

**Identifikation und Lokalisation der
seneszenzassoziierten Cysteinprotease
HvPAP14 in Gerste**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Julien-Alexander Hollmann

Kiel 2016

Erste Gutachterin: Prof. Dr. Karin Krupinska
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Rüdiger Schulz

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.2016
Zum Druck genehmigt: 29.11.2016

gez. Prof. Dr. Natascha Oppelt, Dekanin

Für Olga und Erich

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	II
1 Zusammenfassung	1
2 Summary	2
3 Einleitung	3
3.1 Alterung, Zelltod und Seneszenz bei Pflanzen	3
3.2 Charakterisierung der Blattseneszenz	4
3.3 Induktion und Regulation der Blattseneszenz	9
3.3.1 Genexpression während der Blattseneszenz	11
3.3.2 Regulation der Blattseneszenz durch Transkriptionsfaktoren	14
3.4 Proteasen	17
3.4.1 Proteasen während der Blattseneszenz	18
3.4.2 Die Familie der Papain-ähnlichen Cysteinproteasen	19
3.5 Zielsetzung	28
4 Veröffentlichungen	29
4.1 Arbeit I An alternative strategy of dismantling of the chloroplasts during leaf senescence observed in a high-yield variety of barley	29
4.2 Arbeit II Identification of predominant genes involved in regulation and execution of senescence-associated nitrogen remobilization in flag leaves of field grown barley	31
4.3 Arbeit III The senescence upregulated gene <i>HvPAP14</i> encodes a cysteine protease associated to thylakoid membranes after activation	32
5 Zusammenfassende Diskussion	35
5.1 Alternative Strategien zum Abbau der Chloroplastenproteine bei einer Hochleistungsorte der Gerste während der Seneszenz	36
5.2 Identifizierung von Genen, die in die Regulation und die Abbauprozesse der seneszenzassoziierten Stickstoffremobilisierung in Fahnenblättern der Gerste involviert sind	41
5.2.1 Stickstoffabhängige Genexpression während der Seneszenz	47
5.2.2 Entwicklungsabhängige Genexpression während der Seneszenz	49
5.3 Das seneszenzassoziierte Gen <i>HvPAP14</i> kodiert für eine Cysteinprotease, die nach ihrer Aktivierung mit der Thylakoidmembran assoziiert ist	53
5.3.1 Lokalisation von HvPAP14 in der Zelle	54
5.3.2 Potentielle Funktion von HvPAP14	61
6 Ausblick	64
7 Literaturverzeichnis	66
Lebenslauf	85
Erklärung	86
Danksagung	87
Anhang	88

Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure
ATP	Adenosintriphosphat
C	Cystein (Cys)
CCV	<i>CV-containing vesicle</i>
CET	Mitteleuropäische Zeit (<i>Central European Time</i>)
Chl	Chlorophyll
COPI	Mantel-Protein-Komplex I (<i>coat protein complex I</i>)
CV	<i>chloroplast vesiculation protein</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
H	Histidin (His)
HDEL	ER-Rückhaltesignal ([K/H/T)DEL)
HN	Düngung mit Stickstoffüberschuss
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR	hypersensitive Reaktion
kDa	Kilodalton
LHC	Lichtsammelkomplex
LHCII	Lichtsammelkomplexe des Photosystems II
LSU	große Untereinheit von Rubisco (<i>large subunit of Rubisco</i>)
MeJA	Methyljasmonat
N	Asparagin (Asn)
NCC	nicht fluoreszierende Endprodukte des Chlorophyllabbaus (<i>non-fluorescent chlorophyll catabolites</i>)
NLS	Kernlokalisierungssignal (<i>nuclear localisation signal</i>)
NPIR	Lokalisationssequenz für die Vakuole
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
PCD	programmierter Zelltod (<i>programmed cell death</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion
qRT-PCR	quantitative <i>Real-Time</i> PCR
QTL	<i>Quantitative Trait Locus</i>
RCB	Rubisco beinhaltendes Vesikel (<i>rubisco containing bodie</i>)
RFP	rot fluoreszierendes Protein (<i>red fluorescing protein</i>)
RNAi	RNA-Interferenz Technik
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
SAG	während der Seneszenz raufreguliertes Gen (<i>senescence-associated gene</i>)
SAV	seneszenzassoziierte Vakuole (<i>senescence-associated vacuole</i>)

SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDG	während der Seneszenz herunterreguliertes Gen (<i>senescence downregulated gene</i>)
SN	Düngung mit einer üblichen Menge Stickstoff
SP	N-terminales Signalpeptid
SSU	kleine Untereinheit von Rubisco (<i>small subunit of Rubisco</i>)
unv.	Sequenz ist unvollständig
w/v	Gewichtsprozent
YFP	gelb fluoreszierendes Protein (<i>yellow fluorescing protein</i>)

1 Zusammenfassung

Während der Blattseneszenz werden die Proteine des Photosyntheseapparates in den Chloroplasten abgebaut und der enthaltene Stickstoff remobilisiert. Um Proteasen zu identifizieren, die entscheidend am Proteinabbau während der Seneszenz von Gerstenblättern beteiligt sind, wurden zwei Ansätze verfolgt. Zum einen wurde die Genexpression während der Seneszenz an Fahnenblättern der Gerste unter Freilandbedingungen untersucht. Zum anderen wurde ein biochemischer Ansatz zur Identifizierung aktiver Cysteinproteasen in seneszierenden Primärblättern der Gerste durchgeführt. Die Genexpressionsuntersuchungen erfolgten mit Blattmaterial der Hochleistungssorte cv. Lomerit. Die Charakterisierung der Seneszenzprozesse in dieser Sorte zeigte, dass diese sich von älteren Sorten der Gerste und anderen Pflanzenarten durch eine Zunahme des Chlorophyll a/b-Verhältnisses während der Seneszenz unterschied. Damit einhergehend ergaben Ultrastrukturanalysen, dass die Granathylakoide relativ früh während der Seneszenzphase abgebaut werden. Durch eine Microarray-Analyse wurden Gene identifiziert, die während der Seneszenz in Blättern der Sorte Lomerit verstärkt exprimiert werden. Zur Unterscheidung von Genen, die entweder eine Rolle in der Stickstoffremobilisierung oder in entwicklungsabhängigen Prozessen spielen, wurde die Genexpression in unterschiedlich stark mit Stickstoff gedüngten Pflanzen verglichen. Das entwicklungsabhängig verstärkt exprimierte Gen *HvPAP14* war unabhängig von der Düngung eines der am stärksten während der Seneszenz aufregulierten Gene.

Mittels einer Affinitätsaufreinigung über DCG-04 und anschließender Massenspektrometrie wurde *HvPAP14* unter den während der Blattseneszenz proteolytisch aktiven Cysteinproteasen identifiziert. *HvPAP14* gehört zur CEP1-Gruppe der Papain-ähnlichen, am Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisierten, Cysteinproteasen, die als Präproteine kodiert sind. Mit Hilfe von zwei Antikörpern gegen unterschiedliche Bereiche von *HvPAP14* konnte eine Proform in *Microbodies* und in Chloroplasten nachgewiesen werden. In den Chloroplasten wurde die Proform sowohl in der Thylakoidmembranfraktion als auch im Lumen und die potentiell aktive Form nur in der Thylakoidmembranfraktion detektiert. Die Lokalisation im Lumen könnte in Beziehung stehen zur Aktivierung bei einem niedrigen pH-Wert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Cysteinprotease *HvPAP14* aus dem ER in die Chloroplasten transportiert wird und dort vermutlich am Abbau von Proteinen der Thylakoidmembran beteiligt ist.

2 Summary

During leaf senescence proteins of the photosynthetic apparatus are degraded in chloroplasts and nitrogen is remobilized. To identify proteases involved in protein degradation during barley leaf senescence, two approaches were used. First, gene expression of barley flag leaves grown under field conditions was analysed. Second, a biochemical approach was used to identify active cysteine proteases in senescing primary foliage leaves. For gene expression studies leaves of the high-yield barley variety cv. Lomerit were used. The characterization of the senescence processes showed, that this variety differed from older varieties of barley and other plant species by a senescence-associated increase in the chlorophyll a/b ratio. Consistent with this finding ultrastructural analysis revealed an early degradation of grana stacks during senescence.

By microarray analyses senescence-associated genes were identified in barley flag leaves collected from field plots with standard or high nitrogen supply. Due to the different amounts of nitrogen supply it was possible to distinguish between genes that play a role in nitrogen remobilization or in development-dependent processes. Independent of the nitrogen supply, *HvPAP14* was identified as one of the most up-regulated genes in senescing flag leaves.

By an affinity approach based on the probe DCG-04 and subsequent mass spectrometry, *HvPAP14* was identified as one of the proteolytic active cysteine proteases during leaf senescence. *HvPAP14* is a member of the CEP1 group of papain-like cysteine proteases, which are encoded as preproteins and synthesized at the ER. Using two antibodies against different regions of *HvPAP14* the subcellular localisations of these different forms were analysed. The proform was detected in microbodies as well as in chloroplasts in association with thylakoid membranes and in the lumen. The potentially proteolytic active form of the enzyme could be detected exclusively in the thylakoid membranes. The localisation in the lumen could be related to the activation of the protease by low pH. The results show, that the cysteine protease *HvPAP14* is transported from the ER into the chloroplasts and is presumably involved in the degradation of thylakoid membrane proteins.

3 Einleitung

3.1 Alterung, Zelltod und Seneszenz bei Pflanzen

Altern und Seneszieren einzelner Zellen, Organe und des ganzen Organismus sind Phasen des Lebenszyklus einer Pflanze. Die Begriffe Altern und Seneszenz werden im Allgemeinen benutzt, um sehr ähnliche oder sogar identische Prozesse zu benennen. Bei der Beschreibung der Entwicklungsphasen einer Pflanze sind allerdings Alterungs- und Zelltodprozesse voneinander zu unterscheiden.

Alterungsprozesse stellen eine passive Folge von exogenen Einflüssen wie Abnutzungserscheinungen dar, die mit vorschreitendem Alter akkumulieren (Gepstein 2004; Noodén 2013; Thomas 2013). Dahingegen unterliegen Zelltodprozesse einer intensiven aktiven genetischen Kontrolle, welche allerdings ebenfalls durch exogene Faktoren beeinflusst werden kann (Noodén *et al.* 1997; Reape *et al.* 2008).

Der kontrollierte oder programmierte Zelltod (PCD, *programmed cell death*) ist in eine Vielzahl an Entwicklungs- und Adaptationsprozessen eingebunden, wie beispielsweise in die Entstehung der Tracheen, in die Bildung des Aerenchymgewebes oder in die Abwehr von Pathogenen durch die hypersensitive Reaktion (HR, *hypersensitive response*). Solche Zelltodprozesse sind im Allgemeinen zügige unumkehrbare Prozesse, die mit dem Tod der betreffenden Zelle(n) enden. Hingegen ist die Seneszenz ein meist über einen längeren Zeitraum andauernder Prozess, der bis zu einem späten Zeitpunkt reversibel ist (van Doorn 2005). So konnte an blühenden Tabakpflanzen gezeigt werden, dass die seneszierenden Blätter wieder ergrünen, wenn sie mit Ammoniumnitrat besprüht oder wenn alle jüngeren grünen Blätter sowie die Achselknospen entfernt werden (Mothes 1960; Zavaleta-Mancera *et al.* 1999). Im zweiten Fall konnte der Seneszenzprozess in fast weißen Blättern, die nahezu kein Chlorophyll mehr beinhalteten, gestoppt und revertiert werden, sodass die Blätter wieder ergrünt und ein, wenn auch unregelmäßiges, Größenwachstum zeigten. Ähnliche Prozesse wurden beispielsweise auch für die Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris* L.) (Jenkins & Woolhouse 1981) oder die Sojabohne (*Glycine max* (L.) Merr.) (Tuquet & Newman 1980) beschrieben.

Aufgrund der Unterschiede zwischen Seneszenz und programmiertem Zelltod wird diskutiert, ob die Seneszenz eine besondere Form des programmierten Zelltods ist oder ein eigenständiger Prozess, auf den der programmierte Zelltod folgt (Thomas *et*

al. 2003; Wagstaff *et al.* 2003; van Doorn & Woltering 2004; Jansson & Thomas 2008).

Das bekannteste Beispiel für Seneszenz ist die Blattverfärbung und der Laubfall, der jedes Jahr im Herbst bei den Laubbäumen der gemäßigten Klimazonen zu beobachten ist. Nach der Reproduktionsphase werden die Nährstoffe von den Blättern in überdauernde Organe verlagert und dort gespeichert. Dabei sterben einzelne Pflanzenteile bzw. Organe ab und werden abgeworfen (Munné-Bosch 2008). In der Regel stirbt dabei allerdings nicht die ganze Pflanze. Dieser Prozess, die polykarpe Seneszenz, tritt bei mehrjährigen Pflanzen auf und kann von der monokarpen Seneszenz der ein- und zweijährigen, selten auch einiger mehrjähriger Pflanzen unterschieden werden (Leopold 1961; Thomas 2013). Die monokarpe Seneszenz tritt bereits während der Reproduktionsphase auf und verlagert die Nährstoffe aus den übrigen Pflanzenteilen, meist den Blättern, in die sich entwickelnden Samen oder Früchte (Davies & Gan 2012). Dabei sterben in der Regel zunächst die Pflanzenteile ab, die weiter von den reproduktiven Organen entfernt sind (Feller *et al.* 2008). Letztendlich stirbt die ganze Pflanze mit Ausnahme der Samen ab.

Ein Beispiel für monokarpe Seneszenz ist das typische Abreifen eines Gerstenfeldes. Hierbei wird zudem der wirtschaftliche Aspekt der Seneszenz deutlich. In Gerste, wie auch in anderen Getreidearten, stellen die remobilisierten Nährstoffe den größten Anteil an der Kornfüllung und somit am Ertrag (Hirel *et al.* 2007).

3.2 Charakterisierung der Blattseneszenz

Die Blattseneszenz ist die letzte Phase der Blattentwicklung. Ihr voran gehen eine Wachstums- und eine Reifephase (Guiboileau *et al.* 2010). Dabei wandelt sich mit dem Abschluss der Wachstumsphase die Nährstoffbilanz des Blattes von einem hauptsächlich aufnehmenden Organ (*sink*) in ein hauptsächlich abgebendes Organ (*source*). So werden während der Wachstumsphase Nährstoffe zum größten Teil in das Blatt transportiert (*sink*). Sie werden dort vor allem zum Aufbau des Blattes und somit zur Vergrößerung der Photosyntheseleistung genutzt. In der Reifephase überwiegt die Menge an Photosyntheseprodukten, die aus dem Blatt exportiert werden und somit anderen Pflanzenteilen zur Verfügung stehen (*source*). Während der Blattseneszenz werden zusätzlich die zuvor importierten Ressourcen durch regulierte

Abbauprozesse remobilisiert, exportiert und somit ebenfalls anderen Pflanzenteilen zur Verfügung gestellt (*source*).

Die Seneszenz der Blätter ermöglicht so, die insgesamt zur Verfügung stehenden Ressourcen möglichst effektiv auszunutzen und somit die Überlebens- und Fortpflanzungsfähigkeit der Pflanze positiv zu beeinflussen (Thomas 1994; 2013).

Die Abläufe während der Blattseneszenz können in drei Phasen unterteilt werden (Noodén *et al.* 1997; Yoshida 2003; De Michele *et al.* 2009). In der ersten Phase, der Initiationsphase, wird die Seneszenz durch exogene oder endogene Faktoren ausgelöst. Es kommt zu einer weitgehenden Reduktion des Wachstums und zu ersten Veränderungen in der Expression bestimmter Gene. In der sich anschließenden zweiten Phase, der Reorganisations- oder Abbauphase, kommt es zu einem streng regulierten massiven Abbau von Zellbestandteilen und zur Remobilisierung der darin enthaltenen Nährstoffe. Wie bereits in 3.1 beschrieben, kann dieser Prozess bis zu einem bestimmten Punkt (*point of no return*) aufgehalten und umgekehrt werden. In der letzten Phase der Blattseneszenz, der terminalen Phase, kommt es zum Verlust der Zellintegrität, zum Zelltod und letztendlich zum Absterben des gesamten Blattes. Die Regulation der Abläufe während dieser Seneszenzphasen wird durch die Abfolge der Veränderungen in der Zelle besonders deutlich. Nach dem Einsetzen der Blattseneszenz sind die ersten Veränderungen in den Chloroplasten erkennbar. Bedingt durch die Abbauprozesse verändern sich Struktur und Aufbau der Thylakoide und es kommt zur Bildung von Plastoglobuli (Lichtenthaler 1969; Hurkman 1979). Auf diese Weise entwickeln sich die Chloroplasten zu Gerontoplasten (Sitte 1977). Dahingegen bleiben andere Organellen wie die Mitochondrien oder der Zellkern zunächst intakt. Sie ermöglichen die Energieversorgung und Steuerung der Abbau- und Remobilisierungsprozesse (Smart 1994; Amasino & Gan 1997). Erst zu einem späten Zeitpunkt kommt es zur Kondensation des Chromatins, zur DNA-Fragmentierung und zum Zusammenbruch der Vakuole. Schließlich führt dies zum Verlust der Integrität der Plasmamembran und zum Tod der Zelle (Yen & Yang 1998; Reape *et al.* 2008).

Die deutliche Umstrukturierung in den Chloroplasten während der Seneszenz dient der effizienten Remobilisierung verschiedener Nährstoffe, vor allem von Stickstoff. Stickstoff macht den mit Abstand größten Anteil der während der Blattseneszenz remobilisierten Nährstoffe aus. Daneben werden noch weitere Makronährstoffe wie

Kalium, Phosphor, Schwefel, Magnesium und Calcium sowie Mikronährstoffe wie Kupfer, Zink und Mangan remobilisiert (Maillard *et al.* 2015). Der remobilisierte Stickstoff stammt zu 75% aus den Chloroplasten, wovon alleine 70% aus Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) stammen (Peoples & Dalling 1988; Feller *et al.* 2008). Der Abbau von Rubisco ist bisher nicht vollständig aufgeklärt (Feller *et al.* 2008; Gregersen *et al.* 2008). Es konnte aber gezeigt werden, dass er bereits in den Chloroplasten beginnt (Nakano *et al.* 1997; Ishida *et al.* 1998; Murakami *et al.* 2000; Kato *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2007) und in der Vakuole fortgesetzt wird (Yoshida & Minamikawa 1996).

Von den übrigen 30% Stickstoff aus den Chloroplasten stammt der größte Anteil aus den Apoproteinen der Lichtsammelkomplexe der Thylakoidmembranen (Matile 1992). Zum Abbau dieser Apoproteine muss jedoch zunächst ihre Bindung an die Chlorophylle gelöst werden (Hilditch *et al.* 1989; Bachmann *et al.* 1994). Die dann ungebundenen Chlorophylle können weiterhin Lichtenergie absorbieren, sie aber innerhalb der Lichtsammelkomplexe nicht weitergeben. Stattdessen können sie die Energie auf molekularen Sauerstoff übertragen. Dies führt zur Bildung von hochreaktiven Sauerstoffverbindungen, welche die Zelle schädigen und einen vorzeitigen Zelltod auslösen können. Dies hätte zur Folge, dass noch in der Zelle verbliebene Nährstoffe nicht weiter remobilisiert werden könnten und der übrigen Pflanze nicht weiter zur Verfügung stehen würden. Zur Vermeidung dieser phototoxischen Schädigung und der daraus resultierenden Folgen werden die Chlorophylle über mehrere aufeinanderfolgende enzymatische Prozesse abgebaut und die farblosen Endprodukte (NCC, *nonfluorescent chlorophyll catabolites*) in der Vakuole eingelagert (Hörtensteiner & Feller 2002; Hörtensteiner & Kräutler 2011; Christ & Hörtensteiner 2013). Die vier Stickstoffatome des Porphyrinringsystems der Chlorophylle sind in diesen Endprodukten noch enthalten (Hörtensteiner & Kräutler 2011). Obwohl der Stickstoff des Chlorophylls nicht remobilisiert wird, ist der Chlorophyllabbau während der Blattseneszenz somit wichtig für eine hohe Ausbeute bei der Stickstoffremobilisierung. Die resultierende Verfärbung der Blätter ist zudem ein frühes, gut sichtbares und leicht messbares Merkmal der einsetzenden Seneszenz (Humbeck *et al.* 1996). In den höheren Pflanzen gibt es zwei Formen an Chlorophyll, das primäre Photosynthesepigment Chlorophyll a und das Chlorophyll b. Die beiden Pigmente unterscheiden sich in einer Seitenkette des Porphyrinrings und weisen daher unterschiedliche

Absorptionsspektren auf. Bei Chlorophyll a ist eine Methylgruppe an Position 7 angehängt, die bei Chlorophyll b durch eine Formylgruppe ersetzt ist. Das Verhältnis von Chlorophyll a zu b bleibt bei konstanten Bedingungen in der Regel relativ unverändert. Allerdings nimmt das Verhältnis von Chlorophyll a zu b in den meisten Pflanzen während der natürlichen Seneszenz ab (Wolf 1956; Jenkins *et al.* 1981; Kura-Hotta *et al.* 1987; Špundová *et al.* 2003; Tang *et al.* 2005; Nath *et al.* 2013; Wang *et al.* 2014). Aufgrund der unterschiedlichen Verteilung der beiden Chlorophylle in den Thylakoiden weist die Veränderung des Chlorophyll a zu b Verhältnisses auf Veränderungen in der Struktur der Thylakoide hin (Krupinska & Humbeck 2004).

In den Reaktionszentren der Photosysteme kommt ausschließlich Chlorophyll a vor. Hingegen bestehen die Lichtsammelkomplexe aus Chlorophyll a und b. Das meiste Chlorophyll b ist mit den Lichtsammelkomplexen des Photosystems II (LHCII) assoziiert, die zusammen mit dem Photosystem II zum größten Teil in den Granathylakoiden lokalisiert sind (Andersson & Anderson 1980; Melis 1991). Granathylakoide bestehen aus dicht aufeinander gestapelten Thylakoidmembranen. Daneben gibt es einfache ungestapelte Thylakoide, die Stromathylakoide (Abbildung 1). In den Stromathylakoiden überwiegen die Komplexe des Photosystems I und die ATP-Synthase. Die Cytochrom- b_6/f -Komplexe sind in den Randbereichen der Granathylakoide und in den Stromathylakoiden lokalisiert. Diese unterschiedliche Verteilung der Photosysteme in den Thylakoidmembranen wird als laterale Heterogenität beschrieben (Abbildung 1) (Anderson 1999).

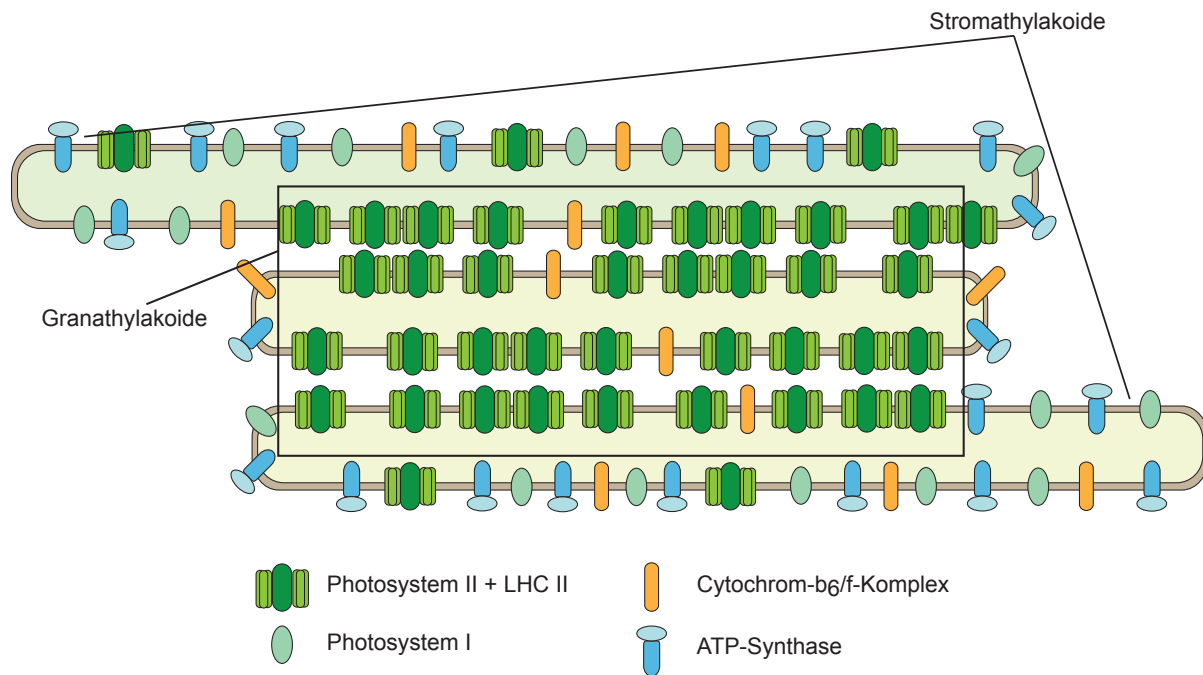


Abbildung 1. Schematische Darstellung der unterschiedlichen Verteilung der Photosysteme auf die frei im Stroma liegenden Stromathylakoide und die übereinander gestapelten Granathylakoide (laterale Heterogenität). Die Abbildung ist verändert nach Pribil *et al.* (2014).

