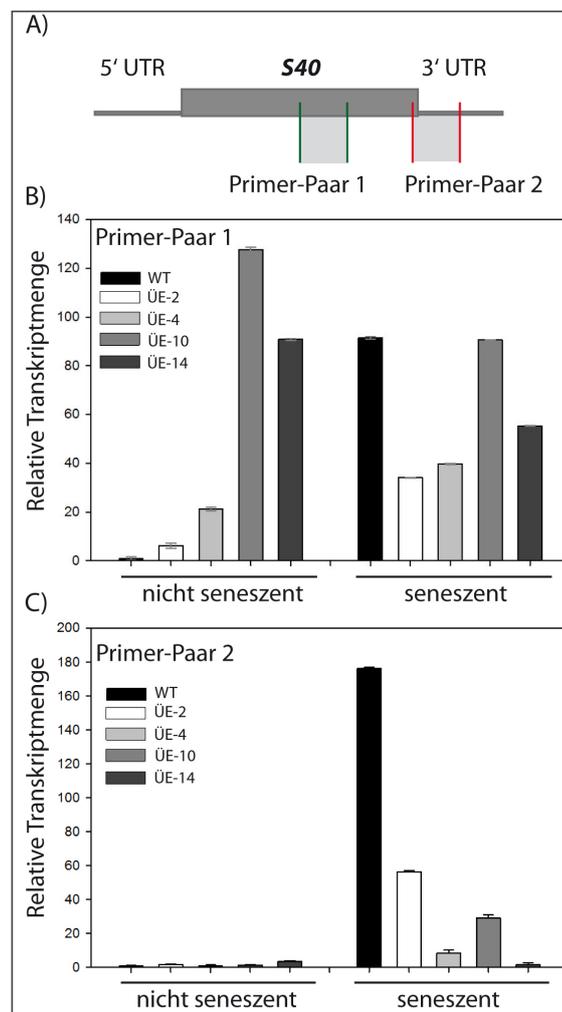


Abbildung (34) *S40*-Transkriptniveau in seneszierenden FBP:ÜE-*S40*-Linien im Vergleich zum Wildtyp. A) Hybridisierungsstellen der Primerpaare, die für die Ermittlung der *S40*-Transkriptmenge verwendet wurden. B) Relative *S40*-Transkriptmenge, die mit dem Primer-Paar 1 ermittelt wurde. C) Mit dem Primer-Paar 2 wurde die relative Menge des endogenen *S40*-Transkriptes bestimmt. Die Standardabweichungen beider qRT-PCRs ergeben sich aus drei technischen Replikaten.

In den seneszierenden Blättern der FBP:*S40*-ÜE-Linien liegt die endogene *S40*-Transkriptmenge deutlich unter dem Niveau der *S40*-Transkriptmenge der seneszierenden Wildtypblätter (Abb.

34 C). Im Zusammenhang mit dem beobachteten *Stay Green*-Phänotyp könnte dies bedeuten, dass die Pflanzen, bedingt durch eine Überexpression des Leserahmens *HvS40+3*, ihr biologisches Alter nicht „kennen“. In Folge dessen wird die Expression seneszenzassoziierter Gene, zu denen *S40* selbst zählt, nicht eingeleitet.

3.6.8 Zusammenfassung der Phänotypisierung

Die RNAi-*S40*-Linien und die ÜE-*S40*-Linien zeigten unter verschiedenen Anzuchtbedingungen unterschiedliche Phänotypen, die in der Abbildung 35 zur besseren Übersicht schematisch zusammengefasst worden sind. Bei Anzucht unter natürlichen Bedingungen im Gewächshaus bei einer Lichtintensität von ca. 100 μE zeigten die RNAi-*S40*-Linien 7 und 11 im Vergleich zum Wildtyp einen schneller seneszierenden Phänotyp (siehe 3.6.4.2). Im Gegensatz dazu wiesen diese Linien einen funktionalen *Stay Green*-Phänotyp auf, wenn in abgeschnittenen Primärblättern die Seneszenz durch Dunkelheit künstlich induziert wurde (siehe 3.6.4.1).

Die Ubi:ÜE-*S40*- sowie die FBP:ÜE-*S40*-Linien zeigten während der natürlichen Seneszenz eine Verzögerung im Verlauf der Seneszenz (siehe 3.6.5). Sie blieben länger grün als der Wildtyp und ihre Ährenentwicklung war verzögert. Die FBP:*S40*-ÜE-Linien 2 ,4, 10 und 14 zeigten während der durch Dunkelheit induzierten Seneszenz wie die Pflanzen der RNAi-Linien einen funktionalen *Stay Green*-Phänotyp (siehe 3.6.7.1).

Linie \	natürliche Seneszenz	dunkelinduzierte Seneszenz
RNAi- <i>HvS40</i>		
ÜE- <i>HvS40</i>		
Wildtyp cv. <i>Golden Promise</i>		

Abbildung (35) Schematische Darstellung der unterschiedlichen Seneszenz-Phänotypen der RNAi-*S40*- und ÜE-*S40*-Linien im Vergleich zum Wildtyp. Gelb: stark seneszent; hellgrün: leicht seneszent; dunkelgrün: nicht seneszent.

3.7 Versuche zum Nachweis der HvS40-Proteine

3.7.1 Der gegen HvS40 gerichtete Antikörper

Um das HvS40-Protein immunologisch nachzuweisen, wurde ein über eine Sulfolink-Säule aufgereinigter Antikörper eingesetzt, der bereits 2002 hergestellt wurde. Er wird im Folgenden als α -HvS40 bezeichnet. Dieser Antikörper ist gegen das in *E.coli* überexprimierte HvS40-Protein gerichtet (AG Krupinska; Herstellung des AK: Pierce Biotechnology, Bonn). Das HvS40-Protein zeigte in Fusion mit GFP eine subzelluläre Lokalisation im Zellkern (siehe 3.5). Für den immunologischen Nachweis des nativen HvS40-Proteins wurden daher Zellkerne aus unterschiedlichem Pflanzenmaterial gewonnen. Zellkerne aus 7 d alten, nicht-seneszierendem Blattmaterial sowie aus Primärblättern, in denen die Seneszenz durch Dunkelheit künstlich induziert wurde und Zellkerne aus 7 d alten Primärblättern der *S40*-Überexpressions-Linie 10 wurden zusammen mit Plastidenproteinen aus nicht-seneszierenden und seneszierenden Blättern über eine SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 2.5.7). Es folgte die Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran, die daraufhin mit α -HvS40 inkubiert wurde (siehe 2.5.9). Das Ergebnis ist in Abbildung 36 gezeigt.

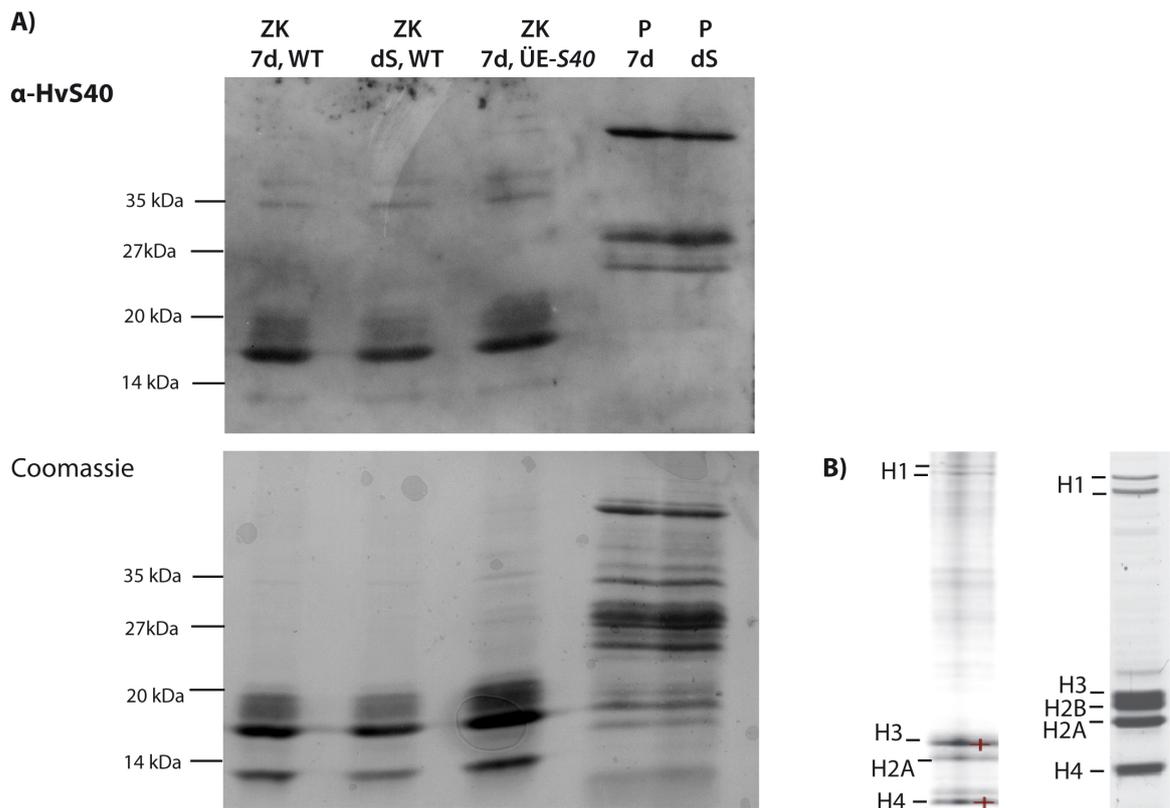


Abbildung (36) A) Immunologische Untersuchungen mit Zellkernproteinen (ZK) und Plastidenproteinen (P) aus sieben Tage alten (7d) und zur Einleitung der Seneszenz dunkelgestellten Primärblättern (dS) des Wildtyps sowie Kernproteine der ÜE-*S40*-Linie 10. Es wurden jeweils 20 μ g Kernprotein und 15 μ g Plastidenprotein auf ein 15%-Polyacrylamidgel aufgetragen, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die Immundetektion erfolgte mit dem aufgereinigten HvS40-Antikörper und dem ECL-System. B) Kernproteine aus *Medicago truncatula* und HeLa-Zellen, die über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt wurden (Repetto *et al.*, 2008; Shechter *et al.*, 2007)

Dem HvS40-Protein wird mit Hilfe des Programms ExpASy eine theoretische Größe von 15,4 kDa vorhergesagt. In allen Zellkern-Proben ließen sich mit α -HvS40 mehrere Banden detektieren, wovon jeweils eine einer Größe von ungefähr 16 kDa entsprach (Abb. 36 A). Diese Bande war nicht in den Plastidenfraktionen zu finden, weshalb ausgeschlossen werden kann, dass es sich hierbei um eine Kontamination mit plastidären Protein handelte. Vergleicht man jedoch die in den Zellkernen detektierten 16 kDa-Banden miteinander, so fällt auf, dass sie wider Erwarten immer die gleiche Intensität besitzen. Man würde erwarten, dass sowohl in den Kernproben aus senescentem Blattmaterial (ZK dS) als auch in den Kernproben der Überexprimierer (ÜE-S40) deutlich mehr HvS40-Protein zu finden ist als in den Kernproben aus jungem, nicht-seneszierendem Blattmaterial (ZK 7d). Auch in der Coomassie-Färbung des Polyacrylamidgels sind die 16 kDa großen Proteine bereits deutlich zu erkennen und auch hier besitzen sie alle die gleiche Intensität. Mit sehr großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich bei den prominenten Banden um Histone, die abundantesten Proteine im Zellkern. Diese besitzen Größen von 10 bis 37 kDa. Zum Vergleich sind Zellkernextrakte aus *Medicago truncatula* und aus HeLa-Zellen aus zwei Veröffentlichungen gezeigt, die sich in einer SDS-PAGE sehr ähnlich auftrennen wie die Zellkernproteine der Gerste (Abb. 36 B; Repetto *et al.* (2008); Shechter *et al.* (2007)).

Da kein eindeutiges Signal für das HvS40-Protein zu ermitteln war, wurde untersucht, ob sich eines der zusätzlich neben den Histonproteinen nachgewiesenen Proteine in seiner Intensität vermindern ließe, wenn man α -HvS40 zuvor mit dem rekombinanten Protein aus *E.coli* inkubierte. Das rekombinante HvS40-Protein musste dafür erneut aus *E.coli* gewonnen werden. Für die Überexpression wurde dabei dasselbe *HvS40*-Konstrukt verwendet, das bereits 2002 für die Herstellung des Antikörpers diente. Es handelt sich dabei um den Vektor pET-14b, in den über die XhoI-Schnittstelle die *HvS40*-Sequenz hineinkloniert wurde (Kilbienski, 2007). Durch Zugabe von 1 mM IPTG kann am T7-Promotor des pET14b-Vektors die erhöhte Expression des heterologen Gens induziert werden (siehe 2.5.1). Das rekombinante HvS40-Protein besitzt nach der Synthese in *E.coli* am N-Terminus eine Sequenz, die aus sechs Histidinen besteht. Dieser sogenannte Histidin-Tag diente der Gewinnung und der Isolierung des rekombinanten Proteins mit Hilfe von Ni-NTA und Imidazol (siehe 2.5.2).

In Abbildung 37 sind *E.coli*-Proteinextrakte gezeigt, die jeweils 2015 und 2002 vor und nach IPTG-Zugabe gewonnen und über eine SDS-PAGE aufgetrennt wurden. 2002 konnte so ein Protein identifiziert werden, dass nach IPTG-Zugabe ankonzentriert wird (Abb. 37 A2). Dieses Protein mit derselben Größe konnte auch 2015 überexprimiert werden (Abb. 37 A1). Dabei fiel auf, dass die Größe der Proteinbande mit 26 kDa deutlich von der berechneten Größe des rekombinanten Proteins (19 kDa) abwich. Das vermeintliche rekombinante Protein konnte, wie bereits 2002 geschehen, mit Hilfe von Ni-NTA vollständig aus den Bakterienlysaten gefällt werden (Abb. 37 B1 und B2). Nach einem Waschschriff (W) wurde das Protein schließlich mit Imidazol aus der Lösung eluiert (E). Proteinproben beider Schritte wurden über SDS-PAGEs aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (Abb. 37 B1 und B2). In Ermangelung eines His-Tag-Antikörpers wurde 2015 zur Überprüfung des erhaltenen rekombinanten Proteins eine Immundetektion mit dem gegen dieses Protein gerichteten Antikörper α -HvS40 durchgeführt. Dieser erkannte in einer Immundetektion das Protein (Abb. 37 C1).

Es blieb jedoch die Frage, ob es sich bei dem 2002 und 2015 überexprimierten Protein, gegen das α -HvS40 gerichtet ist, überhaupt um das rekombinante HvS40-Protein handelt. Neben dem

großen Unterschied in der berechneten (19 kDa) und der beobachteten Größe des erhaltenen Proteins (26 kDa), fiel auf, dass dieses Protein in Bakterienextrakten bereits vor der Zugabe von IPTG mit dem Antikörper nachweisbar war (Abb. 37 C2). 2002 wurde keine Negativ-Kontrolle der IPTG-Induktion durchgeführt. Während dieser zieht man Bakterien ohne IPTG-Zugabe parallel zu den Bakterien an, die mit IPTG versetzt wurden. Im Vergleich beider Anzuchten erkennt man, ob die (Über-)Produktion eines Proteins spezifisch von der IPTG-Zugabe abhängt.

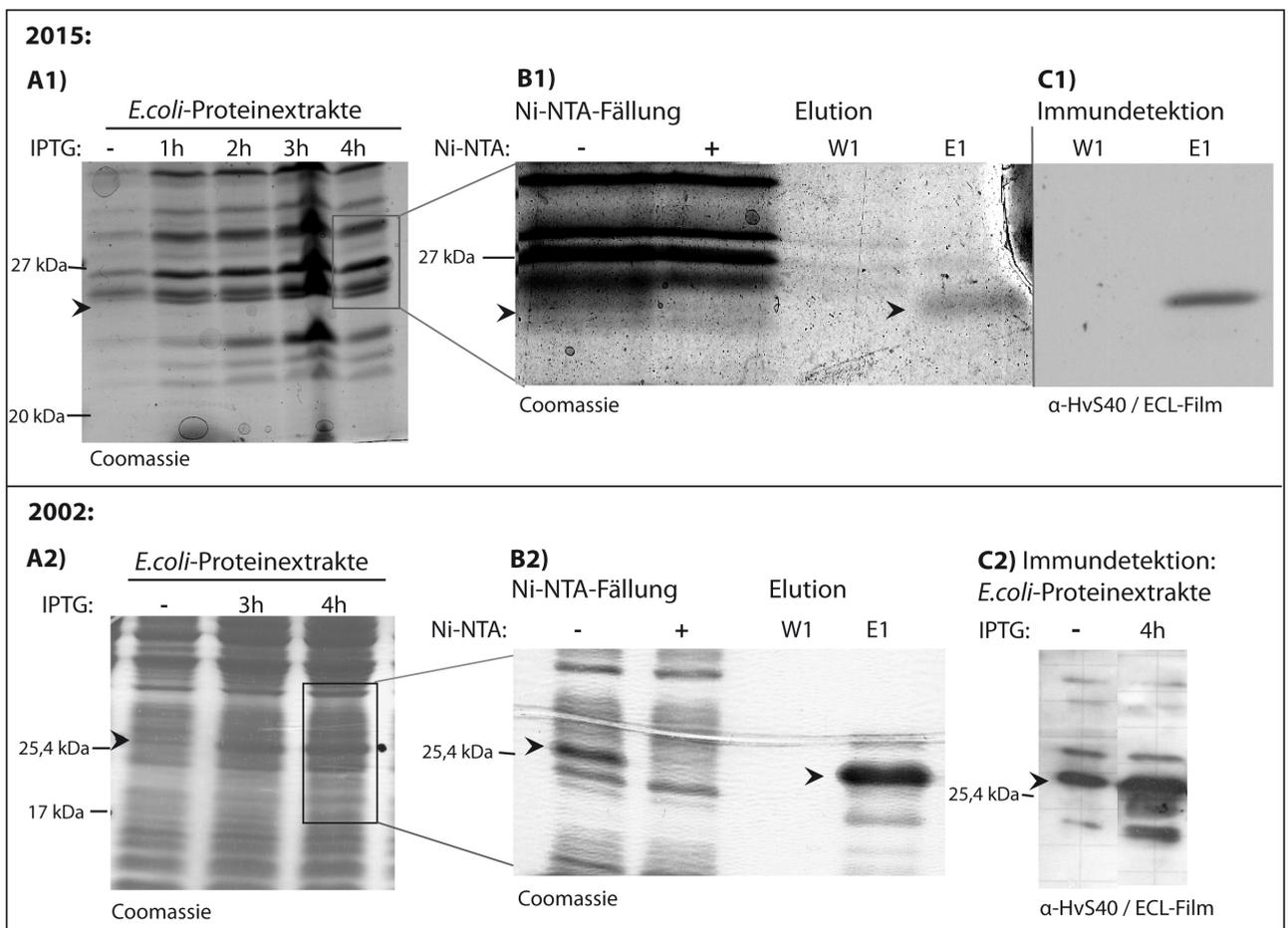


Abbildung (37) Vergleich der 2002 und 2015 durchgeführten Aufreinigungen eines in *E. coli* synthetisierten Proteins. A1, A2) Gelelektrophoretisch aufgetrennte und mit Coomassie angefärbte *E. coli*-Proteinextrakte vor (-) und nach der Zugabe von 1 mM IPTG. B1, B2) Proteinextrakte, vor (-) und nach (+) Bindung des Proteins an Ni-NTA sowie nach Waschen (W) und nach Elution des Proteins mit Imidazol (E). Diese wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. C1) Die Proteine der Wasch- und der Elutionsfraktion wurden auf eine Membran übertragen, gezeigt ist der ECL-Film nach Immundetektion mit α -HvS40. C2) *E. coli*-Proteinextrakte vor (-) und nach Zugabe (4h) von 1 mM IPTG wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Gezeigt ist der ECL-Film nach Immundetektion mit α -HvS40.

Diese Ergebnisse und die Tatsache, dass der Antikörper selbst in der *S40*-Überexpressionslinie kein S40-Protein erkennt, führten zu der Annahme, dass es sich bei dem vermeintlich rekombinanten Protein um ein Protein von *E. coli* handeln könnte. Bolanos-Garcia und Davies (2006) beschreiben gleich mehrere native *E. coli*-Proteine, die aufgrund einer Abfolge mehrerer Histidin-Reste ebenfalls stark an Ni-NTA binden. Wenn das bakterielle Protein eine ähnliche Größe wie das rekombinante Protein besitzt oder in einer hohen Konzentration vorkommt, führt dies in den meisten Fällen zu einer ausschließlichen Aufreinigung des bakteriellen Proteins (Robichon *et al.*, 2011). Zu den Beispielen an häufig durch Bindung an Ni-NTA mit aufgereinigten bakteriellen Proteinen zählt die Peptidoylprolin-Isomerase (SlyD). SlyD besitzt ein Molekulargewicht von

21 kDa, welches dem Molekulargewicht des rekombinanten S40-Proteins mit 19 kDa sehr nahe kommt, und ist als Hauptkontaminant von Ni-NTA-basierten Aufreinigungsmethoden bereits länger bekannt (Porath, 1988; Arnold, 1991). Dieses Protein läuft während einer SDS-PAGE aufgrund seiner sehr sauren Eigenschaften auf einer Höhe zwischen 26-27 kDa (Robichon *et al.*, 2011), was der Größe des oben beschriebenen Proteins entspricht (Abb. 37 A1, A2). Mit sehr großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich bei dem Protein, gegen das der α -“HvS40“-Antikörper von 2002 gerichtet ist, um SlyD von *E. coli*. Der Antikörper konnte deshalb nicht zur Detektion von HvS40 herangezogen werden.

3.7.2 Charakterisierung eines Antikörpers, der gegen eine Peptidsequenz des alternativen HvS40-Proteins gerichtet ist

Die Herstellung eines polyklonalen Alt-S40-Antikörpers mit Hilfe eines synthetischen Peptids erfolgte in Kaninchen (BioGenes, Berlin). Dabei war zu beachten, dass das zur Antikörpersynthese verwendete Epitop nicht in der plastidären Transitsequenz von Alt-HvS40 wiederzufinden ist, da der Nachweis des Proteins auch nach seiner Prozessierung in den Chloroplasten möglich sein sollte. Mit den Programmen iPSORT und ChloroP wurden daher Vorhersagen zu möglichen Prozessierungsstellen von Alt-HvS40 getroffen, sie sind in der Abbildung 38 A mit zwei Pfeilen gekennzeichnet. Als Epitop diente schließlich der C-terminal gelegene Sequenzbereich SDGGGSPGGRRRPT (Abb. 38 A). Ein Vergleich mit dem Proteom von *Hordeum vulgare* ergab, dass nur Alt-HvS40 diese spezifische Peptidsequenz aufweist. Der über eine CNBr-Sepharose-Affinitätssäule von der Firma BioGenes aufgereinigte Antikörper wird im Folgenden als α -Alt-S40 bezeichnet.

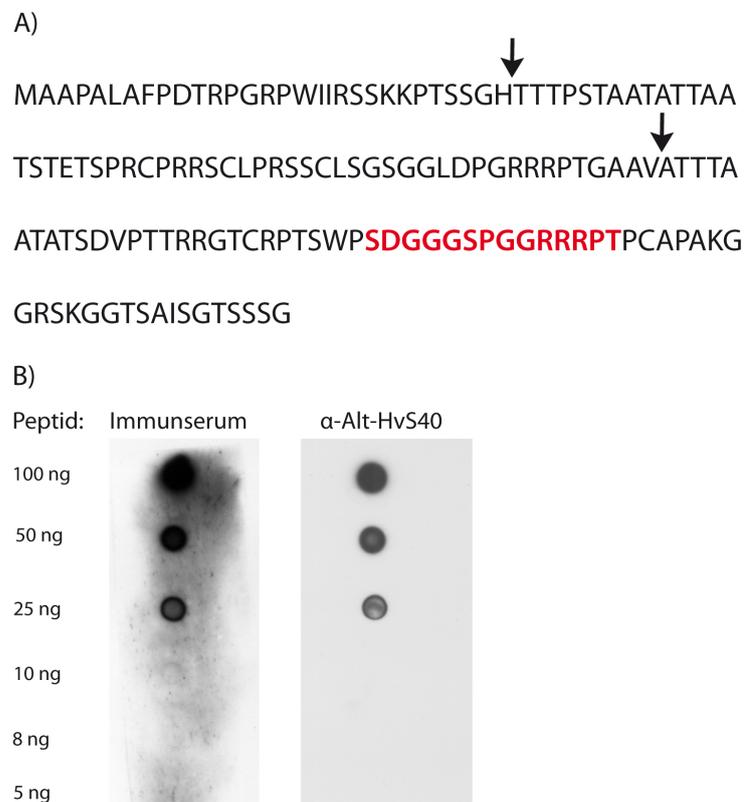


Abbildung (38) A) Aminosäuresequenz von Alt-HvS40. Rot dargestellt ist der Sequenzbereich, der für die Synthese eines künstlichen Peptids verwendet wurde und gegen den der Alt-HvS40-Antikörper gerichtet ist. Die Pfeile markieren die vorhergesagten Prozessierungsstellen (iPSORT, ChloroP). B) Untersuchungen zur Sensitivität des aufgereinigten Antikörpers im Vergleich zum Rohserum. 5 bis 100 ng des synthetisierten Peptids wurden auf Nitrocellulose-Membranen aufgetragen. Diese wurde mit dem aus Kaninchen gewonnenen Rohserum des Antikörpers bzw. mit dem aufgereinigten α -Alt-S40 inkubiert. Die Antikörperdetektion erfolgte mit dem ECL-System.

Um zunächst die Sensitivität des aufgereinigten Antikörpers zu testen, wurden 5 bis 100 ng des synthetischen Peptids, gegen das der Antikörper gerichtet ist, direkt auf Nitrocellulose-Membranen aufgetragen. Daraufhin wurden die Membranen mit dem den Antikörper enthaltenden Immunserum und dem aufgereinigten α -Alt-S40 inkubiert. Die Detektion der Chemielumineszenz-Signale erfolgte mit dem ECL-System (siehe 2.5.9). Das Alt-HvS40-Peptid ließ sich mit dem aufgereinigten Antikörper bis zu einer Konzentration von 25 ng nachweisen (Abb. 38 B). Bei

Verwendung des Immunserrums konnte das Peptid bis zu einer Konzentration von 10 ng nachgewiesen werden (Abb. 38 B). Die Sensitivität des Antikörpers ließ sich also durch die Aufreinigung nicht verstärken, jedoch konnte der unspezifische Hintergrund deutlich reduziert werden.