Parallel zum gesamten Chlorophyllgehalt nimmt die Photosynthesekapazität während der Seneszenz ab, wobei die Effizienz des Photosystems II zunächst stabil bleibt. Erst zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt nimmt auch die Effizienz des Photosystems II ab (Humbeck *et al.* 1996; Miersch *et al.* 2000). Zusammen mit der Abnahme des Chlorophyll *a/b*-Verhältnisses weist dies auf eine erhöhte Stabilität der Granathylakoide im Vergleich zu den Stromathylakoiden hin (Wolf 1956; Kura-Hotta *et al.* 1987). Diese Annahme wird gestützt durch Ultrastrukturanalysen von Gerontoplasten, die im Vergleich zu Chloroplasten kaum noch Stromathylakoide aufweisen (Hurkman 1979; Gepstein 1988). Zusätzlich konnte durch *Western Blot* Analysen (Miersch *et al.* 2000; Wang *et al.* 2014), native Gelelektrophorese (Tang *et al.* 2005; Wang *et al.* 2014) und die Messung von 77K Chlorophyll-Fluoreszenz-Emissionsspektren (Tang *et al.* 2005) gezeigt werden, dass das Photosystem I vor dem Photosystem II abgebaut wird.

Interessanterweise gibt es aber auch den entgegengesetzten Fall. Während der Blattseneszenz kann das Photosystem I eine höhere Stabilität aufweisen (Ghosh *et al.* 2001) und das Chlorophyll *a/b*-Verhältnis ansteigen (Špundová *et al.* 2003) oder unverändert bleiben (Ghosh *et al.* 2001; Agüera *et al.* 2010).

Die Prozesse, die in den unterschiedlichen Phasen der Seneszenz ablaufen, sind auf Ebene der Organellen, der Zellen, der Organe bis hin zum ganzen Organismus stark strukturiert. Bisher ist allerdings nur ein Teil der Abläufe genau verstanden. Die Strukturierung der Seneszenzprozesse setzt eine intensive Regulation dieser Prozesse voraus, die im nächsten Kapitel vorgestellt werden. Die Remobilisierung von Nährstoffen ist ein entscheidender Faktor für den Ertrag bei Kulturpflanzen wie der Gerste. Daher ist das Verständnis der Seneszenzprozesse und deren Regulation eine wichtige Grundlage für eine effizientere Züchtung neuer Sorten zur Sicherung und Steigerung des Ertrags in der Landwirtschaft (Gregersen *et al.* 2013).

3.3 Induktion und Regulation der Blattseneszenz

Die Blattseneszenz ist ein genetisch kontrollierter Entwicklungsprozess, dessen Induktion und Regulation von einer Vielzahl an endogenen und exogenen Faktoren beeinflusst wird. Eine wichtige Voraussetzung für die Induktion der Blattseneszenz ist der Entwicklungsstand, sowie das Alter der Pflanze und des betreffenden Blattes (Davies & Gan 2012). Weitere endogene Faktoren sind Phytohormone (Jibrán *et al.* 2013), reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Khanna-Chopra 2012) und Metabolite wie Zucker oder Stickstoff (Masclaux-Daubresse *et al.* 2000; Paul & Foyer 2001; Yoshida 2003). Daneben wirken auch exogene Faktoren auf die Pflanze, die sich in abiotische und biotische Faktoren unterteilen lassen. Zu den abiotischen Faktoren zählen Temperatur (Berberich *et al.* 1999), Salzgehalt (Balazadeh *et al.* 2010), extreme Lichtbedingungen wie Dunkelheit (Kleber-Janke & Krupinska 1997; Park *et al.* 1998; Weaver *et al.* 1998; John *et al.* 2001), Ozongehalt (Miller *et al.* 1999) und die Verfügbarkeit von Wasser und Nährstoffen (Brandner *et al.* 1998; Munné-Bosch & L 2002; Criado *et al.* 2007; Kong *et al.* 2013). Biotische Faktoren sind Herbivore und Pathogene (Lim *et al.* 2007; Schippers *et al.* 2015).

Der Bedarf und die Verfügbarkeit von Stickstoff spielt eine wichtige Rolle während der Blattseneszenz. Wie bereits erwähnt, ist der Beginn der monokarpen Seneszenz eng mit der Ausbildung der Reproduktionsorgane und somit dem Entwicklungsstand der Pflanze verknüpft. Eine treibende Kraft hierfür stellt der Nährstoffbedarf bzw. der Stickstoffbedarf der in Entwicklung befindlichen reproduktiven Organe dar (Kelly & Davies 1986; Ono *et al.* 2001; Guiboileau *et al.* 2010; Davies & Gan 2012). So

zeigen bestimmte Genotypen der Erbse, die durch eine stark verzögerte Wachstumsrate der Reproduktionsorgane charakterisiert sind, eine Verzögerung der Seneszenz (Kelly & Davies 1986). Ebenso konnte sowohl in *Arabidopsis* als auch in Gerste gezeigt werden, dass die Seneszenz durch eine intensive Stickstoffgabe verzögert und sogar revertiert werden kann (Diaz *et al.* 2005; Martre *et al.* 2006; Schildhauer *et al.* 2008). Ein Stickstoffmangel hingegen führt zu einer beschleunigten Seneszenz (Schulze *et al.* 1994; Lemaître *et al.* 2008). Allerdings kann Stickstoffmangel im Blatt auch zu einer Akkumulation von Kohlenstoff in Form von Zucker führen (Ono *et al.* 1996; Ono & Watanabe 1997; Paul & Driscoll 1997). Hohe Zuckerkonzentrationen können wiederum selbst die Blattseneszenz induzieren und vorantreiben (Dai *et al.* 1999; Pourtau *et al.* 2006). In Transkriptomstudien an Gerstenblättern, bei denen es durch künstliche Unterbrechung des Phloems zu einer Zuckerakkumulation kommt, sind größtenteils dieselben Gene differentiell exprimiert, wie bei der natürlichen Blattseneszenz (Parrott *et al.* 2007; Christiansen & Gregersen 2014). Wingler folgte daher, dass die Induktion der Seneszenz nicht allein auf dem Stickstoffmangel basiert, sondern zumindest zum Teil auch auf der Akkumulation von Zucker (Wingler 2005).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Zucker als Signalmolekül in eine Reihe von Entwicklungsprozessen involviert ist (Wingler & Roitsch 2008) und dass die Signalwege von Stickstoff und Zucker in der Regulation der Genexpression teilweise interagieren (Price *et al.* 2004; Palenchar *et al.* 2004). Allerdings ist der Effekt von Zucker auf die Blattseneszenz noch nicht vollständig verstanden (van Doorn 2008).

Beispielsweise wurde in Sonnenblumen während der Blattseneszenz statt einer Akkumulation eine Abnahme des Zuckergehalts beobachtet (Moschen *et al.* 2016).

Wie am Beispiel der stickstoff- und zuckerabhängigen Regulation der Blattseneszenz deutlich wird, wirken die verschiedenen endogenen und exogenen Faktoren nicht isoliert voneinander. Vielmehr überlappen sich ihre Signalwege teilweise und interagieren miteinander. Die Signalwege bilden ein komplexes regulatorisches Netzwerk, über das die endogenen und exogenen Faktoren in die genetische Steuerung der Seneszenzprozesse integriert sind (He *et al.* 2001; Lim *et al.* 2007; Guo 2013; Penfold & Buchanan-Wollaston 2014) (eine aktuelle Übersicht bietet Schippers 2015).

Amasino und Gan postulierten, dass die Unterbrechung einzelner Signalwege den

Verlauf der Blattseneszenz nicht zwangsläufig beeinträchtigt (Amasino & Gan 1997). Sie bezeichneten dieses Merkmal als „Plastizität der Blattseneszenz“. Obwohl diese Theorie bisher experimentell nur für einen Teil der Gene dieser Signalwege bestätigt wurde, weist sie auf die komplexen Verknüpfungen innerhalb des regulatorischen Netzwerks hin (He *et al.* 2001). In der Pflanzenzüchtung erschweren die Überlappungen und Verknüpfungen zwischen den Signalwegen eine gerichtete Entwicklung und Selektion neuer Sorten mit einem aus Sicht der Züchtung verbesserten Seneszenzverlauf. Das Problem liegt darin, dass sich die Manipulation eines Signalweges eines ausgewählten Faktors auch auf andere Signalwege anderer Faktoren auswirken kann. Unter Freilandbedingungen können trotz gezielter Manipulation somit die Folgen, die sich günstig auf die Seneszenz auswirken, nachteilig für das Züchtungsziel sein, da die Pflanzen im Freiland unterschiedlichsten und sich ständig verändernden Umweltfaktoren ausgesetzt sind (Penfold & Buchanan-Wollaston 2014).

3.3.1 Genexpression während der Blattseneszenz

Die Reorganisation des Metabolismus während der Blattseneszenz wird durch massive Veränderungen in der Genexpression und der Proteinsynthese erreicht. So konnte gezeigt werden, dass durch Verwendung spezifischer Inhibitoren der RNA- oder Protein-Synthese der Reorganisationsprozess gestört und die Symptome der Blattseneszenz teilweise unterdrückt werden können (Amasino & Gan 1997).

In den letzten Jahren standen vor allem die Veränderungen in der Genexpression im Fokus der Forschung. Dabei werden generell zwei Muster der Genexpression unterschieden (Hensel *et al.* 1993; Lohman *et al.* 1994). Auf der einen Seite stehen die SDGs (*senescence downregulated genes*), deren Expressionsrate während der Seneszenz herunterreguliert ist. Dazu gehören die Gene, die für Proteine der Photosyntheseapparate kodieren. Dem gegenüber stehen die SAGs (*senescence-associated genes*), deren Expressionsrate während der Seneszenz heraufreguliert ist oder die ausschließlich während der Seneszenz exprimiert werden. Sie kodieren für Proteine, die potentiell in Seneszenzprozesse involviert sind. Beispielsweise wurden bereits in einer älteren Studie von Lohman und Mitautoren sechs SAGs in *Arabidopsis* identifiziert (Lohman *et al.* 1994). Unter diesen befand sich auch das Gen der Cysteinprotease SAG12, das aufgrund seiner charakteristischen Expression seitdem häufig als Marker für die Seneszenz genutzt wird (Gan & Amasino 1995; Gregersen

& Holm 2006; Ruuska *et al.* 2008; Jukanti & Fischer 2008; Parrott *et al.* 2010; Moschen *et al.* 2016).

Insbesondere durch Methoden wie die Microarray-Technologie oder moderne Hochdurchsatz-Sequenzierverfahren wurden eine Vielzahl an weiteren SAGs und SDGs identifiziert. Diese Methoden erlauben nahezu das gesamte Transkriptom einer Pflanze auf Änderungen in der Genexpression zu analysieren. Außerdem ist es möglich, nicht nur die Veränderungen zwischen einzelnen Zeitpunkten, sondern zusätzlich auch ganze Zeitreihen zu untersuchen und zu vergleichen.

Der größte Teil der Analysen wurde an dem Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. durchgeführt. Je nach experimentellem Ansatz konnten hier zwischen 827 und 6.141 differentiell exprimierte Gene identifiziert werden (Zhu & Wang 2000; Chen *et al.* 2002; Guo *et al.* 2004; Lin & Wu 2004; Buchanan-Wollaston *et al.* 2005; van der Graaff *et al.* 2006; Breeze *et al.* 2011). Die Arbeit von Breeze und Mitautoren stellt eine der detailliertesten Übersichten zu den Veränderungen der Genexpression während der Blattseneszenz in *Arabidopsis* dar (Breeze *et al.* 2011). Sie analysierten einen Zeitraum von 21 Tagen, beginnend kurz bevor das Blatt ausgewachsen ist, bis hin zu dem Zeitpunkt, an dem ungefähr 50% der Blattfläche bereits gelb ist. Insgesamt konnten 6.141 differentiell exprimierte Gene identifiziert werden, wovon 2.849 SDGs und 3.292 SAGs waren.

Neben *Arabidopsis* gibt es eine zunehmende Anzahl an Expressionsanalysen in landwirtschaftlich genutzten Pflanzen wie Weizen (*Triticum aestivum* L.) (Gregersen & Holm 2006), Gerste (Parrott *et al.* 2007; Jukanti & Fischer 2008; Christiansen & Gregersen 2014), Reis (*Oryza sativa* L.) (Liu *et al.* 2008; Sperotto *et al.* 2009), Mais (*Zea mays* L.) (Escobar-Gutiérrez & Combe 2012), Raps (*Brassica napus* L.) (Koeslin-Findeklee *et al.* 2015), Klee (*Medicago trunculata* Gaertn.) (De Michele *et al.* 2009), Sonnenblume (*Helianthus annuus* L.) (Moschen *et al.* 2016) und Baumwolle (*Gossypium hirsutum* L.) (Lin *et al.* 2015). Die Analysen in Reis, Mais und Sonnenblume wurden in Pflanzen durchgeführt, welche unter landwirtschaftlich relevanten Gesichtspunkten im Freiland angebaut wurden. Die Pflanzen, die in den anderen Studien analysiert wurden, wurden entweder im Gewächshaus oder in der Klimakammer unter kontrollierten Bedingungen angezogen.

In einer Übersichtsarbeit fasste Gepstein die Ergebnisse einer Expressionsstudie von Guo und Mitautoren aus dem Jahr 2004 zusammen und ordnete die identifizierten

SAGs in Arabidopsis funktionellen Kategorien zu (Abbau, Recycling, Verteidigung/Schutz, Regulation und Signaltransduktion) (Tabelle 1) (Guo *et al.* 2004; Gepstein 2004).

Tabelle 1. Funktionelle Kategorien der SAGs in Arabidopsis. Die Tabelle aus Gepstein, 2004 wurde übersetzt.

Funktionelle Kategorie	Prozess	Abundante Gene
Makromolekülabbau	Abbau von Proteinen, Nukleinsäuren, Lipiden und Polysacchariden	Cysteinproteasen, Ubiquitin-System, Nukleasen, Lipasen/Acylhydrolasen, Phospholipasen, Glukosidasen, Pektinasen
Nährstoff-Recycling	Transport von Peptiden, Aminosäuren, Zuckern, Purine, Pyrimidine und Ionen	Oligopeptid-Transporter, Ammonium-Transporter, Purin- und Pyrimidin-Transporter, Glutamin- und Glutamat-Synthase, Zucker-Transporter, ABC-Transporter
Verteidigungs- und Schutzmechanismen	Abiotischer und biotischer Stress	Metallthionein, Glutathion S-Transferase, Glutathion-Peroxidase, jasmonat induzierbare Proteine, COR6.6
Transkriptionelle Regulation	Transkriptionsfaktoren	Zink-Finger Proteine, Helix-loop-Helix Proteine, bZIP Proteine, HMG-Box Proteine, Transkriptionsfaktoren der WRKY, NAC, AP2, MYB, HB, TCP und GRAS Familie
Signaltransduktion	Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen	Rezeptor-Kinasen, Komponenten der MAP-Kinase Kaskaden, Phosphatasen, Calcium-abhängige Proteinkinasen, Cytoskelett-assoziierte Proteine

Guo selbst erweiterte diese Tabelle einige Jahre später um die Ergebnisse aus weiteren Studien mit Pappel (Andersson *et al.* 2004) und Weizen (Gregersen & Holm 2006). Er stellte fest, dass Gene während der Blattseneszenz in den getesteten monokotylen und dikotylen Arten aus nahezu den gleichen funktionellen Gruppen und Untergruppen aufreguliert sind (Guo 2013). Die große Übereinstimmung zwischen den hochregulierten funktionellen Kategorien der unterschiedlichen Arten, insbesondere der Transkriptionsfaktoren, legt nahe, dass die Regulation der Genexpression während der Blattseneszenz stark konserviert ist (Gregersen *et al.* 2013; Guo 2013).

3.3.2 Regulation der Blattseneszenz durch Transkriptionsfaktoren

Auf transkriptioneller Ebene kontrollieren Transkriptionsfaktoren die weitreichenden Veränderungen während der Blattseneszenz. Daneben spielen auch übergeordnete epigenetische Modifikationen der Chromatinstruktur eine Rolle (Lim & Nam 2007; Bruslan *et al.* 2012; Humbeck 2013; Woo *et al.* 2013; Ay *et al.* 2013; 2014).

Transkriptionsfaktoren können sie sich entweder aktivierend oder reprimierend auf die Transkription auswirken (Liu *et al.* 1999). Typische pflanzliche Transkriptionsfaktoren setzen sich aus unterschiedlichen Proteindomänen zusammen: einer oder mehrerer DNA-bindender Domänen, einer Effektor-domäne, einer Multimerisierungs-domäne und einem oder mehreren Kernlokalisierungssignalen (*nuclear localisation signal*, NLS) (Liu *et al.* 1999). Das charakterisierende Merkmal ist die DNA-bindende Domäne, anhand der die meisten Transkriptionsfaktoren in Familien unterteilt werden können. Sie ist verantwortlich für die Identifikation des Zielgens, in dem sie eine kurze DNA-Sequenz, das *cis*-Element, im Promotor des Zielgens erkennt und daran bindet. Allerdings sind in einem Promoter eine ganze Reihe an *cis*-Elementen für unterschiedliche Transkriptionsfaktoren vorhanden (Pruneda-Paz *et al.* 2014). Ebenso ist ein spezifisches *cis*-Element nicht auf einen Promotor beschränkt, sondern kann in einer Vielzahl an Promotern vorkommen. Das so entstehende regulative Netzwerk ermöglicht mit einer relativ geringen Anzahl an Transkriptionsfaktoren die Anpassung der Transkription an die unterschiedlichsten endogenen und exogenen Faktoren (Singh 1998).

In *Arabidopsis* kodieren von den insgesamt 27.655 Genen 2.296 für Transkriptionsfaktoren (Jin *et al.* 2014; Cheng *et al.* 2016). Von denen je nach Aufbau der jeweiligen Studie zwischen 41 und 168 Gene, während der Blattseneszenz hochreguliert und zwischen 79 und 144 runterreguliert sind (Guo *et al.* 2004; van der Graaff *et al.* 2006; Balazadeh *et al.* 2008; Breeze *et al.* 2011). Zu den verstärkt exprimierten Transkriptionsfaktoren zählen vor allem Mitglieder der bZIP-, C3H-, MYB-, AP2-EREBP-, WRKY- und NAC-Familien. Die entsprechenden *cis*-Elemente, die von diesen Transkriptionsfaktoren erkannt und gebunden werden, wurden überproportional häufig in den Promotoren von SAGs identifiziert (Robatzek & Somssich 2001; Breeze *et al.* 2011). Dies trifft besonders auf *cis*-Elemente zu, an denen NAC- oder zu einem etwas geringeren Umfang WRKY-Transkriptionsfaktoren binden können.

In Gerste kodieren von insgesamt 24.287 Genen 2.621 für Transkriptionsfaktoren (Consortium 2013; Jin *et al.* 2014). Davon sind in der bisher umfangreichsten Transkriptomstudie der Blattseneszenz in Gerste 50 in ihrer Expression hoch- und 29 herunterreguliert (Christiansen & Gregersen 2014). Diese aufregulierten Gene kodieren für Mitglieder der selben Transkriptionsfaktorfamilien, die auch während der Blattseneszenz in Arabidopsis identifiziert wurden. Wie in Arabidopsis kodieren auch in Gerste die meisten aufregulierten Gene für Transkriptionsfaktoren aus der NAC-Familie (Guo *et al.* 2004; Breeze *et al.* 2011; Christiansen & Gregersen 2014). Zusätzlich wurde auch in Gerste die zentrale Rolle der NACs während der Blattseneszenz in einer Promotorstudie, die vergleichbar ist mit der oben erwähnten Promotoranalyse von Breeze und Mitautoren in Arabidopsis, bestätigt (Guo *et al.* 2004; Breeze *et al.* 2011; Christiansen & Gregersen 2014). Dazu wurden die Promotoren der SAGs in Gerste auf die Verteilung der *cis*-Elemente untersucht, an die spezifisch NAC-Transkriptionsfaktoren binden können. Allerdings konnten damals aufgrund der unvollständigen Annotation des Gerstengenoms nur die Promotoren von insgesamt 1.106 SAGs untersucht werden, wovon 330 SAGs mindestens ein NAC spezifisches *cis*-Element aufwiesen (Consortium 2013; Christiansen & Gregersen 2014). Von diesen 330 SAGs sind während der Blattseneszenz tatsächlich 71 mit seneszenz-assoziierten NACs streng koexprimiert.

Weitere Analysen von zwei dieser NAC-Transkriptionsfaktoren, **HvNAC005** und **HvNAC013**, konnten zwar belegen, dass sie tatsächlich an die entsprechenden *cis*-Elemente während der Blattseneszenz binden. Allerdings konnte mittels des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems nur für **HvNAC013** und nicht für **HvNAC005** eine Induktion der Transkription nachgewiesen werden (Kjaersgaard *et al.* 2011). Die Autoren vermuten, dass **HvNAC005** eventuell eine die Transkription reprimierende Funktion haben könnte.

Einige der wichtigsten in Gerste identifizierten seneszenzassoziierten Transkriptionsfaktoren konnten den entsprechenden Orthologen in anderen Arten zugeordnet werden, die ebenfalls eine Funktion innerhalb der Blattseneszenz übernehmen. So gehören die NAC-Transkriptionsfaktoren **HvNAC005**, **HvNAC023** und **HvNAC027** zur gleichen Untergruppe (NAC-a) wie auch AtNAP (alternativer Name: ANAC029) aus Arabidopsis. AtNAP ist ein Bestandteil des Seneszenz-induzierenden Abscisinsäure (ABA) Signalweges (Zhang & Gan 2012). In AtNAP T-DNA-Insertionsmutanten

ist die Blattseneszenz deutlich verlangsamt (Guo & Gan 2006). Dahingegen setzt die Blattseneszenz in Pflanzen, in denen das *AtNAP* Gen überexprimiert wurde, verfrüht ein.

Distelfeld und Mitautoren konnten **HvNAC029** (HvNAM-1) aus Gerste dem TaNAM-B1 aus Weizen zuordnen (Distelfeld *et al.* 2008). In Weizenpflanzen, in denen die Translation von TtNAM-B1 durch die RNA-Interferenz Technik (RNAi) unterdrückt wurde, ist die Blattseneszenz um mehr als 3 Wochen verzögert und der Gehalt an Zink, Eisen und Proteinen in den Körner um 30% verringert (Uauy *et al.* 2006). Gleichzeitig ist der Gehalt an Zink, Eisen und Stickstoff in den Fahnenblättern erhöht. **HvNAC008** konnte ORE1 (alternativer Name: ANAC092, ATNAC2) aus Arabidopsis zugeordnet werden (Kohl *et al.* 2012). Interessant ist dabei, dass die Transkriptmenge von *ORE1* durch eine microRNA (miR164) reguliert wird. Außerdem steht diese microRNA, wie auch *ORE1* selbst unter der Kontrolle von EIN2 (ETHYLENE-INSENSITIVE 2) und wird somit Ethylen-abhängig reguliert.

Von den seneszenzassoziierten WRKY-Transkriptionsfaktoren ist AtWRKY53 in Arabidopsis am besten untersucht. AtWRKY53 nimmt eine zentrale Rolle während der frühen Phase der Blattseneszenz ein und reguliert andere WRKYs und SAGs (Hinderhofer & Zentgraf 2001; Miao *et al.* 2004; Zentgraf *et al.* 2010). Überexprimiert führt *AtWRKY53* zu einer beschleunigten Seneszenz, während es in RNAi Pflanzen zu einer verzögerten Seneszenz kommt (Miao *et al.* 2004). Die Zuordnung von *AtWRKY53* zu einem orthologen Gen in Gerste ist nicht abschließend geklärt. Aufgrund einer positiven Korrelation der Expressionsprofile in unterschiedlichen Organen der Pflanzen zwischen Arabidopsis und Gerste schlagen Distelfeld und Mitautoren **HvWRKY23** als orthologes Gen zu *AtWRKY53* vor (Distelfeld *et al.* 2014). Allerdings ist **HvWRKY23** in der Expressionsanalyse von Christiansen und Mitautoren nicht seneszenzabhängig exprimiert (Christiansen & Gregersen 2014).

Die hier vorgestellten Transkriptomstudien in Arabidopsis und Gerste spiegeln ein idealisiertes Muster der Genexpression während der Blattseneszenz wider, da das analysierte Blattmaterial unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus oder in Klimakammern angezogen wurde. Besonders im Fall der Gerste wären für einen möglichst engen Bezug zur landwirtschaftlichen Praxis Versuche unter realen Bedingungen interessant. Diese Freilandversuche hätten den Vorteil, dass die Aus-

wirkungen einer deutlich größeren Bandbreite an exogenen Faktoren auf die Pflanzen berücksichtigt werden können.

In diesem Kapitel wurde die Regulation der Expression der SAGs und SDGs durch Transkriptionsfaktoren während der Blattseneszenz beschrieben. Im nächsten Kapitel soll eine für die Abbauprozesse während der Blattseneszenz wichtige Enzymfamilie, die durch SAGs kodiert wird, vorgestellt werden, die Papain-ähnlichen Cysteinproteasen.

3.4 Proteasen

Proteasen katalysieren die Hydrolyse von Peptidbindungen in Proteinen und Peptiden. Während der Seneszenz ermöglichen sie so die Remobilisierung der in den Proteinen enthaltenen Nährstoffe.

Allgemein unterscheidet man Exoproteasen, die am N- oder C- Terminus des Proteins aktiv werden, von Endoproteasen, die die Peptidkette innerhalb des Proteins spalten. Einzelne Proteasen können zu beiden Gruppen gehören.

Eine detailliertere Unterteilung der Proteasen wurde von Rawlings und Barrett eingeführt (Rawlings & Barrett 1993; Schaller 2004; Rawlings *et al.* 2008). Sie unterscheiden die Proteasen nach ihrem chemischen Katalysemechanismus, also dem Aufbau des aktiven Zentrums, in Aspartat-, Cystein-, Glutamin-, Metallo-, Serin- und Threoninproteasen sowie unbekannte Proteasen. Innerhalb dieser Gruppen sind die Proteasen aufgrund von Sequenzhomologien und ihrer molekularen Struktur in *Clans* und diese wiederum in Familien unterteilt.

In *Arabidopsis* konnten 763 und in Gerste bisher 759 Proteasen identifiziert werden (Rawlings *et al.* 2008). Für ein Teil dieser Proteasen konnte gezeigt werden, dass sie in nahezu alle Prozesse der Pflanze involviert sind, vom Zellzyklus bis hin zur Samenreife. Allerdings ist die Funktion der meisten Proteasen bisher noch unbekannt (Van der Hoorn 2008). Ein Problem bei der Aufklärung der Funktion einzelner Proteasen sind Redundanzen innerhalb einer Familie, da teilweise mehrere Proteasen dieselbe Funktion übernehmen und Analysen unter Verwendung von Mutanten erschwert werden (Richau *et al.* 2012).

3.4.1 Proteasen während der Blattseneszenz

Schon früh konnte ein Zusammenhang zwischen Stickstoffremobilisierung während der Blattseneszenz und Proteinabbau durch Proteasen hergestellt werden. So konnte ein Zusammenhang zwischen dem Abbau von Rubisco, der Hauptstickstoffquelle während der Seneszenz (Kapitel 3.2), und einer zunehmenden proteolytischen Aktivität in abgetrennten Gersten- und Weizenblättern während der dunkelinduzierten Seneszenz beobachtet werden (Peterson & Huffaker 1975; Wittenbach 1978). Dabei war die proteolytische Aktivität bei sauren pH-Werten besonders hoch, was auf eine Lokalisation der Proteasen im sauren Milieu der Vakuole hindeutet (Müntz 2007). Tatsächlich sind einige der seneszenzassoziierten Proteasen in der Vakuole lokalisiert (Lin & Wittenbach 1981; Wittenbach *et al.* 1982; Huffaker 1990; Hensel *et al.* 1993; Drake *et al.* 1996; Srivalli *et al.* 2001; Martinez *et al.* 2007; Distelfeld *et al.* 2014). Nun stellt sich allerdings die Frage, wie die Bestandteile der Chloroplasten durch Proteasen, die hauptsächlich in der Vakuole lokalisiert sind, abgebaut werden können (Distelfeld *et al.* 2014).

Es konnte gezeigt werden, dass Bestandteile der Chloroplasten über verschiedene Wege in die Vakuole transportiert werden können (Xie *et al.* 2015). Der Transport von Stromaproteinen, wie Rubisco ist dabei am besten untersucht. Zum einen wurde der Transport durch Vesikel, sogenannte *rubisco containing bodies* (RCBs), die mit Hilfe von Autophagie gebildet werden, beschrieben (Chiba *et al.* 2003; Ishida & Yoshimoto 2008; Wada & Ishida 2013; Spitzer *et al.* 2015). Eine weitere Möglichkeit stellen kleine lytische Vesikel mit niedrigem pH-Wert dar, sogenannte *senescence-associated vacuoles* (SAVs) (Abbildung 2) (Otegui *et al.* 2005; Martinez *et al.* 2008). In *Arabidopsis* und Tabak konnte in solchen SAVs die Cysteinprotease SAG12 jeweils durch eine Transformation mit einem *SAG12:GFP* Fusionskonstrukt nachgewiesen werden (Otegui *et al.* 2005; Carrion *et al.* 2013). Zusätzlich konnten in SAVs, die aus seneszenten Tabakblättern isoliert wurden, mehrere Cysteinproteasen mittels eines Affinitätsnachweises mit einem biotinylierten Derivat des Cysteinproteaseninhibitors E64 (DCG-04) nachgewiesen werden (Carrion *et al.* 2013). Die dritte Möglichkeit ist der Transport über Vesikel, deren Bildung durch das *chloroplast vesiculation protein* (CV) induziert wird, die *CV-containing vesicles* (CCVs) (Wang &

Blumwald 2014). Nach den Stromaproteinen ist die nächst größere Menge an Stickstoff in den Thylakoiden gespeichert (Kapitel 3.2). Bisher konnten allerdings lediglich in CCVs Bestandteile der Thylakoidmembranen und in SAVs Proteine des Photosystems I nachgewiesen werden (Costa *et al.* 2013; Wang & Blumwald 2014). Außerdem wurde die Aufnahme ganzer Chloroplasten in die Vakuole beschrieben (Wittenbach *et al.* 1982; Minamikawa *et al.* 2001; Mulisch & Krupinska 2013).

Interessanterweise konnte auch gezeigt werden, dass der Abbau von Proteinen aus den Chloroplasten, wie beispielsweise von Rubisco (Kapitel 3.2), zum Teil bereits in den Chloroplasten stattfindet (Nakano *et al.* 1997; Ishida *et al.* 1998; Murakami *et al.* 2000; Kato *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2007).

In den Chloroplasten wurden bisher allerdings nur wenige Proteasen identifiziert, die im Zusammenhang mit dem seneszenz- oder stressbedingten Proteinabbau stehen (Yang *et al.* 2004; Sakamoto 2006). Die Aspartatprotease CND41 ist in den Abbau von Rubisco involviert (Kato *et al.* 2004; 2005). Es konnte gezeigt werden, dass in transgenen Tabakpflanzen mit verringerter Expression von *CND41* die Konzentration von Rubisco im Blatt während der Seneszenz unverändert bleibt. Hingegen ist bei Überexpression von *CND41* die Konzentration von Rubisco im Vergleich zum Wildtyp deutlich verringert. ATP-abhängige CLP Serinproteasen sind im Stroma lokalisiert und in den Abbau von löslichen und membrangebunden Proteasen involviert (Nakabayashi *et al.* 1999; Adam 2000). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass am Abbau von lichtgeschädigtem D1 Protein, das in den Thylakoidmembranen lokalisiert ist, DEGP Serinproteasen sowie FTSH Metalloproteasen beteiligt sind (Lindahl *et al.* 2000; Haussühl *et al.* 2001; Adam & Clarke 2002). Durch Proteomstudien an isolierten Chloroplasten konnte in Arabidopsis die Papain-ähnliche Cysteinprotease RD21 (Kapitel 3.4.2) identifiziert werden (Kleffmann *et al.* 2004; Peltier *et al.* 2004). Die verschiedenen Abbauwege können auch gleichzeitig auftreten.

3.4.2 Die Familie der Papain-ähnlichen Cysteinproteasen

Die Cysteinproteasen sind nach dem MEROPS-System in Arabidopsis wie auch in Gerste in 5 *Clans* und diese wiederum in insgesamt 16 Familien unterteilt. Im Papain Clan CA sind dabei alle Familien zusammengefasst, deren Mitglieder eine strukturelle Ähnlichkeit oder Sequenzhomologien zu der namensgebenden Protease Papain

haben (Rawlings *et al.* 2008). Papain wurde als erste Protease dieses Clans identifiziert, und sie gilt als die am besten untersuchte pflanzliche Protease. Sie kann aus der noch grünen Schale oder aus dem Kern der Papaya gewonnen werden. Die proteolytische Aktivität der Papaya ist bereits seit 1880 bekannt (Martin 1884; Rawlings *et al.* 2008). Innerhalb des Clans CA gehört Papain in die sogenannte Papain-ähnliche Familie (C1A). Das ist die größte Familie der Cysteinproteasen. Transkriptomstudien in Gerste und in anderen Arten wie Arabidopsis (Kapitel 3.3.1) haben gezeigt, dass vor allem die Genexpression von Cysteinproteasen aus dieser Familie während der Blattseneszenz aufreguliert sind (Buchanan-Wollaston *et al.* 2005; Parrott *et al.* 2007; Jukanti *et al.* 2008; Breeze *et al.* 2011; Roberts *et al.* 2012; Christiansen & Gregersen 2014; Diaz-Mendoza *et al.* 2014).

Der strukturelle Aufbau der Papain-ähnlichen Proteasen besteht aus einer für diese Familie typischen Faltung von zwei gegenüberliegenden Domänen, einer α -Helix und einem β -Faltblatt (Turk *et al.* 2001). Die beiden Domänen sind wie zwei Schenkel eines Dreiecks zu einander angeordnet, in dessen Spalt sich das aktive Zentrum aus den Aminosäuren Cystein (Cys), Histidin (His) und Asparagin (Asn) befindet. Papain-ähnliche Cysteinproteasen werden in der Regel als Präproenzyme synthetisiert (Tabelle 2). Durch die N-terminale Prädomäne, die ein Signalpeptid repräsentiert, gelangt das Proenzym cotranslational in das Endoplasmatische Retikulum (ER), in dem es entweder verbleibt oder in das entsprechende Zielkompartiment weiter transportiert wird (Grudkowska & Zagdanska 2004). Dazu haben einige dieser Proteasen ein C-terminales ER-Rückhaltungssignal ([K/H/T]DEL) oder eine N-terminale Lokalisationssequenz für die Vakuole (NPIR) (Munro & Pelham 1987; Napier *et al.* 1992; Gomord *et al.* 1997; Ahmed *et al.* 2000).

Die Prodomäne wirkt als Inhibitor und wird zur Aktivierung des Enzyms autokatalytisch oder durch ein anderes Enzym pH-abhängig abgespalten (Taylor *et al.* 1995; Wiederanders *et al.* 2003). Zusätzlich unterstützt die Prodomäne die korrekte Faltung der Protease. Bei einem Teil der Papain-ähnlichen Proteasen liegt in der Prodomäne ein ERFNIN Motiv ($\text{Ex}_3\text{Rx}_3\text{Fx}_2\text{Nx}_3[\text{I/V}]\text{x}_3\text{N}$), welches in die inhibitorische Funktion involviert ist (Karrer *et al.* 1993; Beers *et al.* 2000; Grudkowska & Zagdanska 2004). Einige der Papain-ähnlichen Proteasen weisen eine C-terminale Granulin-ähnliche Domäne ($\text{Cx}_5\text{Cx}_5\text{CCCx}_7\text{Cx}_4\text{CCx}_6\text{CCx}_5\text{CCx}_6\text{Cx}_6\text{C}$) auf. Es konnte gezeigt werden,

dass diese Domäne einen Einfluss auf die Reifung der Protease und auf die Löslichkeit des Proteins haben kann (Yamada *et al.* 2001).

Die Familie der Papain-ähnlichen Proteasen wurde nach zwei unterschiedlichen Systemen strukturiert (Richau *et al.* 2012). Beers und Mitautoren führten eine phylogenetische Klassifizierung der Proteasen in *Arabidopsis* ein, die später in anderen Arten bestätigt wurde (Beers *et al.* 2004; García-Lorenzo *et al.* 2006). Sie unterteilten die Familie auf Grund von Sequenzhomologien in acht Gruppen mit je einem namensgebenden Vertreter: RD21a (C1A-1), CEP1 (C1A-2), XCP2 (C1A-3), SAG12 (C1A-4), THI1 (C1A-5), RD19A (C1A-6), AALP/AtALEU (C1A-7), CTB3 (C1A-8). Martínez und Diaz untersuchten die phylogenetische Herkunft der Papain-ähnlichen Cysteinproteasen und unterteilten sie anhand ihrer Ähnlichkeit zu den bereits ausführlich untersuchten orthologen Proteasen in Säugetieren, den Cathepsinen, in die Gruppen B, F, H und L (Martínez & Diaz 2007). Die Cathepsin L-ähnlichen Proteasen können nach diesem Schema weiter in Untergruppen von A bis E unterteilt werden. Aufgrund der starken Sequenzhomologie der Papain-ähnlichen Proteasen in den unterschiedlichen Arten wurden beide Klassifizierungen später auf Gerste übertragen (Tabelle 2) (Martínez *et al.* 2009; Richau *et al.* 2012; Diaz-Mendoza *et al.* 2014). Bis auf wenige Ausnahmen entstehen nach beiden Systemen die gleichen Gruppierungen. In den letzten Jahren wurde diese Liste durch Sequenzierprojekte des Transkriptoms und Genoms der Gerste weiter vervollständigt (Tabelle 2) (Thiel *et al.* 2012; Kohl *et al.* 2012; Consortium 2013; Diaz-Mendoza *et al.* 2014; Kohl *et al.* 2015).

Die bisher durchgeführten Expressionsstudien zur Blattseneszenz in Gerste umfassen allerdings nur einen Teil der in Tabelle 2 aufgeführten Proteasen. Trotzdem sind aus allen acht Gruppen einzelne oder mehrere Proteasen in den unterschiedlichen Studien enthalten (Tabelle 2, Spalte: SAG). Außer in der SAG12 Gruppe wurden dabei in allen anderen Gruppen Gene identifiziert, die während der Blattseneszenz verstärkt exprimiert werden.

Interessanterweise ist das einzige Mitglied der SAG12 Gruppe in Gerste, das Gen **HvPAP17**, während der Blattseneszenz nicht aufreguliert. Das ist bemerkenswert, da Vertreter dieser Gruppe bei einer Reihe anderer Pflanzenarten als Seneszenzmarker genutzt werden, wie beispielsweise *AtSAG12* aus *Arabidopsis* (Lohman *et al.* 1994;

Gregersen & Holm 2006; Breeze *et al.* 2011). Das Gerstengen **HvPAP13**, das ortholog zu *AtSAG12* ist und auch während der Seneszenz verstärkt exprimiert wird, wird hingegen der TH11 Gruppe (L-like E) zugeordnet (Diaz-Mendoza *et al.* 2014). Es konnte gezeigt werden, dass Teile des Promoters von *AtSAG12* in Arabidopsis und dem orthologen Gen *OsSAG39* in Reis jeweils für die spezifische Expression während der Blattseneszenz verantwortlich sind (Noh & Amasino 1999; Liu *et al.* 2010). Außerdem konnten Fusionsexperimente nachweisen, dass der Promotor des Arabidopsisgens auch in Tabak zu einem ähnlichen Expressionsmuster während der Seneszenz führt (Gan & Amasino 1995).

Tabelle 2. Klassifizierung der Papain-ähnlichen Cysteinproteasen nach dem System von Beers (2004), Richau (2012) und Diaz-Mendoza (2014). SAG: das entsprechende Gen wird während der Blattseneszenz verstärkt exprimiert (Scharrenberg *et al.* 2003; Parrott *et al.* 2007; Christiansen *et al.* 2011; Diaz-Mendoza *et al.* 2014); SP: N-terminales Signalpeptid; NPIR: Lokalisationssequenz für die Vakuole; ERFNIN: strukturelles Motiv in der Prodomäne; Cys: Cystein; His: Histidin; Asn: Asparagin; KDEL: C-terminales ER-Rückhaltesignal; Granulin: C-terminale Granulin-ähnliche Domäne; unv.: Sequenz ist unvollständig.

Beers <i>et al.</i> 2004	Diaz-Mendoza <i>et al.</i> 2014	Name	SAG	SP	NPIR	ERFNIN	aktives Zentrum	KDEL	Granulin	
RD21A	C1A-1	L-like D	HvPAP6	X	X	-	X	X	-	X
	C1A-1	L-like D	HvPAP7	X	X	-	-	X	-	X
	C1A-1	L-like D	HvPAP8	X	X	-	X	X	-	X
	C1A-1	L-like D	HvPAP45		unv.	unv.	unv.	X	unv.	unv.
	C1A-1	L-like D	HvPAP46		unv.	unv.	unv.	X	unv.	unv.
	C1A-1	L-like D	HvPAP51		unv.	unv.	unv.	X	-	X
CEP1	C1A-2	L-like B	HvPAP9		X	-	-	X	TDEL	-
	C1A-2	L-like B	HvPAP10, 11		X	-	X	X	-	-
	C1A-2	L-like B	HvPAP14	X	X	-	X	X	HDEL	-
	C1A-2	L-like B	HvPAP42		X	-	X	X	-	-
XCP2	C1A-3	L-like C	HvPAP4	X	X	-	X	X	-	-
	C1A-3	L-like C	HvPAP5		X	-	X	X	-	-
	C1A-3	L-like D	HvPAP23		X	-	X	X	-	-
	C1A-3	L-like C	HvPAP26		X	-	X	X	-	-
SAG12	C1A-4	L-like A	HvPAP17		X	-	X	X	-	-
THI1	C1A-5	L-like E	HvPAP13	X	X	-	X	X	-	-
	C1A-5	L-like E	HvPAP15	X	X	-	X	X	-	-
	C1A-5	L-like E	HvPAP16		X	-	X	X	-	-
	C1A-5	L-like E	HvPAP18		X	-	-	X	-	-
	C1A-5	L-like E	HvPAP21		X	-	X	X	-	-
	C1A-5	L-like E	HvPAP22	X	X	-	X	X	-	-
	C1A-5	L-like E	HvPAP25		unv.	unv.	unv.	X	-	-
	C1A-5	L-like E	HvPAP27		X	-	-	X	-	-
	C1A-5	L-like E	HvPAP28		X	-	-	X	-	-
	C1A-5	L-like E	HvPAP29		X	-	-	X	-	-
	C1A-5	L-like E	HvPAP33		X	-	X	X	-	-
	C1A-5	L-like E	HvPAP34		X	-	X	X	-	-
	C1A-5	L-like E	HvPAP35		X	-	X	X	-	-
	C1A-5	L-like E	HvPAP36		X	-	X	X	-	-
	C1A-5	L-like E	HvPAP37		X	-	X	X	-	-
	C1A-5	L-like E	HvPAP38		X	-	X	X	-	-
	C1A-5	L-like B	HvPAP40		X	-	-	X	-	-
	C1A-5	L-like B	HvPAP41		X	-	-	X	-	-
	C1A-5	L-like E	HvPAP43		unv.	unv.	unv.	X	-	-
	C1A-5	L-like E	HvPAP47		X	-	X	X	-	-
C1A-5	-	HvPAP24		X	-	X	X	-	-	
C1A-5	-	HvPAP49		X	-	-	X	-	-	
C1A-5	-	HvPAP52		X	-	-	X	-	-	
RD19A	C1A-6	F-like	HvPAP1	X	X	-	-	X	-	-
	C1A-6	F-like	HvPAP2	X	X	-	-	X	-	-
	C1A-6	F-like	HvPAP3		X	-	-	X	-	-
	C1A-6	F-like	HvPAP44		X	-	-	X	-	-
	C1A-6	F-like	HvPAP50		X	-	X	X	-	-
AALP	C1A-7	H-like	HvPAP12	X	X	X	-	X	-	-
	C1A-7	H-like	HvPAP48		unv.	unv.	unv.	X	-	-
CTB3	C1A-8	B-like	HvPAP19	X	X	-	-	X	-	-
	C1A-8	B-like	HvPAP20	X	X	-	-	X	-	-
	C1A-8	B-like	HvPAP30		X	-	-	X	-	-
	C1A-8	-	HvPAP31		X	-	X	X	-	-
	C1A-8	-	HvPAP32		X	-	-	X	-	-
	C1A-8	-	HvPAP39		X	-	-	X	-	-

Bisher ist wenig darüber bekannt, in welche spezifischen Abbauprozesse während der Blattseneszenz die einzelnen Papain-ähnlichen Cysteinproteasen der unterschiedlichen Gruppen genau involviert sind. Neben Expressionsanalysen ist die Lokalisation der jeweiligen Protease innerhalb der Zelle hierfür ein wichtiger Hinweis. Obwohl der größte Teil der proteolytischen Aktivität in der Vakuole zu finden ist, besitzen nur Mitglieder der AALP Gruppe (H-Like), wozu in Gerste die seneszenzassoziierte **HvPAP12** gehört, eine Lokalisationssequenz für die Vakuole (Tabelle 2) (Richau *et al.* 2012; Diaz-Mendoza *et al.* 2014). Für AtALEU aus der gleichen Gruppe in Arabidopsis konnte gezeigt werden, dass die Sortierung in die Vakuole über Clathrin-umhüllte Vesikel in Abhängigkeit von der Bindung der Lokalisationssequenz an den AtELP Rezeptor erfolgt (Ahmed *et al.* 2000). Allerdings wurden auch Mitglieder anderer Gruppen, die keine bekannte Lokalisationssequenz für die Vakuole besitzen, in der Vakuole identifiziert.

Für AtRD21 der RD21A Gruppe (L-like D) aus Arabidopsis konnte gezeigt werden, dass das Protein posttranslational über das Golgi-Netzwerk in die Vakuole transportiert wird und erst dort proteolytisch aktiv ist (Yamada *et al.* 2001; Carter 2004; Gu *et al.* 2012). Zusätzlich konnte AtRD21 in Proteomstudien in den Chloroplasten nachgewiesen werden (Kleffmann *et al.* 2004; Peltier *et al.* 2004). *AtRD21* ist wie die orthologen Gene aus derselben Gruppe in Gerste, **HvPAP6**, **HvPAP7** und **HvPAP8**, ebenfalls seneszenzassoziiert (Tabelle 2), wird aber auch als Reaktion auf unterschiedliche abiotische und biotischen Stressfaktoren verstärkt exprimiert (Yamada *et al.* 2001; Gu *et al.* 2012).

Neben einem Signalpeptid haben die meisten Proteasen der CEP1-Gruppe (L-like B) ein C-terminales ER-Rückhaltesignal ([K/H/T]DEL) (Munro & Pelham 1987; Napier *et al.* 1992; Gomord *et al.* 1999). In Gerste haben von den vier Mitgliedern dieser Gruppe nur zwei (**HvPAP9** und **HvPAP14**) ein solches ER-Rückhaltesignal, wobei nur **HvPAP14** während der Blattseneszenz verstärkt exprimiert wird (Tabelle 2). Proteine mit einem solchen ER-Rückhaltesignal gelangen in der Regel über ein N-terminales Signalpeptid cotranslational in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums und können von dort posttranslational in die Zisternen der *cis*-Seite des Golgi-Netzwerks transportiert werden (Montesinos *et al.* 2014). Dort werden sie von ERD2-KDEL Rezeptoren gebunden und mit der Hilfe von Vesikeln mit dem Mantel-Protein-Komplex I (COPI, coat protein complex II) in das Endoplasmatische Retikulum

zurück transportiert (Pagny *et al.* 1999; Capitani & Salles 2009). Dieser Kreislauf kann durch Abspaltung des Rückhaltesignals unterbrochen werden (Okamoto *et al.* 2000).