3.7.3 Versuche zum immunologischen Nachweis des Alt-HvS40-Proteins in Plastiden und im Zellkern

α -Alt-S40 erkennt das synthetische Peptid, gegen das er gerichtet ist (siehe 3.7.2). Versuche mit Proteinen aus Chloroplastenfraktionen der Gerste sollten zeigen, ob der Antikörper auch in der Lage ist, das native Alt-HvS40 Protein zu erkennen. Denn computergestützte Vorhersagen und Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation des Alt-HvS40-Proteins unterstützen die Annahme, dass Alt-HvS40 während der Seneszenz in die Chloroplasten transportiert wird (siehe 3.4.3 und 3.5). Chloroplasten wurden aus sieben Tage alten Primärblättern, aus für mehrere Stunden dunkelgestellten Primärblättern sowie aus natürlich seneszierenden Primärblättern des Wildtyps isoliert (siehe 2.5.6). Die daraus gewonnenen Proteinextrakte wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 2.5.7) und auf Nitrocellulose-Membranen übertragen, die daraufhin entweder mit α -Alt-S40 oder dem Prä-Immunserrum inkubiert wurden (siehe 2.5.9).

In allen Chloroplastenfraktionen konnte mit α -Alt-S40 ein Protein mit einer ungefähren Größe von 13 kDa nachgewiesen werden, das in Abbildung 39 mit einem Pfeil gekennzeichnet ist. Dieses Protein ließ sich mit dem Prä-Immunserrum nicht nachweisen (Abb. 39). Die mit dem Programm iPSORT vorhergesagte Größe des prozessierten Proteins beträgt 11,4 kDa. Es ist zu beachten, dass es sich hierbei um eine Vorhersage handelt. Die tatsächliche Prozessierungsstelle des Proteins muss noch experimentell nachgewiesen werden. Der Unterschied in der vorhergesagten und der tatsächlich beobachteten Größe des prozessierten Proteins schließt daher die Möglichkeit, dass es sich um das Alt-HvS40-Protein handelt, nicht aus.

In der nicht seneszenten Chloroplastenprobe ließ sich deutlich weniger von dem Protein nachweisen als in Proben, in denen die Seneszenz künstlich induziert wurde oder die aus natürlich seneszierendem Material gewonnen wurden (Abb. 39). Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass das alternative S40-Protein während der Seneszenz in die Chloroplasten importiert wird (siehe 3.5.4). Es könnte sich also bei der nachgewiesenen Bande um das alternative S40 Protein handeln. Das Vorkommen des Proteins in der nicht seneszenten Probe könnte damit zu erklären sein, dass es auch im grünen Blatt bereits einzelne Zellen gibt, die seneszenzieren oder die unter biotischem/abiotischem Stress stehen. In der Probe, die aus natürlich seneszierendem Blattmaterial gewonnen wurde, ließ sich mit dem Antikörper eine Doppelbande bei 13 kDa nachweisen. Diese ist in Abbildung 39 mit zwei Pfeilen gekennzeichnet. Alt-HvS40 weist wie HvS40 mehrere Phosphorylierungs- und weitere posttranslationale Prozessierungsstellen auf (siehe Tabelle 9 und Anhang, Abb. 48). Bei dem etwas kleineren Protein könnte es sich um ein weniger posttranslational modifiziertes Alt-HvS40 handeln, das in einer SDS-PAGE schneller aufgetrennt wird.

In allen Chloroplastenextrakten konnten noch weitere Proteine mit unterschiedlichen Größen detektiert werden. Sie sind in Abbildung 39 zur besseren Übersicht mit unterschiedlichen Symbolen markiert. Da diese Proteine in allen Proben gleich stark auftraten und sich ebenfalls mit dem Prä-Immunserrum nachweisen ließen, handelte es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um unspezifische Signale.

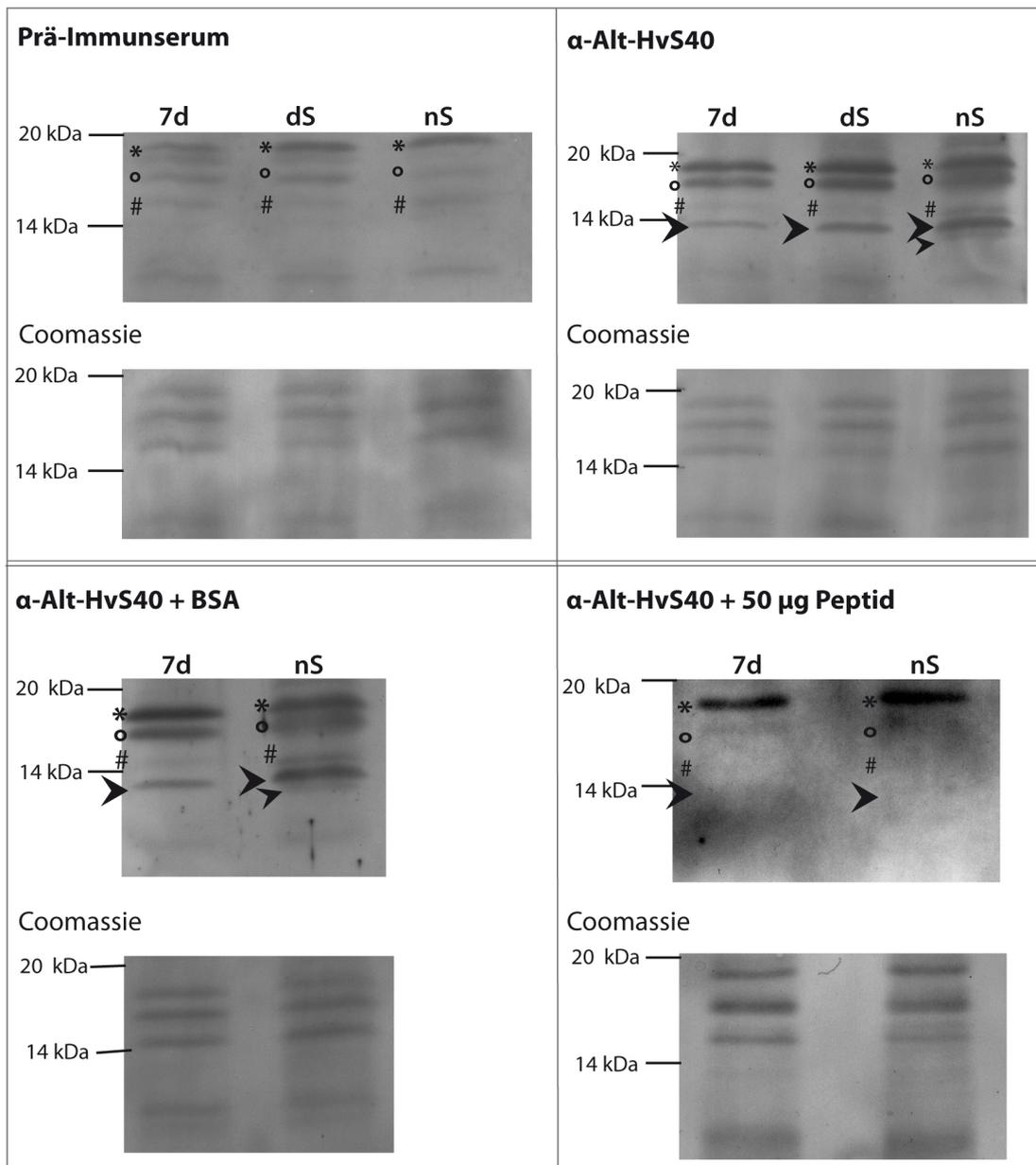


Abbildung (39) Untersuchungen zur Spezifität der Immunreaktion des Antikörpers, der gegen eine Peptidsequenz des Alt-HvS40-Proteins gerichtet ist. Chloroplastenfractionen wurden aus sieben Tage alten Primärblättern der Gerste (7d), aus dunkel gestellten Primärblättern der Gerste (dS) und aus natürlich seneszierenden Primärblättern gewonnen (nS). Es wurden jeweils 15 µg Protein auf ein 15%-Polyacrylamidgel aufgetragen, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Nachweis des Proteins erfolgte mit dem aufgereinigten Alt-HvS40-Antikörper und zur Kontrolle der Spezifität mit dem Prä-Immunsrum. Zur weiteren Kontrolle der Spezifität wurde der Antikörper zuvor mit 50 µg Peptid bzw. BSA vorinkubiert. In der Abbildung sind Autoradiogramme nach ECL-Detektion gezeigt sowie die zur Ladungskontrolle mit Coomassie gefärbten Polyacrylamidgele. Die Alt-HvS40-Signale sind mit Pfeilen markiert.

Zur weiteren Überprüfung der Spezifität des Antikörpers wurden zwei weitere gleich beladene Membranen hergestellt, auf die aufgetrennte Proteine aus Chloroplasten transferiert wurden. Vor der Immundetektion wurde der Antikörperlösung Peptid oder BSA als spezifische beziehungsweise unspezifische Kompetitoren zugesetzt. Die Antikörperlösungen wurden, bevor sie zur Membran gegeben wurden, für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Alt-S40-Peptid oder BSA vorinkubiert. Da das 13 kDa große Protein nach Vorinkubation der Antikörperlösung mit dem Peptid nicht mehr nachgewiesen werden konnte, nach Vorinkubation mit dem unspezifischen

Kompetitor BSA hingegen schon, kann man von einer spezifischen Antigen-Antikörperreaktion ausgehen (Abb. 39).

Um weiter zu überprüfen, ob es sich bei dem zuvor beobachteten 13 kDa großen Protein um Alt-HvS40 handelt, wurde dessen Konzentration im Wildtyp mit der Konzentration in der RNAi-*S40*-Linie 7 verglichen. Diese sollte eine geringere Konzentration an S40-Protein aufweisen. Chloroplastenfraktionen wurden aus Primärblättern beider Linien gewonnen, in denen die Seneszenz durch Dunkelheit induziert worden war. Die Proteinextrakte wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 2.5.7), auf Nitrocellulose-Membranen übertragen und mit α -Alt-S40 und zur Kontrolle mit dem Prä-Immunsereum inkubiert.

Es konnte ein 13 kDa großes Protein mit α -Alt-S40 in der Chloroplastenfraktion des Wildtyps nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Wildtyp lag das entsprechende Protein in der RNAi-*S40* Linie in einer deutlich geringeren Konzentration vor (Abb. 40). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei dem beobachteten Protein um das alternative S40 Protein handeln könnte.

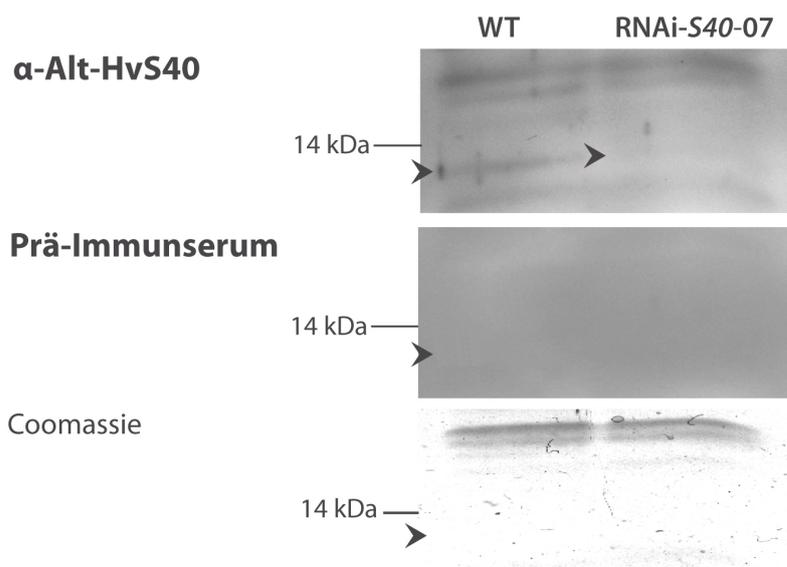


Abbildung (40) Versuch zum immunologischen Nachweis von Alt-HvS40 in Chloroplastenextrakten aus für mehrere Stunden dunkelgestellten Primärblättern des Wildtyps und der RNAi-*S40*-Linie 07. Es wurden jeweils 15 μ g Protein auf ein 12%-Polyacrylamidgel aufgetragen, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Nachweis des Proteins erfolgte mit α -Alt-S40 und zur Kontrolle mit dem Prä-Immunsereum. In der Abbildung sind die Autoradiogramme nach ECL-Detektion gezeigt sowie das zur Ladungskontrolle mit Coomassie gefärbte Polyacrylamidgel. Die Alt-HvS40-Signale sind mit Pfeilen markiert.

die Plastiden transportierten Alt-HvS40 Proteins zustande kommen. Um jedoch eine signifikante Aussage über das im Kern nachgewiesene Protein treffen zu können, sind weitere Versuche unabdingbar.

4 | Diskussion

4.1 Regulation der *HvS40*-Genexpression

Diverse Stressfaktoren und Umweltreize können die Expression von *HvS40* einleiten. Zu diesen Faktoren zählen Phytohormone wie ABA, BAP, Ethylen, Methyljasmonat und Salicylsäure (Haussühl, 1998; Krupinska *et al.*, 2002; Dähnhardt, 2003), abiotische Reize wie Verwundung des Gewebes, Wassermangel, Dunkelheit und Hitze (Haussühl, 1998; Dähnhardt, 2003) sowie pathogene Pilze (Haussühl, 1998; Krupinska *et al.*, 2002). All die genannten Faktoren können die Auslösung eines verfrüht einsetzenden Seneszenzprozesses zur Folge haben, mit dem die Pflanze versucht, den Stress zu vermeiden und Nährstoffe für die folgende Generation zu sichern. Da *HvS40* auch während der natürlichen altersbedingten Seneszenz exprimiert wird (Humbeck *et al.*, 1996), scheint es eine wichtige regulatorische Rolle in Seneszenzsituationen zu spielen. Eine Theorie zum evolutionären Ursprung des Seneszenzprozesses besagt, dass sich die Seneszenz aus den Abwehrstrategien der Pflanzen gegen Pathogene und anderen Stressoren heraus entwickelt haben könnte (Wu *et al.*, 2012b). Diese Überlegung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass viele seneszenzassoziierte Gene auch während pflanzlicher Stressreaktionen, wie zum Beispiel bei Befall der Pflanze mit Pathogenen, verstärkt exprimiert werden. Umgekehrt werden viele pathogen-sensitive Gene (auch *pathogen related*, PR-Gene) während der natürlichen altersbedingten Seneszenz exprimiert (Guo and Gan, 2012). Der in dieser Arbeit untersuchte Promotorbereich von *HvS40* spiegelt mit seinen Bindungsstellen für diverse Transkriptionsfaktoren die Sensitivität dieses Gens für die verschiedenen Signale wider (siehe 3.1, Tab. 8). Dabei könnten vor allem Transkriptionsfaktoren, die durch Phytohormone und ROS-Signale aktiviert oder deaktiviert werden, die *S40*-Expressionsrate sowohl während der natürlichen als auch während der stressinduzierten Seneszenz bestimmen (Fujita *et al.*, 2006). Durch die Bindung weiterer entwicklungs- und gewebespezifischer Transkriptionsfaktoren an den *S40*-Promotorbereich könnte die Expression von *HvS40* auf verschiedene zellinterne und -externe Signale hin abgestimmt werden. Dies soll im Folgenden näher erläutert werden.

4.1.1 ROS

ROS werden wegen ihrer Funktion als sekundäre Botenstoffe unter vielen verschiedenen Stresssituationen gebildet (siehe 1.2.3), so auch unter den oben beschriebenen Stresssituationen, die die *S40*-Genexpression einleiten. Daher könnten ROS ein Hauptregulator der *S40*-Genexpression sein. ROS regulieren die Expression sogenannter redoxsensitiver Gene, indem sie spezifische Transkriptionsfaktoren oxidieren, die daraufhin an die Promotoren der redoxsensitiven Gene binden können. Die Hypothese, dass auch *HvS40* zu den redoxsensitiven Genen zählt, wird durch eine Genexpressionsanalyse unterstützt, die 2002 mit genetisch veränderten Gerstenpflanzen durchgeführt wurde. Diese Pflanzen produzieren das antioxidativ wirkende Phenol Resveratrol in sehr hohen Mengen, weshalb mehr ROS in den Zellen dieser Pflanzen abgefangen werden (Leckband and Lörz, 1998). In diesen Transformanten, deren ROS-Signalwirkung bei Pathogenbefall stark reduziert ist, war die *HvS40*-Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert (Leckband and Lörz, 1998; Krupinska *et al.*, 2002).

Die Behandlung von Gerstenpflanzen mit verschiedenen Phytohormonen, wie sie in dieser Ar-

beit mit ABA und MeJA durchgeführt wurde, führt zu einer verstärkten *HvS40*-Genexpression (siehe 3.2). Allgemein spielen Phytohormone sowohl während des natürlichen als auch während des stressinduzierten Seneszenzprozesses eine wichtige Rolle. Ihre Signalwirkung üben die Phytohormone u.a. dadurch aus, dass sie neue, sekundäre Botenstoffe generieren, die eine schnelle und effiziente Signaltransduktion gewährleisten. Zu den sekundären Botenstoffen, die von Phytohormonen generiert werden, zählen ROS (Navabpour *et al.*, 2003). Umgekehrt leiten zum Beispiel durch Ozon-Stress gebildete ROS die Synthese von seneszenzfördernden Phytohormonen ein (Tamaoki, 2008). Es konnten bereits seneszenzassoziierte Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die durch die duale Signalwirkung von ROS und Phytohormonen sowohl aktiviert als auch deaktiviert werden. In *Arabidopsis thaliana* wird zum Beispiel BOS1, ein Transkriptionsfaktor der MYB-Familie, über ABA- und ROS-Signale reguliert (Fujita *et al.*, 2006). MYB-Transkriptionsfaktoren kontrollieren die Genexpression der Pflanze bei abiotischen/biotischen Stress und während der natürlichen Seneszenz (Hollmann *et al.*, 2014). Mehrere *cis*-Elemente der MYB-Transkriptionsfaktoren, die MYB-Boxen, konnten im *HvS40*-Promotor identifiziert werden (siehe 3.1, Tab. 8). Es ist wahrscheinlich, dass die Transkription von *HvS40* während Stresssituationen durch diese Proteine reguliert wird (Abb. 42).

Sowohl HSE- als auch GTCC-Boxen, die *cis*-Elemente der Hitzeschock- und der C2H2-Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren, wurden im Promotor von *HvS40* identifiziert (siehe 3.1, Tab. 8). Der Hitzeschock-Transkriptionsfaktor HSF21 von *Arabidopsis* ist ein Beispiel für einen Transkriptionsfaktor, der an der Wahrnehmung von sich erhöhenden ROS-Konzentrationen in der Zelle beteiligt ist. HSF21 wird direkt durch H_2O_2 , dessen Akkumulation durch eine Vielzahl von Umweltreizen und Stressfaktoren ausgelöst wird, oxidiert und dadurch aktiviert (Davletova *et al.*, 2005). In Folge dessen werden Gene wie *AtZat21* verstärkt exprimiert (Davletova *et al.*, 2005). *AtZat21* kodiert für einen Transkriptionsfaktor der C2H2-Zinkfinger-Familie, der in die Regulation diverser Abwehrstrategien gegen biotischen und abiotischen Stress involviert ist und im Englischen daher als *multiple-stress-responsive transcription factor* beschrieben wird (Davletova *et al.*, 2005). Transkriptionsfaktoren dieser Familie könnten ebenfalls für die durch Stressfaktoren ausgelöste Expression von *HvS40* verantwortlich sein (Abb. 42).

Im *HvS40*-Promotor konnten ebenfalls Bindestellen für NAC-Transkriptionsfaktoren identifiziert werden (siehe 3.1, Tab. 8 und Abb. 42). Gene, die für NAC-Transkriptionsfaktoren kodieren, regulieren in der Gerste sowohl den natürlichen Seneszenzprozess als auch die Stressreaktion der Pflanze bei biotischem Stress (Christiansen and Gregersen, 2014). Die Gene *HvNAC005* und *HvNAC023* könnten in die Regulation der ABA-Signalwirkung zu Beginn der Seneszenz involviert sein (Christiansen and Gregersen, 2014). Die Expression des *AtRD26*-Gens, das für einen NAC-Transkriptionsfaktor von *Arabidopsis* kodiert, wird sowohl durch H_2O_2 als auch durch JA und ABA induziert. Eine verstärkte Expression dieses Gens konnte auch bei Pathogenbefall, Verwundung, hoher Salzkonzentration und Hitze beobachtet werden (Fujita *et al.*, 2004). Diese Stresssituationen führen zu einer vermehrten Bildung von ROS. Die Gene, die durch RD26 in ihrer Expression kontrolliert werden, sind in die Pathogenabwehr involviert und regulieren das antioxidative System sowie den Seneszenzprozess (Fujita *et al.*, 2004).

Im Promotorbereich von *HvS40* konnten mehrere W-Boxen, an die die Transkriptionsfaktoren der WRKY-Familie binden können, identifiziert werden (siehe 3.1, Tab. 8 und Abb. 42). WRKY-Transkriptionsfaktoren, die zum größten Teil in die Signaltransduktion des Phytohormons SA involviert sind, sind wichtige Regulatoren der pflanzlichen Pathogenabwehr und des natürlichen Seneszenzprozesses (siehe auch 1.2.1). WRKY53 ist das am besten untersuchte Protein dieser Familie. Das *AtWRKY53*-Gen von Arabidopsis ist redoxsensitiv und wird durch erhöhte H_2O_2 -Konzentrationen in der Zelle verstärkt exprimiert (Thomas and Ougham, 2014). Von dem Transkriptionsfaktor *AtWRKY53* wird angenommen, dass er ein positiver Regulator der Seneszenz ist und dass er mit dem während der Seneszenz exprimierten Transkriptionsfaktor *AtWRKY30* interagiert (Besseau *et al.*, 2012). Für die WRKY-Transkriptionsfaktoren *AtWRKY30* und *AtWRKY54* konnte gezeigt werden, dass sie sowohl durch ROS als auch durch SA reguliert werden (Besseau *et al.*, 2012).

Mit der Zeit bewirken ROS in der Zelle Veränderungen, von denen angenommen wird, dass sie der eigentliche Grund des Alterns sind (Schippers, 2015). Ay *et al.* (2015) konnten zeigen, dass die Expression von *HvS40* unter epigenetischer Kontrolle steht und dass dieser epigenetische Einfluss sich mit dem Alter der Zelle ändert. Während der Entwicklung vom reifen zum seneszierenden Blatt verändern sich die posttranslationalen Modifizierungen einiger der Histone, die an die *HvS40*-DNA-Sequenz binden und sie strukturieren (Ay *et al.*, 2015) (siehe auch 1.2.6). Diese Histone werden mit zunehmendem Alter der Zelle vermehrt acetyliert, welches die Auflockerung der DNA-Struktur zur Folge hat und die Bindung von Transkriptionsfaktoren ermöglicht. Es ist anzunehmen, dass nach Auflockerung der Chromatinstruktur im Bereich des *HvS40*-Promotors seneszenzassoziierte Transkriptionsfaktoren binden können und die altersbedingte Genexpression von *HvS40* einleiten (Abb. 42).

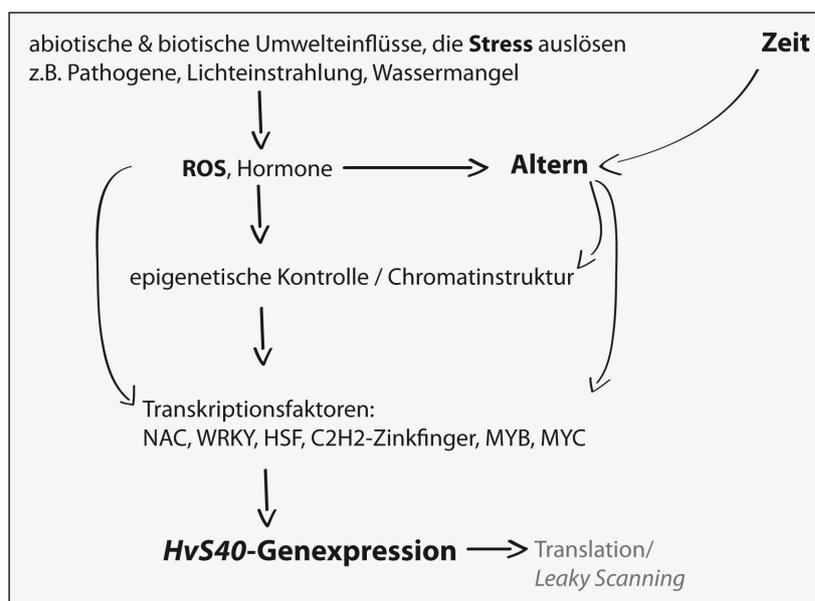


Abbildung (42) Modell zur positiven Regulation der *HvS40*-Genexpression während der stress- und altersbedingten Seneszenz. Abiotische und biotische Stressfaktoren können über die Signalwirkung von Phytohormonen und ROS die Aktivierung/Deaktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren zur Folge haben. Diese regulieren die *HvS40*-Genexpression über die Bindung an spezifische *cis*-Elemente, die im Promotor identifiziert werden konnten (siehe 3.1). Die Expression von *HvS40* steht darüber hinaus unter epigenetischer Kontrolle, deren Einfluss sich mit der älter werdenden Zelle (Ay *et al.*, 2015) und vermutlich auch unter Stresssituationen ändert. Das Altern der Zelle (zeitbedingte strukturelle Veränderungen) wird u.a. durch das Wirken von ROS und Phytohormonen bestimmt.

4.1.2 Lichtregulierte Genexpression

HvS40 wurde im Rahmen dieser Arbeit als potentiell dual kodierendes Gen charakterisiert (siehe auch 4.2), das für zwei verschiedene Proteine mit unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation kodiert. Das HvS40:GFP-Protein ist im Zellkern lokalisiert, während Alt-HvS40 in Fusion mit GFP eine duale subzelluläre Lokalisation in den Plastiden und im Zellkern aufwies (siehe 3.5). Im *HvS40*-Promotor identifizierte *cis*-Elemente unterstützen die Annahme, dass das *HvS40*-Gen für ein alternatives, in den Plastiden lokalisiertes HvS40-Protein kodieren könnte: In Promotoren von Kerngenen, die für Plastidenproteine kodieren, befinden sich spezifische *cis*-Elemente wie zum Beispiel das GATA-Element (Reyes *et al.*, 2004), die über die Signalwirkung des Lichtes reguliert werden. Unter anderem kontrollieren diese *cis*-Elemente die Expression des kernkodierten *RBCS*-Gens, das für die kleine Untereinheit der RuBisCo kodiert, des *CAB*-Gens, welches für das Chlorophyll-A/B-Bindeprotein des LHC II kodiert oder des *GAPCp-B*-Gens, das für die B-Untereinheit der plastidären Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodiert (Reyes *et al.*, 2004). Im Promotor des *HvS40*-Gens konnten sechs GATA-Boxen sowie vier G-Boxen und ein INR-Element identifiziert werden (siehe 3.1, Tab. 8). Auch die G-Box und INR-Elemente sind Elemente in Promotoren von Kerngenen, die für plastidäre Proteine kodieren. G-Box-Elemente lassen sich zum Beispiel ebenfalls im Promotor des *RBCS*-Gens finden und werden über Lichtsignale reguliert. Das INR-Element wurde erstmals im Promotor des Kerngens *PSA D* beschrieben, welches für eine Ferredoxin bindende Untereinheit des PS I kodiert (Burke and Kadonaga, 1996; Nakamura *et al.*, 2002). Der Promotor von *PSA D* weist keine TATA-Box auf, weshalb das lichtregulierte INR-Element die Initiation der Transkription übernimmt.