Es wurden allerdings auch alternative Wege von Papain-ähnlichen Cysteinproteasen mit einer C-terminalen KDEL Sequenz beschrieben. SH-EP aus Mungobohne (*Vigna radiata* (L.) R.Wilczek) und die orthologe Protease aus Gartenbohne EP-C1 werden durch sogenannte KDEL-Vesikel (KV) vom Endoplasmatischen Retikulum in die Vakuole transportiert (Toyooka *et al.* 2000; Minamikawa *et al.* 2001; Okamoto 2003). In diesen Transportweg ist das Golgi-Netzwerk nicht involviert. Es wird angenommen, dass die KDEL Sequenz an der Bildung der KV beteiligt ist (Okamoto 2003). RcCysEP aus Wunderbaum (*Ricinus communis* L.) und SICysEP, die orthologe Protease aus Tomate (*Solanum lycopersicum* L.), werden ebenfalls in Vesikeln, den Ricinosomen, aus dem Endoplasmatischen Retikulum in das Cytoplasma transportiert (Mollenhauer & Totten 1970; Gietl & Schmid 2001; Schmid *et al.* 2001; Senatore *et al.* 2008). Im Gegensatz zu den KV transportieren die Ricinosomen die Protease nicht zur Vakuole, sondern ins Cytosol. Während der letzten Phase des pflanzlichen Zelltods kollabiert die Vakuole, wodurch der pH-Wert des Cytoplasmas sinkt. Durch den sauren pH-Wert werden die Ricinosomen zerstört und die Protease durch Abspaltung der inhibitorischen Prodomäne aktiviert (Schmid *et al.* 2001; Senatore *et al.* 2008; Lopez-Fernandez & Maldonado 2013).

Eine der zu RcCysEP orthologen Proteasen in Arabidopsis, AtCEP2, akkumuliert ebenfalls in Vesikeln, die aus dem Endoplasmatischen Retikulum stammen. Dies geschieht allerdings in zwei unterschiedlichen Formen, zum einen in Ricinosomen-ähnlichen Vesikeln als auch in länglichen spindelförmigen Vesikeln, den sogenannten *ER-bodies* (Yamada *et al.* 2011; Hierl *et al.* 2014). Diese *ER-bodies* wurden bisher nur in Kreuzblütlern beobachtet und spielen vermutlich eine Rolle in der Pathogenabwehr.

Nach oder eventuell auch während des Transports in das jeweilige Zielkompartiment werden die Papain-ähnlichen Cysteinproteasen durch eine pH-abhängige Abspaltung der Prodomäne aktiviert (Taylor *et al.* 1995; Schmid *et al.* 2001; Wiederanders *et al.* 2003). Interessant ist dabei ein eventueller Zusammenhang zwischen dem pH-Wert in dem jeweiligen Kompartiment und dem optimalen pH-Wert für die Aktivierung der Protease.

Die verschiedenen Kompartimente einer Zelle weisen zum Teil unterschiedliche und zum Teil auch sich verändernde pH-Werte auf. Die Regulation und Homöostase dieser pH-Werte ist dabei entscheidend für die Funktionalität der Kompartimente und der Zelle (Casey *et al.* 2010; Järvi *et al.* 2012). Abbildung 2 gibt eine grobe Übersicht über die pH-Werte in den einzelnen Kompartimenten der Zelle in Arabidopsis (Kramer *et al.* 1999; Järvi *et al.* 2012; Shen *et al.* 2014).

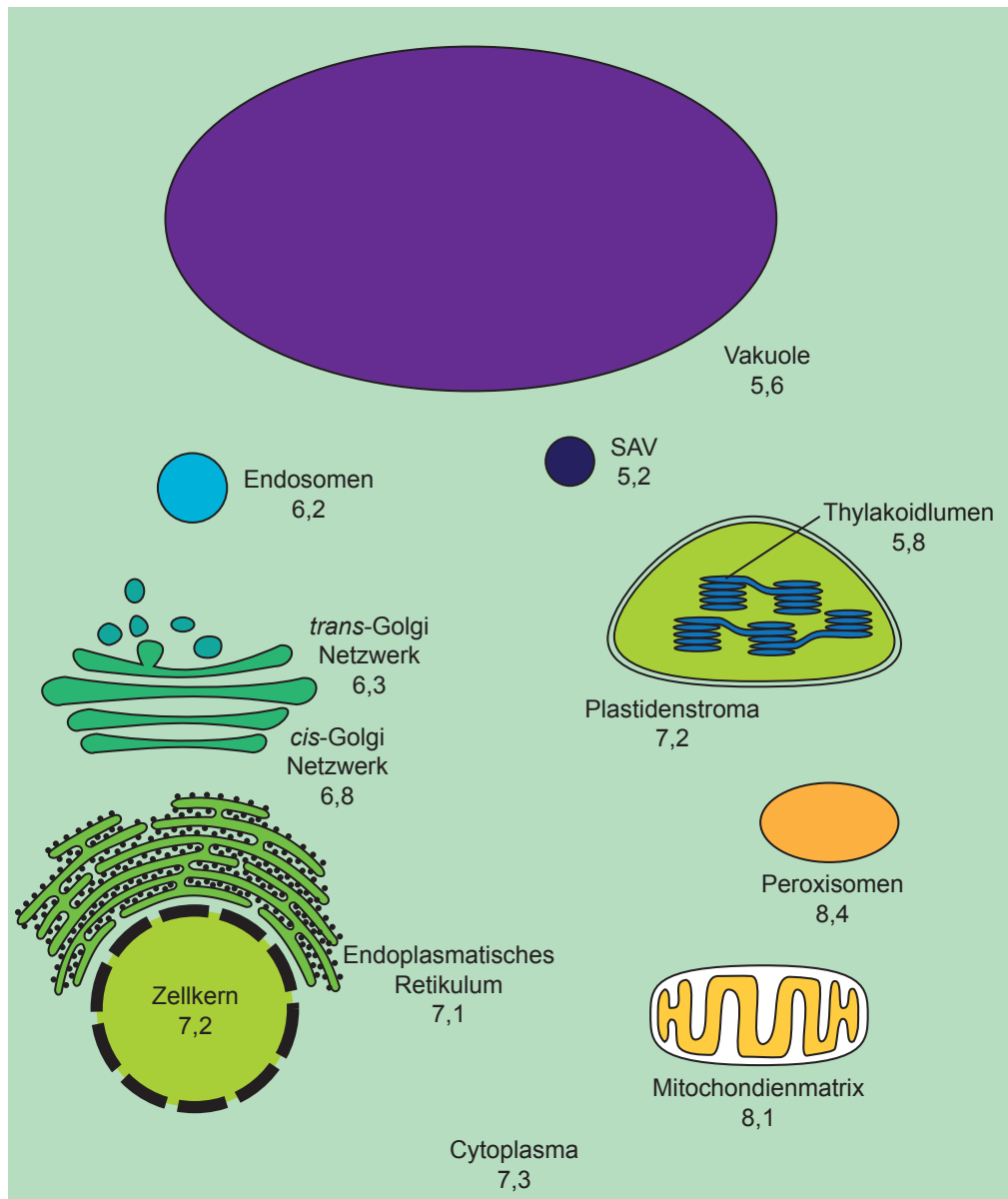


Abbildung 2. pH-Werte der intrazellulären Kompartimente einer Zelle aus Arabidopsis. Ähnliche pH-Werte sind ähnlich gefärbt. Die Abbildung ist verändert nach Shen *et al.*, 2014 und ergänzt mit Daten aus Otegui *et al.*, 2005.

Einzelne Mitglieder der verschiedenen Gruppen der Papain-ähnlichen Cysteinproteasen werden ebenfalls zum Teil in unterschiedlichen pH-Bereichen aktiviert

(Schmid *et al.* 2001; Senatore *et al.* 2008; Richau *et al.* 2012). Durch eine aktivitätsabhängige Fluoreszenzmarkierung konnten in Arabidopsis Mitglieder der RD21A Gruppe (L-like D) sowie der CTB3 Gruppe (B-like) bei jedem getesteten pH-Wert (pH 3 - 10) markiert werden. Mitglieder der XCP2 Gruppe (L-like C, L-like D) (pH 6 - 9) und der AALP Gruppe (H-like) (pH 6 - 8) konnten nur im nahezu neutralen Bereich markiert werden. Hingegen wurde ein Mitglied der TH11 Gruppe (L-like E) nur im basischen Bereich (pH 7 - 10) markiert. Lediglich die Proteasen der CEP1-Gruppe (L-like B) und der RD19A Gruppe (F-like) wurden im sauren Bereich (pH 4 - 6,5) aktiviert.

Neben dem sauren Milieu der Vakuole, in dem der größte Teil der proteolytischen Aktivität der Cysteinproteasen identifiziert wurde, gibt es demnach noch weitere Kompartimente, deren pH-Werte die Aktivierung einiger Cysteinproteasen zumindest ermöglichen (Wittenbach *et al.* 1982; Richau *et al.* 2012). Allerdings muss bei Rückschlüssen vom pH-Wert des jeweiligen Kompartiments auf die tatsächliche Lokalisation der proteolytischen Aktivität der Protease beachtet werden, dass der spezifische pH-Wert zum Teil nur für die Aktivierung und nicht für die Aktivität notwendig ist. So konnte für die AtCEP2 Protease der CEP1-Gruppe (L-like B) eine optimale Aktivierung zwischen pH-Wert 4 und 5, aber eine vom pH-Wert unabhängige Aktivität im gesamten getesteten Bereich zwischen pH-Wert 4 und 8 gezeigt werden (Hierl *et al.* 2014).

3.5 Zielsetzung

Während der Blattseneszenz werden Nährstoffe aus den Blättern remobilisiert, um sie für den Aufbau neuer Organe bereitzustellen. Dies geschieht zum größten Teil durch den Abbau von Proteinen aus den Chloroplasten. Aus Arbeiten in Gerste, Weizen und Arabidopsis ist bekannt, dass diese Prozesse unter anderem durch Transkriptionsfaktoren reguliert werden. Außerdem wurde festgestellt, dass verschiedene Proteasen, insbesondere Cysteinproteasen, an den Abbauprozessen während der Blattseneszenz beteiligt sind.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll der Abbau der Chloroplastenproteine in Gerste untersucht werden. Dabei sollen die regulatorisch wirkenden Transkriptionsfaktoren und die Proteasen, die maßgeblich an diesem Prozess beteiligt sind, identifiziert werden.

Um einen möglichst engen agronomischen Bezug herzustellen, werden zur Aufklärung dieser Fragen Gerstenpflanzen der Hochleistungssorte Lomerit untersucht, welche unter Gabe unterschiedlicher Stickstoffmengen im Feld angezogen werden. Zunächst soll in Fahnenblättern dieser Pflanzen der Verlauf der Abbauprozesse während der Blattseneszenz charakterisiert werden. Hierzu werden die Veränderungen in der Proteinzusammensetzung als auch der Ultrastruktur der Chloroplasten analysiert. Im nächsten Schritt sollen unter Verwendung von Microarrays Transkriptionsfaktoren und Proteasen identifiziert werden, die während der Seneszenz besonders stark exprimiert sind. Mit Hilfe eines spezifischen Verfahrens, das die Verwendung eines modifizierten Cysteinproteaseinhibitors (DCG-04) einschließt, sollen außerdem Cysteinproteasen identifiziert werden, die während der Seneszenz enzymatisch aktiv sind. Von besonderem Interesse wären hier Cysteinproteasen, die während der Seneszenz stark exprimiert und auch proteolytisch aktiv sind.

Zur weiteren molekularbiologischen Analyse einer solchen Cysteinprotease sollen im nächsten Schritt Antikörper hergestellt werden, mit deren Hilfe die Proteinmenge und die subzelluläre Lokalisation während der Prozessierung zum aktiven Protein verfolgt werden kann.

4 Veröffentlichungen

4.1 Arbeit I

An alternative strategy of dismantling of the chloroplasts during leaf senescence observed in a high-yield variety of barley

Karin Krupinska, Maria Mulisch, Julien Hollmann, Krzysztof Tokarz, Wiebke Zschiesche, Henning Kage, Klaus Humbeck und Wolfgang Bilger

Die Veränderungen in der Funktion und Zusammensetzung der Photosyntheseapparate und in der Struktur der Chloroplasten während der Blattseneszenz wurden in Mesophyllzellen aus Fahnenblättern der Gerste analysiert. Hierfür wurden Pflanzen der Hochleistungssorte *Hordeum vulgare* L. cv. Lomerit verwendet, die in zwei aufeinanderfolgenden Jahren im Feld unter agronomischen Bedingungen angebaut worden sind. Der Entwicklungsstand der Pflanzen wurde durch die charakteristische Abnahme des Chlorophyllgehalts während der Blattseneszenz und den parallelen Anstieg des Trockengewichts der Ähren bestimmt.

Im Gegensatz zu Ergebnissen einer vorangegangenen Studie an der älteren Gerstensorte Carina war die Photosystem II Effizienz (F_v/F_m) in der Sorte Lomerit bis zu einem sehr späten Zeitpunkt während der Blattseneszenz vergleichsweise stabil. Des Weiteren ergaben Messungen der Chlorophyll a Fluoreszenz und der Absorption von P700, dass die Aktivität der Photosysteme I und II parallel abnahmen.

Zu einem späten Zeitpunkt während der Blattseneszenz kam es außerdem zu einem Anstieg des Chlorophyll a/b-Verhältnisses. Der größte Anteil an Chlorophyll b ist mit dem Lichtsammelkomplex II (LHCII) assoziiert. Dementsprechend konnte gleichzeitig mit dem Anstieg des Chlorophyll a/b-Verhältnisses eine vergleichsweise frühe Abnahme der Proteinmenge von LHCB1 beobachtet werden. LHCB1 ist das abundanteste Apoprotein des LHCII. Zusätzlich zu LHCB1 nahmen parallel die Proteinmengen von D1, Cytochrom b_{559} und PSBO des Photosystems II ab. Aufgrund der Lokalisation des Photosystems II und des LHCII, hauptsächlich in den aufeinandergestapelten Granathylakoiden (Abbildung 1), deuten diese Ergebnisse einen frühen Abbau der Granathylakoide während der Blattseneszenz in der Sorte Lomerit an. Im Gegensatz dazu wurde bisher für die meisten anderen Gerstensorten und Arten ein stabiles oder abnehmendes Chlorophyll a/b-Verhältnis, eine lange gleichbleibende

Proteinmenge von LHCB1 sowie eine längere Stabilität der Granathylakoide während der Seneszenz beschrieben.

Ein Vergleich der Ultrastruktur von Chloroplasten und Gerontoplasten der Sorten Lomerit und Carina bestätigte die Unterschiede im Abbau der Thylakoide während der Blattseneszenz (Abbildung 3). In der Sorte Lomerit wiesen die Gerontoplasten längliche, einzelne oder paarweise Thylakoide und keine Granastapel auf (Typ 2). Im Vergleich dazu konnte in Gerontoplasten der Gerstensorte Carina der typische Aufbau der Gerontoplasten aus lockeren Granastapel und nur wenigen Stromathylakoiden gezeigt werden (Typ 1).

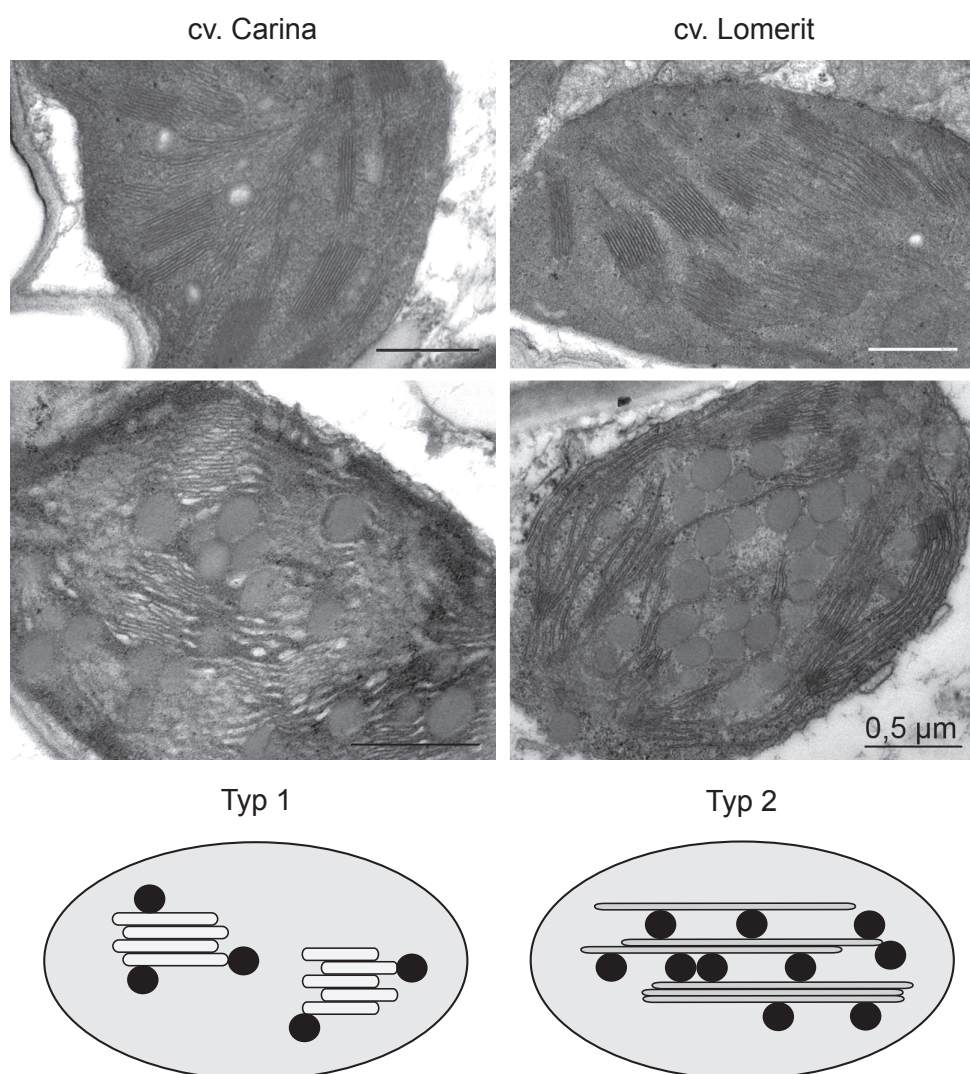


Abbildung 3. Ultrastrukturanalysen von Chloroplasten (oben) und Gerontoplasten (mitte) in Mesophyllzellen der Gerstensorten Carina (Typ 1) und Lomerit (Typ 2). Die Unterschiede in der Ultrastruktur der Gerontoplasten sind als Modell dargestellt. Der angegebene Maßstab entspricht 0,5 µm. Die Abbildung wurde aus **Arbeit II** entnommen.

Eventuell ist in der Sorte Lomerit der frühe Abbau der Granathylakoide mit dem Großteil des LHCII und des Photosystems II eine Möglichkeit, das Risiko für Photoinhibition zu verringern. Zusätzlich bleibt durch einen längeren Erhalt der Stromathylakoide auch die ATP-Synthase länger erhalten und kann so eventuell länger Adenosintri-phosphat (ATP) über die zyklische Photophosphorylierung für ATP-abhängige Seneszenzprozesse bereitstellen. Der alternative Abbauweg der Chloroplasten in der Sorte Lomerit könnte mitverantwortlich für den hohen Ertrag dieser Gerstensorte sein.

4.2 Arbeit II

Identification of predominant genes involved in regulation and execution of senescence-associated nitrogen remobilization in flag leaves of field grown barley

Julien Hollmann, Per L. Gregersen und Karin Krupinska

Zur Identifikation von Genen, die eine Rolle in der Stickstoffremobilisierung während der Blattseneszenz unter agronomischen Bedingungen spielen, wurde die Genexpression in Fahnenblättern der Gerste in unterschiedlich mit Stickstoff gedüngten Pflanzen in zwei aufeinander folgenden Jahren verglichen. Dazu wurden Pflanzen im Feld angezogen und mit einer in der Landwirtschaft üblichen Standardmenge Stickstoff (SN) oder mit Stickstoff im Überschuss (HN) gedüngt. Der Stickstoffüberschuss führte in den Fahnenblättern der HN-Pflanzen zu einem deutlich verzögerten Chlorophyllabbau. Obwohl die Seneszenzprozesse in SN-Pflanzen somit deutlich früher einsetzten, konnte kein Unterschied in der Kornfüllung zwischen HN- und SN-Pflanzen festgestellt werden. Die SN-Pflanzen konnten demnach die geringere insgesamt zur Verfügung stehende Stickstoffmenge durch Remobilisierung aus den Blättern ausgleichen. Aus diesem Grund konnten durch den Vergleich der Genexpressionsänderungen in Fahnenblättern von SN- und HN-Pflanzen während der Seneszenz stickstoffabhängig aufregulierte Gene von anderen aufregulierten Genen unterschieden werden.

Die nur in SN verstärkt exprimierten Gene übernehmen somit wahrscheinlich eine Rolle in der Stickstoffremobilisierung. Hingegen sind die in SN und HN aufregulierten

Gene in allgemeine Prozesse während der späten Blattentwicklung oder in die Remobilisierung von Nährstoffen, außer Stickstoff, involviert.

Mittels Microarray-Analyse wurden im ersten Jahr 376 stickstoffabhängig verstärkt exprimierte Gene identifiziert. Von diesen kodieren 29 für Proteine, die eine potentielle Funktion im Proteinabbau haben und 13 für Transkriptionsfaktoren. Entwicklungsabhängig verstärkt exprimiert waren insgesamt 93 Gene, die für 13 Proteine mit einer Funktion im Proteinabbau und für fünf Transkriptionsfaktoren kodieren.

Die Genexpressionsanalyse von ausgewählten aufregulierten Genen des ersten Jahres wurden mittels quantitativer *Real-Time* PCR (qRT-PCR) in Proben aus dem zweiten Jahr an zusätzlichen Zeitpunkten bestätigt. Dabei waren während der Blattseneszenz stickstoffabhängige Gene verstärkt exprimiert, die für den Transkriptionsfaktor HvNAC026, die Serinprotease SCPL51 und zwei Gene der Autophagiemaschinerie, APG7 und ATG18F kodieren.

Entwicklungsabhängig aufreguliert waren Gene, die für die Transkriptionsfaktoren HvNAC001, HvNAC005, HvNAC013, HvWRKY12, einen MYB-Transkriptionsfaktor, sowie für eine Subtilase und zwei Cysteinproteasen, HvPAP14 und HvPAP20 kodieren. Interessanterweise war *HvPAP14* unabhängig von der Stickstoffdüngung eines der am stärksten aufregulierten Gene der Genexpressionsanalysen.

4.3 Arbeit III

The senescence upregulated gene *HvPAP14* encodes a cysteine protease associated to thylakoid membranes after activation

Julien Hollmann, Susann Frank, Maria Mulisch, Andrea Matros, Cristian Carrión, Hans-Peter Mock, Karin Krupinska

Die Blattseneszenz wird durch einen massiven Abbau der Chloroplastenproteine innerhalb und außerhalb der Organelle charakterisiert. Bisher konnten allerdings nur wenige seneszenzassoziierte Proteasen in den Chloroplasten identifiziert werden. Mit Hilfe von DCG-04, einem biotinylierten Derivat des Cysteinproteaseinhibitors E64, konnte die Cysteinprotease HvPAP14 aus seneszenten Gerstenblättern isoliert und mittels anschließender Massenspektrometrie identifiziert werden. HvPAP14 ist eine Papain-ähnliche Cysteinprotease der CEP1-Gruppe, die als Präproenzyme kodiert sind und in der Regel erst durch mehrere Prozessierungsschritte proteolytisch

aktiviert werden. Rekombinantes HvPAP14, das in Fusion mit einem Maltose-bindenden Protein in *Escherichia coli* überexprimiert wurde, konnte bei einem niedrigen pH-Wert von 4 - 5 aktiviert werden. Nach der Aktivierung war die Aktivität pH-Wert unabhängig.

Durch ein N-terminales Signalpeptid wird HvPAP14 ins Endoplasmatische Retikulum (ER) synthetisiert, das es aufgrund eines C-terminalen ER-Rückhaltesignals wahrscheinlich erst nach dessen Abspaltung verlassen kann. Durch eine transiente Transformation von Gerstenprotoplasten mit einem *HvPAP14:RFP* (*red fluorescing protein*) Fusionskonstrukt konnte das Protein im Cytoplasma in netzartigen Strukturen ähnlich dem ER und in kleinen runden Strukturen detektiert werden. Zur weiteren Analyse wurden zwei Antikörper hergestellt, mit denen die unterschiedlichen Formen des Proteins detektiert werden können.

Western Blot Analysen zeigten, dass die inaktive Proform mit ER-Rückhaltesignal in Fahnenblättern akkumuliert, während parallel der Chlorophyllgehalt abnimmt. Gleichzeitig blieb allerdings die Proteinmenge der Proform ohne ER-Rückhaltesignal und der potentiell aktiven Form konstant.

Durch Immunogoldmarkierungen konnte gezeigt werden, dass die Proformen von HvPAP14 in *Microbodies* und in Chloroplasten lokalisiert sind, was auf eine duale Lokalisierung des Proteins hindeutet.

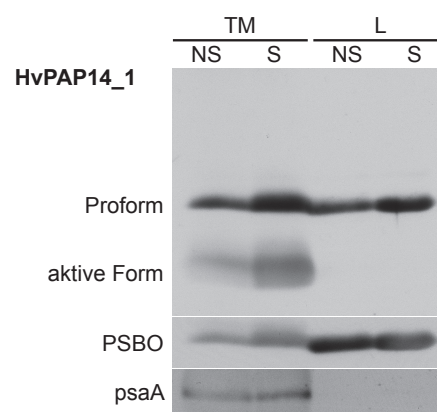


Abbildung 4. Lokalisation der Proform ohne ER-Rückhaltesignal und der potentiell aktiven Form von HvPAP14 in den Thylakoiden. Als Kontrolle für die Reinheit der Fraktionierung sind die Proteine PSBO und PsaA gezeigt. TM: Thylakoidmembranfraktion, L: Lumen, NS: nicht seneszent, S: seneszent. Die Abbildung wurde aus **Arbeit III** entnommen.

In Chloroplastenfraktionen wurde durch eine *Western Blot* Analyse die inaktive Proform in der Thylakoidmembranfraktion und im Lumen nachgewiesen (Abbildung 4).

Im Gegensatz dazu konnte die potentiell aktive Form von HvPAP14 nur in der Thylakoidmembranfraktion detektiert werden. Immunogoldanalysen konnten zusätzlich eine feste Bindung der aktiven Form an die Thylakoidmembran zeigen. Die unterschiedliche Lokalisation der inaktiven Proform und der aktiven Form weisen darauf hin, dass die inhibitorische Domäne an der luminalen Seite der Thylakoidmembran abgespalten wird und das Protein so durch den sauren pH-Wert des Lumens aktiviert werden könnte. Aufgrund der festen Bindung der aktiven Form an die Thylakoidmembran scheint das Substrat von HvPAP14 ein Thylakoidmembranprotein zu sein.

5 Zusammenfassende Diskussion

Zuchtprogramme für Getreidepflanzen und agronomische Verbesserungen im Anbau haben in den letzten 50 Jahren zu einer weltweiten Steigerung der Getreideproduktion um 3,7% jährlich geführt. Allerdings haben Hochrechnungen bis zum Jahr 2050 ergeben, dass zukünftig eine jährliche Steigerungsrate von mindestens 5% pro Jahr notwendig ist, um die wachsende Weltbevölkerung ernähren zu können (Alston *et al.* 2009; Godfray *et al.* 2010; Tester & Langridge 2010). Eine entsprechende Steigerung der Getreideproduktion wird erschwert durch weitreichende weltweite Veränderungen im Klima, weniger Ackerflächen und zunehmende Wasserknappheit in bestimmten Gebieten. Zusätzlich ist die Herstellung und der Einsatz von Düngemitteln mit einem steigenden Kostenaufwand und negativen Auswirkungen auf die Umwelt verbunden (Kant *et al.* 2011).

Getreidepflanzen können wie alle Höheren Pflanzen ihren Standort nicht wechseln, ihnen steht somit nur eine begrenzte Menge an Nährstoffen zur Verfügung. In Anpassung an die begrenzten Ressourcen sind in Pflanzen Mechanismen entstanden, die es ihnen ermöglichen, die zur Verfügung stehenden Nährstoffe möglichst effektiv auszunutzen. So haben in Gerste die während der Seneszenz remobilisierten Nährstoffe den größten Anteil an der Kornfüllung (Hirel *et al.* 2007). Studien an Gerste und anderen Pflanzen wie Weizen und Reis konnten einen Zusammenhang zwischen der Seneszenz und der Zusammensetzung sowie der Menge des Ertrags herstellen (Uauy *et al.* 2006; Heidlebaugh *et al.* 2008; Jukanti & Fischer 2008; Gregersen *et al.* 2013). Allerdings ist bisher nur ein Teil der Regulation der einzelnen Seneszenzprozesse aufgeklärt.

Vor dem Hintergrund des Nahrungsmittelbedarfs einer wachsenden Weltbevölkerung sowie hoher Kosten für Düngemittel ist ein genaues Verständnis der Seneszenzprozesse besonders unter landwirtschaftlichen Gesichtspunkten von Interesse (Tilman *et al.* 2002; Glass 2003; Schaffnit-Chatterjee 2009; Masclaux-Daubresse *et al.* 2010; Distelfeld *et al.* 2014). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Seneszenz in einer modernen Hochleistungssorte der Gerste untersucht (**Arbeit I**, Kapitel 5.1). Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden im Anschluss mögliche weitere Bestandteile der Abbauprozesse wie Proteasen und Transkriptionsfaktoren durch eine Expressionsstudie identifiziert (**Arbeit II**, Kapitel 5.2). Für eine dieser Proteasen, HvPAP14, konnte gezeigt werden, dass sie während der Seneszenz katalytisch aktiv

ist. Zusätzlich wurde die Lokalisation von HvPAP14 in der Zelle untersucht (**Arbeit III**, Kapitel 5.3).

5.1 Alternative Strategien zum Abbau der Chloroplastenproteine bei einer Hochleistungssorte der Gerste während der Seneszenz

Der größte Teil der während der Blattseneszenz remobilisierten Nährstoffe stammt aus den Chloroplasten (Peoples & Dalling 1988; Feller *et al.* 2008). In **Arbeit I** konnte gezeigt werden, dass in unterschiedlichen Gerstensorten alternative Abbauwege der Chloroplasten existieren.

Moderne Hochleistungssorten sind über Jahre hinweg für einen erhöhten Ertrag und für eine verringerte Anfälligkeit gegenüber Umweltfaktoren optimiert worden. Für nahezu alle bisher durchgeführten Seneszenzstudien an Gerste wurden allerdings Sorten verwendet, die nicht mehr oder noch nie landwirtschaftlich genutzt wurden (Humbeck *et al.* 1996; Miersch *et al.* 2000; Parrott *et al.* 2005; Springer *et al.* 2015). Zusätzlich wurden bisher die meisten Studien dieser Art unter standardisierten Bedingungen in Klimakammern oder im Gewächshaus durchgeführt. Um einen möglichst engen agronomischen Bezug zu erreichen, wurde hingegen in der vorliegenden Arbeit die moderne Hochleistungssorte Lomerit (Bundessortenamt 2016) im Feld angebaut und mit der älteren Sorte Carina, die in einem vorherigen Feldversuch angebaut worden war (Humbeck *et al.* 1996), verglichen.

In Getreidepflanzen wie Gerste oder Weizen beginnt die Remobilisierung von Nährstoffen in den unteren älteren Blättern, wodurch deren Nährstoffe den darüber liegenden jüngeren Blättern zur Verfügung gestellt werden (Wiedemuth *et al.* 2005). Remobilisierte Nährstoffe aus dem obersten Blatt, dem Fahnenblatt, werden direkt über das Phloem oder indirekt über die Spelzen und über die Wurzeln den sich entwickelnden Körnern zur Verfügung gestellt (Simpson *et al.* 1983; Lopes *et al.* 2006; Feller *et al.* 2008; Kohl *et al.* 2015; Egle *et al.* 2015). Die Blattseneszenz der Fahnenblätter ist somit am engsten mit der Versorgung der sich entwickelnden Körner verbunden (Stoy 1973; Stamp & Herzog 1976; Masclaux-Daubresse *et al.* 2008; Gonzalez *et al.* 2010). In **Arbeit I** wurde dieser Zusammenhang indirekt anhand des ansteigenden Trockengewichts der Ähren und des abnehmenden Chlorophyllgehalts in

den Fahnenblättern während der Seneszenz beobachtet. Der abnehmende Chlorophyllgehalt repräsentiert dabei den Abbau der Bestandteile der Thylakoide in den Chloroplasten und stellt somit einen leicht messbaren Wert für den Fortschritt der Seneszenz dar (vgl. Kapitel 3.2) (Humbeck *et al.* 1996). Der Chlorophyllgehalt setzt sich aus dem Gehalt der Chlorophylle a und b zusammen. In den meisten bisherigen Analysen, beispielsweise der Gerstensorten Trixi oder Carina (nicht veröffentlichte Daten aus Humbeck *et al.* 1994; 1996), nimmt das Verhältnis von Chlorophyll a/b während der Blattseneszenz ab (vgl. Kapitel 3.2). Im Gegensatz dazu konnte bei der hier untersuchten Gerstensorte Lomerit ein deutlicher Anstieg des Chlorophyll a/b-Verhältnisses während der Blattseneszenz gemessen werden. In einer anderen Studie konnte an der Gerstensorte Akcent ebenfalls eine, wenn auch wesentlich geringere, Steigerung des Chlorophyll a/b-Verhältnisses gemessen werden (Špundová *et al.* 2003). Während der Blattseneszenz der Sonnenblume (Agüera *et al.* 2010) und der Amerikanischen Platane (*Platanus occidentalis* L.) (Adams *et al.* 1990) wurde hingegen keine Änderung im Chlorophyll a/b-Verhältnis gemessen. Die Unterschiede im Abbau von Chlorophyll a und b zwischen der Sorte Lomerit und den anderen Arten und Sorten weisen auf Unterschiede im zeitlichen Ablauf des Abbaus der Grana- und Stromathylakoide hin. So sind die Chlorophylle a und b unterschiedlich auf die Photosysteme verteilt, die wiederum unterschiedlich in den Grana- und Stromathylakoiden verteilt sind (laterale Heterogenität, Abbildung 1) (Anderson 1999). Der Großteil an Chlorophyll b ist dabei mit den Lichtsammelkomplexen des Photosystems II (LHCII) assoziiert, die in den Granathylakoiden lokalisiert sind (Andersson & Anderson 1980; Melis 1991). Der Anstieg des Chlorophyll a/b-Verhältnisses in der Sorte Lomerit deutet somit auf einen bevorzugten Abbau der Granathylakoide hin. Im Gegensatz dazu wurde in den meisten Studien zum Abbau der Chloroplasten ein früher Abbau der Stromathylakoide beschrieben, der in einer Abnahme des Chlorophyll a/b-Verhältnisses resultiert (Wolf 1956; Kura-Hotta *et al.* 1987).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Proteinmenge von LHCB1, dem abundantesten Apoprotein des LHCII, parallel mit den Proteinen D1, Cytochrom b_{559} und PSBO des Photosystems II abnimmt. Die Abnahme der Proteinmenge von LHCB1 ist eventuell auf die deutlich verringerte Transkriptmenge von *LHCB1* während der Blattseneszenz zurückzuführen. Im Unterschied zu der Sorte Lomerit waren in Studien an der Gerstensorte Carina, an Reis und an der Gartenbohne die Apoproteine

des LHCII während der Blattseneszenz länger stabil und konnten noch bis zu einem späten Zeitpunkt immunologisch detektiert werden (Roberts *et al.* 1987; Hidema *et al.* 1992; Humbeck *et al.* 1996). In Reisblättern konnte die stabile LHCII Proteinmenge während der Seneszenz auf einen geringen *turnover* der Apoproteine zurückgeführt werden (Hidema *et al.* 1992).

Zur Überprüfung der Hinweise auf einen Abbau der Granathylakoide vor den Stromathylakoiden in der Sorte Lomerit wurden Aufnahmen der Ultrastruktur von Gerontoplasten der Sorten Lomerit und Carina verglichen. Wie bereits erwähnt wurde in Carina im Gegensatz zu Lomerit, die typische Abnahme des Chlorophyll a/b-Verhältnisses während der Seneszenz beobachtet (nicht veröffentlichte Daten aus Humbeck *et al.*, 1996). Entsprechend der Annahme, dass es sich um einen unterschiedlichen Abbau der Grana- und Stromathylakoide während der Blattseneszenz handelt, waren in seneszenten Chloroplasten, den Gerontoplasten, in der Sorte Carina erwartungsgemäß lockere Granastapel, aber kaum noch Stromathylakoide erkennbar (Hurkman 1979; Gepstein 1988; Krupinska 2006). Hingegen wurde in Gerontoplasten der Sorte Lomerit tatsächlich ein bevorzugter Abbau der Granathylakoide beobachtet.

In der bereits erwähnten Studie an der Gerstensorte Akcent wurde ebenfalls ein leichter Anstieg des Chlorophyll a/b-Verhältnisses während der Blattseneszenz beschrieben (Špundová *et al.* 2003). Zusätzlich wurde, ähnlich zu den Beobachtungen an Lomerit, durch Ultrastrukturaufnahmen auch ein bevorzugter Abbau der Granathylakoide gezeigt. Dies war allerdings nur der Fall während der Seneszenz in abgetrennten Blättern, die dauerhaft einer Beleuchtungsstärke von $90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ausgesetzt waren. In abgetrennten Blättern, die im gleichen Zeitraum in Dunkelheit gehalten wurden, konnten diese Effekte nicht beobachtet werden. Die Autoren schlugen deshalb vor, dass der beschriebene Effekt eventuell dazu beiträgt, photooxidative Schäden durch die konstante hohe Lichtintensität von $90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ zu verringern. Dies erscheint bei der verwendeten vergleichswisen niedrigen Lichtintensität allerdings als unwahrscheinlich, da es sich um eine Sorte handelt, die über viele Jahre im Freiland landwirtschaftlich genutzt wurde, und die Lichtintensitäten im Freiland mittags bis zu $2000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ erreichen können. Eventuell handelt es sich bei dem beschriebenen Effekt um eine spezielle Eigenschaft der Sorte Akcent, vergleichbar

zu der Situation in Lomerit. Der Verdacht auf eine ähnliche Abstammung der beiden Sorten, aus der dieser Effekt heraus resultieren könnte, bestätigte sich nicht. Soweit der Abstammungskatalog der Gerste in der Züchtungsgeschichte der beiden Sorten zurückreicht, gibt es keine Gemeinsamkeiten (LfL Bayern 2004).

Der frühzeitige Abbau des LHCII in der Sorte Lomerit im Vergleich zu anderen Gerstensorten wie Carina könnte in Zusammenhang mit der Entstehung von reaktivem Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) während der Seneszenz stehen und sich somit indirekt auf die Steuerung der Seneszenzprozesse auswirken.

In einer aktuellen Studie wurde die Entstehung von Singulett-Sauerstoff, Superoxid-Radikal-Anionen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in den Sorten Lomerit und Carina während der Blattseneszenz verglichen (Krieger-Liszkay *et al.* 2015). In Thylakoidmembranfraktionen, die jeweils aus Fahnenblättern einer der beiden Sorten isoliert worden sind, konnten Krieger-Liszkay und Mitautoren während der Seneszenz einen lichtabhängigen Anstieg der Menge an Superoxid-Radikal-Anionen und Wasserstoffperoxid messen. Gleichzeitig nahm die Singulett-Sauerstoffmenge in Lomerit ebenfalls zu, blieb aber in der Sorte Carina konstant (Krieger-Liszkay *et al.* 2015). Da Singulett-Sauerstoff entweder am Photosystem II oder an beschädigten LHCII entsteht und in der Sorte Lomerit speziell diese Komplexe deutlich früher von Abbauprozessen betroffen sind als in Carina (**Arbeit I**; Humbeck *et al.*, 1996), liegt ein Zusammenhang zwischen dem Anstieg der Singulett-Sauerstoffmenge und dem frühzeitigen Abbau dieser Komplexe in Lomerit nahe.

Als Hauptquelle für die vermehrte Singulett-Sauerstoffproduktion in der Sorte Lomerit vermuten Krieger-Liszkay und Mitautoren noch nicht vollständig abgebaute und beschädigte LHCII. Gegen eine erhöhte Singulett-Sauerstoffproduktion am Photosystem II spricht der bereits erwähnte frühzeitige parallele Abbau von LHCII und Photosystem II, der das Risiko einer Singulett-Sauerstoffproduktion durch Photoinhibition des Photosystems II verringert. Zusätzlich blieb die Effizienz von verbliebenem Photosystem II (F_v/F_m) während der Seneszenz stabil, was ebenfalls gegen eine verstärkte Photoinhibition spricht.

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Singulett-Sauerstoff spielen eine wichtige Rolle in der Induktion von SAGs (Buchanan-Wollaston *et al.* 2005) und in der Regulation verschiedener Seneszenzprozesse (Apel & Hirt 2004; Juvany *et al.* 2013). Allerdings

können sich dabei die verschiedenen ROS unterschiedlich auf die Seneszenz auswirken. In Arabidopsis konnte gezeigt werden, dass Singulett-Sauerstoff und Wasserstoffperoxid unterschiedliche Signalwege induzieren (Mullineaux & Baker 2010; Kim *et al.* 2012; Kim & Apel 2013). Krieger-Liszkay und Mitautoren vermuten daher, dass die verstärkte Singulett-Sauerstoffproduktion, ausgelöst durch beschädigte LHCII, eventuell als Signal oder Botenstoff für eine andere oder eine zusätzliche Remobilisierungsstrategie während der Seneszenz in Lomerit verantwortlich ist. Eine daraus resultierende Steigerung der Remobilisierungsrate könnte letztendlich zu dem vergleichsweise hohen Ertrag der Sorte Lomerit beitragen.

Neben dem frühzeitigen Abbau der Granathylakoide bleiben während der Blattseneszenz die Stromathylakoide in der Sorte Lomerit länger erhalten als in einigen anderen Sorten. Es bleibt also auch die ATP-Synthase in den Stromathylakoiden (Abbildung 1) länger erhalten.

Durch den längeren Erhalt der ATP-Synthase kann vermutlich länger Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) für die ATP-abhängigen Prozesse der Seneszenz bereitgestellt werden. In diesem Fall könnte der Bedarf der ATP-Synthase an Elektronen nicht über die reguläre lineare Photophosphorylierung, sondern durch die zyklische Photophosphorylierung gedeckt werden, in deren Ablauf nur das Photosystem I und nicht das Photosystem II involviert ist. Ein ähnlicher Vorgang läuft auch unter Stressbedingungen ab, bei denen die zyklische Photophosphorylierung ebenfalls aktiviert wird, um den erhöhten ATP-Bedarf zu decken (Rumeau *et al.* 2007).

Zusammenfassend scheint durch langjährige Züchtung in der Gerstensorte Lomerit ein alternativer Weg zum Abbau der Chloroplasten entstanden zu sein, der eine effizientere Remobilisierung während der Blattseneszenz und somit höhere Erträge ermöglicht. Dieser Effekt entsteht wahrscheinlich aus der Kombination mehrerer potentieller Vorteile des alternativen Abbauwegs. Erstens wird das Risiko für Photoinhibition durch den frühzeitigen parallelen Abbau von LHCII und Photosystem II vermindert. Zweitens kann die erhöhte Singulett-Sauerstoffproduktion als Signal agieren und andere oder zusätzliche Remobilisierungsprozesse in Gang setzen. Drittens kann durch den längeren Erhalt der Stromathylakoide länger Energie für ATP-abhängige Prozesse in der Seneszenz bereitgestellt werden.

5.2 Identifizierung von Genen, die in die Regulation und die Abbauprozesse der seneszenzassoziierten Stickstoffremobilisierung in Fahnenblättern der Gerste involviert sind

Stickstoff aus den Chloroplasten macht den größten Anteil an den remobilisierten Nährstoffen während der Seneszenz aus (Peoples & Dalling 1988; Feller *et al.* 2008). In **Arbeit I** wurden daher die Seneszenzprozesse in den Chloroplasten der Gerstensorte Lomerit charakterisiert. In **Arbeit II** wurden dann Gene identifiziert, die in dieser Sorte während der Blattseneszenz im Zusammenhang mit der Stickstoffremobilisierung stehen.

Um Gene zu identifizieren, die spezifisch in die Remobilisierung von Stickstoff involviert sind, wurden in **Arbeit II** die Änderungen der Genexpression in unterschiedlich stark mit Stickstoff gedüngten Feldern während der Seneszenz verglichen. In diesem Ansatz wurde ausgenutzt, dass die Seneszenz in Gerstenpflanzen maßgeblich von der Verfügbarkeit von Stickstoff abhängt (Martre *et al.* 2006). Bei optimaler Stickstoffversorgung wird das Blattwachstum gefördert und Seneszenzprozesse werden verzögert (Vos & van der Putten 1998; Diaz *et al.* 2005). Hingegen kommt es bei Stickstoffmangel zu einer Induktion und Beschleunigung der Seneszenzprozesse (Schulze *et al.* 1994; Lemaître *et al.* 2008). In **Arbeit II** wurden daher Felder verglichen, die entweder mit einer in der Landwirtschaft üblichen Standardmenge Stickstoff (SN) oder mit einem deutlichen Stickstoffüberschuss gedüngt (HN) worden sind. Erwartungsgemäß setzte dabei der Chlorophyllabbau, der die fortschreitenden Abbauprozesse repräsentiert (vgl. Kapitel 3.2), in den Fahnenblättern der SN-Pflanzen deutlich früher und zudem stärker ein als in denen der HN-Pflanzen (Abbildung 5a, c). Zusätzlich war die Lebensdauer und somit die Phase mit intensiver Photosynthese bei HN-Fahnenblättern deutlich länger als bei den SN-Blättern.

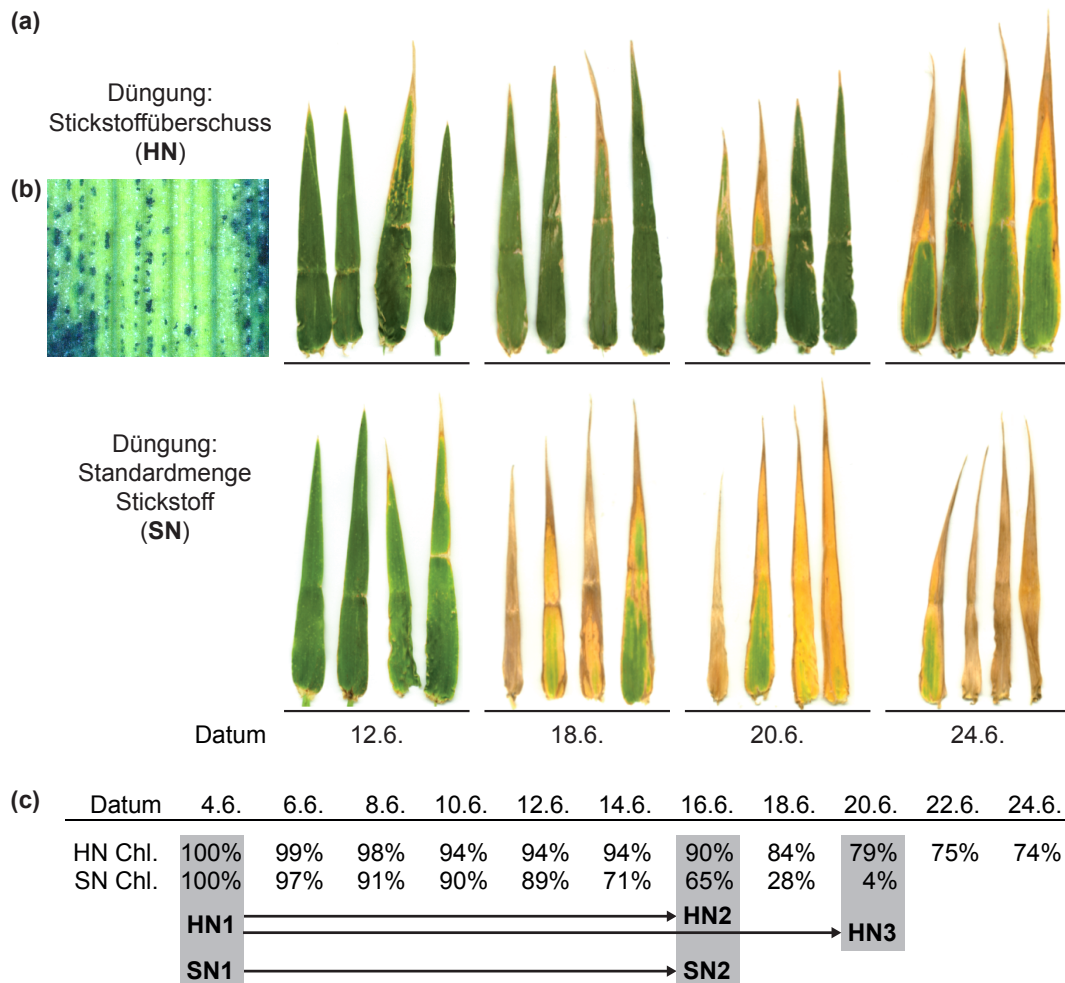


Abbildung 5. Charakterisierung der Fahnenblätter von Pflanzen, die mit Stickstoff im Überschuss (HN) oder mit einer Standardmenge Stickstoff (SN) gedüngt worden sind. **a** Aufnahmen repräsentativer Fahnenblätter von HN- und SN-Pflanzen (bereitgestellt von K. Krupinska). **b** Nachweis von abgestorbenen Zellen in einem HN-Fahnenblatt vom 20.6.2009 durch eine Färbung mit Evans-Blau (0,25% (w/v)) (bereitgestellt von C. Desel). **c** Relativer Chlorophyllgehalt der HN- und SN-Fahnenblätter in Prozent bezogen auf den 4.6.2009. Grau hinterlegt sind die Zeitpunkte, in denen die Genexpression mittels Microarray-Technologie analysiert wurde.