4.1.3 Gewebespezifische Expression

Während der Seneszenz akkumuliert die *HvS40*-mRNA hauptsächlich in Zellen des Mesophyllgewebes (Krupinska *et al.*, 2002). Das *cis*-regulatorische MEM1-Element könnte bewirken, dass *HvS40* vor allem in diesem Gewebe exprimiert wird (siehe 3.1, Tab. 8). Die Expression von Genen, die dieses Element in ihrem Promotor aufweisen, wird spezifisch im Mesophyll induziert und in Bündelscheidenzellen und in den Leitgeweben unterdrückt (Gowik *et al.*, 2004; Akyildiz *et al.*, 2007). Das Mesophyll ist gekennzeichnet durch Zellen, die photosynthetisch aktive Chloroplasten enthalten. Da während der Seneszenz hauptsächlich die Chloroplasten der Nährstoffremobilisierung dienen (siehe 1.1.1), werden vor allem im Mesophyll Regulatoren des plastidären Seneszenzprozesses, zu denen das alternative HvS40-Protein zählen könnte, benötigt.

4.1.4 Retrograde Signale aus den Plastiden

An die meisten im *S40*-Promotor identifizierten *cis*-Elemente binden Transkriptionsfaktoren, die durch ROS reguliert werden und die die Expression des Gens in Abhängigkeit von Stress, Phytohormonen, Licht und Entwicklungsphase kontrollieren könnten (Abb. 42). *HvS40* besitzt in seinem Promotor somit viele *cis*-Elemente, die eine an die Situation der Chloroplasten angepasste Genexpression ermöglichen. Es wird angenommen, dass Chloroplasten die Organellen der pflanzlichen Zelle sind, in denen Stress und das vermehrte Auftreten von ROS als erstes wahrgenommen werden (Cao *et al.*, 2011; Nomura *et al.*, 2012). In Folge dessen wird die Genexpression im Zellkern verändert und es kommt zur Synthese der stress- und seneszenzfördernden

Phytohormone JA, ABA, Ethylen und SA. Deren Biosynthese wiederum findet zu großen Teilen im Chloroplasten statt (siehe 1.2.1). Plastiden und Zellkern besitzen daher eine gut aufeinander abgestimmte Genexpression und stehen über anterograde und retrograde Signale miteinander in Zwiesprache (siehe auch 4.3.2). Es gibt verschiedene Hinweise darauf, dass ABA an der Übertragung von retrograden Signalen aus Plastiden an den Zellkern beteiligt ist. ABA ist zum Beispiel als Repressor verschiedener kernlokalisierter Gene beschrieben worden, die für Proteine der Photosyntheseapparate kodieren (Rook *et al.*, 2006). Viele Kerngene, von denen bekannt ist, dass sie durch retrograde Plastidensignale reguliert werden, weisen in ihren Promotoren sogenannte **ABA-responsible Elemente** (*ABREs*) auf (Rook *et al.*, 2006). Diese liegen sehr häufig in unmittelbarer Nähe zu *cis*-Elementen, die durch die Signalwirkung des Lichtes kontrolliert werden (Rook *et al.*, 2006). In der schematischen Darstellung des *HvS40*-Promotors (Abb. 5, Seite 54) lässt sich erkennen, dass auch hier ABA- und lichtregulierte *cis*-Elemente häufig nah beieinander zu finden sind. Unter diesen ließen sich neun ABRE-Elemente identifizieren (Tab. 8, Seite). Dies ist ein möglicher Hinweis darauf, dass die *HvS40*-Expression durch spezifische Plastidensignale reguliert werden könnte und gleichzeitig ein weiterer Hinweis darauf, dass das Alt-S40-Protein unter bestimmten Bedingungen in den Plastiden benötigt wird.

4.1.5 WHIRLY1 als Bindefaktor?

In früheren Arbeiten wurde das DNA-Bindeprotein WHIRLY1 als regulatorisches Protein beschrieben, das an bestimmte Promotorelemente des *HvS40*-Promotors binden kann (siehe 1.2.6). Chromatin-Immunpräzipitationen konnten die postulierte Bindung von WHIRLY1 an den Promotor von *HvS40* bisher nicht bestätigen (W. Kucharewicz, unveröffentlichte Daten). Es ist fraglich, ob die 2003 beobachtete Bindung von WHIRLY1 an Promotorelemente des *HvS40*-Gens (Affinitätsansatz mit Kernproteinen und kurzen Nukleotidsequenzen, die das ERE-Element beinhalteten, Dähnhardt (2003)) *in vivo* tatsächlich vorliegt. Kernproteinproben sind häufig mit plastidären Proteinen "verunreinigt", die allgemein kaum aus Kernproteinproben zu entfernen sind (Sikorskaite *et al.*, 2013). Da WHIRLY1 in großen Mengen in den Plastiden akkumuliert, könnte es als Verunreinigung in den Kernproteinproben aus jungen Blättern vorgekommen sein, die für die Bindungsversuche mit dem ERE-Element von *HvS40* verwendet wurden.

Jedoch wurde im Rahmen dieser Arbeit in nicht-seneszenten Primärblättern der Gerstentransformante RNAi-*WHY1-7*, in der das WHIRLY1-Protein kaum nachweisbar ist (Krupinska *et al.*, 2014b), im Vergleich zum Wildtyp ein höherer Gehalt an *HvS40*-Transkripten ermittelt (siehe 3.1). Da die Konzentration des WHIRLY1-Proteins mit fortschreitendem Alter in der Zelle abnimmt (Krupinska *et al.*, 2014b), könnte dies bedeuten, dass WHIRLY1 als negativer Regulator des *S40*-Gens agiert, bevor der Seneszenzprozess eintritt. Expressionsanalysen von RNAi-*WHY1*-Linien, die die gesamte Wachstumsperiode der Transformanten von der 10 Tage alten bis zur seneszierenden Pflanze umfassten, zeigten ebenfalls eine niedrigere *S40*-Expression in jungen Blättern der RNAi-*WHY1*-Linie (AG Krupinska, unveröffentlichte Daten; Kucharewicz *et al.*, 2016, *in preparation*). Allerdings konnten während der Seneszenz keine signifikanten Unterschiede in der Expression von *HvS40* und anderer SAGs, die ebenfalls das ERE-Element in ihren Promotoren aufweisen, ermittelt werden. Der verzögerte Seneszenzprozess, der bei den RNAi-*WHY1*-Pflanzen beobachtet werden konnte, ist daher nicht auf eine von WHIRLY1 während der Seneszenz durchgeführte direkte Regulation von Seneszenzgenen wie *HvS40* zurückzuführen.

Vielmehr kann diskutiert werden, dass eine von WHIRLY1 vor Beginn des eigentlichen Seneszenzprozesses kontrollierte Genexpression von Seneszenzfaktoren, zu denen auch *HvS40* zählt könnte, die Pflanze auf eine optimale Stressreaktion vorbereitet, damit sie zum richtigen Zeitpunkt den Seneszenzprozess einleiten kann (Kucharewicz *et al.*, 2016, *in preparation*).

4.2 Das Phänomen der dual kodierenden Gensequenzen

Das seneszenzassoziierte Gen *HvS40* der Gerste konnte im Rahmen dieser Arbeit als dual kodierendes Gen beschrieben werden. Nach der Definition von Chung *et al.* (2007) besteht ein dual kodierendes Gen aus zwei offenen Leserahmen, die beide auf demselben DNA-Strang lokalisiert sind. Als kanonisch wird der Leserahmen bezeichnet, der als proteinkodierend in Datenbanken und Literatur annotiert ist. Der zweite überlappende Leserahmen ist relativ zum kanonischen Leserahmen um ein oder zwei Nukleotide verschoben und wird als alternativer Leserahmen bezeichnet. Nach dieser Definition ließen sich in Säugetieren bis jetzt drei Klassen dual kodierender Gene identifizieren. Sie sind in Abbildung 43 gezeigt.

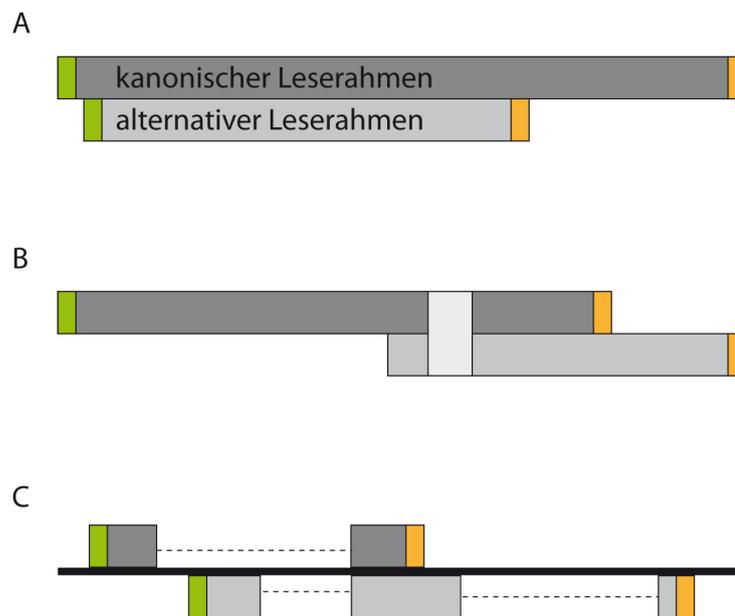


Abbildung (43) Drei Klassen dual kodierender Gensequenzen. A) Zwei überlappende offene Leserahmen auf unterschiedlichen Leserastern werden in ein Transkript mit zwei Translations-Initiationssequenzen übersetzt, dargestellt am Beispiel des *Gnas1*-Gens des Menschen. B) Die Entfernung einer Platzhalter-Region (*Spacer*) führt zur Erstellung eines um den alternativen Leserahmen verlängerten Transkriptes, das für ein neues Protein kodiert, hier dargestellt am Beispiel des *XPB1*-Gens von Säugetieren. C) Durch Exonen, die auf verschiedenen Leserastern liegen, können über den Mechanismus des alternativen Spleißens verschiedene Proteine synthetisiert werden, wie hier am Beispiel des *Ink4a*-Gens von Säugetieren gezeigt ist. Grüne Box: Translationsstart, rote Box: Translationsstop. Die Abbildung ist verändert nach Chung *et al.* (2007).

Zur ersten Klasse zählen Gene, die intronlos sind und die zwei sich überlappende Leserahmen auf unterschiedlichen Leserastern aufweisen. Der alternative Leserahmen kann dabei entweder in 5'-Richtung oder in 3'-Richtung über den kanonischen Leserahmen hinausreichen oder eingebettet in der kodierenden Sequenz des kanonischen Leserahmens vorliegen. Nach der Transkription dieser Gene liegt eine mRNA mit zwei Translations-Initiationssequenzen vor, von der zwei unterschiedliche Proteine translatiert werden können. Zu dieser Klasse der dual kodierenden Gene gehört das Gen *Gnas1* des Menschen, das für zwei Proteine des G-Protein-gekoppelten Signal-

weges (XLas und ALEX) kodiert (Klemke *et al.*, 2001; Nekrutenko *et al.*, 2005) (Abb. 43 A). Auch das *HvS40*-Gen der Gerste gehört zu dieser Klasse der dual kodierenden Gene.

Das *PRNP*-Gen des Menschen, das für das Prion-Protein kodiert, weist ebenfalls einen alternativen *out-of-frame* Leserahmen innerhalb der kodierenden Sequenz auf (Vanderperre *et al.*, 2011). Dieser alternative Leserahmen des *PRNP*-Gens ist in vielen Säugetieren hoch konserviert und kodiert für das Alternative-Prion-Protein (Alt-PRP). Mit dem seneszenzassoziierten Gen *HvS40* der Gerste sind bis heute sechs dual kodierende Gene der Klasse 1 in Eukaryoten näher beschrieben. Sie sind in Tabelle 10 aufgeführt. Außer dem *HvS40*-Gen ist bis heute kein weiteres dual kodierendes Gen in Pflanzen bekannt.

Tabelle (10) Dual kodierende Gene der Klasse 1 in Eukaryoten. Die aufgeführten Gene sind alle intronlos und besitzen sich überlappende offene Leserahmen auf unterschiedlichen Leserastern. Bis auf *HvS40* sind alle aufgeführten Gene in Säugetieren bzw. *Homo sapiens* beschrieben worden.

Name Gen & Alt-Protein	Funktion Alt-Protein	Lage des Alt-ORF	Literatur
<i>Adora2a</i> uORF5	das uORF5-Peptid reguliert die Expression von Genen, die in den MAPK-Signalweg involviert sind	überlappt den kanonischen ORF in 5'-Richtung	Lee <i>et al.</i> (2014)
<i>Ataxin1</i> Alt-ATXN1	Alt-ATXN1 interagiert mit ATXN1 und bestimmt dessen subzelluläre Lokalisation	liegt innerhalb der kodierenden Sequenz des kanonischen ORFs	Bergeron <i>et al.</i> (2013)
<i>Gnas1</i> ALEX	ALEX ist involviert in den G-Protein gekoppelten Signalweg	liegt innerhalb der kodierenden Sequenz des kanonischen ORFs	Klemke <i>et al.</i> (2001)
<i>HvS40</i> Alt-HvS40	Alt-HvS40 ist in den Chloroplasten lokalisiert; mögliche Signalfunktion während der Seneszenz	überlappt den kanonischen ORF in 5'-Richtung	diese Arbeit
<i>PRNP</i> Alt-PRP	Alt-PRP ist in Mitochondrien lokalisiert; möglicher Zusammenhang mit TSE	überlappt den kanonischen ORF in 5'-Richtung	Vanderperre <i>et al.</i> (2011)
<i>TYRP1</i> ORF3P	das ORF3P-Peptid wird von T-Zellen als antigenes Epitop in Krebszellen erkannt	liegt innerhalb der kodierenden Sequenz des kanonischen ORFs	Wang <i>et al.</i> (1996)

Neben der ersten Klasse existieren in Säugetieren noch zwei weitere Klassen dual kodierender Gene. Die Kapazität, für zwei Proteine gleichzeitig zu kodieren, wird hier ebenfalls durch die Nutzung zweier offener Leserahmen auf verschiedenen Leserastern erreicht. Dies geschieht jedoch unter Einbeziehung von Platzhalter-Sequenzen (*Spacern*) und des Mechanismus' des alternativen Spleißens (Abb. 43 B, C). Durch das Entfernen einer Platzhalter-Sequenz werden zum Beispiel die zwei offenen Leserahmen des *XBPI*-Gens miteinander verbunden, und es entsteht so ein neues, alternatives Transkript (Yoshida *et al.*, 2006).

Die dritte Klasse involviert alternatives Spleißen, um Exonen, die auf verschiedenen Leserastern liegen, miteinander zu verbinden. Dabei überlappen einige der Exonsequenzen zweier verschiedener Leserahmen, weshalb man auch hier von einem dual kodierenden Gen spricht. Ein Beispiel für solch ein Gen ist das *INK4A*-Gen, das für die beiden Tumorsuppressor-Proteine p16 und INK4a in Säugetieren kodiert (Sharpless, 2005).

Potentiell dual-kodierende Gene von Säugetieren, die mit Hilfe von bioinformatischen Analysen identifiziert wurden, zeigen eine niedrige Konservierung zwischen den Arten (Xu *et al.*, 2010). Dies deutet auf einen eher jungen Ursprung dieser Gene in Säugetieren hin (Liang, 2010). In Übereinstimmung mit einem ebenfalls eher jungen Ursprung des dual-kodierenden *S40*-Gens ist die Tatsache, dass der alternative, überlappende Leserahmen nur in Arten identifiziert werden konnte, die zu den kleinkörnigen Getreidearten und Süßgräsern zählen. Das *S40*-Gen, das für das DUF584-Protein kodiert, kann hingegen sowohl in monokotylen als auch in dikotylen Pflanzen gefunden werden. Die ersten Landpflanzen, zu denen die Moose zählen, traten vor etwa 485 - 444 Mio Jahre auf und entwickelten sich aus den Grünalgen (Stewart and Rothwell, 1993; Willis and McElwain, 2014). In den Grünalgen *Micromonas* und *Coccomyxa* sowie im Moos *Physcomitrella patens* konnten DUF584-Gene identifiziert werden (siehe 3.4.1 und Abb. 10, Seite 65), jedoch nicht in Cyanobakterien. Dies deutet daraufhin, dass das *S40*-Gen mit der eukaryotischen Situation der Zelle entstand (Schimper, 1883; Mereschkowsky, 1905; Margulis, 1975). Die ersten Bedecktsamer, zu denen die monokotylen Pflanzen zählen, haben ihren Ursprung vor etwa 145 Mio Jahren. Man geht davon aus, dass sich die Gräser vor etwa 66 - 35 Mio Jahren bildeten (Stewart and Rothwell, 1993; Willis and McElwain, 2014). Zu dieser Zeit könnte sich der nur in monokotylen Pflanzen identifizierte alternative Leserahmen des *S40*-Gens entwickelt haben.

Dual kodierende Gene können häufig in Bakterien, Viren und Bakteriophagen gefunden werden. Man geht davon aus, dass sie in die Regulation der bakteriellen Genexpression involviert sind (Johnson and Chisholm, 2004) und dass sie helfen, die wegen der Physiologie der Kapsidstruktur begrenzte Genomgröße in Viren und Bakteriophagen gering zu halten (Chirico *et al.*, 2010). Die Entdeckung dual kodierender Gene in Eukaryoten, also in Organismen mit weitaus größeren Genomen, benötigt allerdings eine andere Erklärung.

4.2.1 Funktionelle Vorteile dual kodierender Gene in Eukaryoten

Der Vorteil überlappender Gene könnte in einer kontrollierten und koordinierten Ko-Expression zweier unterschiedlicher Leserahmen liegen, die für zwei Proteine mit aufeinander abgestimmten Funktionen kodieren. Für die alternativen Proteine Alt-ATXN1 und ALEX konnte gezeigt werden, dass sie mit den jeweiligen kanonischen Proteinen ATXN1 und XL α s interagieren (Bergeron *et al.*, 2013; Nekrutenko *et al.*, 2005). Alt-ATXN1 bindet wie das ATXN1-Protein an RNA und interagiert gleichzeitig mit dem N-Terminus von ATXN1. ATXN1 bildet im Zellkern von HeLa-Zellen Aggregate und rekrutiert Alt-ATXN1, das ohne Bindung an ATXN1 eine diffuse Verteilung im Nukleoplasma zeigt, in diese Aggregate hinein. Aufgrund dieser Ergebnisse vermuten die Autoren, dass Alt-ATXN1 die Funktion von ATXN1 unterstützt (Bergeron *et al.*, 2013).

Das alternative Protein ALEX ist wie das kanonische Protein XL α s in der Plasmamembran lokalisiert (Klemke *et al.*, 2001). Auch diese beiden Proteine, die von sich überlappenden Leserahmen eines dual kodierenden Gens kodiert werden, interagieren miteinander. Dabei bindet ALEX an die XL-Domäne von XL α s. Die Funktion des alternativen ALEX-Proteins ist unbekannt. Es könnte jedoch eine wichtige Rolle bei der Regulation der von XL α s vermittelten Signal-Transduktion spielen, indem es die Eigenschaften des G-Proteins XL α s verändert (Klemke *et al.*, 2001).

Ein weiterer funktioneller Vorteil von dual kodierten Proteinen könnte darin bestehen, dass

sie mehrere verschiedene Aufgaben zur selben Zeit am selben Ort erfüllen könnten, wobei die verschiedenen Funktionen jeweils von dem kanonischen und dem alternativen Protein ausgeübt werden (Chung *et al.*, 2007). Ein Beispiel ist das dual kodierende Gen der Adenylatzyklase 8. ADCY8 ist ein membrangebundenes Enzym, das zwei Funktionen ausführt: Es interagiert mit Ca^{2+} und Calmodulin, und es bindet an die katalytische Untereinheit der Proteinphosphatase 2A (Crossthwaite *et al.*, 2006). Im 5'-Bereich des Gens liegt ein alternativer Leserahmen vor (*out-of-frame*), der für ein Alt-Protein kodiert. Die Autoren von Chung *et al.* (2007) vermuten, dass das alternative Protein an die Adenylatzyklase 8 bindet und dem Enzym so die Bindung von Calmodulin erst ermöglicht.

Ein weiterer Vorteil dual kodierender Gene besteht darin, dass die Translation zweier Leserahmen sehr schnell und sensitiv reguliert werden kann. Eine mRNA mit zwei TIS bietet dabei die Möglichkeit, über verschiedene Translationinitiations-Faktoren den zu translatierenden Leserahmen zu selektieren (siehe auch 4.2.3). Die Zelle kann über die Kontrolle der Translations-Initiation viel schneller auf Hormone, Wachstumsfaktoren oder Nährstoffe reagieren als dies über die Initiation der Transkription möglich wäre. Umgekehrt kann als Reaktion auf Stressoren wie ROS, DNA-Schäden und Nährstoffmangel die Rate der Proteinsynthese innerhalb von Minuten herunter reguliert werden (Van Der Kelen *et al.*, 2009). Für die dual kodierenden Gene *GNAS1* und *A2AR* konnte gezeigt werden, dass sie jeweils für ein einzelnes Transkript mit zwei alternativen funktionsfähigen TIS kodieren (Klemke *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2014). Die Translation dieser Transkripte mit zwei TIS führt zur Synthese von zwei unterschiedlichen Proteinen. Der Mechanismus, der die Translation solcher Transkripte ermöglichen könnte, wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

4.2.2 Alternative Translation von Leserastern: Der *Leaky Scanning*-Mechanismus

In den Northern-Blot Analysen zur Expression des *HvS40*-Gens konnte nicht vollständig geklärt werden, ob es sich um ein oder zwei *S40*-Transkripte handelte (siehe 3.2, Abb. 7, Seite 61). Bei Anzucht der Pflanzen auf Vermiculit ließ sich über der detektierten Hauptbande noch eine weitere etwas schwächere Bande erkennen. Von dieser ist nicht auszuschließen, dass es sich um ein zweites *S40*-Transkript handelte, da die verwendete Sonde gegen eine Nukleotidsequenz gerichtet ist, die in beiden Leserahmen zu finden ist. Es ist jedoch wahrscheinlicher, dass es sich bei der *S40*-mRNA um ein Genprodukt mit zwei TIS handelt, das unterschiedlich translatiert wird. Dies ist auch der Fall beim *Gnas1*-Gen des Menschen, das wie *HvS40* aus einem einzigen großen Exon besteht und einen den kanonischen Leserahmen fast vollständig überlappenden alternativen Leserahmen aufweist (siehe Tab. 10). Für das *Gnas1*-Gen konnte gezeigt werden, dass sowohl das XLas-Protein als auch das alternative Protein ALEX von derselben mRNA translatiert werden (Klemke *et al.*, 2001). Die Autoren diskutieren, dass *Leaky Scanning* der Mechanismus sein könnte, der eine Translation zweier in ihrer Aminosäuresequenz unterschiedlicher Proteine von einer mRNA ermöglicht. Während dieses Mechanismus' kommt es zum diskontinuierlichen Abtasten (*Leaky Scanning*) der mRNA durch die Ribosomen (Kochetov, 2008). Dies kann zur Verschiebung des Leserasters während der Translation führen.

Die Initiation der Translation verläuft normalerweise nach dem von Kozak (1987) beschriebenen *Scanning*-Modell: die 40S-Untereinheiten der Ribosomen werden über Initiationsfaktoren an die Cap-Struktur der mRNA rekrutiert. Der Initiationskomplex, bestehend aus 40S-Untereinheit

A) Lineares Scanning Modell

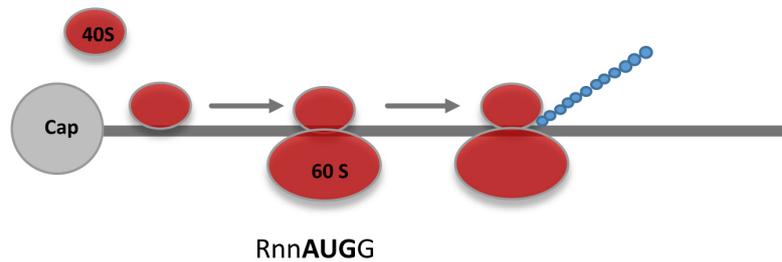
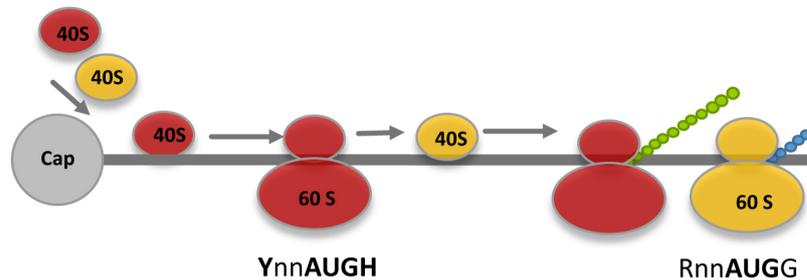
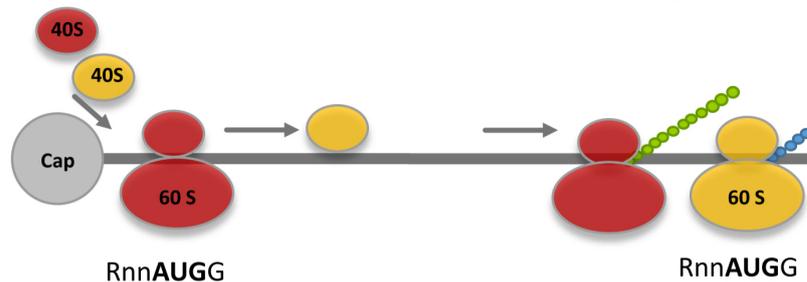
B) Alternative Translation verursacht durch *Leaky Scanning*C) Alternative Translation verursacht durch *Leaky Scanning*

Abbildung (44) Unterschiedliche Modelle zur Initiation der Translation in Eukaryoten. A) Während des Linearen Abtastens (*Linear Scanning Model*) lesen die ribosomalen 40S-Untereinheiten die mRNA-Sequenz ab und initiieren die Translation am zuerst in der Sequenz auftretenden AUG, das in einem optimalen Kontext liegt. B) Während des *Leaky Scannings* überlesen einige 40S-Untereinheiten das erste AUG, da es in einem suboptimalen Kontext liegt und initiieren die Translation an einem weiter strängabwärts gelegenen AUG. C) Liegt das erste AUG zwar in einem optimalen Kontext, ist aber zu nahe an der Cap-Struktur der mRNA lokalisiert, können die 40S-Untereinheiten nicht effizient binden und initiieren die Translation an einem strängabwärts gelegenen AUG. Die Abbildung ist verändert nach Kochetov (2008).

und Initiationsfaktoren, liegt nun gebunden an die mRNA vor und liest diese in 3'-Richtung ab. Trifft der Initiationskomplex auf ein AUG, das in einem optimalen Kontext liegt, so leitet er an dieser Stelle die Translation ein (Abb. 44 A). Dazu werden Elongationsfaktoren rekrutiert, und die ribosomale 60S-Untereinheit bindet an die 40S-Untereinheit. In den meisten Fällen dient das in der Sequenz zuerst auftretende AUG im optimalen Kontext als Translations-Initiationssequenz (TIS) (Kozak, 1987).

Wenn der Kontext des AUGs hingegen suboptimal ist, erkennen zwar einige 40S-Untereinheiten das AUG als TIS, andere jedoch können es überlesen und fahren fort, die mRNA in 3'-Richtung abzulesen (Abb. 44 B). So kann gleichzeitig an einem zweiten, strängabwärts gelegenen AUG die Translation initiiert werden (Kochetov, 2008). Dieser Mechanismus, über den es möglich wäre, aus einer mRNA zwei in ihrer Aminosäuresequenz unterschiedliche Proteine zu synthetisieren,

wird als *Leaky Scanning* bezeichnet.

In Lukaszewicz *et al.* (2000) sind monokotyle Konsensussequenzen beschrieben, die eine effiziente Initiation der Translation am AUG-Codon ermöglichen. Solch eine TIS ließ sich sowohl für den alternativen als auch für den kanonischen *HvS40*-Leserahmen identifizieren. Die TIS des *HvS40+1*-Leserahmens stimmt dabei zu 89% mit der beschriebenen Konsensussequenz überein und die des kanonischen Leserahmens zu 78% (siehe 3.3, Abb. 8, Seite 62). Das AUG des alternativen Leserahmens, das strangaufwärts vor dem AUG des *HvS40+3*-Leserahmens gelegen ist, wird also von einem optimalen Nukleotidkontext umgeben. Das erste AUG kann jedoch auch dann von den 40S-Untereinheiten überlesen werden, wenn es von einem optimalen TIS-Kontext umgeben ist. Dies geschieht, wenn das AUG zu nah an der Cap-Struktur der mRNA gelegen ist und eine effiziente Translation nicht gewährleistet werden kann (Abb. 44 C), (Slusher *et al.*, 1991; Kozak, 2005).

4.2.3 Regulation des *Leaky Scanning*-Mechanismus?

Viele Studien haben gezeigt, dass die Translation vor allem auf Ebene der Initiation reguliert wird (Kozak, 1999; Muench *et al.*, 2012). Der Translations-Initiationskomplex besteht aus der ribosomalen 40S-Untereinheit, der Methionin-tRNA und aus mehreren Translationinitiationsfaktoren (TI-Faktoren). In Eukaryoten existieren oft mehrere Isoformen von verschiedenen TI-Faktoren, deren zugehörige Gene differenziell exprimiert werden (Muench *et al.*, 2012). Die zu verschiedenen Zeitpunkten und unter verschiedenen Bedingungen synthetisierten TI-Faktoren ermöglichen variierende Zusammensetzungen des Initiationskomplexes (Muench *et al.*, 2012). In Folge wird die Initiation der Translation durch die unterschiedliche Einbindung von gewebe-, wachstums-, stress- oder seneszenzspezifischen TI-Faktoren in den Initiationskomplex moduliert. Die Aktivität und Funktion der TI-Faktoren kann zudem durch posttranslationale Modifizierungen reguliert werden (Muench *et al.*, 2012).

Eine mRNA mit zwei TIS bietet die Möglichkeit, über variierende TI-Faktoren den zu translatierenden Leserahmen auszuwählen. Der Vorteil dieses Mechanismus liegt darin, dass die Zelle über die Änderung der Translation viel schneller auf Umweltreize und Stress reagieren kann, als dies über die zeitaufwendigere Änderung der Genexpression möglich wäre (Van Der Kelen *et al.*, 2009). Die Translation des entsprechenden Leserahmens kann ebenso schnell wieder herunter reguliert werden, wenn der Zustand der Zelle sich ändert und andere TI-Faktoren die Initiation der Translation bestimmen (Wamboldt *et al.*, 2009; Van Der Kelen *et al.*, 2009).

In *Arabidopsis thaliana* stellen TI-Faktoren eine große Proteinfamilie dar, die an der Steuerung vieler verschiedener zellulärer Prozesse beteiligt sind (Wamboldt *et al.*, 2009). Wamboldt *et al.* (2009) konnten zeigen, dass der AUG-Kontext einer potentiellen TIS nicht nur das Ablesen und Pausieren der ribosomalen 40S-Untereinheit, sondern auch die Bindung des eukaryotischen Initiationsfaktors 4 (eIF4) beeinflusst. Das *Poly2*-Gen, das in *Arabidopsis* für eine in den Organellen lokalisierte DNA-Polymerase kodiert, wird in eine mRNA mit mehreren TIS übersetzt. In Keimblättern wird nur die plastidäre Form der DNA-Polymerase synthetisiert, während im Übergangsbereich zwischen Wurzel und Spross sowohl die mitochondriale als auch die plastidäre Form vorliegt (Wamboldt *et al.*, 2009). Die Autoren diskutieren, dass eIF4 den *Leaky Scanning*-Mechanismus so beeinflusst, dass je nachdem in welchem Gewebe die Zelle sich befindet, in ihr entweder die etwas größere mitochondriale oder die kleinere plastidäre Form der DNA-

Polymerase synthetisiert wird (Wamboldt *et al.*, 2009). Die verschiedenen TIS von *Poly2* liegen alle auf demselben Leseraster. Es ist jedoch vorstellbar, dass variierende bzw. posttranslational modifizierte TI-Faktoren auch dann die alternative Translation über die Kontrolle des *Leaky Scannings* regulieren können, wenn die TIS auf verschiedenen Leserastern liegen.

So könnten auch in Gerste TI-Faktoren, die während der entwicklungsbedingten und der durch Stress eingeleiteten Seneszenz auftreten, die Translation des alternativen und des kanonischen Leserahmens von *HvS40* regulieren. Stresssituationen könnten dabei die vermehrte Translation des alternativen *HvS40*-Leserahmens bewirken. Das in 4.2 beschriebene *PRP*-Gen von Säugetieren kodiert für eine mRNA mit zwei TIS, von der sowohl das Prion-Protein als auch das alternative Prion-Protein translatiert wird (Vanderperre *et al.*, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass das in den Mitochondrien lokalisierte alternative Prion-Protein unter ER-Stress vermehrt synthetisiert wird (Vanderperre *et al.*, 2011). Mitochondrien sind in tierischen Zellen die Organellen, die auftretenden Stress als erstes wahrnehmen. In pflanzlichen Zellen sind es die Chloroplasten, die maßgeblich an der Wahrnehmung von Stress-Signalen und als Produzenten von Phytohormonen und ROS an der Regulation der darauf folgenden zellulären Stressreaktion beteiligt sind (Cao *et al.*, 2011; Nomura *et al.*, 2012). Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von Alt-HvS40:GFP haben gezeigt, dass das Fusionsprotein während der Seneszenz und unter Stressbedingungen in die Chloroplasten transportiert wird (siehe 3.5.4).

JIP60 (*jasmonate-induced protein 60*) ist ein interessanter die Translation regulierender Faktor, der in Gerste beschrieben wurde. Die Synthese des JIP60-Proteins wird durch MeJA induziert und findet auch verstärkt während der natürlichen Seneszenz statt (Rustgi *et al.*, 2014). JIP60 besitzt am N-Terminus eine Domäne, die die Inaktivierung von Ribosomen bewirken kann. Gleichzeitig weist das Protein am C-Terminus eine Domäne auf, die dem eukaryotischen Translationinitiations-Faktor 4E (eIF4E) stark ähnelt (Rustgi *et al.*, 2014). Das JIP60-Protein wird *in vivo* prozessiert, welches die Abtrennung der eIF4E-Domäne bewirkt, die nun frei von der restlichen Proteinsequenz weitere Translationsfaktoren rekrutieren kann. Diese Abtrennung der eIF4E-Domäne ließ sich sowohl bei Behandlung der Pflanzen mit MeJA als auch während der natürlichen Seneszenz beobachten (Rustgi *et al.*, 2014). Die Autoren nehmen an, dass das von JIP60 freigesetzte eIF4E an die Cap-Struktur von mRNAs und an den TI-Faktor eIF4G binden kann. Diese Bindung könnte für die beobachtete Umprogrammierung der Translation verantwortlich sein, die nach der MeJA- und seneszenzbedingten Abspaltung von eIF4E beobachtet werden konnte (Rustgi *et al.*, 2014). Das JIP60-Protein führt unter Stressbedingungen und während der Seneszenz also zwei Funktionen aus. Zum einen hemmt es ganz allgemein die Translation von Transkripten, in dem es die Zusammensetzung der ribosomalen Untereinheiten verhindert. Zum anderen fördert es die Translation von stressassoziierten Transkripten, die die Pflanze für ihre Toleranz gegenüber dem Stress benötigt (Rustgi *et al.*, 2014).

Ein weiteres Beispiel für einen TI-Faktor, der während der Blattseneszenz verstärkt synthetisiert wird und dessen Funktion durch eine posttranslationale Modifizierung verändert wird, ist eIF5A von *Arabidopsis*. eIF5A wird posttranslational durch die Substitution der Aminosäure Hypusin modifiziert. Man geht davon aus, dass der hypusinierte eIF5A-Faktor die Seneszenz fördert, während die unhypusinierte Form die Seneszenz reprimiert (Ma *et al.*, 2010).

4.3 Subzelluläre Lokalisation von Alt-HvS40 und HvS40

4.3.1 Subzelluläre Lokalisation von Alt-HvS40 in seneszierenden Plastiden

Transiente Ko-Transformationen von Zwiebelepidermiszellen mit RFP- und GFP-Fusionskonstrukten zeigten, dass die Alt-S40-Proteine von Gerste und Weizen in den Leukoplasten lokalisiert sind (siehe 3.5.3). In Gerstenprotoplasten, die aus grünem nicht seneszierendem Blattgewebe gewonnen wurden, zeigte das Alt-HvS40:GFP-Fusionsprotein eine subzelluläre Lokalisation im Zellkern und im Cytoplasma (siehe 3.5.4). In Gerstenprotoplasten, die aus natürlich seneszierendem Blattgewebe gewonnen wurden, konnten hingegen grüne Fluoreszenzsignale in den Chloroplasten und im Zellkern detektiert werden (siehe 3.5.4). Auch in Gerstenprotoplasten, die vermehrtem Stress durch Hormonbehandlung und Verwundung des Originalgewebes ausgesetzt waren, zeigte Alt-HvS40:GFP eine subzelluläre Lokalisation in den Chloroplasten und im Zellkern (siehe 3.5.4). Der Import von Alt-HvS40 in die Chloroplasten ist also seneszenz- und stressbedingt. Es ließ sich allerdings nicht gänzlich klären, ob ein bestimmtes seneszenzförderndes Phytohormon die Umverteilung von Alt-HvS40:GFP in die Chloroplasten bewirkt hat (siehe 3.5.4.3). Alle Primärblätter, die für die Phytohormonversuche verwendet und aus denen anschließend die Protoplasten gewonnen wurden, mussten für die Versuchsdurchführung verwundet werden (Abschneiden der Blattbasis und der Blattspitze; siehe 2.3.3). Die Lokalisation von Alt-HvS40 in den Chloroplasten könnte daher durch Jasmonsäure verursacht werden. Jasmonsäure reguliert die pflanzliche Abwehr- und Stressreaktion bei Pathogenbefall und kontrolliert im Zusammenhang damit die Reaktion der Pflanze bei Verwundung. JA hat zudem einen fördernden Einfluss auf den Seneszenzprozess (siehe auch 1.2.1) und könnte auch für den seneszenz-abhängigen Import von Alt-HvS40 in die Chloroplasten verantwortlich sein.

Während der Seneszenz wandeln sich Chloroplasten in Gerontoplasten um (siehe auch 1.1.1). Für diese Umwandlung von einer Plastidenform in die andere ist eine Veränderung der plastidären Proteinzusammensetzung notwendig. 90% der 3000 in Plastiden lokalisierten Proteine sind im Kern kodiert und müssen aus dem Cytosol über die TOC/TIC-Proteinkomplexe (*translocon at the outer/inner membrane of chloroplasts*) in die Plastiden transportiert werden (siehe auch 4.3.2). Es wird diskutiert, dass eine sich verändernde Zusammensetzung von GTP-Rezeptorproteinen, die ein wichtiger Bestandteil des TOC-Komplexes sind, den Protein-Import und damit die Entwicklung der Plastide bestimmt (Ling *et al.*, 2012).

Der TOC-Komplex besteht hauptsächlich aus dem Omp85-Protein (*outer membrane protein*, 85 kDa), dem kanalbildenden TOC75-Protein und GTP-Rezeptorproteinen (Ling *et al.*, 2012). Die GTP-Rezeptorproteine sind Bestandteil der äußeren Hüllmembran und ragen in das Cytoplasma der Zelle hinein. Im Cytoplasma sind sie für die Erkennung von plastidären Vorläuferproteinen anhand der plastidären Transitdomäne (pTP) verantwortlich (Ling and Jarvis, 2015). Im Gegensatz zum TOC75-Protein, das in *Arabidopsis thaliana* durch ein einziges Gen kodiert wird und das in nur einer Isoform vorliegt, weisen die Rezeptorproteine eine große Diversität an verschiedenen Isoformen auf (Ling and Jarvis, 2015). Diese Diversität ist notwendig, da abhängig vom Entwicklungsstand der Plastide unterschiedliche Vorläuferproteine von den Rezeptorproteinen erkannt werden müssen. Plastidäre Vorläuferproteine können in mehrere Gruppen eingeteilt werden (Ling and Jarvis, 2015). Proteine der Gruppe I werden hauptsächlich in junge Plastiden importiert und sind meist Bestandteil des Photosyntheseapparates. Proteine der Gruppe II sind

solche, die für die Aufrechterhaltung des Plastiden-Haushalts verantwortlich sind (*Housekeeping-Proteine*). Sie werden sowohl in jungen als auch in alternden Plastiden gebraucht und werden daher während der gesamten plastidären Entwicklung importiert. Eine weitere Gruppe, die Proteine umfasst, die hauptsächlich in seneszierende Plastiden importiert werden, ist noch nicht näher beschrieben worden. Da es sich aber gerade bei den seneszenzspezifischen Proteinen um solche handelt, die aufgrund ihrer katalytischen Eigenschaften starken Schaden in nicht seneszierenden Chloroplasten anrichten können, ist es sehr wahrscheinlich, dass ihr Import ebenfalls einer starken Kontrolle unterliegt. Zu dieser Gruppe könnte Alt-HvS40 zugeordnet werden. Die Identifizierung der seneszenzassoziierten RING-E3-Ubiquitin-Ligase SP1, die die Zusammensetzung der GTP-Rezeptorproteine während der Seneszenz verändert, unterstützt die Annahme, dass es einen seneszenzspezifischen Proteinimport in die Plastiden gibt (Ling *et al.*, 2012).

4.3.2 Duale Lokalisation von DNA-Bindeproteinen

Mit Plastiden und Mitochondrien existieren in pflanzlichen Zellen neben dem Zellkern noch zwei weitere DNA-enhaltende Kompartimente. Die Genome der Organellen sind polyploid und in Nukleoiden organisiert, welche aus mehreren Kopien ringförmiger, doppelsträngiger DNA bestehen. Die Existenz von drei Genomen in pflanzlichen Zellen lässt sich durch die Endosymbiontentheorie erklären. Danach haben sich Plastiden und Mitochondrien aus phototrophen Cyanobakterien bzw. respiratorischen α -Proteobakterien entwickelt, die zuvor von einem größeren Einzeller endocytotisch aufgenommen worden waren (Schimper, 1883; Mereschkowsky, 1905; Margulis, 1975). Die genetische Information der Organellen-Genome reicht heute bei Weitem nicht mehr aus, um für alle Funktionen zu kodieren, die in Plastiden und Mitochondrien nachgewiesen worden sind. Das Auftreten der Plastiden und Mitochondrien mit einem eigenem Genom forderte von der pflanzlichen Zelle sowohl die metabolische als auch die genetische Integration der zuvor frei lebenden endosymbiontischen Partner (Herrmann, 1999, 1997). So beinhalten Chloroplasten und Mitochondrien verschiedene Proteine, die im Kern kodiert sind und posttranslational in die Plastiden importiert werden müssen. Eine Vielzahl der plastidären und mitochondrialen Proteinkomplexen besteht sowohl aus importierten als auch aus in den Organellen synthetisierten Proteinen. Dies erfordert von allen DNA-haltigen Kompartimenten eine aufeinander abgestimmte Genexpression, die durch den ständigen Austausch anterograder und retrograder Signale zwischen dem Zellkern und den Organellen erreicht wird (Beck, 2001; Koussevitzky *et al.*, 2007).

Zellkern und Organellen stehen vor allem während der Entwicklung und in Stresssituationen in intensiver Zwiesprache miteinander. Umweltveränderungen und Stress werden in pflanzlichen Zellen hauptsächlich von den Chloroplasten wahrgenommen (Bouvier *et al.*, 2009), die mittels retrograder Signale wie H_2O_2 und O_2^- eine Veränderung in der Expression von Kerngenen erreichen können (Beck, 2001; Koussevitzky *et al.*, 2007). Auch Enzyme und Intermediate der Tetrapyrrolbiosynthese (Beck, 2001), PAP (Phosphoadenosin-Phosphat; Estavillo *et al.* (2011)) und der Redoxzustand der Photosyntheseapparate (Pfannschmidt *et al.*, 2003) werden als Auslöser retrograder Signale diskutiert. Daneben sind mehrere Proteine beschrieben worden, die dual in Plastiden und Zellkern lokalisiert sind und die als Überträger retrograder Signale oder selbst als Signal dienen könnten. Die meisten dieser Proteine sind in den DNA- und RNA-Metabolismus involviert und werden bei biotischem Stress, wie zum Beispiel Pathogenbefall, vermehrt synthetisiert (Krause *et al.*, 2012). Sie sind daher ideale Kandidaten, um unter Stress die Genexpression

der DNA-enhaltenden Kompartimente effizient und schnell zu verändern und zu koordinieren (Small *et al.*, 1998; Krause and Krupinska, 2009; Krause *et al.*, 2012).

Es ist wahrscheinlich, dass die in DNA-haltigen Kompartimenten lokalisierten S40-Proteine ebenfalls eine Funktion als DNA/RNA-Bindeproteine ausüben und die Genexpression in Plastiden und Zellkern beeinflussen. In der Tat wurden für die in dieser Arbeit untersuchten S40- und Alt-S40-Proteinen mit Hilfe von Vorhersageprogrammen Funktionen als DNA/RNA- und Zink-Bindeproteine vorhergesagt (siehe 3.4.3). Viele Proteine, die an die DNA binden, besitzen gleichzeitig eine Bindefunktion für Zink. Ein bekanntes Beispiel sind Transkriptionsfaktoren, die eine Zinkfinger-Domäne aufweisen. Die Säureeigenschaften des Zn(II)-Liganden sind dabei wichtig für die Interaktion des zinkbindenden Proteins mit weiteren Liganden (Dupont *et al.*, 2010). Anders als Kupfer oder Eisen unterliegt Zink in der Zelle keinen Redoxreaktionen. Es kann als inert betrachtet werden, reagiert also kaum oder nur in verschwindend geringem Maße mit Biomolekülen wie zum Beispiel der DNA. Zinkbindende Proteine sind daher ideale Kandidaten, um redoxunabhängige Funktionen im Zellkern auszuführen (Dupont *et al.*, 2010).

Die alternativen S40-Proteine, die in der Gruppe II des phylogenetischen Stammbaumes zu finden sind, weisen keine DUF584-Domäne auf. Jedoch konnten im Rahmen dieser Arbeit DUF584-Proteine identifiziert werden, denen zusätzlich zu der konservierten DUF584-Domäne am N-Terminus ein plastidäres oder mitochondriales Transitpeptid vorhergesagt wird (siehe 3.4.3.1 und Anhang, Abb. 49). Solche Proteine konnten in fast allen untersuchten monokotylen Arten identifiziert werden. Auch Gerste besitzt mehrere Proteine, in denen DUF584-Domäne und mitochondriales Transitpeptid miteinander „vereint“ in einem Protein zu finden sind. Es handelt sich dabei um die Proteine Hordeum-2, Hordeum-3 und Hordeum-5 (Anhang, Abb. 49). Die Aufklärung der subzellulären Lokalisation dieser Proteine dürfte in Zukunft ein neues Licht auf die Funktion der DUF584-Domäne werfen.

4.3.3 Mögliche Umverteilung von Alt-HvS40 aus den Plastiden in den Zellkern

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit dem α -Alt-S40-Antikörper in Fraktionen von Zellkernproteinen und Chloroplastenproteinen ein Protein mit einer Größe von 12-13 kDa nachgewiesen werden. Die Konzentration des 13 kDa großen Proteins ist in seneszierenden Chloroplasten höher als in jungen, während es im Zellkern bei einer gleichbleibenden Konzentration des 12 kDa großen Proteins bleibt (siehe 3.7.3). Bei dem in den Proteinfractionen aus Zellkernen und Chloroplasten nachgewiesenen Protein handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um das Alt-HvS40-Protein. Die im Vergleich zum Wildtyp geringere Konzentration dieses Proteins in den Chloroplastenfraktionen der RNAi-*S40*-Linie 7 unterstützt diese Annahme (siehe 3.7.3). Es ist fast nicht möglich, Zellkernextrakte zu gewinnen, die frei von Plastiden sind. Es bleibt deshalb zu beachten, dass mittels der *Western Blot*-Methode die Umverteilung eines Plastidenproteins in den Zellkern nur schwer zu belegen ist (Sikorskaite *et al.*, 2013).

Alt-HvS40 hätte im Zellkern und in den Chloroplasten fast dieselbe Größe. Der leichte Größenunterschied von ungefähr 1 kDa könnte durch unterschiedliche posttranslationale Modifizierungen des Proteins bewirkt werden. Das Alt-HvS40-Protein besitzt mehrere Aminosäuren, die posttranslational durch Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung und Sumolierung verändert werden könnten (siehe 3.4.3). Vor allem die Phosphorylierung bestimmter Aminosäuren der NLS- und NES-Sequenzen könnte die Lokalisation des Proteins im Zellkern beeinflussen (siehe 4.3.4).

Die gleiche Größe von Alt-HvS40 in beiden Kompartimenten würde zudem bedeuten, dass das Protein zunächst in die Plastiden transportiert und dort prozessiert wird, um daraufhin in den Zellkern zu gelangen. Bei dem im Zellkern und in den Plastiden detektierten Protein würde es sich also jeweils um die prozessierte Form handeln. Bis heute sind nur sehr wenige dual lokalisierte Proteine beschrieben, die in Zellkern und Plastiden die gleiche Größe haben. Das DNA-Bindeprotein WHIRLY1 ist ein Beispiel für ein dual in Chloroplasten und Zellkern lokalisiertes Protein, das in beiden Kompartimenten die gleiche Größe aufweist (Grabowski *et al.*, 2008). Es wird diskutiert, dass WHIRLY1 zunächst in den Plastiden gespeichert wird, um unter bestimmten Situationen, wie zum Beispiel bei Befall der Pflanze mit Pathogenen, in den Zellkern umverteilt zu werden (Isemer *et al.*, 2012). WHIRLY1 könnte so als retrogrades Signal auf die Expression von PR-Genen im Zellkern einwirken. Die Umverteilung von WHIRLY1 könnte das Phytohormon Salicylsäure bewirken, das bei Pathogenbefall verstärkt in den Plastiden gebildet wird (Isemer, 2013).

Ein weiteres Beispiel für ein Protein mit derselben Größe in Plastiden und Zellkern ist das HEMERA-Protein von Arabidopsis, das in Plastiden Bestandteil des Transkriptionsaktiven Chromosoms (TAC) ist und daher auch pTAC12 genannt wird (Pfalz *et al.*, 2006). Im Zellkern ist HEMERA Bestandteil der Phytochrom enthaltenen Körperchen, die unter Einfluss von Lichtsignalen die Expression von Kerngenen steuern (Chen *et al.*, 2010). Es ist jedoch noch nicht bekannt, ob HEMERA wie WHIRLY1 und Alt-HvS40 dual in Plastiden und Zellkern derselben Zelle lokalisiert ist oder ob es in Abhängigkeit vom Entwicklungsstand der Zelle oder vom Zelltyp entweder in die Plastiden oder den Zellkern transportiert wird.

Das PEND-Protein zeigte in Fusion mit GFP ebenfalls eine duale Lokalisation in Plastiden und Zellkern (Terasawa and Sato, 2005). Die Autoren nehmen an, dass das Protein zuerst in die Plastiden importiert wird, um darauhin aus den Plastiden in den Zellkern transportiert zu werden. Dort könnte PEND eine Funktion als Transkriptionsfaktor ausüben und eine veränderte Genexpression einleiten (Terasawa and Sato, 2009).

Von Alt-HvS40 kann angenommen werden, dass es in Plastiden und Zellkern an die DNA bindet (siehe 4.3.2). Alt-HvS40 könnte ähnlich wie WHIRLY1 an der retrograden Kommunikation zwischen Organell und Zellkern beteiligt sein, indem es als Reaktion auf Stress aus den Plastiden hinaus transportiert wird und in den Zellkern importiert wird, wo es die Genexpression bestimmter SAGs oder PR-Gene modulieren könnte (Abb. 45). Einige der in Abschnitt 4.2 beschriebenen Proteine, die durch ein dual kodierendes Gen kodiert werden, interagieren mit den jeweiligen dazugehörigen Alternativen Proteinen (Klemke *et al.*, 2001; Vanderperre *et al.*, 2011; Bergeron *et al.*, 2013). Im Zellkern könnte Alt-HvS40 mit HvS40 interagieren und so eine veränderte Genexpression im Zellkern erzielen (Abb. 45). Alt-HvS40 könnte auch im Cytoplasma an HvS40 binden und so einen Import des Proteins in den Zellkern durch Maskierung der NLS verhindern (siehe 4.3.4) (Abb. 45). Die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC-Assay) kann einen ersten Hinweis darauf geben, ob zwei Proteine tatsächlich miteinander interagieren. Erste BiFC-Versuche mit Alt-HvS40 und HvS40 schlugen im Rahmen dieser Arbeit leider fehl, da es technische Probleme mit der Transformation der Gerstenprimärblätter mit *Agrobacterium tumefaciens* gab.