Auf die Kornfüllung hat sich allerdings weder die geringe Stickstoffdüngung noch die daraus resultierende kürzere Lebensdauer/Photosynthesephase der SN-Fahnenblätter limitierend ausgewirkt, da Unterschiede zwischen SN- und HN-Pflanzen im Trockengewicht der Ähren weder im Verlauf der Kornfüllung noch nach der Abreife festgestellt wurden. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass während der Kornfüllung in SN-Pflanzen die niedrigere insgesamt zur Verfügung stehende Stickstoffmenge durch Remobilisierung von Stickstoff aus den Blättern ausgeglichen wurde, was in HN-Pflanzen in dem Umfang nicht nötig war (Masclaux-Daubresse *et al.* 2010; Masclaux-Daubresse & Chardon 2011). Vielmehr deuten diese Ergebnisse

an, dass die Aufnahme von einem Überschuss Stickstoff und Photosyntheseprodukten durch eine Limitierung auf Seiten der *sink*, also der Nährstoffaufnahme durch die Körner, begrenzt ist (Bingham *et al.* 2007; Serrago *et al.* 2013) und so das Trockengewicht in HN nicht deutlich höher als in SN ausfällt.

Gene, die während der Seneszenz nur in SN-Blättern und nicht in HN-Blättern verstärkt exprimiert werden, stehen somit potentiell in einem Zusammenhang mit der Stickstoffremobilisierung (**Gruppe 1**). Mittels Microarray-Technologie konnten so 376 ausschließlich in SN-Blättern verstärkt exprimierte Gene identifiziert werden, wovon 13 Gene für Transkriptionsfaktoren kodieren und 29 für Proteine, die in Proteinabbauprozesse involviert sind (Abbildung 6).

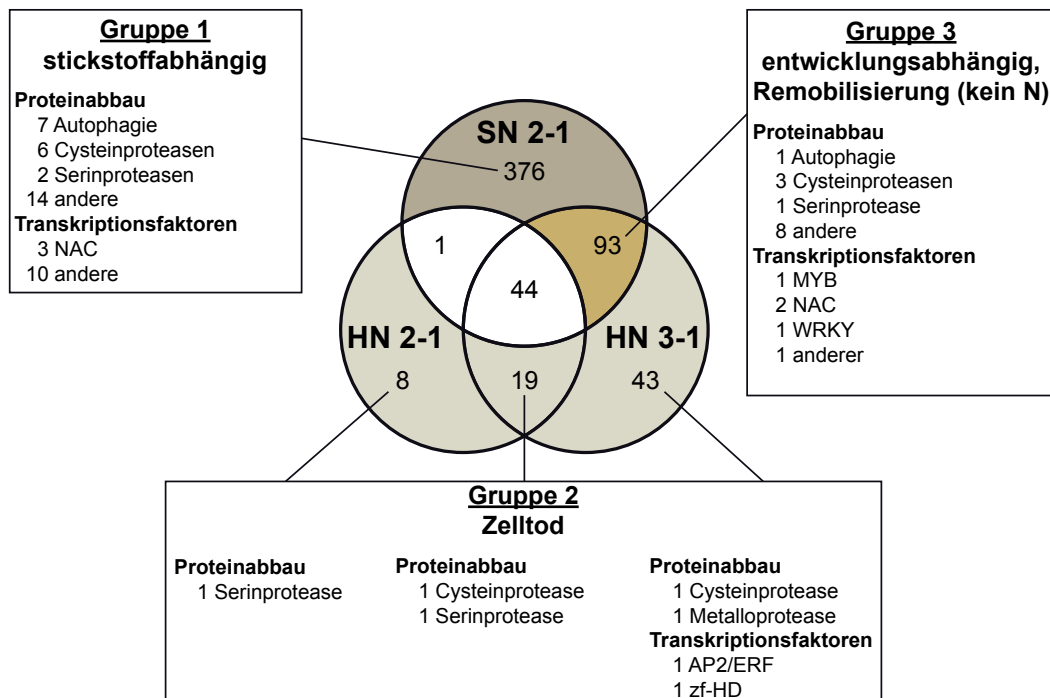


Abbildung 6. Während der Blattseneszenz in SN-Pflanzen und zu zwei Zeitpunkten in HN-Pflanzen aufregulierte Gene. Die jeweils verglichenen Zeitpunkte sind in Abbildung 5c angegeben. Es wurden nur Gene berücksichtigt, die in mindestens einem Vergleich mindestens 2-fach (\log_2) aufreguliert waren. N: Stickstoff.

In Abbildung 5a ist der deutlich verzögerte Chlorophyllabbau in HN-Pflanzen im Vergleich zu SN durch repräsentative Fahnenblätter des Feldversuchs abgebildet. Während der Durchführung des Feldversuchs war besonders an HN-Pflanzen auffällig, dass in den Fahnenblättern in Bereichen mit einem hohen Chlorophyllgehalt kleine braune Flecken zu erkennen waren. Mittels Evans-Blau-Färbung konnte nachgewiesen werden, dass die Zellen in diesen Bereichen abgestorben waren

(Abbildung 5b), da dieser Farbstoff nur in Zellen ohne intakte Plasmamembran eindringen und sie markieren kann.

Die Bereiche mit abgestorbenen Zellen sind somit durch Seneszenz- und/oder Zelltodprozesse entstanden, die auf einen engen Bereich begrenzt sind. Die enge Begrenzung dieser Prozesse kann durch ein ebenfalls lokal begrenztes Signal ausgelöst und/oder durch ein laterales inhibierendes Signal auf diesen Bereich begrenzt werden (Martienssen 1997). Da insgesamt in HN-Fahnenblättern die Seneszenzprozesse aufgrund ausreichender Stickstoffversorgung erst vergleichsweise spät einsetzen, erscheint es allerdings als unwahrscheinlich, dass es zu einer frühen Induktion der Seneszenz in solchen begrenzten Bereichen in den HN-Blättern gekommen ist. Lokal begrenzte Zelltodprozesse erscheinen hier wahrscheinlicher, ähnlich der hypersensitiven Reaktion. Solche Prozesse werden durch bestimmte Signale ausgelöst, dazu gehören unter anderem ROS (Van Breusegem 2006).

Interessanterweise wurden in Arabidopsisblättern fleckige Muster ähnlich zu denen in HN-Blättern beschrieben, die durch Zelltodprozesse in einzelnen aneinander angrenzenden Zellen entstanden sind (Kim *et al.* 2012). Diese Zelltodprozesse wurden durch Stress in Form von Starklicht in Kombination mit niedrigen Temperaturen im Wildtyp induziert und konnten in einer *executer 1 (ex1)-ex2*-Doppelmutante vollständig unterdrückt werden. EX1 und EX2 sind wichtige Bestandteile des Singulett-sauerstoff-Signalwegs. Passend dazu konnten, wie in Kapitel 5.1 bereits erwähnt, Krieger-Liszkay und Mitautoren zeigen, dass es speziell in Lomerit zu einer Akkumulation von Singulett-sauerstoff während der Blattseneszenz kommt (Krieger-Liszkay *et al.* 2015). Vorversuche konnten jedoch keinen deutlichen Unterschied in der Singulett-sauerstoffmenge zwischen seneszenten SN- und HN-Fahnenblättern zeigen (durchgeführt von A. Krieger-Liszkay). Allerdings konnte in der transkriptomweiten Expressionsanalyse aus **Arbeit II** für die zu EX1 und EX2 orthologen Gene in Gerste eine stärkere Herabregulation der Expression während der Seneszenz in SN-Fahnenblättern im Vergleich zu HN gezeigt werden. Anscheinend kann die erhöhte Singulett-sauerstoffmenge während der Seneszenz hauptsächlich in den HN-Blättern Zelltodprozesse auslösen, da nur hier die für den Singulett-sauerstoff-Signalweg essentiellen EX Gene ausreichend stark exprimiert werden. Da gezeigt werden konnte, dass Remobilisierungsprozesse während der Seneszenz Zelltodprozesse negativ regulieren können, könnte die Herabregulation der EX Gene in SN-Blättern in Abhängigkeit von den Remobilisierungsprozessen in diesen Blättern stehen.

Die negative Regulation der Zelltodprozesse durch Remobilisierungsprozesse wie die Autophagie konnte beispielsweise in den Arabidopsismutanten *atg2* und *atg5* gezeigt werden (Yoshimoto *et al.* 2009). Durch diese Mutationen ist die Autophagiemaschinerie in diesen Pflanzen funktionsunfähig und Zelltodprozesse werden stark beschleunigt.

Zusammengefasst scheinen Zelltodprozesse während der Seneszenz in SN-Fahnenblättern unterdrückt und in HN verstärkt zu sein. Demnach sollten weitere Gene, die im Zusammenhang mit Zelltodprozessen stehen, während der Seneszenz besonders in HN-Fahnenblättern und nicht in SN verstärkt exprimiert werden (**Gruppe 2**).

Durch die Microarray-Analyse konnten so insgesamt 70 während der Seneszenz in HN-Blättern aufregulierte Gene identifiziert werden, von denen fünf für Proteasen und zwei für Transkriptionsfaktoren kodieren.

Ein Teil der so identifizierten Gene unterstützt die Annahme, dass die in HN während der Seneszenz aufregulierten Gene möglicherweise eine Rolle in Zelltodprozessen spielen. So konnten bereits mehrfach Cystein- und Serinproteasen verschiedenen Zelltodprozessen zugeordnet werden, wie zum Beispiel der Tracheenentwicklung (Groover & Jones 1999; Funk *et al.* 2002; Mulisch *et al.* 2013). In Arabidopsis *flu*-Mutanten wird das orthologe Gen zu dem hier identifizierten AP2/ERF-Transkriptionsfaktor nach einem Dunkel/Licht Transfer der Pflanze deutlich verstärkt exprimiert (Gadjev *et al.* 2006). Der Transfer induziert in diesen Mutanten eine verstärkte Singulett-Sauerstoffproduktion (Camp *et al.* 2003).

Neben Genen, die eine potentielle Rolle in der Stickstoffremobilisierung (**Gruppe 1**) oder in Zelltodprozessen (**Gruppe 2**) spielen, wurden Gene identifiziert, die während der Blattseneszenz in SN2 und HN3 verstärkt exprimiert wurden (**Gruppe 3**). Diese Gene waren zwar seneszenzabhängig aufreguliert, sie spielen aber weder eine Rolle in der Stickstoffremobilisierung, noch scheinen sie in Zelltodprozessen eine Rolle zu spielen. Wahrscheinlich sind diese Gene entweder in die Remobilisierung von anderen Nährstoffen, außer Stickstoff, involviert (vgl. Kapitel 3.2) (Stigter & Plaxton 2014), oder sie spielen eine Rolle in entwicklungsabhängigen Prozessen. In dieser **Gruppe 3** konnten insgesamt 93 Gene identifiziert werden, von denen fünf für Transkriptionsfaktoren und 13 für Proteine kodieren, die eine Rolle im Proteinabbau spielen.

Die Expressionsänderungen einer Auswahl der stickstoffabhängig (**Gruppe 1**) und entwicklungsabhängig (**Gruppe 3**) aufregulierten Gene wurden in einem zweiten Feldversuch durch quantitative *Real-Time* PCR (qRT-PCR) Analysen verifiziert. Als Referenzen für die Entwicklung der Pflanzen dienten die Transkriptmengen der Gene *HvRBCS* und *HvSAG12*. *HvRBCS* kodiert für die kleine Untereinheit von Rubisco, deren Expression während der Seneszenz typischerweise herabreguliert ist (Jukanti *et al.* 2008; Parrott *et al.* 2010; Christiansen & Gregersen 2014). *HvSAG12* kodiert für eine Cysteinprotease, die während der Seneszenz verstärkt exprimiert wird und somit bereits häufig als Marker für die Seneszenz eingesetzt wurde (Lohman *et al.* 1994; Jukanti *et al.* 2008; Parrott *et al.* 2010; Christiansen & Gregersen 2014).

Von allen sechs per qRT-PCR überprüften entwicklungsabhängig aufregulierten Genen (**Gruppe 3**) konnte diese Zuordnung im zweiten Feldversuch bestätigt werden. Ebenso konnte für vier Gene die Zuordnung zu den stickstoffabhängig exprimierten Genen (**Gruppe 1**) in dem zweiten Feldversuch bestätigt werden. Das war allerdings nicht für die Gene *HvPAP20* und *HvNAC001* der Fall, sie waren im zweiten Feldversuch in HN- und SN-Pflanzen ähnlich aufreguliert und somit in diesem Versuch eindeutig entwicklungsabhängig reguliert.

Die unterschiedliche Zuordnung von *HvPAP20* und *HvNAC001* im ersten Feldversuch zu den stickstoffabhängig und im zweiten Feldversuch zu den entwicklungsabhängig exprimierten Genen kann nicht auf Unterschiede in der jeweils für HN- und SN-Pflanzen insgesamt zur Verfügung stehenden Stickstoffmenge zurückzuführen sein. Zum einen wurde jeweils die gleiche Menge und Art Stickstoff zum Düngen verwendet und zum anderen wurde durch die Verteilung der Felder im Feldversuch eventuellen Standortunterschieden vorgebeugt.

Allerdings gab es Unterschiede bei den Wetterbedingungen zwischen den beiden Feldversuchen. Die Wetterbedingungen während des zweiten Feldversuchs führten zu einer verzögerten Blüte der Gerstenpflanzen und somit zu einem verkürzten Zeitraum zwischen Blüte und dem Einsetzen der Seneszenz. Eventuell haben sich diese Unterschiede auf die Expression von *HvPAP20* und *HvNAC001* ausgewirkt und zu der unterschiedlichen Zuordnung geführt.

Interessanterweise konnte durch eine aktuelle Genexpressionsstudie die Zuordnung von *HvPAP20* und *HvNAC001* zu den entwicklungsabhängig aufregulierten Genen und somit die Ergebnisse der qRT-PCR Analyse des zweiten Feldversuchs bestätigt

werden (Christiansen & Gregersen 2014). In dieser Studie wurden Gerstenpflanzen der Sorten Golden Promise im Gewächshaus mit zusätzlicher Stickstoffversorgung über das Bewässerungssystem angezogen. Diese zusätzliche Stickstoffversorgung erzeugt einen ähnlichen Stickstoffüberschuss wie bei den in **Arbeit II** verwendeten HN-Pflanzen.

5.2.1 Stickstoffabhängige Genexpression während der Seneszenz

Der Fokus in **Arbeit II** lag auf der Identifikation von Genen, die spezifisch in stickstoffabhängige Regulations- und Abbauprozesse während der Blattseneszenz involviert sind (**Gruppe 1**). Von den mittels Microarray-Analyse im ersten Feldversuch identifizierten Genen (Abbildung 6) wurden vier Gene im zweiten Feldversuch durch qRT-PCR Analysen bestätigt. Diese vier Gene kodieren für den Transkriptionsfaktor HvNAC026 sowie für SCPL51, APG7 und ATG18F.

HvNAC026 ist der einzige Transkriptionsfaktor, dessen Gen in beiden Feldversuchen während der Seneszenz stickstoffabhängig verstärkt exprimiert wurde. Obwohl bereits in früheren Studien für mehrere NAC- aber auch WRKY-Transkriptionsfaktoren eine seneszenzabhängige Aufregulation der Genexpression in verschiedenen Arten gezeigt werden konnte (Guo *et al.* 2004; Buchanan-Wollaston *et al.* 2005; Balazadeh *et al.* 2008; Breeze *et al.* 2011; Fischer 2012), wurde bisher in Gerste nur HvNAC026 mit der Remobilisierung von Stickstoff während der Seneszenz in Verbindung gebracht (Christiansen *et al.* 2011; Brockerhoff 2015). Lediglich für einen weiteren NAC-Transkriptionsfaktor, HvNAM-1 (alternativer Name: HvNAC029), gibt es durch *quantitative trait locus* (QTL) Studien Hinweise auf einen Einfluss auf die Stickstoffremobilisierung (Uauy *et al.* 2006; Distelfeld *et al.* 2008; Jukanti & Fischer 2008; Distelfeld *et al.* 2014).

Die Hypothese einer stickstoffabhängigen Expression von *HvNAC026* während der Seneszenz wird durch zwei aktuelle Genexpressionsstudien an Pflanzen der Gersensorte Golden Promise weiter gestärkt (vgl. Kapitel 5.2). In beiden Versuchen wurden die Pflanzen im Gewächshaus mit zusätzlicher Stickstoffversorgung über das Bewässerungssystem angezogen, wodurch Gene, die eine Rolle in der Stickstoffremobilisierung spielen, während der Seneszenz nicht verstärkt exprimiert werden

sollten. Dementsprechend konnte im ersten Versuch nur eine sehr geringe Steigerung der Expression von *HvNAC026* in seneszenten Blättern und Körnern im Stadium der Teigreife (Korninhalt weich und trocken) und im zweiten Versuch keine Veränderung der Expression festgestellt werden (Christiansen *et al.* 2011; Christiansen & Gregersen 2014; Brockerhoff 2015). Das zu *HvNAC026* orthologe Protein in Arabidopsis, *XND1*, wirkt sich negativ auf die Synthese der Lignocellulose und auf Zelltodprozesse im Xylem aus (Zhao *et al.* 2007). Das orthologe Protein in Pappel (*Populus trichocarpa* Hook.) ist ebenfalls in die Bildung des Xylems, aber auch in das Blattwachstum und in andere Entwicklungsprozesse involviert (Grant *et al.* 2010). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *HvNAC026* Zelltodprozesse unterdrücken und so eine effizientere Stickstoffremobilisierung ermöglichen könnte.

Neben diesem Transkriptionsfaktor wurden drei Gene identifiziert, die ebenfalls während der Blattseneszenz stickstoffabhängig exprimiert werden und potentiell in den Abbau von Proteinen involviert sind. Eines davon ist *SCPL51*, welches für eine Serinprotease kodiert, während die anderen beiden, *ATG7* und *ATG18F* für Proteine der Autophagiemaschinerie kodieren.

Obwohl bereits zahlreiche Proteasen im Zusammenhang mit Abbauprozessen während der Seneszenz beschrieben worden sind, konnte bisher nur für wenige eine Rolle in der Stickstoffremobilisierung nachgewiesen werden (Gepstein *et al.* 2003; Guo *et al.* 2004; Buchanan-Wollaston *et al.* 2005; Parrott *et al.* 2005; 2007). Für das Gen der Serinprotease *SCPL51* wurde in vorangegangenen Studien lediglich eine verstärkte Expression in keimenden Gerstenkörnern (Druka *et al.* 2006; Sreenivasulu *et al.* 2008) und in Korrelation mit einem erhöhten Proteingehalt der Gerstenkörner beschrieben (Jukanti & Fischer 2008). Im Unterschied zu der verstärkten Expression von *SCPL51*, besonders in SN-Fahnenblättern, ist diese Protease in der bereits erwähnten Genexpressionsanalyse an der Gerstensorte Golden Promise während der Seneszenz auch bei einem Stickstoffüberschuss verstärkt exprimiert (Christiansen & Gregersen 2014). Obwohl die Ergebnisse aus **Arbeit II** auf eine Funktion der Serinprotease in der Stickstoffremobilisierung hindeuten, sind aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse aus der Studie an Golden Promise weitere Versuche notwendig, um den Zusammenhang zwischen *SCPL51* und der Stickstoffremobilisierung zu überprüfen.

Ein Zusammenhang zwischen Proteinabbau, Autophagie und Stickstoffremobilisierung ist bereits bekannt (Masclaux-Daubresse *et al.* 2008; 2010; Masclaux-Daubresse & Chardon 2011; Wada & Ishida 2013; Lee *et al.* 2013) und wird durch die stickstoffabhängige Genexpression von *ATG7* und *ATG18F* in Gerste bestätigt. Dieser Zusammenhang wird zusätzlich durch die bereits erwähnte Genexpressionsanalyse in der Gerstensorte Golden Promise erhärtet. Bei dieser Analyse scheint die ausreichende Stickstoffversorgung die Expression von *ATG7* und *ATG18F* während der Seneszenz erwartungsgemäß zu reprimieren (Christiansen *et al.* 2011). Ebenso konnte in einer anderen Studie an dieser Gerstensorte eine stickstoff- und seneszenzabhängige Aufregulation der Genexpression von *ATG7* gezeigt werden (Avila-Ospina *et al.* 2016).

Bei *ATG7* handelt es sich um ein E1-ähnliches Enzym, das bei der Bildung des *ATG12* Konjugationssystems eine Rolle spielt (Mizushima *et al.* 1998; 2011). *ATG18F* ist in das Recycling von *ATG9* involviert (Guiboileau & Masclaux-Daubresse 2012). Zudem konnte in Arabidopsisprösslingen gezeigt werden, dass die Genexpression von *ATG18f* unter Stickstoffmangel, aber nicht während der dunkelinduzierten Seneszenz aufreguliert wird (Xiong *et al.* 2005). Die Expression von *ATG18f* ist ebenfalls unter dem Einfluss von biotischem Stress wie Trockenheit und Hitze erhöht (Rizhsky *et al.* 2004). Neben dem Abbau von Proteinen unterdrückt Autophagie wahrscheinlich über einen NPR1-abhängigen Salizylsäure-Signalweg Zelltodprozesse während der Seneszenz oder während einer Immunantwort (vgl. Kapitel 5.2) (Yoshimoto *et al.* 2009).

5.2.2 Entwicklungsabhängige Genexpression während der Seneszenz

Neben Genen, die während der Seneszenz ausschließlich in SN oder in HN aufreguliert waren und eine Rolle in der Stickstoffremobilisierung (**Gruppe 1**) oder bei Zelltodprozessen (**Gruppe 2**) spielen, konnten Gene identifiziert werden, die während der Blattseneszenz in SN2 und HN3 aufreguliert waren (**Gruppe 3**). Zusätzlich wurden zwei Gene, *HvPAP20* und *HvNAC001*, die zunächst als stickstoffabhängig (**Gruppe 1**) eingruppiert worden sind, auf Grund der Ergebnisse der qRT-PCR Analyse (vgl. Kapitel 5.2) und einer weiteren Expressionsanalyse (Christiansen & Gregersen 2014) in **Gruppe 3** eingruppiert.

Die Gene der **Gruppe 3** spielen eventuell eine Rolle in der Remobilisierung von anderen Nährstoffen außer Stickstoff oder in entwicklungsabhängigen Prozessen. Sie kodieren für die Transkriptionsfaktoren HvNAC001, HvNAC005, HvNAC013, MYB und WRKY12 sowie für die zwei Cysteinproteasen HvPAP14 und HvPAP20 sowie eine Subtilase. Eine aktuelle Studie an der Gerstensorte Golden Promise stützt die Annahme, dass diese Gene während der Seneszenz nicht in die Stickstoffremobilisierung involviert sind (Christiansen & Gregersen 2014). Dieser Rückschluss ist möglich, da in dieser Studie die Gene der **Gruppe 3** während der Seneszenz stark aufreguliert waren, obwohl die Pflanzen mit einer zusätzlichen Stickstoffdüngung über das Bewässerungssystem angezogen worden sind.

Christiansen und Mitautoren haben die Genexpression von NAC-Transkriptionsfaktoren in unterschiedlichen Organen und unter verschiedenen Bedingungen in Gerste untersucht (Christiansen *et al.* 2011). Neben der verstärkten Expression während der Blattseneszenz konnten sie für *HvNAC001* und *HvNAC005* eine Aufregulation in Körnern im Stadium der Milchreife (Korninhalt milchig) und der Vollreife (Körner hart, kaum zu brechen) (Brockerhoff 2015) beobachten. Zusätzlich konnten sie eine verstärkte Expression von *HvNAC005* und *HvNAC013* unter dem Einfluss des Phytohormons Abscisinsäure (ABA) und für *HvNAC013* auch unter dem Einfluss von Methyljasmonat (MeJA) beobachten. In einer Seneszenzstudie an *Arabidopsis* konnte für *AtNAP* (alternativer Name: *ANAC029*), dem orthologen Gen zu *HvNAC005*, ebenfalls eine Aufregulation während der Seneszenz beobachtet werden (Guo *et al.* 2004).

Speziell für *HvNAC013* konnte nachgewiesen werden, dass es während der Seneszenz die Transkription von Genen mit einer NAC-Transkriptionsfaktorbindestelle (NACBS) im Promotor induziert (vgl. Kapitel 3.3.1.1) (Kjaersgaard *et al.* 2011). Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass die RST Domäne des Gersten Proteins RADICAL-INDUCED CELL DEATH 1 (*HvRCD1*) mit der die Transkription regulierende Domäne (TRD) von *HvNAC013* interagieren kann. *RCD1* wurde als entwicklungs- und stressabhängiger Regulator von Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis* beschrieben (Jaspers *et al.* 2009; Teotia & Lamb 2011).

Das Gen, das für den MYB-Transkriptionsfaktor kodiert, wird in Gerste auch in keimenden Samen (Zhang *et al.* 2004) und in sich entwickelnden Körnern 14-21 Tage nach der Blüte (Jukanti & Fischer 2008) verstärkt exprimiert. Eine genaue

Zuordnung zu einem orthologen Gen beispielsweise in Arabidopsis oder Weizen ist auf Grund von zu großen Unterschieden in der Aminosäuresequenz nicht sicher möglich. Erwähnenswert ist aber eine schwache Ähnlichkeit zu *AtMYB90* in Arabidopsis, das während der Seneszenz ebenfalls verstärkt exprimiert wird (Warner 2008). Der Transkriptionsfaktor *AtMYB90* spielt zusammen mit *AtMYB75* eine Rolle in der Regulation der Biosynthese von Anthocyanen, die während der Seneszenz das Blatt vor photooxidativen Schäden schützen.

HvWRKY12 war das einzige während der Seneszenz in HN und SN aufregulierte Gen, das für einen WRKY-Transkriptionsfaktor kodiert. Im Unterschied zu der vorliegenden Studie (**Arbeit II**) war die Expression von *HvWRKY12* nicht in Blättern aufreguliert, in denen die Seneszenz künstlich durch die Unterbrechung des Phloems und der daraus resultierenden Zuckerakkumulation im Blatt induziert wurde (Parrott *et al.* 2007). Das zu *HvWRKY12* orthologe Gen in Arabidopsis, *AtWRKY75*, wird während der Seneszenz (Guo *et al.* 2004) oder bei einem Befall mit Pathogenen (Chen *et al.* 2013) verstärkt exprimiert. Die Expression des entsprechenden orthologen Gens in Reis, *OsWRKY72*, kann durch die Behandlung mit ABA verstärkt werden.

Zusammenfassend scheinen die hier identifizierten Transkriptionsfaktoren an Remobilisierungsprozessen (*HvNAC001*, *HvNAC005* und MYB), Stressantworten (*HvNAC005*, *HvNAC013* und WRKY12) und entwicklungsabhängigen Prozessen (*HvNAC013* und MYB) beteiligt zu sein. Aufgrund der Komplexität der Genregulation durch Transkriptionsfaktoren (vgl. Kapitel 3.3.1.1) stellt diese Zuordnung allerdings nur einen ersten Hinweis auf die tatsächliche jeweilige Funktion dar.

Neben den fünf Transkriptionsfaktoren war die Expression von drei Proteasegenen in SN2 und HN3 während der Seneszenz aufreguliert. Bisher wurden Proteasen während der Seneszenz hauptsächlich mit der Stickstoffremobilisierung in Verbindung gebracht (vgl. Kapitel 5.2.1). Die hier identifizierten Proteasen scheinen aber aufgrund ihrer Expressionsmuster eine Rolle entweder in der Remobilisierung von anderen Nährstoffen außer Stickstoff oder entwicklungsabhängigen Prozessen zu übernehmen.

Besonders bemerkenswert ist hier die Cysteinprotease *HvPAP14*. Diese Protease wird von einem der Gene kodiert, die am stärksten während der Seneszenz sowohl in SN- als auch in HN-Pflanzen aufreguliert waren. *HvPAP14* zählt zu der CEP1-

Gruppe der Papain-ähnlichen Cysteinproteasen (vgl. Kapitel 3.4.2) (Martínez *et al.* 2009; Richau *et al.* 2012; Diaz-Mendoza *et al.* 2014). Für Mitglieder dieser Gruppe wurde bereits mehrfach eine aufregulierte Genexpression während der Seneszenz in verschiedenen Arten beschrieben, unter anderem in Arabidopsis, Espe (*Populus tremula* L.), Tabak (*Nicotiana tabacum* L.), Oster-Lilie (*Lilium longiflorum* Thunb.) und Weizen (Bhalerao 2003; Guo *et al.* 2004; Buchanan-Wollaston *et al.* 2005; Beyene 2006; Gregersen & Holm 2006; Ruuska *et al.* 2008; Breeze *et al.* 2011; Roberts *et al.* 2012; Battelli *et al.* 2014). Speziell in Gerste wurde für *HvPAP14* eine seneszenz-abhängige Erhöhung der Genexpression in drei unterschiedlichen Studien beschrieben. In der ersten Studie wurde die Blattseneszenz durch den Verschluss des Phloems und die daraus resultierende Anreicherung von Kohlenhydraten im Blatt induziert (Parrott *et al.* 2005; 2007). In der zweiten Studie handelt es sich um die Genexpressionsstudie an den Fahnenblättern der Gerstensorte Golden Promise, bei der die Pflanzen mit einer zusätzlichen Stickstoffdüngung angezogen wurden (Christiansen & Gregersen 2014). In der dritten Studie wurde die Blattseneszenz durch eine siebentägige Dunkelinkubation der ganzen Pflanze induziert (Diaz-Mendoza *et al.* 2014).

Die Expressionsdaten zu *HvPAP14* und orthologen Genen in anderen Arten deuten deutlich auf eine Funktion während der Seneszenz hin. Allerdings scheint *HvPAP14* nicht in die Remobilisierung von Stickstoff oder in Zelltodprozesse involviert zu sein. Die starke Expression in alten SN- und HN-Blättern deutet vielmehr auf eine Rolle von *HvPAP14* in der Remobilisierung von anderen Nährstoffen, außer Stickstoff, oder auf eine entwicklungsabhängige Funktion hin. Um zusätzliche Hinweise auf eine mögliche Funktion von *HvPAP14* zu sammeln, wurde das Protein in **Arbeit III** genauer untersucht.

Neben *HvPAP14* war das Gen der Cysteinprotease *HvPAP20* ebenfalls während der Seneszenz in SN und HN aufreguliert. Allerdings blieb die Expression von *HvPAP20* unverändert während der Blattseneszenz ausgelöst entweder durch eine siebentägige Dunkelinkubation (Diaz-Mendoza *et al.* 2014) oder durch eine Zuckerakkumulation in Folge einer Unterbrechung des Phloems der Blätter (Parrott *et al.* 2007). *HvPAP20* zählt zur CTB3-Gruppe der Papain-ähnlichen Cysteinproteasen, aus der in Arabidopsis für die homologen Gene zu *AtCathB* (*AtCathB1*, *AtCathB2* und *AtCathB3*) eine Aufregulation der Expression während der Blattseneszenz beschrieben

wurde, die durch eine dreitägige Dunkelinkubation induziert war (McLellan *et al.* 2009).

Die hier als Subtilase bezeichnete Serinprotease aus der Familie der Subtilasen wird durch das Gen *AK365933* (alte Bezeichnung: *TA42918_4513*) kodiert. Das orthologe Gen in *Arabidopsis* *AT3G14067* kodiert für eine Subtilase, die in dem Proteom der Vakuole identifiziert werden konnte (Carter 2004). Außerdem war *AT3G14067* in *miR159*-Mutanten aufreguliert. Die microRNA *miR159* ist in die Regulation von Zelltodprozessen involviert (Alonso-Peral *et al.* 2010).

5.3 Das seneszenzassoziierte Gen *HvPAP14* kodiert für eine Cysteinprotease, die nach ihrer Aktivierung mit der Thylakoidmembran assoziiert ist

In **Arbeit II** wurde gezeigt, dass die Genexpression der Cysteinprotease *HvPAP14* unabhängig von der Verfügbarkeit von Stickstoff während der Seneszenz in SN- und HN-Blättern aufreguliert ist. Daher scheint *HvPAP14* entweder in die Remobilisierung von anderen Nährstoffen, außer Stickstoff, oder in entwicklungsabhängige Prozesse involviert zu sein. Um weitere Hinweise auf eine mögliche Funktion von *HvPAP14* zu erhalten, wurde das Protein in **Arbeit III** näher analysiert und seine Lokalisation in der Zelle untersucht.

Die Veränderung der Expression eines Gens zu einem bestimmten Zeitpunkt oder unter bestimmten Bedingungen gibt nur einen ersten Hinweis auf die eigentliche Funktion des resultierenden Proteins. So akkumuliert beispielsweise das Transkript der Cysteinprotease *SlCysEP* während der Blütenentwicklung der Tomate in einem früheren Entwicklungsstadium als das eigentlich prozessierte und aktive Enzym (Senatore *et al.* 2008). Im Gegensatz dazu konnte für *HvPAP14* neben der stark aufregulierten Genexpression (**Arbeit II**) auch die Aktivität des resultierenden Enzyms während der Seneszenz nachgewiesen werden. Durch einen Affinitätsnachweis mittels eines biotinylierten Derivats des Cysteinproteaseinhibitors E64 (DCG-04) konnten im *Western Blot* vier Banden in nicht seneszenten und fünf Banden in seneszenten Primärblättern der Gerste detektiert werden, die aktive Cysteinproteasen repräsentieren. In einem zweiten Ansatz wurden die Cysteinproteasen auf Höhe der zusätzlichen Bande des Affinitätsnachweises per Massenspektrometrie (ESI-LC/MS) analysiert. Im Vergleich zwischen nicht seneszenten und seneszenten

Blättern konnten so nur die Cysteinproteasen HvPAP14 und HvSAG12 (alternativer Name: HvPAP13) ausschließlich in seneszenten Blättern identifiziert werden. Bemerkenswert ist dabei, dass orthologe Gene zu *HvSAG12* seit vielen Jahren in Transkriptomstudien an verschiedenen Arten als Seneszenzmarker eingesetzt werden (vgl. Kapitel 3.4.2) (Lohman *et al.* 1994; Gregersen & Holm 2006; Breeze *et al.* 2011).

5.3.1 Lokalisation von HvPAP14 in der Zelle

Wie alle Papain-ähnlichen Cysteinproteasen der C1A-Gruppe (Tabelle 2) wird HvPAP14 als Präproenzym synthetisiert (Richau *et al.* 2012). Durch ein N-terminales Signalpeptid gelangt das Protein cotranslational in das Endoplasmatische Retikulum (ER). Im ER wird das Signalpeptid abgespalten, und es entsteht eine ca. 37 kDa große Proform. HvPAP14 besitzt, wie auch andere Mitglieder der CEP1-Gruppe, zusätzlich ein C-terminales ER-Rückhaltesignal (HDEL) (vgl. Kapitel 3.4.2). Proteine mit einer [H/K/T]DEL-Sequenz werden in der Regel über ein Signalpeptid ins ER synthetisiert und können von dort in die *cis*-Seite des Golgi-Netzwerkes gelangen. Vom Golgi-Netzwerk werden sie dann über einen ERD2-KDEL Rezeptor zurück ins ER gebracht (vgl. Kapitel 3.4.2). Dieser Rücktransport verhindert, dass die Proteine das ER mit einer [H/K/T]DEL-Sequenz über das Golgi-Netzwerk verlassen können. Es wird angenommen, dass dieser Prozess als eine Art Qualitätskontrolle für Proteine aus dem ER dient (Stornaiuolo *et al.* 2003).

Dementsprechend konnte HvPAP14 mittels einer transienten Transformation von Gerstenprotoplasten mit dem *HvPAP14:RFP* Fusionskonstrukt im ER nachgewiesen werden (S. Frank, Dissertation in Vorbereitung). Dabei wurde ein netzartig verteiltes Fluoreszenzsignal detektiert, ähnlich der Verteilung des ERs in der Zelle. Zusätzlich wurden einzelne Signale in kleinen runden Strukturen beobachtet.

Es stellte sich somit die Frage, ob HvPAP14 das ER eventuell dauerhaft verlassen kann. Beispielsweise konnte für Cysteinproteasen der CEP1-Gruppe aus anderen Arten gezeigt werden, dass sie auch mit KDEL-Sequenz das ER verlassen können. Dabei scheint es mindestens zwei Wege zu geben (vgl. Kapitel 3.4.2). Zum einen kann RcCysEP aus dem Wunderbaum, das ER über sogenannte Ricinosomen ver-

lassen (Schmid *et al.* 2001). In diesen Ricinosomen konnten RcCysEP mit KDEL-Sequenz sowie weitere Proteine aus dem ER nachgewiesen werden. Zum anderen wurde für SH-EP aus der Mungobohne gezeigt, dass sie das ER in KDEL-Vesikel (KV) verlassen kann (Okamoto 2003). Dabei scheint die KDEL-Sequenz entscheidend für die Entstehung der KV zu sein. Entsprechend konnten in *sh-ep*-Mutanten ohne KDEL-Sequenz keine KV beobachtet werden und SH-EP wurde hauptsächlich im Apoplasten immunologisch nachgewiesen.

Im Gegensatz zu RcCysEP und SH-EP wurde allerdings in der Proteinsequenz von HvPAP14 unmittelbar vor der HDEL-Sequenz an Position 303/304 eine Furin-ähnliche Schnittstelle bioinformatisch vorhergesagt (Duckert *et al.* 2004). In Säugetieren, Hefe und Tabak wurde gezeigt, dass an einer solchen Schnittstelle ein Protein im Golgi-Netzwerk durch eine Furin- oder Kexin-ähnliche Protease geschnitten werden kann (Jiang & Rogers 1999). Dies würde im Fall von HvPAP14 dazu führen, dass es ohne ER-Rückhaltesignal das ER in Vesikeln dauerhaft verlassen kann.

Bei weiteren Untersuchungen zur Lokalisation von HvPAP14 in der Zelle war zu berücksichtigen, dass Papain-ähnliche Cysteinproteasen wie HvPAP14 als Präprotein synthetisiert werden und somit verschiedene Zwischenstufen des Proteins entstehen können, die eventuell unterschiedlich lokalisiert sind. So wurde eine schrittweise Prozessierung bereits immunologisch für mehrere zu HvPAP14 orthologe Cysteinproteasen aus Tomate (Senatore *et al.* 2008; Trobacher *et al.* 2012), Wunderbaum (Schmid *et al.* 1998), Gartenbohne (Tanaka *et al.* 1993), Futterwicke (*Vicia sativa* L.) (Becker *et al.* 1997), Mungobohne (Mitsuhashi & Minamikawa 1989; Minamikawa *et al.* 2001), Weiß-Fichte (*Picea glauca* (Moench) Voss) (He & Kermode 2003), Oster-Lilie (Battelli *et al.* 2014), Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) (Lopez-Fernandez & Maldonado 2013) und Arabidopsis (Hierl *et al.* 2014) gezeigt.

Wie bereits erwähnt wird das Signalpeptid von HvPAP14 cotranslational abgespalten. Das resultierende ca. 37 kDa Proprotein mit HDEL-Sequenz könnte dann an der Furin-ähnlichen Schnittstelle geschnitten werden und könnte so ohne HDEL-Sequenz das ER wahrscheinlich verlassen. Durch die Abspaltung des ER-Rückhaltesignals entsteht ein ca. 33 kDa großes inaktives Zwischenprodukt von HvPAP14. Zur Aktivierung dieses Proenzym muss die inhibitorisch wirkende Prodomäne abgespalten werden, was in der Regel pH-abhängig geschieht (Taylor *et al.* 1995;

Wiederanders *et al.* 2003). Dementsprechend konnte rekombinant erzeugtes HvPAP14 durch einen niedrigen pH-Wert (pH 4 - 5) aktiviert werden (S. Frank, Dissertation in Vorbereitung). Nach der Aktivierung ist die Aktivität allerdings von dem pH-Wert unabhängig. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit der Aktivierung der orthologen Cysteinprotease AtCEP2 aus Arabidopsis und RcCysEP aus dem Wunderbaum (Schmid *et al.* 2001; Hierl *et al.* 2014). Bioinformatisch konnte in der HvPAP14 Aminosäuresequenz eine weitere Schnittstelle zwischen der Prodomäne und der Proteasendomäne an Position 74/75 vorhergesagt werden (Duckert *et al.* 2004). Das resultierende Protein hat eine Größe von ca. 26 kDa und repräsentiert sehr wahrscheinlich das aktive Enzym.

Um die unterschiedlichen Formen von HvPAP14 untersuchen zu können, wurden zwei Antikörper hergestellt (Abbildung 7). Der erste Antikörper ist gegen ein Peptid innerhalb der Proteasendomäne gerichtet (HvPAP14_1). Der zweite ist gegen ein Peptid innerhalb der Prodomäne gerichtet (HvPAP14_2). Mit dem Antikörper HvPAP14_1 können somit alle potentiellen Formen von HvPAP14 detektiert werden, während mit HvPAP14_2 nur die inaktiven Formen detektiert werden können, bei denen die Prodomäne noch nicht abgespalten ist.

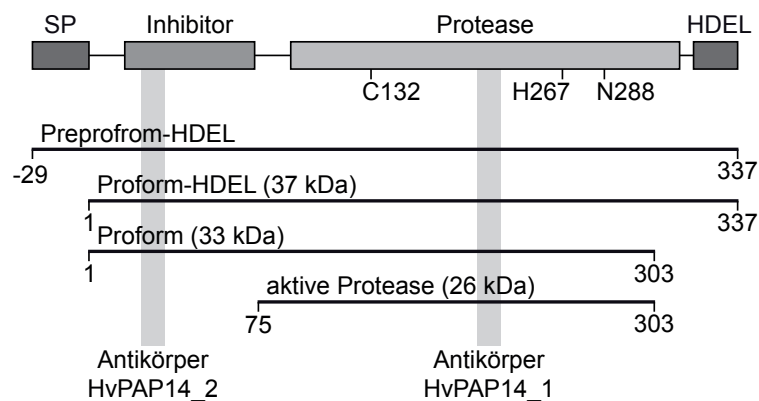


Abbildung 7. Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz und der unterschiedlichen vorhergesagten Formen von HvPAP14 mit den berechneten Größen des jeweiligen Proteins. Die Position der Peptide, gegen die die Antikörper gerichtet sind, sind in grau markiert. Die angegebenen Aminosäuren repräsentieren das aktive Zentrum der Protease, das aus Cystein (C), Histidin (H) und Asparagin (N) besteht. SP: Signalpeptid, HDEL: ER-Rückhaltesignal. Die Abbildung wurde aus **Arbeit III** entnommen.

Mittels diesen Antikörper wurde dann die Lokalisation der verschiedenen Formen von HvPAP14 immunologisch in Fraktionen aus Gerstenblättern untersucht.

Erwartungsgemäß konnte die Proform mit HDEL-Sequenz nur im Gesamtproteinextrakt, der auch das ER enthält, nachgewiesen werden. Dabei war das Signal der Proform stärker als die Signale der anderen Formen von HvPAP14. Eine entsprechende Akkumulation der Proform mit ER-Rückhaltesignal konnte auch durch das *HvPAP14:RFP* Fusionskonstrukt in Gerstenprotoplasten gezeigt werden (S. Frank, Dissertation in Vorbereitung). Wie bereits erwähnt wies die Verteilung des *HvPAP14:RFP* Signals in der Zelle auf eine hauptsächliche Lokalisation der Proform im ER hin. Durch eine Immunogoldmarkierungen mit den HvPAP14-Antikörpern konnten allerdings nur wenige Signale am ER detektiert werden. Der Unterschied zwischen den Signalstärken der Proform in der *Western Blot* Analyse und des Fusionskonstrukts im Vergleich zu den wenigen Signalen der Immunogoldmarkierung am ER deuteten darauf hin, dass die Proform mit HDEL-Sequenz eventuell nicht mittels Immunogoldmarkierung detektiert werden konnte. Das könnte bedeuten, dass die wenigen Signale der Immunogoldmarkierung am ER eventuell die bereits prozessierte Proform ohne HDEL-Sequenz repräsentieren. Allerdings könnte das Protein ohne das ER-Rückhaltesignal das ER in Vesikeln verlassen und würde nicht zurücktransportiert werden (vgl. Kapitel 3.4.2). Somit könnte die Immunogoldmarkierung eventuell die Proform von HvPAP14 ohne HDEL-Sequenz in Vesikeln am ER repräsentieren. Wie bereits erwähnt gibt es eine Schnittstelle in der Aminosäuresequenz von HvPAP14, die eine Abspaltung des ER-Rückhaltesignal ermöglichen könnte.

Neben der Proform von HvPAP14 mit ER-Rückhaltesignal konnte auch die prozessierte Form ohne ER-Rückhaltesignal immunologisch in der Gesamtproteinfraktion nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde diese prozessierte Form zusammen mit der potentiell aktiven Form ohne inhibitorische Prodomäne in der Membranfraktion der Plastiden nachgewiesen. Dabei wurde die potentiell aktive Form allerdings nur in der Membranfraktion detektiert, was daraufhin deutet, dass die inhibitorische Prodomäne erst nach dem Transport in die Plastiden abgetrennt wird.

Bisher konnten nur wenige Cysteinproteasen in den Chloroplasten identifiziert werden. In Proteomstudien an isolierten Chloroplasten wurden bisher die Papain-ähnliche Cysteinprotease RD21A (RD21A-Gruppe, Tabelle 2) (Kleffmann *et al.* 2004; Peltier *et al.* 2004) und eine UB-ähnliche Cysteinprotease in *Arabidopsis* (Reiland *et al.* 2009) sowie die OTU-ähnliche Cysteinprotease OTU3 in Erbse (*Pisum sativum* L.)

(Simm *et al.* 2013; Gutierrez-Carbonell *et al.* 2014) und Arabidopsis (Ferro *et al.* 2010) nachgewiesen. In einer weiteren Proteomstudie an Chloroplasten der Erbse wurde außerdem die OTU-ähnliche Cysteinprotease OTL identifiziert (Bayer *et al.* 2011). Die plastidäre Lokalisation von OTL wurde zusätzlich durch eine transiente Transformation von Tabakblättern mit einem *OTL:YFP* (*yellow fluorescing protein*) Fusionskonstrukt bestätigt. Außerdem wurde in einer Proteomstudie an isolierten Chloroplasten aus Weizen der Cysteinproteaseinhibitor 12 nachgewiesen (Kamal *et al.* 2011), was auf eine Lokalisation von Cysteinproteasen in den Chloroplasten hindeutet.

Des Weiteren wurden in einer älteren Studie die Proteaseaktivitäten in Chloroplasten aus Spinat untersucht (Sokolenko *et al.* 1997). Dazu wurden unterschiedliche Chloroplastenfraktionen mit spezifischen Proteaseinhibitoren inkubiert. Kam es bei einem der eingesetzten Inhibitoren zu einer Verringerung der Proteaseaktivität, konnten so Rückschlüsse auf den Proteasetyp hergestellt werden. Auf diese Art wurden im Stroma und in der Thylakoidmembran die Aktivität mehrerer unterschiedlicher potentieller Serinproteasen und im Lumen der Thylakoide die Aktivität einer potentiellen Cysteinprotease nachgewiesen. Nach einem ähnlichen Prinzip wurde mittels verschiedener Proteaseinhibitoren je eine Cysteinprotease in Assoziation mit der Thylakoidmembran in Erbse (Forsberg *et al.* 2005) und Spinat (*Spinacia oleracea* L.) (Lindahl *et al.* 1995; Yang *et al.* 1998) identifiziert.