Der Mechanismus, der zu einem Transport von Proteinen aus den Plastiden heraus führen könnte, ist noch nicht vollends bekannt. Die denkbar einfachste Möglichkeit besteht darin,

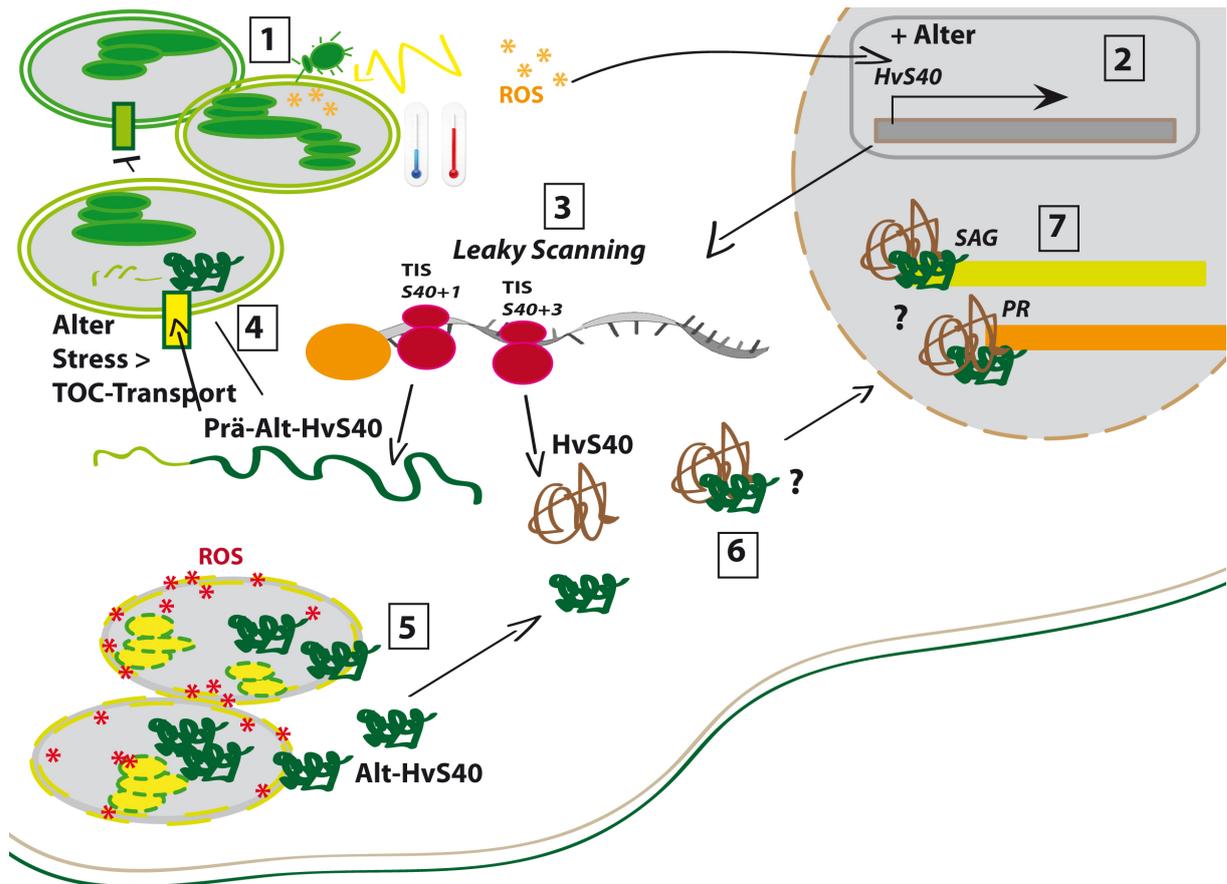


Abbildung (45) 1) ROS werden unter Stress und während der Seneszenz vermehrt gebildet. 2) Die Transkription von *HvS40* kann durch ROS sowie durch stress- und seneszenzassoziierte Transkriptionsfaktoren induziert werden (4.1). 3) Die Translation des alternativen Leserahmens und des kanonischen Leserahmens von einer mRNA könnte über den *Leaky Scanning*-Mechanismus und variierende TI-Faktoren reguliert werden (4.2.2 und 4.2.3). 4) Das alternative S40-Protein wird nur in seneszierende Chloroplasten importiert. Dies könnte durch die unterschiedliche Zusammensetzung der GTP-Rezeptorproteine der TOC-Apparate während der Seneszenz gewährleistet werden (4.3.1). 5) Bedingt durch den Ubiquitin-vermittelten Abbau von stark geschädigten Chloroplasten-Membranen könnte Alt-HvS40 aus seneszierenden Chloroplasten wieder entlassen werden (4.3.3), um daraufhin über die Bindung von Importin in den Zellkern transportiert zu werden (4.3.4). 7) Alt-HvS40 und HvS40 besitzen wahrscheinlich Funktionen als DNA-Bindeproteine, die als positive bzw. negative Regulatoren den Verlauf der Seneszenz beeinflussen (4.3.2 und 4.5). 6)-7) Die Funktion der beiden Protein könnte auch durch eine Interaktion miteinander beeinflusst werden (4.3.2).

dass sich die Membranen der Plastiden während Stresssituationen und während der Seneszenz durchlässig werden und die in ihnen enthaltenen Proteine in das Cytoplasma entlassen werden (Krause and Krupinska, 2009). Für das PEND-Protein, für das ebenfalls eine Umverteilung aus den Plastiden in den Zellkern postuliert wird, konnte bereits gezeigt werden, dass seine Konzentration im Zellkern mit zunehmenden Alter der Zelle ansteigt (Terasawa and Sato, 2005, 2009). Kim *et al.* (2012) zeigten, dass in Plastiden auftretender oxidativer Stress, der durch hohe Lichtintensitäten bei gleichzeitig niedrigen Temperaturen ausgelöst wurde, zur Entlassung von plastidenlokalisierten GFP aus den Chloroplasten in das Cytoplasma führt. Unter oxidativen Stressbedingungen kommt es zu einer vermehrten Ubiquitylierung der Chloroplasten-Hüllmembranen, die daraufhin vom Ubiquitin-26S-Proteasom-System abgebaut wird (Woodson *et al.*, 2015). Auch unter anderen Stressbedingungen wie zum Beispiel bei Pathogenbefall, aber auch während der Seneszenz, kommt es zu einem Anstieg der ROS-Konzentration in der Plastide. Die Überschreitung eines bestimmten Schwellenwertes der ROS-Konzentration bzw. der durch

ROS geschädigten Membranproteine könnte die Ubiquitylierung der Hüllmembranen und die Auflösung der Chloroplasten bewirken (Woodson *et al.*, 2015). Dabei könnten im Chloroplasten enthaltene lösliche Proteine wie Alt-HvS40 ins Cytoplasma entlassen werden (Abb. 45).

In Arabidopsis ist die im Cytoplasma lokalisierte E3-Ubiquitin-Ligase PUB4 (*plant U-box 4*) für die Ubiquitylierung der Chloroplastenhüllmembran mit verantwortlich (Woodson *et al.*, 2015). In Arabidopsis-Mutanten, die keine PUB4 enthalten, wird der Seneszenzprozess verfrüht eingeleitet. Ein gut koordinierter und spezifischer Abbau von beschädigten Chloroplasten scheint demnach wichtig zu sein, um durch sie verursachten oxidativen Stress zu vermeiden und dadurch die Langlebigkeit der photosynthetisch aktiven Zelle und des gesamten Organs zu sichern (Woodson *et al.*, 2015). Die Koordination des Chloroplastenabbaus während der Seneszenz erfordert eine gut abgestimmte Zwiesprache zwischen Zellkern und Chloroplasten (siehe 4.3.2). Zunächst in die Plastiden transportierte und unter extremen Situationen aus den Plastiden wieder freigesetzte Alt-HvS40-Proteine könnten an dieser wichtigen Zwiesprache beteiligt sein (Abb. 45).

4.3.4 *Shuttle*-Proteine: Pendeln zwischen Cytoplasma und Zellkern

Es gibt Kernproteine, die neben NLS- auch NES-Sequenzen besitzen. Die Kombination dieser beiden Motive erlaubt diesen Proteinen ein Pendeln zwischen Kern und Cytoplasma, weshalb sie auch als *Shuttle*-Proteine bezeichnet werden. Zu solchen *Shuttle*-Proteinen zählen Transkriptionsfaktoren, Kinasen und Regulatoren des Zellzyklus (Poon and Jans, 2005). Auch für die Mehrheit der S40- und Alt-S40-Proteine konnten sowohl NLS- als auch NES-Sequenzen vorhergesagt werden (siehe 3.4.3), weshalb auch die S40-Proteine zwischen Kern und Cytoplasma hin und her wandern könnten. Der Aufenthalt der Pendel-Proteine im Zellkern unterliegt einer starken Kontrolle, da sie in der Regel einen großen Einfluss auf die im Zellkern ablaufenden Prozesse ausüben (Poon and Jans, 2005). Die Lokalisation der Pendel-Proteine wird über die posttranslationale Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung ihrer NLS- und NES-Sequenzen reguliert (Poon and Jans, 2005). Die Aktivität der beteiligten Kinasen und Phosphatasen wird daher durch das Auftreten von Hormonen, Wachstumsfaktoren, Entwicklungs- und Stresssignalen genau abgestimmt (Poon and Jans, 2005). Dies ermöglicht der Zelle, die Konzentration von regulatorischen Proteinen im Zellkern zu verändern und zum Beispiel an Stresssituationen oder den Entwicklungsstand der Zelle anzupassen (Poon and Jans, 2005). Alt-HvS40 und HvS40 sind sehr kleine Proteine, die ohne Import- oder Exportsequenz durch passiven Transport über die Zellkernmembran transportiert werden könnten. Die Identifizierung von NLS- und NES-Sequenzen in allen untersuchten S40-Proteinen lässt annehmen, dass die Lokalisation dieser Proteine im Zellkern und im Cytoplasma einer starken Regulierung unterliegt. Sowohl für HvS40 als auch für Alt-HvS40 wurden mit Hilfe von Vorhersageprogrammen Aminosäuren identifiziert, die nahe an den jeweiligen NLS-Sequenzen gelegen sind und die möglicherweise posttranslational phosphoryliert werden (Anhang, Abb. 48). Für das HvS40-Protein konnte bereits experimentell gezeigt werden, dass es posttranslational phosphoryliert werden kann (Kilbiński, 2007). Es wäre also möglich, dass bei beiden Proteinen die subzelluläre Lokalisation im Zellkern über die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung bestimmter Aminosäuren gesteuert wird. Eine Phosphorylierung, die nahe der NLS- oder NES-Sequenz stattfindet, stärkt die Bindungsaffinität der Rezeptorproteine Importin oder Exportin für diese Motive. Dies führt zu einer höheren Konzentration des Proteins im entsprechenden Kompartiment (Poon and Jans, 2005).

Es wird generell angenommen, dass die NLS/NES-Sequenzen gut zugänglich auf der „Oberfläche“ der Proteinstruktur gelegen sein müssen, um durch Importin/Exportin erkannt zu werden. Die NLS- oder die NES-Sequenz kann jedoch durch die Proteinladung oder die Proteinstruktur so maskiert sein, dass Importin bzw. Exportin nicht binden können. Eine spezifische Phosphorylierung des Proteins kann dann eine Struktur- und Ladungsänderung zur Folge haben, so dass die ehemals verdeckte Sequenz für Importin oder Exportin wieder zugänglich wird und das Protein entsprechend in den oder aus dem Zellkern hinaus transportiert werden kann (Poon and Jans, 2005).

NLS/NES-Sequenzen können durch die Bindung von interagierenden Proteinen maskiert werden. Ankerproteine können ebenfalls an diese Sequenzen binden und so den Verbleib des Proteins im Zellkern oder Cytoplasma fördern (Poon and Jans, 2005). Disulfidbrücken-Verbindungen, die aufgrund von Oxidationen auftreten, können ebenfalls die Erkennung einer NLS/NES durch Importin/Exportin verhindern. Manche Proteine werden nur durch spezifische Importine in den Zellkern transportiert, die nur in bestimmten Geweben exprimiert werden. So kommt es zu einer gewebe- und entwicklungspezifischen subzellulären Lokalisation eines Zellkernproteins (Fang *et al.*, 2001).

In Säugetieren konnte gezeigt werden, dass es während der Entwicklung zu Veränderungen in der Zusammensetzung der Nukleoporeine kommt, die den Kernporenkomplex bilden. Dies kann einen erheblichen Einfluss auf den Import von Proteinen in den Zellkern haben (Poon and Jans, 2005). Auch in Pflanzen geht man davon aus, dass es während der Entwicklung und unter spezifischen Stresssituationen zu einer veränderten Zusammensetzung der Nukleoporeine kommt (Meier and Brkljacic, 2009). Dies kann die Zusammensetzung des Zellkernproteoms beeinflussen und zum Beispiel durch eine veränderte Zusammensetzung von Transkriptionsfaktoren eine veränderte Genexpression zur Folge haben. Analysen von Arabidopsis-Mutanten zeigten, dass eine veränderte Zusammensetzung von bestimmten Nukleoporeinen die Expression von auxin-sensitiven Genen beeinflusst. Dadurch wird in diesen Mutanten die Signalwirkung von Auxin verändert (Ferrandez-Ayela *et al.*, 2013). Während der Seneszenz kommt es zu massiven Änderungen in der Genexpression von kernkodierten Genen (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Guo and Gan, 2012; Breeze *et al.*, 2011). Dies wird unter anderem dadurch erreicht, dass vermehrt seneszenz- und stressassoziierte Transkriptionsfaktoren die Genexpression im Zellkern steuern. Dass die erhöhte Konzentration dieser spezifischen Transkriptionsfaktoren u.a. durch eine veränderte Importaffinität der Nukleoporeine gegenüber (*Shuttle*-) Proteinen erreicht wird, ist vorstellbar. Auch die S40-Proteine könnten eine Funktion als DNA-Bindeproteine ausüben und die Expression von seneszenzassoziierten Genen beeinflussen. In Arabidopsis konnte bereits gezeigt werden, dass AtS40-3 die Expression der SAGs *WRKY53*, *SAG12* und *SEN1* beeinflusst (Fischer-Kilbienski *et al.*, 2010). Die mögliche Funktion der S40-Proteine der Gerste soll im nächsten Abschnitt diskutiert werden.

4.4 Charakterisierung von Gersten-Transformanten mit verändertem *S40*-Transkriptgehalt

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gerstenlinien charakterisiert, die zum einen eine verminderte *S40*-Expression durch einen RNAi-Effekt aufweisen und zum anderen den *HvS40+3*-Leserahmen unter der Kontrolle des *HvFBP*-Promotors überexprimieren (siehe 3.6). Unter den verschiedenen Anzuchtbedingungen zeigten die unterschiedlichen Transformanten entweder eine schneller einsetzende Seneszenz oder einen verzögerten Seneszenzprozess.

4.4.1 RNAi-*S40*-Linien

Die antiparallel ausgerichteten *S40*-Sequenzen, deren Expression in den Gerstenpflanzen den RNAi-Effekt bewirken, stehen unter der Kontrolle des *Ubiquitin*-Promotors. Analysen zur Promotoraktivität während der durch Dunkelheit induzierten Seneszenz ergaben, dass das endogene *Ubiquitin*-Gen während der Seneszenz leicht verstärkt exprimiert wird (siehe 3.6.3.1). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass das Ubiquitin-26S-Proteasom-System an dem verstärkten Makromolekülabbau während der Seneszenz beteiligt ist. So werden zum Beispiel seneszierende Chloroplasten, die durch ROS geschädigte Hüllmembranen aufweisen, mit Ubiquitin markiert und über das Ubiquitin-26S-Proteasom-System abgebaut (Woodson *et al.*, 2015). Für die RNAi-Transformanten bedeutet eine verstärkte *Ubiquitin*-Promotoraktivität, dass auch mehr Haarnadelkonstrukte in der Zelle vorliegen, die die beabsichtigte Herabregulation des endogenen *S40*-Transkriptes herbeiführen. Da der RNAi-Effekt beide *S40*-Leserahmen betrifft, sollte in der Zelle sowohl eine geringere Konzentration an Alt-HvS40 als auch an HvS40 vorliegen. Wider Erwarten zeigten einige der homozygoten RNAi-*S40*-Linien während der Seneszenz einen höheren *S40*-Transkriptgehalt als der Wildtyp (siehe 3.6.3.2). Die in der qRT-PCR verwendeten Oligonukleotide binden an einen Bereich der 3'-UTR des *HvS40*-Genes, so dass nur der Gehalt an endogenen *S40*-Transkripten mit diesen ermittelt werden kann. Warum es in diesen Linien zu einem Anstieg der *S40*-Transkripte kam und nicht zu ihrer Herabregulation, ließ sich nicht klären. In früheren Arbeiten mit RNAi-*WHY1*-Linien wurde ebenfalls beobachtet, dass es zu einem Anstieg der *WHY1*-Transkriptmenge kam (Grabowski, 2008). Von fünf anfänglichen RNAi-*S40*-Linien konnte nur mit den Linien 7 und 11 weiter gearbeitet werden, die einen um 40-45% verminderten *S40*-Transkriptgehalt im Vergleich zum Wildtyp aufzeigten (siehe 3.6.3.2) und in deren genomische DNA das Vektorkonstrukt einmal bzw. dreimal eingefügt worden war (siehe 3.6.2).

4.4.2 ÜE-*S40*-Linien

In den Überexpressions-Linien steht der *S40+3*-Leserahmen unter der Kontrolle des *FBP*-Promotors, von dem angenommen wird, dass er im ausdifferenzierten Blatt aktiver ist als im Keimblatt. Dies bietet den Vorteil, spezifisch den Einfluss der *S40+3*-Überexpression auf die Blattseneszenz beobachten zu können, wobei ein Einfluss der Überexpression auf die Keimung nahezu ausgeschlossen werden kann. Eine Überprüfung der *FBP*-Promotoraktivität während der durch Dunkelheit induzierten Seneszenz zeigte eine leichte Herunterregulation der *FBP*-Transkripte (siehe 3.6.6.1). Das Enzym Fruktosebiphosphatase ist Teil des Calvin-Benson-Zyklus und der Glykolyse, beide Prozesse sind lichtabhängig. Dies erklärt, warum es zu einer

Herunterregulation der *FBP*-Transkripte während der durch Dunkelheit induzierten Seneszenz kommt. Die *FBP*-Promotoraktivität nimmt zwar ab, die verbleibende Aktivität sollte aber auch im Dunkeln für eine Expression des *S40+3*-Konstruktes sorgen. In jungen Primärblättern der Transformanten lagen im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Konzentrationen an *HvS40*-Transkripten vor (siehe 3.6.6.2).

Ist die *S40*-Transkriptmenge in dunkel-seneszierenden Pflanzen der ÜE-*S40+3*-Linien im Vergleich zum Wildtyp noch erhöht (siehe 3.6.7.1), so ist in natürlich seneszierenden Transformanten die *S40*-Transkriptmenge wider Erwarten herunter reguliert (siehe 3.6.7.2 und Abb. 35, Seite 96). Die Überexpression des *S40+3*-Leserahmens über einen langen Zeitrahmen könnte zu einem Effekt führen, der als Posttranskriptionelle Geninaktivierung (PTGS, *post transcriptional gene silencing*) bekannt ist. Während der PTGS verringert sich die mRNA-Konzentration trotz Aufrechterhaltung der Transkription deutlich. Es konnte gezeigt werden, dass das Überschreiten eines Schwellenwertes für eine bestimmte mRNA-Konzentration die Bildung von doppelsträngiger mRNA (ds-mRNA) zur Folge hat (Schubert *et al.*, 2004). Die initiale Bildung der ds-mRNA wird von RNA-abhängigen RNA-Polymerasen über einen bisher unbekanntem Mechanismus durchgeführt (Sijen *et al.*, 2001). Die ds-mRNA wird durch den DICER-Komplex erkannt und abgebaut und die entstehenden siRNAs (*small interfering RNA*) werden in den RISC-Komplex eingebaut. Dieser ist nun in der Lage, Transkripte mit Sequenzhomologie zur siRNA abzubauen. Die hierbei entstehenden Spaltungsprodukte könnten wiederum den RNA-abhängigen RNA Polymerasen als Primer dienen, um weiter überschüssige Transkripte in doppelsträngige mRNA-Moleküle zu überführen und so den Abbau noch zu verstärken (Sijen *et al.*, 2001). Dieser Kreislauf führt zu einem Effekt, der dem der RNA-Interferenz ähnelt und die Herunterregulation eines Transkriptes zur Folge hat (siehe auch 3.6.3.2).

Da die Transkriptmenge des überexprimierten Gens direkt proportional zur Integrationsanzahl (Kopienzahl) des Gens in die genomische DNA der Pflanze ist, wird PTGS umso wahrscheinlicher, je höher die Integrationsanzahl ist (Schubert *et al.*, 2004). Eine Analyse der Insertionsereignisse des Vektorkonstruktes in die genomische DNA der untersuchten ÜE-*S40*-Linien steht allerdings noch aus.

4.5 Phänotypisierung der Transformanten

Die RNAi-*S40*-Linien und die ÜE-*S40*-Linien zeigten während der durch Dunkelheit induzierten Seneszenz einen funktionalen *Stay Green*-Phänotyp. Im Gewächshaus und in der Klimakammer seneszierten die RNAi-*S40*-Linien jedoch schneller als der Wildtyp, während die ÜE-*S40*-Linien auch unter Lichteinstrahlung einen verzögerten Seneszenzprozess aufwiesen (siehe 3.6.8 und Abb. 46, Seite 128). Im Dunkeln scheint das *HvS40*-Protein ein negativer Regulator der Seneszenz zu sein, da eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte *S40+3*-Transkriptmenge zu einem *Stay-Green*-Phänotyp führt (siehe 3.6.7.1 und Abb. 46, Seite 128). Dieser Phänotyp wurde bei sieben Tage alten Primärblättern beobachtet, die für mehrere Stunden dunkel gestellt worden waren. In älteren ÜE-*S40*-Pflanzen, die über mehrere Wochen angezogen worden waren, kommt es jedoch zur Herunterregulation des überexprimierten Transkriptes, so dass die Pflanzen eine niedrigere *S40*-Transkriptmenge besitzen als der Wildtyp (siehe 3.6.7.2 und Abb. 46, Seite 128). Auch diese Pflanzen, die nunmehr eine geringere *S40*-Transkriptmenge aufweisen, bleiben im Vergleich zum Wildtyp länger grün (siehe 3.6.7.2). Dies steht im Widerspruch mit dem beobachteten

Phänotyp der RNAi-Pflanzen, die ebenfalls eine niedrigere *S40*-Transkriptmenge besitzen, jedoch bei Anzucht in Gewächshaus oder Klimakammer schneller seneszierern als der Wildtyp. Es ist nicht auszuschließen, dass die unterschiedliche Ausprägung des Phänotyps davon abhängt, ob die Transkripte durch RNA-Interferenz (RNAi) oder durch PTGS (siehe 4.4.2) herunter reguliert werden. So besteht der Unterschied zwischen den RNAi-*S40*- und den ÜE-*S40*-Linien darin, dass in den Pflanzen der RNAi-Linien die *S40*-Transkriptmenge und vermutlich auch die Konzentration beider Proteine von Anfang an reduziert vorliegt (siehe 3.6.3.2 und Abb. 46, Seite 128), während in jungen Pflanzen der ÜE-Linie die *S40+3*-Transkriptmenge und wahrscheinlich auch das HvS40-Protein zunächst in sehr hohen Konzentrationen vorliegen (siehe 3.6.6.2). Die *S40+3*-Transkriptmenge wird erst zu einem späteren Zeitpunkt, wahrscheinlich durch PTGS, wieder vermindert. Nichtsdestotrotz führt eine in jungen Blättern erhöhte *S40+3*-Transkriptmenge und im Zusammenhang damit eine erhöhte Konzentration des S40-Proteins zu einem verzögerten Seneszenzprozess.

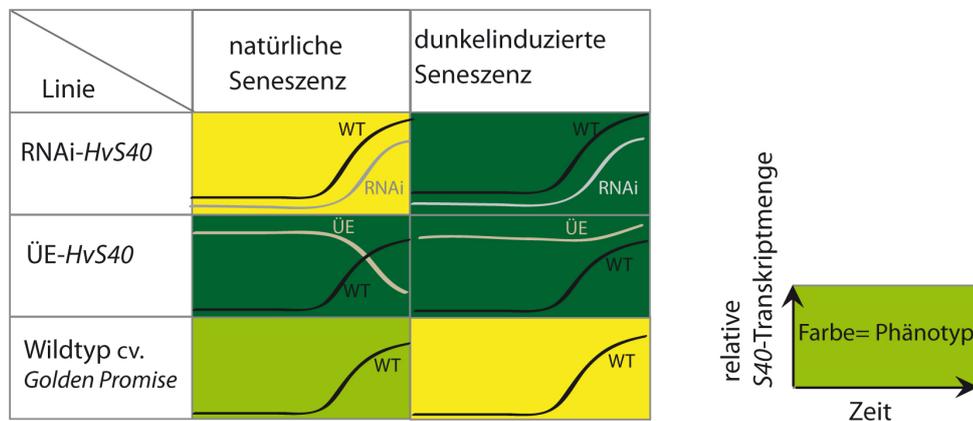


Abbildung (46) Schematische Darstellung der unterschiedlichen Seneszenz-Phänotypen und der idealisierten *S40*-Expressionsmuster in den RNAi-*S40*- und ÜE-*S40*-Linien im Verlauf der Zeit im Vergleich zum Wildtyp. Gelb: stark seneszent; hellgrün: leicht seneszent; dunkelgrün: nicht seneszent.

Die in der Einleitung (siehe 1.2.6) beschriebene T-DNA-Insertionslinie von *Arabidopsis* zeigt ein ähnliches *S40*-Expressionmuster wie die ÜE-*S40*-Linien der Gerste. Auch in *Arabidopsis thaliana* führt eine in jungen Blättern der Mutante erhöhte und in älteren Blättern im Vergleich zum Wildtyp erniedrigte *S40*-Expression zu einem verzögerten Seneszenzprozess (Fischer-Kilbiński *et al.*, 2010). Für das AtS40-3-Protein von *Arabidopsis* konnte bereits gezeigt werden, dass es die Expression von seneszenzassoziierten Genen wie *WRKY53*, *SAG12* und *SEN1* während der Seneszenz positiv reguliert. Allerdings könnte die Expression von seneszenzassoziierten Genen durch *S40* auch reprimiert werden, wenn das Gen in jungen Blättern zu früh exprimiert ist. Dies könnte ebenfalls Auswirkungen auf den Beginn der Seneszenz haben und, wie für die T-DNA-Insertionslinie von *Arabidopsis* und die ÜE-*S40*-Linien der Gerste beobachtet, zu einem verzögerten Seneszenzprozess führen. Durch eine Ermittlung der *HvS40*-Expression über den gesamten Zeitrahmen der Pflanzenanzucht hinweg, ließe sich der Zeitpunkt identifizieren, zu dem die *HvS40+3*-Überexpression zu einer Herunterregulation der *S40*-Transkriptmenge führt. Durch die gleichzeitige Expressionsanalyse von Seneszenzmarker-Genen wie zum Beispiel *WRKY53* oder *SAG12* ließe sich die Auswirkung der veränderten *S40*-Expression auf den beobachteten Phänotyp erklären.

4.5.1 Antagonistische Funktionen der S40-Proteine der Gerste

Pflanzen sind während ihrer Lebensspanne vielen verschiedenen Stressoren ausgesetzt, derer sie sich erwehren müssen. Dabei gehen die Stressvermeidungsstrategien, wie sie zum Beispiel die Reaktionen der Pflanze bei Pathogenbefall darstellen, mit einer starken Reduzierung des Wachstums einher. Die „Entscheidung“, ob auftretende Stressfaktoren die Aktivierung der Stressreaktion zur Folge haben oder ob das Wachstum der Pflanze aufrecht erhalten werden soll, wird über ein molekulares Netzwerk aus Hormonen, Transkriptionsfaktoren und Rezeptoren reguliert. Die Faktoren, die an diesem Netzwerk beteiligt sind, fördern entweder die Stressreaktion, also die Seneszenz oder den programmierten Zelltod, oder sie fördern das Wachstum und die Toleranz gegenüber dem Stress (Dolferus, 2014).

Für die Funktion der S40-Proteine der Gerste während der unterschiedlich eingeleiteten Seneszenzprozesse könnte sich aufgrund der beobachteten unterschiedlichen Phänotypen der RNAi- und ÜE-Linien zunächst folgendes, stark vereinfachtes Modell ergeben: HvS40 übt als negativer Regulator einen hemmenden Einfluss auf den Verlauf der altersbedingten sowie der stressinduzierten Seneszenz aus (siehe 3.6.8, und Abb. 35, Seite 96). Alt-HvS40, das Plastidenprotein, ist hingegen ein positiver Regulator des durch Stress ausgelösten Seneszenzprozesses. Abhängig vom Status der Chloroplasten, die in der pflanzlichen Zelle auftretenden Stress als erstes wahrnehmen, fördert dieses Protein den Fortlauf der Seneszenz. Dabei erfolgt die Translation des alternativen Leserahmens vermutlich nur unter Stressbedingungen, wie im Fall des alternativen Prion-Proteins (Vanderperre *et al.*, 2011) (siehe auch 4.2.3). Um die Hypothese der antagonistischen Funktionen der beiden S40-Proteine zukünftig bestätigen zu können, bedarf es Transformanten, die spezifisch den *HvS40+1*-Leserahmen überexprimieren. Es ist wahrscheinlich, dass die S40-Proteine der Gerste wie das AtS40-3-Protein einen Einfluss auf die Expression von seneszenz- und stressassoziierten Genen ausüben.

Transkriptionsfaktoren, die durch Phytohormone sowie durch ROS aktiviert werden, können als negative oder als positive Regulatoren den Verlauf der Seneszenz beeinflussen. Wenn ein Transkriptionsfaktor ein positiver Regulator der Seneszenz ist, führt seine Herunterregulation oder sein Fehlen zu einem *Stay Green*-Phänotyp (Kusaba *et al.*, 2013). Zu den stressassoziierten Transkriptionsfaktoren zählen NAC-Proteine, deren Synthese durch ABA, Stress und H₂O₂ eingeleitet wird und die den Seneszenzprozess sowohl fördern als auch verzögern können. Die NAC-Proteine ORE1 und NAP fördern zum Beispiel den Seneszenzprozess, in dem sie an die Promotoren von SAGs wie *bifunctional nuclease1* und *SAG113* binden und deren Transkription aktivieren (Matallana-Ramirez *et al.*, 2013; Zhang and Gan, 2012). Mutationen in dem *ORE1*- und *NAP*-Gen von *Arabidopsis thaliana* führen daher zu *Stay Green*-Phänotypen. Die NAC-Transkriptionsfaktoren VNI2 und JUB1 sind hingegen negative Regulatoren der Seneszenz, deren Überexpression in *Arabidopsis* zu einem *Stay Green*-Phänotyp führt (Yang *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012a).

Die zweite große Gruppe seneszenz- und stressassoziiierter Transkriptionsfaktoren bilden die WRKY-Proteine. Das gut untersuchte WRKY53-Protein von *Arabidopsis* ist ein positiver Regulator der Blattseneszenz, seine Überexpression führt zu einem verfrüht einsetzenden Seneszenzprozess (Hinderhofer and Zentgraf, 2001). In Weizen hat die durch Virusbefall verursachte Herunterregulation von *WRKY53* eine verminderte Resistenz gegenüber Blattläusen zur Fol-

ge (Van Eck *et al.*, 2010). Dies zeigt, wie eng der Seneszenzprozess auf molekularer Ebene mit Abwehr- bzw. Toleranzstrategien verwoben ist. WRKY54 und WRKY70 wiederum sind negative Regulatoren der Blattseneszenz, deren Überexpression zu einer verlängerten Wachstumsphase führt (Besseau *et al.*, 2012). Die Expression der meisten *WRKY*-Gene wird durch das Auftreten von SA induziert. Man nimmt an, dass die WRKY-Proteine vor allem eine Funktion in der SA-Signalkaskade ausüben und so den Seneszenzprozess regulieren, der mit der lokalen und systemischen Resistenz auftritt (Kusaba *et al.*, 2013). Auch die WRKY-Proteine sind sowohl Bestandteil der SA-regulierten Stressantwort als auch der natürlichen Seneszenz.

4.5.2 Seneszenzieren: eine Frage der Balance

Für die Gerste sowie für alle anderen Pflanzen ist es wichtig, bei auftretendem Stress den Seneszenzprozess zum richtigen Zeitpunkt einzuleiten. Wird er zu früh eingeleitet und ist der Stress nur vorübergehend, wird die Assimilationsphase „umsonst“ verkürzt. Ein zu spät eingeleiteter Seneszenzprozess kann hingegen die Reproduktion gefährden. Es ist für die Pflanze daher sinnvoll, ein Repertoire von positiven und negativen Seneszenzregulatoren zu besitzen, die aufeinander abgestimmt den Seneszenzprozess einleiten oder verhindern können. Überwiegen zum Beispiel aufgrund von Stresssignalen positive Seneszenzregulatoren in der Zelle, kann die Seneszenz eingeleitet werden. Diese ist reversibel und kann durch auftretende negative Regulatoren wieder „abgebremst“ werden. So kann die Pflanze den Prozess der Seneszenz auf sich verändernde Umweltbedingungen immer wieder abstimmen: Lichtverhältnisse, Wassermangel, Nährstoffverfügbarkeit, Pathogendruck und Temperatur zählen zu den wichtigsten Faktoren, die in der Natur ständigen Schwankungen unterliegen und die einen starken Einfluss auf den Seneszenzprozess haben. Vor allem Phytochrome, Phytohormone sowie ROS sind in die Signaltransduktion involviert, die die Pflanze ihre Umwelt wahrnehmen lassen. Die *HvS40*-Expression wird durch all diese Faktoren induziert (siehe 1.2.6). Das kernlokalisierte HvS40-Protein und das in den Plastiden lokalisierte Alt-HvS40 haben putative Funktionen als negative und positive Seneszenzregulatoren (siehe 4.5). Während der Seneszenz selbst wird zum einen die Photosyntheserate aufrecht erhalten, während es zum anderen zum Abbau der Photosynthesapparate und zur Remobilisierung der aus ihnen gewonnenen Nährstoffe kommt (siehe 1.1.1). Alt-HvS40 und HvS40 sind Komponenten des hochregulierten retrograden und anterograden Signalaustausches, der während der Seneszenz das parallele Ablaufen der Assimilations- und Abbauprozesse gewährleistet und koordiniert.

4.6 Ausblick

Das in dieser Arbeit untersuchte seneszenzassoziierte Gen *HvS40* der Gerste ist das erste in Pflanzen beschriebene dual kodierende Gen. *In silico*-Analysen ergaben, dass noch weitere monokotyle Arten, die zu den kleinkörnigen Getreiden und Gräsern zählen, einen alternativen *S40*-Leserahmen besitzen. Um zu überprüfen, ob in der Zelle wie angenommen ein großes *S40*-Transkript vorliegt oder ob zwei verschiedene *S40*-Transkripte unterschiedlicher Längen vorkommen, können 5'RACE- oder RLM-RACE-PCR-Analysen durchgeführt werden. Diese ermöglichen die Ermittlung der Länge der 5'-UTR von Transkripten.

Die genauere Untersuchung der AUG-Kontexte beider Leserahmen ergab, dass diese in einem optimalen Kontext liegen und dass es sich bei beiden mit hoher Wahrscheinlichkeit um TIS (Translation-Initiationsstellen) handelt. Um zu überprüfen, ob die Translation an beiden TIS initiiert wird, können Versuche zur *in vitro* Translation durchgeführt werden. Die zellfreie Proteinsynthese mit zum Beispiel Weizenkeimextrakten ermöglicht die Markierung neu synthetisierter Proteine mit radioaktiv markierten Aminosäuren wie zum Beispiel ³⁵S-Methionin, welches nach einer Auftrennung der Proteine über eine SDS-PAGE mit Röntgenfilmen nachgewiesen werden kann.

Um die subzelluläre Lokalisation von Alt-HvS40 in den Plastiden zu bestätigen, können *in organello*-Importversuche mit intakten Chloroplasten durchgeführt werden. Dabei werden *in vitro* synthetisierte, radioaktiv mit zum Beispiel ³⁵S-Methionin markierte Vorstufenproteine mit isolierten, intakten Chloroplasten inkubiert. Ein Teil der Chloroplasten wird mit Thermolysin behandelt, während die andere Hälfte unbehandelt bleibt. Wird das Protein erfolgreich in die Chloroplasten importiert, so bleibt es vor dem Abbau durch Thermolysin geschützt und kann in der Chloroplastenfraktion nachgewiesen werden.

Um der Frage nachzugehen, ob eine unter Stresssituationen veränderte Translation der *S40*-mRNA zur Synthese des plastidenlokalisierten Alt-HvS40 führt oder ob ein veränderter Proteinimport über den TOC-Apparat verantwortlich für die Lokalisation von Alt-HvS40 in den Plastiden ist, können neue Gerste-Transformanten hergestellt werden. Für die erste Transformation müssen zwei unterschiedliche Konstrukte hergestellt werden, die jeweils die intakten, die AUGs beider Leserahmen umgebenden Nukleotidkontexte beinhalten, in denen jedoch durch eine gezielte Punktmutation entweder das AUG des *HvS40+1*- oder des *HvS40+3*-Leserahmens nicht mehr in ein Methionin überstezt werden kann. *In frame* zu dem jeweils intakten Leserahmen werden unterschiedliche Reportergene kloniert wie zum Beispiel *GFP* und *CFP*. Durch das Kreuzen zweier Linien, die jeweils für das eine oder das andere Konstrukt homozygot sind, können im zweiten Schritt Pflanzen generiert werden, die beide Konstrukte enthalten. Mit diesen Pflanzen kann beobachtet werden, unter welchen Bedingungen welcher Leserahmen translatiert wird und ob die Lokalisation der Proteine von zusätzlichen Bedingungen abhängt.

Mit großer Wahrscheinlichkeit gelang der Nachweis des Alt-S40-Proteins unter zu Hilfenahme des in dieser Arbeit charakterisierten α -Alt-HvS40-Antikörpers. Um weiter zu überprüfen, ob es sich bei dem mit dem α -Alt-S40 nachgewiesenen Protein um das alternative S40-Protein handelt, könnten die Proteinkonzentrationen von Wildtyp und der weiteren RNAi-*S40*-Linie 11 verglichen werden. ÜE-Linien der Gerste, die spezifisch den *HvS40+1*-Leserahmen überexprimieren, werden zu diesem Zeitpunkt am IPK in Gatersleben hergestellt und können ebenfalls der Überprüfung

des Antikörpers dienen.

Aus Plastiden stammende Proteine in Zellkernen mittels der *Western Blot*-Methode nachzuweisen ist sehr schwierig, da es fast nicht möglich ist, Zellkernextrakte zu gewinnen, die frei von Plastiden sind (Sikorskaite *et al.*, 2013). Um die Hypothese der Umverteilung von Alt-HvS40 aus den Plastiden in den Zellkern zu bestätigen, könnte daher ein Vektorkonstrukt gefertigt werden, das das rekombinante Proteins, für das es kodiert, nur dann im Zellkern von transient transformierten Pflanzen akkumulieren lässt, wenn es zuvor in den Chloroplasten prozessiert wurde. Durch das Vorschalten einer NES vor das plastidäre Transitpeptid am N-Terminus des Alt-HvS40-Proteins wird eine Akkumulation des Proteins im Zellkern verhindert, das Protein liegt daher im Cytoplasma vor. Der Nachweis der subzellulären Lokalisation erfolgt mit Hilfe von GFP, das sich am C-Terminus des Proteins befinden muss. Kommt es unter bestimmten Bedingungen zu einem Import des Proteins in die Chloroplasten, so wird die NES zusammen mit der pTP abgespalten. Ist die GFP-Fluoreszenz nun im Kern nachweisbar, muss es zu einem Transport des Proteins aus den Chloroplasten in den Zellkern gekommen sein. Für das NRIP-Protein des Tabaks konnte so nachgewiesen werden, dass es wahrscheinlich über Stromuli aus den Chloroplasten in den Zellkern transportiert wird (Caplan *et al.*, 2015).

qRT-PCR-Analysen haben gezeigt, dass die *S40*-Transkripte im Vergleich zum Wildtyp in den untersuchten RNAi-Linien herunter reguliert sind und in allen ÜE-Linien in höheren Konzentrationen vorliegen. Dies ist jedoch nur ein erster Hinweis auf eine niedrigere bzw. höhere Proteinkonzentration in der Zelle. Mit dem α -Alt-HvS40-Antikörper und einem neuen Antikörper, der gegen HvS40 gerichtet ist, müssen deshalb Analysen der Proteinkonzentration in den RNAi-*S40*- und den ÜE-*S40*-Linien durchgeführt werden.

Ein induzierbares Promotorsystem würde die Analyse von ÜE-*S40*-Transformanten erleichtern. Mit diesem kann gezielt die *S40*-Überexpression zu einem gewünschten Zeitpunkt der Entwicklung eingeleitet werden. Dadurch kann die Auswirkung der veränderten Transkriptmenge auf den Phänotyp der Gerstenpflanzen analysiert werden, ohne dass durch PTGS vermittelte Transkriptschwankungen berücksichtigt werden müssen.

Für die *S40*-Proteinen der Gerste konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Funktion als Seneszenz-Regulatoren postuliert werden. Inwiefern die *S40*-Proteine der Gerste, ähnlich wie AtS40-3 von Arabidopsis, die Genexpression von kernkodierten SAGs regulieren, kann mit Hilfe der qRT-PCR überprüft werden. Die Expression von zu unterschiedlichen Zeiten im Verlauf der Seneszenz exprimierten SAGs wie zum Beispiel *WRKY53*, *SAG113* oder *SAG12* kann in den Transformanten ermittelt und mit der Expression im Wildtyp verglichen werden. Dadurch ließe sich erkennen, ob und zu welchem Zeitpunkt die HvS40-Proteine einen Einfluss auf die seneszenzspezifische Genexpression haben. Darüber hinaus ließe sich bestimmen, zu welchen Zeitpunkten und unter welchen Bedingungen Alt-HvS40 als positiver Regulator den Verlauf der Seneszenz reguliert. Dafür sind die ÜE-*S40+1*-Linien jedoch unabdingbar. Diese Linien sind ebenfalls von großem Vorteil, um zu überprüfen, ob Alt-HvS40 retrograde Plastidensignale an den Zellkern vermittelt. Dazu kann die Expression von solchen Kerngenen, die nachweislich unter der Kontrolle von retrograden Signalen stehen (zum Beispiel das *LHCB*-Gen), in der ÜE-*S40+1*-Linie, der RNAi-*S40*-Linie und im Wildtyp ermittelt und miteinander verglichen werden.

Einige der in dieser Arbeit beschriebenen alternativen Proteine interagieren mit den kanonischen Proteinen, die von demselben Gen kodiert werden. Erste Untersuchungen zur Interaktion

der beiden S40-Proteine miteinander können mit dem System der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) durchgeführt werden. Mit dem *Yeast Two Hybrid*-System kann zudem untersucht werden, ob es daneben noch weitere potentielle Interaktionspartner der S40-Proteine gibt.

5 | Zusammenfassung / Summary

In der vorliegenden Arbeit wurde das seneszenzassoziierte Gen *HvS40* als dual kodierendes Gen charakterisiert. Damit wurde ein solches Gen erstmals in Pflanzen beschrieben. Die Promotorstudie identifizierte zahlreiche *cis*-Elemente, die die Expression des Gens abhängig von Licht-, Stress- und Entwicklungssignalen kontrollieren können. Der alternative Leserahmen *S40+1*, der den kanonischen Leserahmen *S40+3* im 5'-Bereich überragt, konnte auch in anderen monokotylen, jedoch nicht in dikotylen Arten gefunden werden. Unter anderem weisen Weizen (*Triticum durum*, *Triticum aestivum*) deutsches Weidelgras (*Lolium perenne*) und Kolbenhirse (*Setaria italica*) den alternativen Leserahmen in ihren Sequenzen auf.

Das S40-Protein der Gerste, das durch den kanonischen Leserahmen *S40+3* kodiert wird, kann der pflanzenspezifischen DUF584-Proteinfamilie zugeordnet werden. Diese kommt sowohl in monokotylen als auch in dikotylen Pflanzen vor. Der in dieser Arbeit generierte Stammbaum zeigt, dass die DUF584-Proteine der monokotylen Arten in sieben Gruppen eingeteilt werden können. Dabei bilden die Proteine, die einen alternativen Leserahmen in ihrer kodierenden Sequenz aufweisen, eine eigene phylogenetische Untergruppe.

Versuche zur subzellulären Lokalisation mit PEND- und GFP-Fusionsproteinen zeigten, dass die Alt-S40-Proteine von Gerste und Weizen mit dem PEND-Protein von Arabidopsis in Plastiden und im Zellkern derselben Zelle ko-lokalisiert waren. Die S40-Proteine zeigten in transient transformierten Zwiebelepidermiszellen hingegen eine ausschließliche Lokalisation im Zellkern. Es konnte gezeigt werden, dass der Transport von Alt-HvS40:GFP in die Plastiden abhängig vom Entwicklungsstand der Zelle ist: In Gerstenprotoplasten aus jungem Gewebe war Alt-HvS40:GFP im Cytoplasma und im Zellkern detektierbar, in Protoplasten aus seneszierendem Gewebe hingegen in den Plastiden und dem Zellkern derselben Zelle lokalisiert. HvS40:GFP zeigte sowohl in den Protoplasten aus jungem Gewebe als auch in Protoplasten aus seneszierendem Gewebe eine Lokalisation im Zellkern. Es wurde zudem untersucht, ob die beobachtete Lokalisation von Alt-HvS40 in den Plastiden möglicherweise von Phytohormonen abhängt. Erste Versuche dazu weisen darauf hin, dass Jasmonsäure die Verteilung von Alt-HvS40:GFP in der Zelle regulieren könnte. Im Rahmen dieser Arbeit konnten zudem DUF584-Proteine identifiziert werden, die zusätzlich zu der *Domain of unknown Function* ein potentielles plastidäres oder mitochondriales Transitpeptid aufweisen. Dies wirft ein neues Licht auf die bislang unbekannt Funktion dieser Domäne.

Untersuchungen an Gerstentransformanten mit verändertem *S40*-Transkriptgehalt (RNA-Interferenz- und Überexpressionslinien) zeigten, dass beide Proteine eine regulatorische Funktion während des Seneszenzprozesses ausüben. Dabei agiert das HvS40-Protein als negativer Regulator der Seneszenz, während das alternative Protein den Seneszenzprozess vermutlich in Abhängigkeit von Licht- und Plastidensignalen fördert. Es ist wahrscheinlich, dass beide Proteine eine regulatorische Funktion als DNA-Bindeprotein ausüben. Mit dem in dieser Arbeit charakterisierten Antikörper α -Alt-HvS40, der gegen eine Peptidsequenz des alternativen S40-Proteins gerichtet ist, konnte ein 13 kDa großes Protein in Proteinfractionen aus Chloroplasten und ein 12 kDa großes Protein in Proteinfractionen aus Zellkernen nachgewiesen werden. Bei beiden Proteine kann es sich um das prozessierte alternative S40-Protein der Gerste handeln. Da das detektierte Protein in Plastiden und Zellkern die gleiche Größe hat, kann angenommen werden, dass das

Alt-HvS40-Protein aus den Plastiden in den Zellkern umverteilt wird.

Summary

In this study the senescence associated gene *HvS40* of barley was identified as dual coding gene thereby being the first dual coding gene described in plants. *Cis* regulatory elements identified in the promoter region of the gene are mainly regulated by light- and stress-signals and by ABA. The alternative reading frame *S40+1* which overlaps the canonical reading frame *S40+3* in 5' direction can also be found in other monocotyledonous but not in dicotyledonous plants like *Arabidopsis thaliana*. The alternative reading frame can be found amongst others in wheat (*Triticum durum*, *Triticum aestivum*), perennial ryegrass (*Lolium perenne*) and foxtail millet (*Setaria italica*).

The S40 protein of barley encoded by the canonical reading frame *S40+3* belongs to the plant specific DUF584-protein family which is present in monocotyledons as well as in dicotyledons. A phylogentic tree was created using the protein sequences of the monocotyledonous DUF584-proteins. Within this phylogenetic tree the DUF584-proteins showing an alternative reading frame in the coding sequence constitute an own subgroup.

Co-localization experiments with transiently transformed onion epidermis cells confirmed the subcellular localization of Alt-HvS40:GFP and Alt-TdS40:GFP in plastids and the nucleus of the same cell, whereas the S40-proteins of barley and wheat show an exclusive subcellular localization in the nucleus of transiently transformed onion epidermis cells. It was further demonstrated that the subcellular localization of Alt-HvS40:GFP in the chloroplasts is age dependent: In barley protoplasts isolated from young non-senescent leaves, Alt-HvS40:GFP showed a subcellular localization in the cytoplasm and the nucleus, whereas a subcellular localization in the chloroplasts could only be observed in protoplasts derived from senescent tissue. Additional experiments indicate that jasmonic acid might regulate the distribution of Alt-HvS40:GFP within the cell. Additionally, DUF584-proteins containing a potential mitochondrial or plastidal transit sequence at the N-terminus could also be identified. The validation of the subcellular localization of these proteins in the organelles will shed light on the function of the DUF584 domain whose function is to date unidentified.

To gain more insight into the function of the S40 proteins as potential senescence regulators, transgenic barley lines with altered *S40* transcript levels (RNA interference and overexpression lines) were characterized. The S40 protein from barley was shown to be a negative regulator of senescence whereas the Alt-S40 protein might act as a positive regulator of the senescence process. It is likely that both proteins function as DNA binding proteins as they are both basic proteins with high predictions for DNA binding capacity. It is assumed that Alt-HvS40 is important for perception of stress signals inside plastids and for the plants reactions towards stress.

Immunological studies with cell fractions using an antibody directed against Alt-HvS40 additionally indicate that Alt-HvS40 is dual localized in plastids and the nucleus of the same cell. The fact, that the molecular mass of the detected protein in the nucleus and in the plastids, respectively, is the same, suggests that the Alt-HvS40 protein is processed in plastids and subsequently translocated from the organelles to the nucleus. Therefore Alt-HvS40 can be discussed as a senescence associated transmitter of signals from plastids to the nucleus.

Literaturverzeichnis

- Abe H., Urao T., Ito T., Seki M., Shinozaki K., and Yamaguchi-Shinozaki K. (2003). Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant Cell*, 15:63–78.
- Akyildiz M., Gowik U., Engelmann S., Koczor M., Streubel M., and Westhoff P. (2007). Evolution and function of a cis-regulatory module for mesophyll-specific gene expression in the C4 dicot *Flaveria trinervia*. *The Plant Cell*, 19:3391–3402.
- Apel K. and Hirt H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55:373–399.
- Arenas-Huertero F., Arroyo A., Zhou L., Sheen J., and León P. (2000). Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes & Development*, 14:2085–2096.
- Arnold F. H. (1991). Metal-affinity separations: a new dimension in protein processing. *Nature Biotechnology*, 9:151–156.
- Ay N., Janack B., Fischer A., Reuter G., and Humbeck K. (2015). Alterations of histone modifications at the senescence-associated gene HvS40 in barley during senescence. *Plant Molecular Biology*, 89:127–141.
- Balazadeh S., Riaño-Pachón D., and Mueller-Roeber B. (2008). Transcription factors regulating leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology*, 10:63–75.
- Bartoli C. G., Casalongué C. A., Simontacchi M., Marquez-Garcia B., and Foyer C. H. (2013). Interactions between hormone and redox signalling pathways in the control of growth and cross tolerance to stress. *Environmental and Experimental Botany*, 94:73–88.
- Beck C. F. (2001). Signaling pathways in chloroplast-to-nucleus communication. *Protist*, 152:175–182.
- Becker W. (1991). Isolierung und Charakterisierung von cDNAs für mRNAs, die bei der künstlich induzierten Seneszenz von abgetrennten Gerstenblättern neu auftreten. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- Becker W. and Apel K. (1993). Differences in gene expression between natural and artificially induced leaf senescence. *Planta*, 189:74–79.
- Bergeron D., Lapointe C., Bissonnette C., Tremblay G., Motard J., and Roucou X. (2013). An out-of-frame overlapping reading frame in the ataxin-1 coding sequence encodes a novel ataxin-1 interacting protein. *Journal of Biological Chemistry*, 288:21824–21835.
- Besseau S., Li J., and Palva E. T. (2012). WRKY54 and WRKY70 co-operate as negative regulators of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 63:2667–2679.
- Bimboim H. and Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7:1513–1523.

- Bolanos-Garcia V. M. and Davies O. R. (2006). Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1760:1304–1313.
- Bouvier F., Mialoundama A., and Camara B. (2009). A Sentinel Role for Plastids. Springer, Berlin.
- Bradford M. 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.
- Breeze E., Harrison E., McHattie S., Hughes L., Hickman R., Hill C., Kiddle S., Kim Y. S., Penfold C. A., Jenkins D., *et al.* (2011). High-resolution temporal profiling of transcripts during Arabidopsis leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. *The Plant Cell*, 23:873–894.
- Briggs A. G. and Bent A. F. (2011). Poly(ADP-ribosyl)ation in plants. *Trends in Plant Science*, 16:372–380.
- Buchanan-Wollaston V., Page T., Harrison E., Breeze E., Lim P. O., Nam H. G., Lin J.-F., Wu S.-H., Swidzinski J., Ishizaki K., *et al.* (2005). Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 42:567–585.
- Burke T. W. and Kadonaga J. T. (1996). Drosophila TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes and Development*, 10:711–724.
- Butt A., Mousley C., Morris K., Beynon J., Can C., Holub E., Greenberg J. T., and Buchanan-Wollaston V. (1998). Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein gene in Arabidopsis in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*. *The Plant Journal*, 16:209–221.
- Cai C., Han L., Ji Z. L., Chen X., and Chen Y. Z. (2003). SVM-Prot: web-based support vector machine software for functional classification of a protein from its primary sequence. *Nucleic Acids Research*, 31:3692–3697.
- Cao F. Y., Yoshioka K., and Desveaux D. (2011). The roles of ABA in plant-pathogen interactions. *Journal of Plant Research*, 124:489–499.
- Caplan J. L., Kumar A. S., Park E., Padmanabhan M. S., Hoban K., Modla S., Czymmek K., and Dinesh-Kumar S. P. (2015). Chloroplast stromules function during innate immunity. *Developmental Cell*, 34:45–57.
- Cavalar M., Möller C., Offermann S., Krohn N. M., Grasser K. D., and Peterhänsel C. (2003). The interaction of DOF transcription factors with nucleosomes depends on the positioning of the binding site and is facilitated by maize HMGB5. *Biochemistry*, 42:2149–2157.
- Chen M., Galvão R. M., Li M., Burger B., Bugea J., Bolado J., and Chory J. (2010). Arabidopsis HEMERA/pTAC12 initiates photomorphogenesis by phytochromes. *Cell*, 141:1230–1240.

- Chirico N., Vianelli A., and Belshaw R. (2010). Why genes overlap in viruses. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 277:3809–3817.
- Christiansen M. W. and Gregersen P. L. (2014). Members of the barley NAC transcription factor gene family show differential co-regulation with senescence-associated genes during senescence of flag leaves. *Journal of Experimental Botany*, 65:4009–4022.
- Chung W.-Y., Wadhawan S., Szklarczyk R., Pond S. K., and Nekrutenko A. (2007). A first look at ARFome: dual-coding genes in mammalian genomes. *PLoS Computational Biology*, 3:855–861.
- Cohen S. N., Chang A. C., and Hsu L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69:2110–2114.
- Crossthwaite A. J., Ciruela A., Rayner T. F., and Cooper D. M. (2006). A direct interaction between the N terminus of adenylyl cyclase AC8 and the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Molecular Pharmacology*, 69:608–617.
- 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, Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- Dangl J. L., Dietrich R. A., and Thomas H. (2000). Senescence and Programmed Cell Death. American Society of Plant Physiologists, Rockville.
- Davletova S., Rizhsky L., Liang H., Shengqiang Z., Oliver D. J., Coutu J., Shulaev V., Schlauch K., and Mittler R. (2005). Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis. *The Plant Cell*, 17:268–281.
- Derksen H., Rampitsch C., and Daayf F. (2013). Signaling cross-talk in plant disease resistance. *Plant Science*, 207:79–87.
- Desveaux D., Després C., Joyeux A., Subramaniam R., and Brisson N. (2000). PBF-2 is a novel single-stranded DNA binding factor implicated in PR-10a gene activation in potato. *The Plant Cell*, 12:1477–1489.
- Distelfeld A., Avni R., and Fischer A. M. (2014). Senescence, nutrient remobilization, and yield in wheat and barley. *Journal of Experimental Botany*, 65:3783–3798.
- Dolferus R. (2014). To grow or not to grow: A stressful decision for plants. *Plant Science*, 229:247–261.
- Dupont C. L., Butcher A., Valas R. E., Bourne P. E., and Caetano-Anollés G. (2010). History of biological metal utilization inferred through phylogenomic analysis of protein structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107:10567–10572.
- Estavillo G. M., Crisp P. A., Pornsiriwong W., Wirtz M., Collinge D., Carrie C., Giraud E., Whelan J., David P., Javot H., *et al.* (2011). Evidence for a SAL1-PAP chloroplast retrograde

- pathway that functions in drought and high light signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 23:3992–4012.
- Eulgem T., Rushton P. J., Robatzek S., and Somssich I. E. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*, 5:199–206.
- Fang X.-d., Chen T., Tran K., and Parker C. S. (2001). Developmental regulation of the heat shock response by nuclear transport factor karyopherin- α 3. *Development*, 128:3349–3358.
- Ferrandez-Ayela A., Alonso-Peral M. M., Sánchez-García A. B., Micol-Ponce R., Perez-Perez J. M., Micol J. L., and Ponce M. R. (2013). Arabidopsis TRANSCURVATA1 encodes NUP58, a component of the nucleopore central channel. *PLoS One*, 8:e67661.
- Filichkin S., Leonard J., Monteros A., Liu P., and Nonogaki H. (2004). A novel endo-beta-mannanase gene in tomato LeMAN5 is associated with anther and pollen development. *Plant Physiology*, 134:1080–1087.
- Fischer-Kilbienski I., Miao Y., Roitsch T., Zschiesche W., Humbeck K., and Krupinska K. (2010). Nuclear targeted AtS40 modulates senescence associated gene expression in Arabidopsis thaliana during natural development and in darkness. *Plant Molecular Biology*, 73:379–390.
- Foyer C. H. and Noctor G. (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11:861–905.
- Fu Z. Q. and Dong X. (2013). Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology*, 64:839–863.
- Fujita M., Fujita Y., Maruyama K., Seki M., Hiratsu K., Ohme-Takagi M., Tran L.-S. P., Yamaguchi-Shinozaki K., and Shinozaki K. (2004). A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *The Plant Journal*, 39:863–876.
- Fujita M., Fujita Y., Noutoshi Y., Takahashi F., Narusaka Y., Yamaguchi-Shinozaki K., and Shinozaki K. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology*, 9:436–442.
- Gan S. and Amasino R. M. (1997). Making sense of senescence (molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence). *Plant Physiology*, 113:313–319.
- Genoud T., Buchala A. J., Chua N.-H., and Métraux J.-P. (2002). Phytochrome signalling modulates the SA-perceptive pathway in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 31:87–95.
- Gepstein S. and Thimann K. V. (1980). Changes in the abscisic acid content of oat leaves during senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77:2050–2053.
- Gowik U., Burscheidt J., Akyildiz M., Schlue U., Koczor M., Streubel M., and Westhoff P. (2004). cis-Regulatory elements for mesophyll-specific gene expression in the C4 plant Flaveria trinervia, the promoter of the C4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene. *The Plant Cell*, 16:1077–1090.

- Grabowski E. (2008). Isolierung, Charakterisierung und funktionelle Analyse der Whirly-Proteine der Gerste (*Hordeum vulgare L.*). Dissertation, Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- Grabowski E., Miao Y., Mulisch M., and 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*, 147:1800–1804.
- Graham L. E., Schippers J. H., Dijkwel P. P., and Wagstaff C. (2012). Ethylene and senescence processes. *Annual Plant Reviews, The Plant Hormone Ethylene*, 44:305–341.
- Gregersen P., Holm P., and Krupinska K. (2008). Leaf senescence and nutrient remobilisation in barley and wheat. *Plant Biology*, 10:37–49.
- Gregersen P. L., Culetic A., Boschian L., and Krupinska K. (2013). Plant senescence and crop productivity. *Plant Molecular Biology*, 82:603–622.
- Groten K., Dutilleul C., van Heerden P. D., Vanacker H., Bernard S., Finkemeier I., Dietz K.-J., and Foyer C. H. (2006). Redox regulation of peroxiredoxin and proteinases by ascorbate and thiols during pea root nodule senescence. *FEBS Letters*, 580:1269–1276.
- Gruissem W., Greenberg B. M., Zurawski G., and Hallick R. B. (1986). Chloroplast gene expression and promoter identification in chloroplast extracts. *Methods in Enzymology*, 118:253–270.
- Grzybowska E. A. (2012). Human intronless genes: functional groups, associated diseases, evolution, and mRNA processing in absence of splicing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 424:1–6.
- Guiboileau A., Sormani R., Meyer C., and Masclaux-Daubresse C. (2010). Senescence and death of plant organs: nutrient recycling and developmental regulation. *Comptes Rendus Biologies*, 333:382–391.
- Guo Y., Cai Z., and Gan S. S. (2004). Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence. *Plant, Cell and Environment*, 27:521–549.
- Guo Y. and Gan S. S. (2012). Convergence and divergence in gene expression profiles induced by leaf senescence and 27 senescence-promoting hormonal, pathological and environmental stress treatments. *Plant, Cell and Environment*, 35:644–655.
- Haralampidis K., Milioni D., Rigas S., and Hatzopoulos P. (2002). Combinatorial interaction of cis elements specifies the expression of the Arabidopsis AtHsp90-1 gene. *Plant Physiology*, 129:1138–1149.
- Harman D. (1981). The aging process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78:7124–7128.
- Harris J. B. and Schaefer V. G. (1981). Some correlated events in aging leaf tissues of tree tomato and tobacco. *Botanical Gazette*, 142:43–54.
- Hartmann U., Sagasser M., Mehrtens F., Stracke R., and Weisshaar B. (2005). Differential combinatorial interactions of cis-acting elements recognized by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH

- factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes. *Plant Molecular Biology*, 57:155–171.
- Haussühl K. (1998). Charakterisierung der Blattseneszenz von *Hordeum vulgare* L. unter besonderer Berücksichtigung des Gens *HvS40*. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- He Y., Fukushige H., Hildebrand D. F., and Gan S. (2002). Evidence supporting a role of jasmonic acid in Arabidopsis leaf senescence. *Plant Physiology*, 128:876–884.
- Hensel G., Valkov V., Middlefell-Williams J., and Kumlehn J. (2008). Efficient generation of transgenic barley: the way forward to modulate plant–microbe interactions. *Journal of Plant Physiology*, 165:71–82.
- Herrmann R. (1997). Eukaryotism, Towards a New Interpretation. In *Eukaryotism and Symbiosis*. Springer Berlin.
- Herrmann R. (1999). The Chloroplast: Part of the Integrated Genetic System of the Plant Cell. Kluwer Academy Publication Netherlands.
- Hinderhofer K. and Zentgraf U. (2001). Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence. *Planta*, 213:469–473.
- Hollmann J., Gregersen P. L., and Krupinska K. (2014). Identification of predominant genes involved in regulation and execution of senescence-associated nitrogen remobilization in flag leaves of field grown barley. *Journal of Experimental Botany*, 65:3963–3973.
- Hörtensteiner S. (1999). Chlorophyll breakdown in higher plants and algae. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 56:330–347.
- Hörtensteiner S. and Feller U. (2002). Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *Journal of Experimental Botany*, 53:927–937.
- Hudson M. E. and Quail P. H. (2003). Identification of promoter motifs involved in the network of phytochrome A-regulated gene expression by combined analysis of genomic sequence and microarray data. *Plant Physiology*, 133:1605–1616.
- Humbeck K., Quast S., and Krupinska K. (1996). Functional and molecular changes in the photosynthetic apparatus during senescence of flag leaves from field-grown barley plants. *Plant, Cell & Environment*, 19:337–344.
- Hunter T. (2000). Signaling- 2000 and beyond. *Cell*, 100:113–127.
- Inada N., Sakai A., Kuroiwa H., and Kuroiwa T. (1998). Three-dimensional analysis of the senescence program in rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles. *Planta*, 206:585–597.
- Isemer R. (2013). Die WHIRLY-Proteine von *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, Christian-Albrechts Universität Kiel.
- Isemer R., Mulisch M., Schäfer A., Kirchner S., Koop H.-U., and Krupinska K. (2012). Recombinant Whirly1 translocates from transplastomic chloroplasts to the nucleus. *FEBS Letters*, 586:85–88.

- Jain M., Khurana P., Tyagi A. K., and Khurana J. P. (2008). Genome-wide analysis of intronless genes in rice and Arabidopsis. *Functional & Integrative Genomics*, 8:69–78.
- Jeffares D. C., Penkett C. J., and Bähler J. (2008). Rapidly regulated genes are intron poor. *Trends in Genetics*, 24:375–378.
- Johnson Z. I. and Chisholm S. W. (2004). Properties of overlapping genes are conserved across microbial genomes. *Genome Research*, 14:2268–2272.
- Kang J. Y., Choi H. I., Im M. Y., and Kim S. Y. (2002). Arabidopsis basic Leucine Zipper Proteins that mediate stress-responsive Abscisic Acid signaling. *The Plant Cell*, 14:343–357.
- Khanna-Chopra R. (2012). Leaf senescence and abiotic stresses share reactive oxygen species-mediated chloroplast degradation. *Protoplasma*, 249:469–481.
- 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, Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- Kim C., Meskauskiene R., Zhang S., Lee K. P., Ashok M. L., Blajecka K., Herrfurth C., Feussner I., and Apel K. (2012). Chloroplasts of Arabidopsis are the source and a primary target of a plant-specific programmed cell death signaling pathway. *The Plant Cell*, 24:3026–3039.
- Kim D. W., Lee S. H., Choi S.-B., Won S.-K., Heo Y.-K., Cho M., Park Y.-I., and Cho H.-T. (2006). Functional conservation of a root hair cell-specific cis-element in angiosperms with different root hair distribution patterns. *The Plant Cell*, 18:2958–2970.
- Kim J., Chang C., and Tucker M. L. (2015). To grow old: regulatory role of ethylene and jasmonic acid in senescence. *Frontiers in Plant Science*, 6:1–7.
- Kleber-Janke T. and Krupinska K. (1997). Isolation of cDNA clones for genes showing enhanced expression in barley leaves during dark-induced senescence as well as during senescence under field conditions. *Planta*, 203:332–340.
- Klemke M., Kehlenbach R. H., and Huttner W. B. (2001). Two overlapping reading frames in a single exon encode interacting proteins - a novel way of gene usage. *The EMBO Journal*, 20:3849–3860.
- Kochetov A. V. (2008). Alternative translation start sites and hidden coding potential of eukaryotic mRNAs. *Bioessays*, 30:683–691.
- Koussevitzky S., Nott A., Mockler T. C., Hong F., Sachetto-Martins G., Surpin M., Lim J., Mittler R., and Chory J. (2007). Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science*, 316:715–719.
- Kozak M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Research*, 15:8125–8148.
- Kozak M. (1999). Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*, 234:187–208.

- Kozak M. (2005). Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*, 361:13–37.
- Krause K. and Krupinska K. (2009). Nuclear regulators with a second home in organelles. *Trends in Plant Science*, 14:194–199.
- Krause K., Oetke S., and Krupinska K. (2012). Dual targeting and retrograde translocation: regulators of plant nuclear gene expression can be sequestered by plastids. *International Journal of Molecular Sciences*, 13:11085–11101.
- Krupinska K. (2014). Das Geheimnis des roten Herbstlaubes. *Biologie in unserer Zeit*, 44:281–289.
- Krupinska K., Dähnhardt D., Fischer-Kilbienski I., Kucharewicz W., Scharrenberg C., Trösch M., and Buck F. (2014a). Identification of WHIRLY1 as a factor binding to the promoter of the stress-and senescence-associated gene HvS40. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33:91–105.
- Krupinska K., Desel C., and Mulisch M. (2010). Stromuli. Plastiden-Brücken im Netzwerk der Zelle. *Biologie in unserer Zeit*, 40:162–170.
- Krupinska K., Haussühl K., Schäfer A., van der Kooij T. A., Leckband G., Lörz H., and Falk J. (2002). A novel nucleus-targeted protein is expressed in barley leaves during senescence and pathogen infection. *Plant Physiology*, 130:1172–1180.
- Krupinska K. and Humbeck K. (2004). Photosynthesis and chloroplast breakdown. *Plant Cell Death Processes*, pages 169–187.
- Krupinska K., Oetke S., Desel C., Mulisch M., Schäfer A., Hollmann J., Kumlehn J., and Hensel G. (2014b). WHIRLY1 is a major organizer of chloroplast nucleoids. *Frontiers in Plant Science*, 5:1–11.
- Kura-Hotta M., Hashimoto H., Satoh K., and 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.
- Kusaba M., Tanaka A., and Tanaka R. (2013). Stay-green plants: what do they tell us about the molecular mechanism of leaf senescence. *Photosynthesis Research*, 117:221–234.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–85.
- Lange A., Mills R., Lange J., Stewart M., Devine S., and Corbett A. (2007). Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *Journal of Biological Chemistry*, 282:5101–5105.
- Lawlor D. W. and Paul M. J. (2014). Source/sink interactions underpin crop yield: the case for trehalose 6-phosphate/SnRK1 in improvement of wheat. *Frontiers in Plant Science*, 5:1–14.

- Leckband G. and Lörz H. (1998). Transformation and expression of a stilbene synthase gene of *Vitis vinifera* L. in barley and wheat for increased fungal resistance. *Theoretical and Applied Genetics*, 96:1004–1012.
- Lee C.-f., Lai H.-L., Lee Y.-C., Chien C.-L., and Chern Y. (2014). The A2A adenosine receptor is a dual coding gene: A novel mechanism of gene usage and signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 289:1257–1270.
- Lehtimäki N., Minna M. K., and Mulo P. (2015). Post-translational modifications of chloroplast proteins: An emerging field. *Plant Physiology*, 168:768–775.
- Li Z., Wakao S., Fischer B. B., and Niyogi K. K. (2009). Sensing and responding to excess light. *Annual Review of Plant Biology*, 60:239–260.
- Liang H. (2010). Decoding the dual-coding region: key factors influencing the translational potential of a two-ORF-containing transcript. *Cell Research*, 20:508–509.
- Lim P. O. (2007). Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology*, 58:115–136.
- Lim P. O., Lee I. C., Kim J., Kim H. J., Ryu J. S., Woo H. R., and Nam H. G. (2010). Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity. *Journal of Experimental Botany*, 61:1419–1430.
- Ling Q., Huang W., Baldwin A., and Jarvis P. (2012). Chloroplast biogenesis is regulated by direct action of the ubiquitin-proteasome system. *Science*, 338:655–659.
- Ling Q. and Jarvis P. (2015). Functions of plastid protein import and the ubiquitin-proteasome system in plastid development. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1847:939–948.
- Linthorst H. J. and Van Loon L. (1991). Pathogenesis-related proteins of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 10:123–150.
- Livak K. J. and Schmittgen T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25:402–408.
- Lohman K. N., Gan S., John M. C., and Amasino R. M. (1994). Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 92:322–328.
- Lopez-Molina, L. und Chua N. (2000). A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 41:541–547.
- Lukaszewicz M., Feuermann M., Jérrouville B., Stas A., and Boutry M. (2000). In vivo evaluation of the context sequence of the translation initiation codon in plants. *Plant Science*, 154:89–98.
- Ma F., Liu Z., WANG T.-W., Hopkins M. T., Peterson C. A., and Thompson J. E. (2010). *Arabidopsis* eIF5A3 influences growth and the response to osmotic and nutrient stress. *Plant, Cell & Environment*, 33:1682–1696.
- Mae T., Thomas H., Gay A. P., Makino A., and Hidema J. (1993). Leaf development in *Lolium temulentum*: photosynthesis and photosynthetic proteins in leaves senescing under different irradiances. *Plant and Cell Physiology*, 34:391–399.

- Margulis L. (1975). Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; Criteria for proof. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 29:21–38.
- Marthe C., Kumlehn J., and Hensel G. (2015). Barley (*Hordeum vulgare* L.) Transformation using Immature Embryos. Springer Berlin.
- Martin C. and Thimann K. V. (1972). The role of protein synthesis in the senescence of leaves I. The formation of protease. *Plant Physiology*, 49:64–71.
- Matallana-Ramirez L. P., Rauf M., Farage-Barhom S., Dortay H., Xue G.-P., Dröge-Laser W., Lers A., Balazadeh S., and Mueller-Roeber B. (2013). NAC transcription factor ORE1 and senescence-induced BIFUNCTIONAL NUCLEASE1 (BFN1) constitute a regulatory cascade in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 6:1438–1452.
- Matile P. (1992). Chloroplast Senescence. Elsevier Amsterdam.
- Meier I. and Brkljacic J. (2009). The nuclear pore and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 12:87–95.
- Melonek J., Mulisch M., Schmitz-Linneweber C., Grabowski E., Hensel G., and Krupinska K. (2010). Whirly1 in chloroplasts associates with intron containing RNAs and rarely co-localizes with nucleoids. *Planta*, 232:471–481.
- Mereschkowsky C. (1905). Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biologisches Centralblatt*, 25:38–604.
- Miersch I., Heise J., Zelmer I., and Humbeck K. (2000). Differential degradation of the photosynthetic apparatus during leaf senescence in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Biology*, 2:618–623.
- Morris K., Mackerness S. A.-H., Page T., John C. F., Murphy A. M., Carr J. P., and Buchanan-Wollaston V. (2000). Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *The Plant Journal*, 23:677–685.
- Muench D. G., Zhang C., and Dahodwala M. (2012). Control of cytoplasmic translation in plants. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 3:178–194.
- Mulisch M. and Krupinska K. (2013). Ultrastructural Analyses of Senescence Associated Dismantling of Chloroplasts Revisited. Springer Berlin.
- Munné-Bosch S. and Alegre L. (2002). Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts. *Planta*, 214:608–615.
- Munné-Bosch S., Queval G., and Foyer C. H. (2013). The impact of global change factors on redox signaling underpinning stress tolerance. *Plant Physiology*, 161:5–19.
- Nakamura M., Tsunoda T., and Obokata J. (2002). Photosynthesis nuclear genes generally lack TATA-boxes: a tobacco photosystem I gene responds to light through an initiator. *The Plant Journal*, 29:1–10.

- Navabpour S., Morris K., Allen R., Harrison E., Soheila A., Buchanan-Wollaston V., *et al.* (2003). Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, 54:2285–2292.
- Nekrutenko A., Wadhawan S., Goetting-Minesky P., and Makova K. D. (2005). Oscillating evolution of a mammalian locus with overlapping reading frames: an XLa/ALPHA/ALEX relay. *PLoS Genetics*, 1:197–204.
- Nie H., Zhao C., Wu G., Wu Y., Chen Y., and Tang D. (2012). SR1, a calmodulin-binding transcription factor, modulates plant defense and ethylene-induced senescence by directly regulating NDR1 and EIN3. *Plant Physiology*, 158:1847–1859.
- Nomura H., Komori T., Uemura S., Kanda Y., Shimotani K., Nakai K., Furuichi T., Takebayashi K., Sugimoto T., Sano S., *et al.* (2012). Chloroplast-mediated activation of plant immune signalling in Arabidopsis. *Nature Communications*, 3:1–11.
- Noodén L. (1988). *The Phenomena of Senescence and Aging*. Academic Press, SanDiego.
- Noodén L. D., Guamét J. J., and John I. (1997). Senescence mechanisms. *Physiologia Plantarum*, 101:746–753.
- Olsen A. N., Ernst H. A., Leggio L. L., and Skriver K. (2005). DNA-binding specificity and molecular functions of NAC transcription factors. *Plant Science*, 169:785–797.
- Orendi G., Zimmermann P., Baar C., and Zentgraf U. (2001). Loss of stress-induced expression of catalase3 during leaf senescence in Arabidopsisthaliana is restricted to oxidative stress. *Plant Science*, 161:301–314.
- Pabo C. O., Peisach E., and Grant R. A. (2001). Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 70:313–340.
- Parrott D. L., Martin J. M., and Fischer A. M. (2010). Analysis of barley (*Hordeum vulgare*) leaf senescence and protease gene expression: a family C1A cysteine protease is specifically induced under conditions characterized by high carbohydrate, but low to moderate nitrogen levels. *New Phytologist*, 187:313–331.
- Peleg Z. and Blumwald E. (2011). Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 14:290–295.
- Pfalz J., Liere K., Kandlbinder A., Dietz K.-J., and 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*, 18:176–197.
- Pfannschmidt T., Schütze K., Fey V., Sherameti I., and Oelmüller R. (2003). Chloroplast redox control of nuclear gene expression-A new class of plastid signals in interorganellar communication. *Antioxidants and Redox Signaling*, 5:95–101.
- Pilartz M. and Jeske H. (2003). Mapping of Abutilon mosaic geminivirus minichromosomes. *Journal of Virology*, 77:10808–10818.

- Pinto-Marijuan M. and Munne-Bosch S. (2014). Photo-oxidative stress markers as a measure of abiotic stress-induced leaf senescence: advantages and limitations. *Journal of Experimental Botany*, 65:3845 – 3857.
- Pleijel H., Ojanpera K., Danielsson H., Sild E., Gelang J., and Wallin G. (1997). Effects of ozone on leaf senescence in spring wheat-Possible consequences for grain yield. *Phyton, Annales Rei Botanicae*, 37:227–232.
- Poon I. K. and Jans D. A. (2005). Regulation of nuclear transport: central role in development and transformation? *Traffic*, 6:173–186.
- Porath J. (1988). High-performance immobilized-metal-ion affinity chromatography of peptides and proteins. *Journal of Chromatography A*, 443:3–11.
- Pourtau N., Jennings R., Pelzer E., Pallas J., and Wingler A. (2006). Effect of sugar-induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in Arabidopsis. *Planta*, 224:556–568.
- Queval G. and Noctor G. (2007). A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: application to redox profiling during Arabidopsis rosette development. *Analytical Biochemistry*, 363:58–69.
- Quinn J. M., Eriksson M., Moseley J. L., and Merchant S. (2002). Oxygen deficiency responsive gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* through a copper-sensing signal transduction pathway. *Plant Physiology*, 128:463–471.
- Raab S., Drechsel G., Zarepour M., Hartung W., Koshiba T., Bittner F., and Hoth S. (2009). Identification of a novel E3 ubiquitin ligase that is required for suppression of premature senescence in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 59:39–51.
- Rechsteiner, Martin und Rogers S. W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences*, 21:267–271.
- Repetto O., Rogniaux H., Firnhaber C., Zuber H., Küster H., Larré C., Thompson R., and Gallardo K. (2008). Exploring the nuclear proteome of *Medicago truncatula* at the switch towards seed filling. *The Plant Journal*, 56:398–410.
- Reyes J., Muro-Pastor M., and Florencio F. (2004). The GATA family of transcription factors in Arabidopsis and rice. *Plant Physiology*, 134:1718–1732.
- Robatzek S. and Somssich I. E. (2001). A new member of the Arabidopsis WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence-and defence-related processes. *The Plant Journal*, 28:123–133.
- Robichon C., Luo J., Causey T. B., Benner J. S., and Samuelson J. C. (2011). Engineering *Escherichia coli* BL21 (DE3) derivative strains to minimize *E. coli* protein contamination after purification by immobilized metal affinity chromatography. *Applied and Environmental Microbiology*, 77:4634–4646.

- Rodriguez M. S., Dargemont C., and Hay R. T. (2001). SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *Journal of Biological Chemistry*, 276:12654–12659.
- Rogers H., Bate N., Combe J., Sullivan J., Sweetman J., Swan C., Lonsdale D., and Twell D. (2001). Functional analysis of cis-regulatory elements within the promoter of the tobacco late pollen gene g10. *Plant Molecular Biology*, 45:577–585.
- Rook F., Hadingham S. A., Li Y., and Bevan M. W. (2006). Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. *Plant, Cell & Environment*, 29:426–434.
- Ross E. J., Stone J. M., Elowsky C. G., Arredondo-Peter R., Klucas R. V., and Sarath G. (2004). Activation of the *Oryza sativa* non-symbiotic haemoglobin-2 promoter by the cytokinin-regulated transcription factor, ARR1. *Journal of Experimental Botany*, 55:1721–1731.
- Russo V. E., Martienssen R. A., Riggs A. D., *et al.* (1996). Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Rustgi S., Pollmann S., Buhr F., Springer A., Reinbothe C., von Wettstein D., and Reinbothe S. (2014). JIP60-mediated, jasmonate- and senescence-induced molecular switch in translation toward stress and defense protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111:14181–14186.
- Sanger F., Nicklen S., and Coulson A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74:5463–5467.
- Schimper A. F. W. (1883). Über die Entwicklung der Chlorophyllkörper und Farbkörner. *Botanische Zeitung*, 41.
- Schippers J. H. (2015). Transcriptional networks in leaf senescence. *Current Opinion in Plant Biology*, 27:77–83.
- Schreiber U., Schliwa U., and 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.
- Schubert D., Lechtenberg B., Forsbach A., Gils M., Bahadur S., and Schmidt R. (2004). Silencing in Arabidopsis T-DNA transformants: the predominant role of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects. *The Plant Cell*, 16:2561–2572.
- Sharpless N. E. (2005). INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 576:22–38.
- Shechter D., Dormann H. L., Allis C. D., and Hake S. B. (2007). Extraction, purification and analysis of histones. *Nature Protocols*, 2:1445–1457.
- Shirsat A., Wilford N., Croy R., and Boulter D. (1989). Sequences responsible for the tissue specific promoter activity of a pea legumin gene in tobacco. *Molecular and General Genetics MGG*, 215:326–331.

- Sigurbjornsson, B und Micke A. (1969). Progress in mutation breeding. In *Induced Mutations in Plants. Nature, Induction and Utilization of Mutations in Plants*.
- Sijen T., Vijn I., Rebocho A., van Blokland R., Roelofs D., Mol J. N., and Kooter J. M. (2001). Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Current Biology*, 11:436–440.
- Sikorskaite S., Rajamäki M.-L., Baniulis D., Stanys V., and Valkonen J. P. (2013). Protocol: Optimised methodology for isolation of nuclei from leaves of species in the Solanaceae and Rosaceae families. *Plant Methods*, 9:1–9.
- Slusher L. B., Gillman E. C., Martin N. C., and Hopper A. K. (1991). mRNA leader length and initiation codon context determine alternative AUG selection for the yeast gene MOD5. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88:9789–9793.
- Small I., Wintz H., Akashi K., and Mireau H. (1998). Two birds with one stone: genes that encode products targeted to two or more compartments. *Plant Molecular Biology*, 38:265–277.
- Southern E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98:503–517.
- Stamp P. and Herzog H. (1976). Untersuchungen zur Fahnenblattalterung und zum Kornwachstum einiger deutscher Sommerweizensorten (*Triticum aestivum* L.). *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*, 77:330–338.
- Stewart W. N. and Rothwell G. W. (1993). *Paleobotany and the Evolution of Plants*. Cambridge University Press.
- Stoeldt A. (2001). Pflanzenregeneration aus Protoplasten von Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und genetische Transformation des homologen seneszenzassoziierten Gens *HvS40*. Dissertation, Universität Hamburg.
- Strasburger E. (2014). *Lehrbuch der Pflanzenwissenschaften*. Springer Spektrum Heidelberg.
- Tamaoki M. (2008). The role of phytohormone signaling in ozone-induced cell death in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 3:166–174.
- Tang Y., Wen X., and Lu C. (2005). Differential changes in degradation of chlorophyll-protein complexes of photosystem I and photosystem II during flag leaf senescence of rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43:193–201.
- Terasawa K. and Sato N. (2005). Visualization of plastid nucleoids in situ using the PEND-GFP fusion protein. *Plant and Cell Physiology*, 46:649–660.
- Terasawa K. and Sato N. (2009). Plastid localization of the PEND protein is mediated by a noncanonical transit peptide. *FEBS Journal*, 276:1709–1719.
- Terzaghi W. B. and Cashmore A. R. (1995). Light-regulated transcription. *Annual Review of Plant Biology*, 46:445–474.

- Thomas H. and Ougham H. (2014). The stay-green trait. *Journal of Experimental Botany*, 65:3889–3900.
- Thomson W. and Platt-Aloia K. (1987). Ultrastructure and Senescence in Plants. American Society of Plant Physiologists.
- Van Der Kelen K., Beyaert R., Inzé D., and De Veylder L. (2009). Translational control of eukaryotic gene expression. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44:143–168.
- Van Eck L., Schultz T., Leach J. E., Scofield S. R., Peairs F. B., Botha A.-M., and Lapitan N. L. (2010). Virus-induced gene silencing of WRKY53 and an inducible phenylalanine ammonia-lyase in wheat reduces aphid resistance. *Plant Biotechnology Journal*, 8:1023–1032.
- Vanderperre B., Staskevicius A. B., Tremblay G., McCoy M., O'Neill M. A., Cashman N. R., and Roucou X. (2011). An overlapping reading frame in the PRNP gene encodes a novel polypeptide distinct from the prion protein. *The FASEB Journal*, 25:2373–2386.
- Veyres N., Danon A., Aono M., Galliot S., Karibasappa Y. B., Diet A., Grandmottet F., Tamaoki M., Lesur D., Pilard S., *et al.* (2008). The Arabidopsis sweetie mutant is affected in carbohydrate metabolism and defective in the control of growth, development and senescence. *The Plant Journal*, 55:665–686.
- Wamboldt Y., Mohammed S., Elowsky C., Wittgren C., de Paula W. B., and Mackenzie S. A. (2009). Participation of leaky ribosome scanning in protein dual targeting by alternative translation initiation in higher plants. *The Plant Cell*, 21:157–167.
- Wang R.-F., Parkhurst M. R., Kawakami Y., Robbins P. F., and Rosenberg S. A. (1996). Utilization of an alternative open reading frame of a normal gene in generating a novel human cancer antigen. *The Journal of Experimental Medicine*, 183:1131–1140.
- Weaver L. M., Gan S., Quirino B., and Amasino R. M. (1998). A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Molecular Biology*, 37:455–469.
- Wedemeyer N. (2005). Untersuchungen zur Expression des *HvS40*-Genes in Samen der Gerste (*Hordeum vulgare L.*). Diplomarbeit, Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- Willis K. and McElwain J. (2014). The Evolution of Plants. Oxford University Press.
- Wingler A., Marès M., and Pourtau N. (2004). Spatial patterns and metabolic regulation of photosynthetic parameters during leaf senescence. *New Phytologist*, 161:781–789.
- Wingler A. and Paul M. (2013). The Role of Trehalose Metabolism in Chloroplast Development and Leaf Senescence. Springer Berlin.
- Woodson J. D., Joens M. S., Sinson A. B., Gilkerson J., Salomé P. A., Weigel D., Fitzpatrick J. A., and Chory J. (2015). Ubiquitin facilitates a quality-control pathway that removes damaged chloroplasts. *Science*, 350:450–454.

- Wu A., Allu A. D., Garapati P., Siddiqui H., Dortay H., Zanol M.-I., Asensi-Fabado M. A., Munné-Bosch S., Antonio C., Tohge T., *et al.* (2012a). JUNGBRUNNEN1, a reactive oxygen species-responsive NAC transcription factor, regulates longevity in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 24:482–506.
- Wu X.-Y., Kuai B.-K., Jia J.-Z., and Jing H.-C. (2012b). Regulation of leaf senescence and crop genetic improvement. *Journal of Integrative Plant Biology*, 54:936–952.
- Xu H., Wang P., Fu Y., Zheng Y., Tang Q., Si L., You J., Zhang Z., Zhu Y., Zhou L., *et al.* (2010). Length of the ORF, position of the first AUG and the Kozak motif are important factors in potential dual-coding transcripts. *Cell Research*, 20:445–457.
- Yagisawa H. (2006). Nucleocytoplasmic shuttling of phospholipase C- δ 1: A link to Ca²⁺. *Journal of Cellular Biochemistry*, 97:233–243.
- Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology*, 57:781–803.
- Yanagisawa S. (2000). Dof1 and Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. *The Plant Journal*, 21:281–288.
- Yang J., Zhang J., Wang Z., Zhu Q., and Liu L. (2003). Involvement of abscisic acid and cytokinins in the senescence and remobilization of carbon reserves in wheat subjected to water stress during grain filling. *Plant, Cell & Environment*, 26:1621–1631.
- Yang S.-D., Seo P. J., Yoon H.-K., and Park C.-M. (2011). The Arabidopsis NAC transcription factor VNI2 integrates abscisic acid signals into leaf senescence via the COR/RD genes. *The Plant Cell*, 23:2155–2168.
- Yang T. and Poovaiah B. (2002). A calmodulin-binding/CGCG box DNA-binding protein family involved in multiple signaling pathways in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 277:45049–45058.
- Yoshida H., Oku M., Suzuki M., and Mori K. (2006). pXBP1 (U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1 (S) in mammalian ER stress response. *The Journal of Cell Biology*, 172:565–575.
- Zavaleta-Mancera H., Thomas B., Thomas H., and Scott I. (1999). Regreening of senescent Nicotiana leaves II. Redifferentiation of plastids. *Journal of Experimental Botany*, 50:1683–1689.
- Zhang K. and Gan S.-S. (2012). An abscisic acid-AtNAP transcription factor-SAG113 protein phosphatase 2C regulatory chain for controlling dehydration in senescing Arabidopsis leaves. *Plant Physiology*, 158:961–969.

Anhang

DUF584-Proteine der Gerste

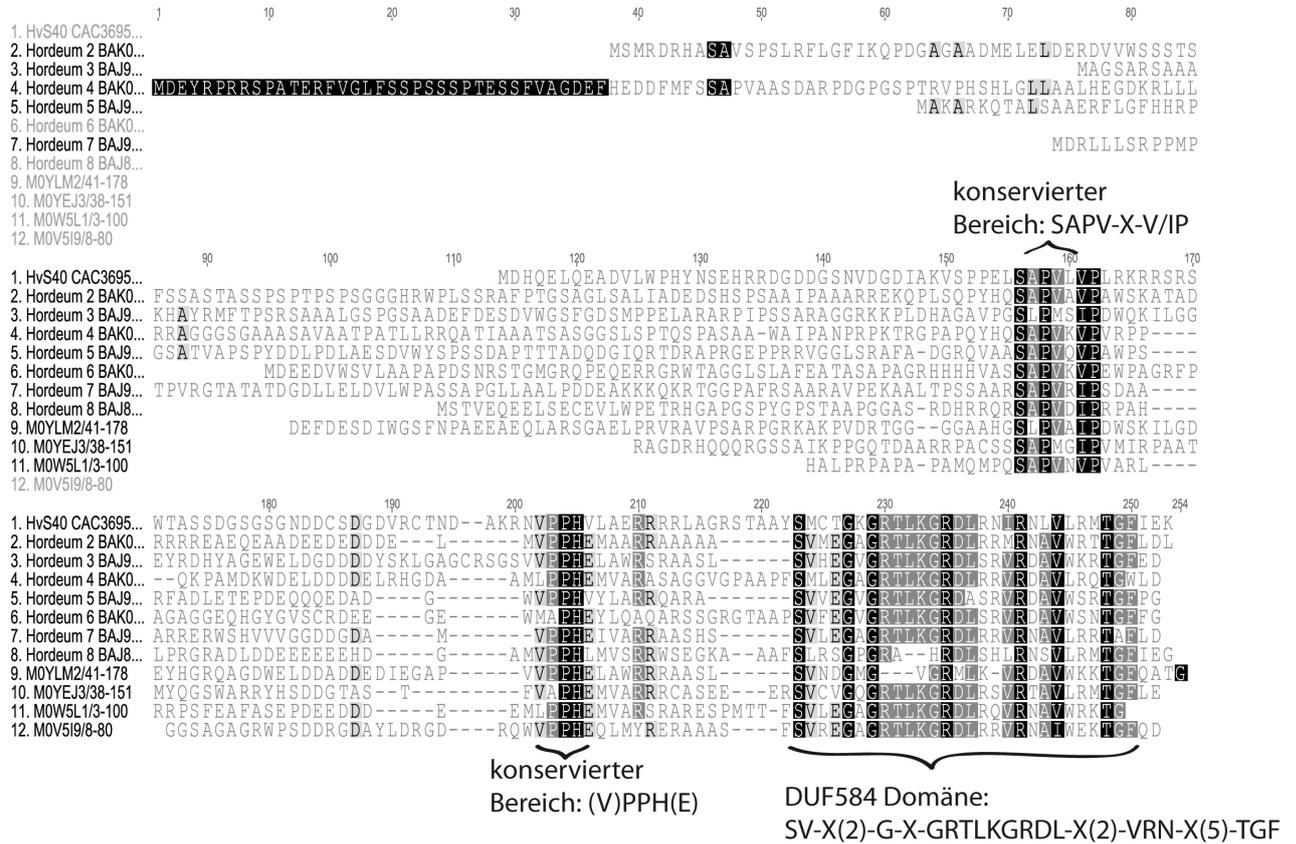


Abbildung (47) A) Sequenzvergleich der 12 DUF584-Proteine der Gerste. Neben der konservierten, C-terminalen DUF-Domäne konnten noch zwei weitere Proteinbereiche identifiziert werden, die konserviert in allen Proteinen vorkommen.

Gruppe II		pTP	mTP	DUF584
S40-Proteine				
HvS40		x	x	ja
TdS40		x	x	ja
LpS40		x	x	ja
LtS40		x	x	ja
ObS40		x	x	ja
TaS40		x	x	ja
ZmS40		x	x	ja
SiS40-1		x	x	ja
Gruppe II				
Alt-S40-Proteine		pTP	mTP	DUF584
Alt-HvS40		ja	x	x
Alt-TdS40		ja	x	x
Alt-LpS40		ja	x	x
Alt-LtS40		ja	x	x
Alt-ObS40		x	ja	x
Alt-TaS40		ja	x	x
Alt-ZmS40		x	ja	x
Alt-SiS40-1		ja	x	x
Gruppe III				
DUF584-Proteine		pTP	mTP	DUF584
<i>Musa acuminata</i>		x	ja	ja
XP_009389297.1				
<i>Oryza sativa</i>		x	ja	ja
NP_001048739.1				
<i>Setaria italica</i>		x	ja	ja
XP_004986011				
Gruppe IV				
DUF584-Proteine		pTP	mTP	DUF584
SiS40-2		x	x	ja
XP_004963651.1				
Alt-SiS40-2		ja	x	x
SiS40-3		ja	x	ja
XP_004977370.1				
<i>Bachypodium distachyon</i>		x	ja	ja
XP_003578892.1				
Gruppe V				
DUF584-Proteine		pTP	mTP	DUF584
<i>Hordeum vulgare 5</i>		x	ja	ja
BAJ96673.1				
<i>Brachypodium distachyon</i>		x	ja	ja
XP_003561535.1				
<i>Oryza sativa</i>		x	ja	ja
EAZ40012.1				
<i>Brachypodium distachyon</i>		x	ja	ja
XP_003563024.1				
<i>Setaria italica</i>		x	ja	ja
XP_004957861.1				
<i>Zea mays</i>		x	ja	ja
DAA40985.1				
<i>Sorghum bicolor</i>		x	ja	ja
XP_002462928.1				
<i>Zea mays</i>		x	ja	ja
NP_001168585.1				
Gruppe VI				
DUF584-Proteine		pTP	mTP	DUF584
<i>Oryza sativa</i>		x	ja	ja
EAY78462.				
<i>Musa acuminata</i>		x	ja	ja
XP_009403667.1				
<i>Phoenix dactylifera</i>		x	ja	ja
XP_008784036.1				
<i>Phoenix dactylifera</i>		ja	x	ja
XP_008784036.1				
Gruppe VII				
DUF584-Proteine		pTP	mTP	DUF584
<i>Setaria italica</i>		x	ja	ja
XP_004976251.1				
<i>Hordeum vulgare 3</i>		x	ja	ja
BAJ92790.1				
<i>Hordeum vulgare 2</i>		x	ja	ja
BAK04510.1				
<i>Oryza sativa</i>		x	ja	ja
NP_001053333.1				
<i>Oryza brachyantha</i>		x	ja	ja
XP_006653605.1				
<i>Brachypodium distachyon</i>		x	ja	ja
XP_003580155.1				
<i>Musa acuminata</i>		x	ja	ja
NP_009381973.1				
<i>Zea mays</i>		x	ja	ja
DAA36906.1				
<i>Zea mays</i>		x	ja	ja
NP_001266292.1				
Gruppe VII				
DUF584-Proteine		pTP	mTP	DUF584
<i>Sorghum bicolor</i>		x	ja	ja
XP_002446872.1				
<i>Zea mays</i>		x	ja	ja
AFW58878.1				
<i>Musa acuminata</i>		x	ja	ja
XP_009387245.1				
<i>Brachypodium distachyon</i>		x	ja	ja
XP_003581474.1				
<i>Zea mays</i>		x	ja	ja
NP_001144899.1				
<i>Oryza sativa</i>		x	ja	ja
AC024594_13				
<i>Sorghum bicolor</i>		x	ja	ja
XP_002448198.1				
<i>Sorghum bicolor</i>		x	ja	ja
XP_002464477.1				
<i>Brachypodium distachyon</i>		x	ja	ja
XP_003571889.1				

Abbildung (49) Vorhersagen zu Proteinstrukturen von DUF584-Proteinen monokotyleyler Arten. Die Proteine wurden gemäß des generierten DUF584-Stammbaumes in Gruppen geordnet (siehe 3.4.1, Abb. 11). In allen dargestellten Gruppen lassen sich entweder Proteine finden, die durch ein dual kodierendes Gen kodiert sind oder solche, die sowohl ein potentielles Transitpeptid als auch eine DUF584-Domäne aufweisen. pTP: plasmatisches Transitpeptid, mTP: mitochondriales Transitpeptid.

Subzelluläre Lokalisation von GFP in Gerstenprotoplasten (Kontrolle)

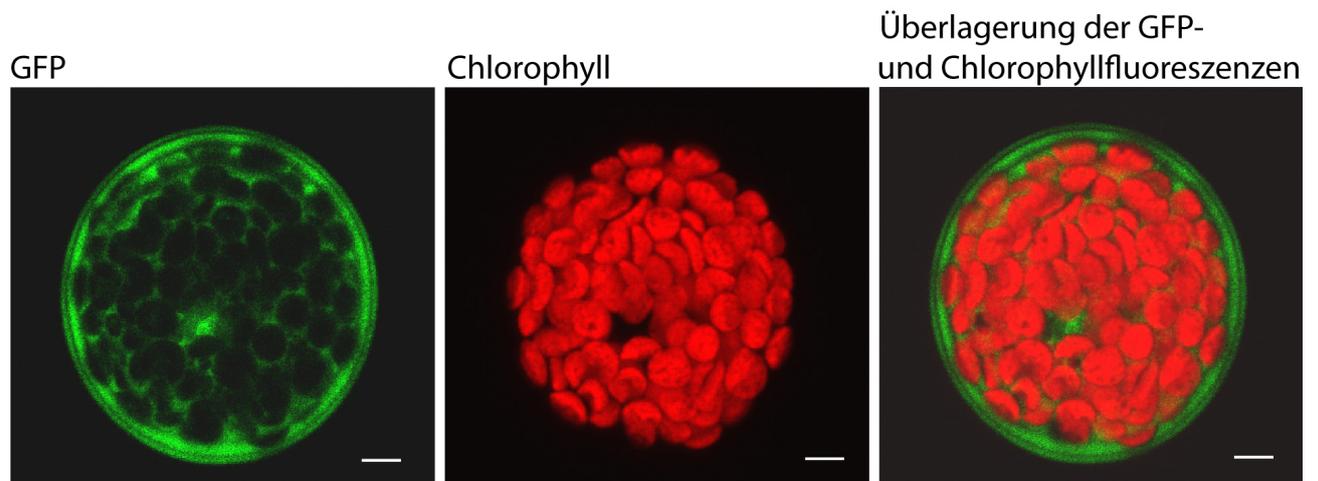


Abbildung (51) Fluoreszenzaufnahmen von Gerstenprotoplasten aus grünem Gewebe, die mit *GFP* transient transformiert wurden (Kontrolle). Die Einzelbild-Aufnahmen entstanden mit Hilfe des Konfokalen Laser-Raster-Mikroskops (CLSM). Anregung der GFP-Fluoreszenz bei 395nm, Emission bei 508nm, Anregung der Chlorophyll-Autofluoreszenz bei 395nm, Emission bei 650nm. Der Messbalken entspricht $5\mu\text{m}$.

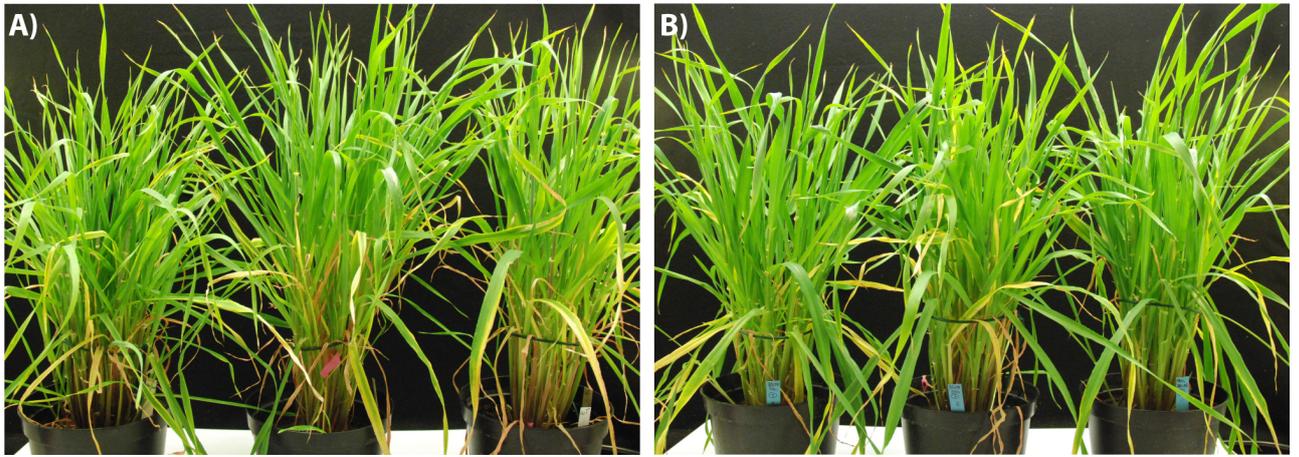
Analyse von RNAi-*S40*-Linien der Gerste

Abbildung (52) Anzucht von Einzelpflanzen in Töpfen im Gewächshaus. A) Wildtyppflanzen (*Golden Promise*) nach 10 Wochen Anzucht und B) Und Pflanzen der RNAi-*S40*-Linie 7 nach 10 Wochen Anzucht im Gewächshaus.

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:

Krupinska K., Dähnhardt D., Fischer-Kilbienski I., Kucharewicz W., Scharrenberg C., Trösch M., and Buck F. (2014) Identification of WHIRLY1 as a Factor Binding to the Promoter of the Stress- and Senescence-Associated Gene *HvS40*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33:91-105.

Beiträge in Mitteilungsbänden von Tagungen:

Trösch M., Hensel G., Krupinska K. (2015) The senescence associated barley gene *HvS40* has two overlapping reading frames encoding two proteins with different impacts on leaf senescence. Annual Conference of the German Genetics Society, Kiel

Trösch M., Krupinska K. (2014) One gene for two different proteins: Alternative translation of the senescence associated gene *HvS40*. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen

Trösch M., Hensel G., Kumlehn J., Krupinska K. (2013) One gene for two different proteins: Alternative translation of the senescence associated gene *HvS40*. 6th European Workshop on Plant Senescence, Paris

Trösch M., Hollmann J., Schäfer A., Krupinska K. (2012) Alternative translation of the senescence associated gene *HvS40* yields a nucleus-plastid targeted protein and an out-of-frame protein exclusively targeted to nucleus. Gordon Reserach Conference on Plant Senescence, Boston

Trösch M., Kilbienski I., Schäfer A., Hensel G., Krupinska K. (2010) The nuclear protein HvS40 controls leaf senescence in barley. The 5th European Plant Senescence Network Meeting, Reading UK

Kiel, den _____

Mirl Trösch

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Frau Prof. Karin Krupinska für die Möglichkeit, diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen sowie für die Unterstützung bei wissenschaftlichen Problemen und Fragestellungen. Die langjährige Förderung meiner Arbeit weiß ich sehr zu schätzen.

Bei Herrn Prof. Klaus Humbeck möchte ich mich ganz herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Meinen Kollegen Rena, Christine, Svenja, Julien, Karo, Heiner, Annika, Susann, Lars, Frauke, Wera, Luca und Andrea gilt mein Dank für eine tolle Doktoranden-Zeit, die durch konstruktive Diskussionen, Erfahrungsaustausch, Kollegialität und Freundschaft gekennzeichnet war.

Bei Anke, Susanne und Uli möchte ich mich ebenfalls ganz herzlich für die Unterstützung des *S40*-Projekts und die wunderbare Zusammenarbeit bedanken.

Andrea Arndt sei gedankt für die unermüdliche und herzliche Hilfe in organisatorischen Fragen, ohne die so mancher bürokratischer Stolperstein nicht aus dem Weg geräumt worden wäre.

Außerdem danke ich allen weiteren Mitgliedern und Ehemaligen der Arbeitsgruppe Krupinska sowie allen Arbeitsgruppen des Botanischen Instituts für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Meinen Freunden, meiner Familie und meinem Freund gilt ein besonders inniger Dank - ich bin froh, euch an meiner Seite zu haben.