Zur genaueren Analyse der Lokalisation von HvPAP14 in den Plastiden wurden Fraktionen der Thylakoide untersucht. Dabei konnte die inaktive Proform ohne ER-Rückhaltesignal (33 kDa) sowohl in der Lumenfraktion als auch in der Thylakoidmembranfraktion detektiert werden. Hingegen wurde die potentiell aktive Form (26 kDa) ausschließlich in der Thylakoidmembranfraktion nachgewiesen. Diese Assoziation der potentiell aktiven Form ausschließlich mit der Thylakoidmembran könnte für das gefleckte Immunfluoreszenzsignal in den Plastiden verantwortlich sein, welches mit dem Antikörper gegen alle Formen von HvPAP14 (HvPAP14_1) detektiert wurde. Im Gegensatz dazu war das Fluoreszenzsignal des Antikörpers gegen die Proformen (HvPAP14_2) gleichmäßiger in den Plastiden verteilt, was auf die zuvor gezeigte Lokalisation der Proform im Lumen und in den Thylakoidmembranen zurückzuführen sein könnte.

Durch Immunogoldanalysen konnte zudem eine feste Bindung der potentiell aktiven Form an die Thylakoidmembran gezeigt werden. Während der Präparation der Proben für diese Analyse wurden zum Teil Zellen und Chloroplasten aufgebrochen, was dazu führte, dass die Thylakoidmembranen freilagen. Lediglich mit dem Antikörper gegen alle Formen von HvPAP14 (HvPAP14_1) wurden an diesen freiliegenden Thylakoidmembranen Signale detektiert. Dies war nicht möglich mit dem Antikörper, der nur die Proformen markiert (HvPAP14_2).

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse auf das folgende Modell hin, das eine Möglichkeit beschreibt, wie HvPAP14 auf dem Weg vom ER zur Thylakoidmembran prozessiert und aktiviert werden könnte (Abbildung 8). HvPAP14 wird durch das Signalpeptid cotranslational als Proform ins ER synthetisiert. Dort verbleibt die Proform bis das ER-Rückhaltesignal im Golgi-Netzwerk eventuell durch eine Furin- oder Kexin-ähnliche Protease abgespalten wird. Ohne ER-Rückhaltesignal würde HvPAP14 nicht mehr über das Golgi-Netzwerk ins ER zurück transportiert, sondern könnte in Vesikeln vom Golgi-Netzwerk in die Chloroplasten transportiert werden. Ein entsprechender Transport von Proteinen aus dem ER über das Golgi-Netzwerk in die Chloroplasten wurde bereits in Arabidopsis für die ALPHA CARBONIC ANHYDRASE 1 (AtCAH1) immunologisch in Zellfraktionen, in einer Immunogoldanalyse sowie mittels eines *CAH1:GFP* Fusionskonstrukts gezeigt (Villarejo *et al.* 2005).

Die Lokalisation der inaktiven Proform von HvPAP14 in den Chloroplasten im Lumen und in der Thylakoidmembranfraktion, sowie die feste Bindung der potentiell aktiven Form von HvPAP14 an die Thylakoidmembran deuten an, dass das Protein an der luminalen Seite der Thylakoidmembranen aktiviert werden könnte und dann fest an die Thylakoidmembran gebunden wird. Wie bereits gezeigt werden konnte, erfolgt die Aktivierung des Enzyms durch die Abspaltung der inhibitorischen Prodomäne am effektivsten bei einem pH-Wert von 4 - 5 (S. Frank, Dissertation in Vorbereitung). Tatsächlich kann im Lumen während der Photosynthese ein vergleichbarer pH-Wert erreicht werden (Kramer *et al.* 1999; Järvi *et al.* 2012).

Zusätzlich zu der Lokalisierung in den Plastiden konnte HvPAP14 durch Immunogoldanalysen in kleinen runden Strukturen nachgewiesen werden, bei denen es sich um *Microbodies* handeln könnte (Abbildung 8). Entgegen der hier beschriebenen Lokalisation in den Plastiden wurde für die meisten Cysteinproteasen der CEP1-

Gruppe eine Lokalisation in Vesikeln aus dem ER gezeigt (vgl. Kapitel 3.4.2). Wie bereits erwähnt können diese Vesikel mindestens in zwei Gruppen unterteilt werden. Vesikel aus der ersten Gruppe, die KDEL-Vesikel (KV), transportieren die inaktive Form der Cysteinproteasen zur Vakuole, in der sie durch den niedrigen pH-Wert aktiviert werden (Toyooka *et al.* 2000; Minamikawa *et al.* 2001; Okamoto 2003; Hierl *et al.* 2014). Vesikel aus der zweiten Gruppe, die Ricinosomen, verbleiben im Cytoplasma. Erst in der letzten Phase des pflanzlichen Zelltods werden die Cysteinproteasen ins Cytoplasma entlassen und dort durch den niedrigen pH-Wert aufgrund der kollabierende Vakuole aktiviert (Mollenhauer & Totten 1970; Schmid *et al.* 1998; Gietl & Schmid 2001; Schmid *et al.* 2001; Senatore *et al.* 2008). Da immunologisch kein potentiell aktives HvPAP14 außerhalb der Plastiden nachgewiesen wurde, ist es unwahrscheinlich, dass das Enzym in den hier gezeigten *Microbodies* aktiv ist oder, wie die Cysteinprotease in den Ricinosomen, im Cytoplasma aktiviert wird. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die inaktive Proform von HvPAP14 in *Microbodies* beispielsweise durch Autophagie in die Vakuole transportiert und dort durch den niedrigen pH-Wert aktiviert wird (Abbildung 8). Ein solcher Weg wurde bereits für eine spezialisierte Form der *Microbodies*, die Peroxisomen, beschrieben (Kim *et al.* 2014). So konnte in *Arabidopsis* durch *atg7-2*- und *atg5-1*-Mutanten gezeigt werden, dass eine funktionsunfähige Autophagiemaschinerie zu einer Akkumulation von mehreren peroxisomalen Markern im Cytoplasma führt. Die Autoren schlossen daraus, dass die Anzahl der Peroxisomen in diesen Mutanten nicht mehr durch Autophagie reguliert werden konnte. Zusätzlich wurden in dieser Arbeit peroxisomale Marker in der Vakuole des Wildtyps nachgewiesen.

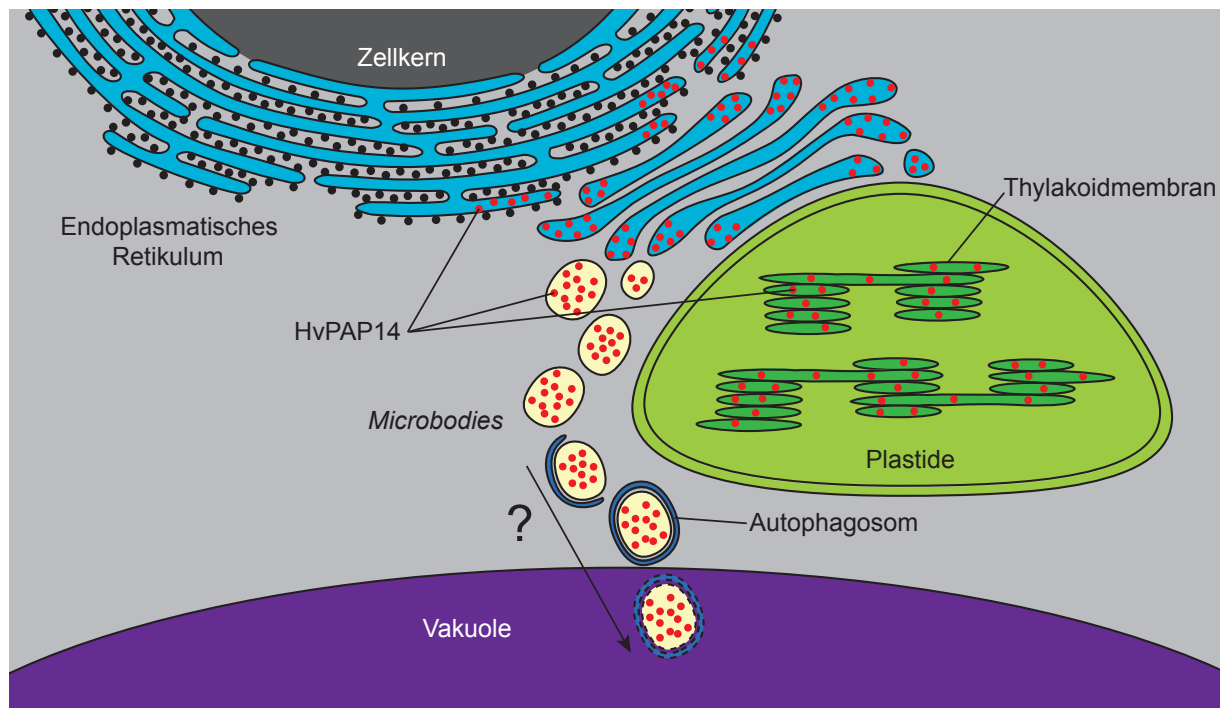


Abbildung 8. Modell zur Lokalisation von HvPAP14 in der Zelle. HvPAP14 wird ins ER synthetisiert und wird von dort wahrscheinlich über das Golgi-Netzwerk entweder in die Plastiden oder in *Microbodies* transportiert. Eventuell kann eine spezialisierte Gruppe dieser *Microbodies*, die Peroxisomen, durch Autophagie in die Vakuole transportiert werden.

5.3.2 Potentielle Funktion von HvPAP14

In **Arbeit II** zählt *HvPAP14* zu den am stärksten aufregulierten Genen in SN- und HN-Pflanzen während der Seneszenz. Diese Genexpressionsanalysen wurden an Gerstenpflanzen durchgeführt, die in zwei aufeinanderfolgenden Jahren im Feld angebaut worden sind. Proteinextrakte aus den Pflanzen des zweiten Jahres wurden in **Arbeit III** genutzt, um die Kinetik der verschiedenen HvPAP14 Formen während der Blattseneszenz zu analysieren.

Es konnte gezeigt werden, dass die 37 kDa Proform von HvPAP14 während der Blattseneszenz der Fahnenblätter akkumuliert. Dabei verläuft der Anstieg der Proteinmenge in den Blättern der SN- und HN-Pflanzen jeweils parallel zu dem abnehmenden Chlorophyllgehalt. Dies deutet darauf hin, dass HvPAP14 eventuell eine Rolle im Abbau von Chlorophyll-bindenden Proteinen des Photosyntheseapparates spielen könnte. Allerdings konnte weder bei der weiter prozessierten 33 kDa Proform noch bei der potentiell aktiven Form (26 kDa) der Protease eine Veränderung der Proteinmenge im Verlauf der Seneszenz gezeigt werden.

Im Vergleich zu den Proteinmengen während der Prozessierung von HvPAP14 wurde für orthologe Proteine aus der CEP1-Gruppe in anderen Arten ebenfalls gezeigt, dass sich in Zeitreihenanalysen die Proteinmenge der Proform nicht zwangsläufig direkt auf die Proteinmenge(n) der anderen Form(en) auswirkt (Mitsubishi & Minamikawa 1989; Becker *et al.* 1997; Schmid *et al.* 1999; He & Kermodé 2003; Senatore *et al.* 2008; Trobacher *et al.* 2012).

Zusammengenommen weist die Lokalisation der aktiven Form von HvPAP14 an der Thylakoidmembran sowie die gleichbleibende Proteinmenge der 33 kDa Proform, als auch der aktiven Form auf eine konstitutive Funktion im Abbau von Bestandteilen der Thylakoidmembran hin. Diese Funktion scheint zusätzlich eine Rolle während der Seneszenz zu spielen, worauf die seneszenzassoziierte Akkumulation der 37 kDa Proform von HvPAP14, die verstärkte Expression des Transkripts (**Arbeit II**), wie auch die über den Affinitätsnachweis gezeigte proteolytischen Aktivität der Protease in seneszenten Blättern hindeuten.

In Plastiden konnten bisher mehr als 20 verschiedene Proteasen identifiziert werden, die in die Anpassung, Umbau und Reparatur von Bestandteilen der Chloroplasten involviert sind. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Metallo-, Serin- und Aspartatproteasen (Adam 2000; Nishimura *et al.* 2016). Allerdings wurden bisher nur wenige Cysteinproteasen in den Chloroplasten identifiziert (vgl. Kapitel 5.3.1). Zwei dieser Cysteinproteasen wurden in den Thylakoidmembranen in Erbse und Spinat durch den Einsatz unterschiedlicher Proteaseinhibitoren nachgewiesen (Lindahl *et al.* 1995; Yang *et al.* 1998; Forsberg *et al.* 2005). In beiden Arten konnte die Aktivität der isolierten Proteasen durch E64, einen spezifischen Inhibitor für Cysteinproteasen, vollständig unterdrückt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass beide Cysteinproteasen in den Abbau von LHCII während der Akklimatisierung an hohe Lichtintensitäten involviert sind.

Da die potentiell aktive Form von HvPAP14 ebenfalls mit der Thylakoidmembran assoziiert ist, könnte HvPAP14 eventuell eine ähnliche Funktion in der Lichtakklimatisierung übernehmen wie die beschriebenen Cysteinproteasen aus Erbse und Spinat. Dafür spricht auch die gleichbleibende Proteinmenge der Proform und der potentiell aktiven Form, da die Anpassung der Lichtsammelkomplexe vor allem in nicht

seneszenten Blättern möglich sein sollte. Während der Seneszenz könnte HvPAP14 in die Remobilisierung von Nährstoffen aus dem LHCII involviert sein.

Proteasen, die in den Abbau von Proteinen des LHCII während der Seneszenz involviert sind, sind bisher kaum bekannt (Kato & Sakamoto 2013). HvPAP14 wäre somit ein interessanter Kandidat für weitere Untersuchungen des Abbaus der Proteine des LHCII während der Seneszenz.

6 Ausblick

Im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchungen zur Blattseneszenz in der Gersensorte Lomerit wurde gezeigt, dass die potentiell aktive Form der Cysteinprotease HvPAP14 an der Thylakoidmembran lokalisiert ist. Außerdem wurde vorgeschlagen, dass HvPAP14 eine Rolle in der Anpassung der Lichtsammelkomplexe an veränderte Lichtintensitäten spielt. Ob diese Hypothese zutrifft und ob es eventuell eine seneszenzabhängige Funktion des Enzyms gibt, muss noch weiter untersucht werden.

Eine Möglichkeit dazu wäre, die Auswirkungen von unterschiedlichen Lichtintensitäten auf die Genexpression und Lokalisation von HvPAP14 zu analysieren. In ausgewählten *chlorina*-Mutanten des Carlsberg Laboratory werden einzelne oder zum Teil auch mehrere Apoproteine der Lichtsammelkomplexe nicht exprimiert (Simpson *et al.* 1985; Bossmann *et al.* 1997). Daher erscheint es vielversprechend, diese Mutanten ebenfalls auf eine veränderte Genexpression und Lokalisation der unterschiedlichen Formen von HvPAP14 zu überprüfen. Zusätzliche Hinweise auf die Proteinfunktion könnten durch die Phänotypisierung von transgenen Pflanzen mit überexprimiertem oder reprimiertem *HvPAP14* gewonnen werden. Außerdem könnten durch die Inkubation der Thylakoidmembranfraktion mit rekombinant erzeugtem HvPAP14 mögliche Substrate des Enzyms ermittelt werden.

Neben der Lokalisation in den Plastiden wurde die Proform von HvPAP14 durch Immunogoldanalysen auch in *Microbodies* nachgewiesen. Es wurde diskutiert, dass diese Proform in *Microbodies* durch Autophagie in die Vakuole transportiert werden könnte. Um diese Annahme zu überprüfen könnten Doppelmarkierungen mit einem HvPAP14 und einem ATG8 Antikörper durchgeführt werden.

Mit Hilfe der Microarray-Analyse konnten neben HvPAP14 noch weitere während der Blattseneszenz verstärkt exprimierte Gene für Proteasen und Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Mittels einer Promotorstudie sollte überprüft werden, ob diese Transkriptionsfaktoren eine Rolle in der Regulation der Expression der verstärkt exprimierten Proteasen spielen.

Der Transkriptionsfaktor HvNAC26 scheint Zelltodprozesse zu unterdrücken und so eventuell eine effizientere Stickstoffremobilisierung zu ermöglichen. Interessant wäre

hier, die Blattseneszenz und den Ertrag in transgenen Pflanzen mit überexprimiertem HvNAC26 zu analysieren.

Die stickstoffabhängige Expression des Gens der Serinprotease SCPL51 entspricht nicht den Ergebnissen aus ähnlichen Genexpressionsanalysen. Da für die jeweilige Analyse eine andere Gerstensorte verwendet wurde, sollte die Expressionsanalyse unter standardisierten Bedingungen für beide Sorten wiederholt werden.

Bei dem Vergleich der Blattseneszenz der Gerstensorte Lomerit mit der Sorte Carina wurden unterschiedliche Abbauewege der Chloroplasten gezeigt. Jedoch gibt es bisher keine Hinweise auf den genetischen Hintergrund des alternativen Abbauewegs. Die Sorte Lomerit wurde aus einer Kombination von drei anderen Gerstensorten gezüchtet. Zunächst sollte die Seneszenzprozesse in diesen Sorten untersucht werden um geeignete Kandidaten mit einem ansteigenden Chlorophyll a/b-Verhältnis während der Seneszenz zu identifizieren. Mittels einer genomweiten Genexpressionsanalyse dieser Kandidaten könnten dann eventuell verantwortliche Gene identifiziert werden.

7 Literaturverzeichnis

- Adam Z. (2000) Chloroplast proteases: possible regulators of gene expression? *Biochimie* **82**:647–654.
- Adam Z., Clarke A.K. (2002) Cutting edge of chloroplast proteolysis. *Trends in Plant Science* **7**:451–456.
- Adams W.W. III, Winter K., Schreiber U., Schramel P. (1990) Photosynthesis and chlorophyll fluorescence characteristics in relationship to changes in pigment and element composition of leaves of *Platanus occidentalis* L. during autumnal leaf senescence. *Plant Physiology* **92**:1184–1190.
- Agüera E., Cabello P., la Haba de P. (2010) Induction of leaf senescence by low nitrogen nutrition in sunflower (*Helianthus annuus*) plants. *Physiologia Plantarum* **138**:256–267.
- Ahmed S.U., Rojo E., Kovaleva V., Venkataraman S., Dombrowski J.E., Matsuoka K., Raikhel N.V. (2000) The plant vacuolar sorting receptor AtELP is involved in transport of NH₂-terminal propeptide-containing vacuolar proteins in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Cell Biology* **149**:1335–1344.
- Alonso-Peral M.M., Li J., Li Y., Allen R.S., Schnippenkoetter W., Ohms S., White R.G., Millar A.A. (2010) The microRNA159-regulated GAMYB-like genes inhibit growth and promote programmed cell death in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **154**:757–771.
- Alston J.M., Beddow J.M., Pardey P.G. (2009) Agricultural research, productivity, and food prices in the long run. *Science* **325**:1209–1210.
- Amasino R.M., Gan S. (1997) Making sense of senescence (Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence). *Plant Physiology* **113**:313.
- Anderson J.M. (1999) Insights into the consequences of grana stacking of thylakoid membranes in vascular plants: a personal perspective. *Functional Plant Biology* **26**:625–639.
- Andersson A., Keskitalo J., Sjödin A., Bhalerao R., Sterky F., Wissel K., Tandre K., Aspeborg H., Moyle R., Ohmiya Y., Bhalerao R., Brunner A., Gustafsson P., Karlsson J., Lundeberg J., Nilsson O., Sandberg G., Strauss S., Sundberg B., Uhlen M., Jansson S., Nilsson P. (2004) A transcriptional timetable of autumn senescence. *Genome Biology* **5**:R24.
- Andersson B., Anderson J.M. (1980) Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* **593**:427–440.
- Apel K., Hirt H. (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**:373–399.
- Avila-Ospina L., Marmagne A., Soulay F., Masclaux-Daubresse C. (2016) Identification of barley (*Hordeum vulgare* L.) autophagy genes and their expression levels during leaf senescence, chronic nitrogen limitation and in response to dark exposure. *Agronomy* **6**:15–18.
- Ay N., Janack B., Humbeck K. (2014) Epigenetic control of plant senescence and linked processes. *Journal of Experimental Botany* **65**:3875–3887.
- Ay N., Raum U., Balazadeh S., Seidensticker T., Fischer A., Reuter G., Humbeck K. (2013) Regulatory factors of leaf senescence are affected in *Arabidopsis* plants overexpressing the histone methyltransferase SUVH2. *Journal of Plant Growth Regulation* **33**:119–136.

- Bachmann A., Fernández López J., Ginsburg S., Thomas H., Bouwkamp J.C., Solomos T., Matile P. (1994) Stay-green genotypes of *Phaseolus vulgaris* L.: chloroplast proteins and chlorophyll catabolites during foliar senescence. *New Phytologist* **126**:593–600.
- Balazadeh S., Riano-Pachon D.M., Mueller-Roeber B. (2008) Transcription factors regulating leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology* **10**:63–75.
- Balazadeh S., Siddiqui H., Allu A.D., Matallana-Ramirez L.P., Caldana C., Mehrnia M., Zanon M.-I., Köhler B., Mueller-Roeber B. (2010) A gene regulatory network controlled by the NAC transcription factor ANAC092/AtNAC2/ORE1 during salt-promoted senescence. *The Plant Journal* **62**:250–264.
- Battelli R., Lombardi L., Picciarelli P., Lorenzi R., Frigerio L., Rogers H.J. (2014) Expression and localisation of a senescence-associated KDEL-cysteine protease from *Lilium longiflorum* tepals. *Plant science* **214**:38–46.
- Bayer R.G., Stael S., Csaszar E., Teige M. (2011) Mining the soluble chloroplast proteome by affinity chromatography. *Proteomics* **11**:1287–1299.
- Becker C., Senyuk V.I., Shutov A.D., Nong H., Fischer J., Horstmann C., Müntz K. (1997) Proteinase A, a storage-globulin-degrading endopeptidase of vetch (*Vicia sativa* L.) seeds, is not involved in early steps of storage-protein mobilization. *European Journal of Biochemistry* **248**:304–312.
- Beers E.P., Jones A.M., Dickerman A.W. (2004) The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in *Arabidopsis*. *Phytochemistry* **65**:43–58.
- Beers E.P., Woffenden B.J., Zhao C. (2000) Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant Molecular Biology* **44**:399–415.
- Berberich T., Sano H., Kusano T. (1999) Involvement of a MAP kinase, ZmMPK5, in senescence and recovery from low-temperature stress in maize. *Molecular and General Genetics* **262**:534–542.
- Beyene G. (2006) Two new cysteine proteinases with specific expression patterns in mature and senescent tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves. *Journal of Experimental Botany* **57**:1431–1443.
- Bhalerao R. (2003) Gene expression in autumn Leaves. *Plant Physiology* **131**:430–442.
- Bingham I.J., Blake J., Foulkes M.J., Spink J. (2007) Is barley yield in the UK sink limited? *Field Crops Research* **101**:198–211.
- Bossmann B., Knoetzel J., Jansson S. (1997) Screening of chlorina mutants of barley (*Hordeum vulgare* L.) with antibodies against light-harvesting proteins of PS I and PS II: Absence of specific antenna proteins. *Photosynthesis Research* **52**:127–136.
- Brandner S.C., Hölzer R., Feller U. (1998) Influence of nitrogen deficiency on senescence and the amounts of RNA and proteins in wheat leaves. *Physiologia Plantarum* **102**:192–200.
- Breeze E., Harrison E., McHattie S., Hughes L., Hickman R., Hill C., Kiddle S., Kim Y.-S., Penfold C.A., Jenkins D., Zhang C., Morris K., Jenner C., Jackson S., Thomas B., Tabrett A., Legaie R., Moore J.D., Wild D.L., Ott S., Rand D., Beynon J., Denby K., Mead A., Buchanan-Wollaston V. (2011) High-resolution temporal profiling of transcripts during *Arabidopsis* leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. *Plant Cell* **23**:873–894.
- Brockerhoff H. (2015) Entwicklungsstadien im Getreide. Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen
- Brusslan J.A., Rus Alvarez-Canterbury A.M., Nair N.U., Rice J.C., Hitchler M.J., Pellegrini M. (2012) Genome-wide evaluation of histone methylation changes associated with leaf senescence in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* **7**:e33151–13.

- 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., Leaver C.J. (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.
- Bundessortenamt (2016) *Blatt für Sortenwesen*. **49**:1–70.
- Camp den R.G.L.O., Przybyla D., Ochsenbein C., Laloi C., Kim C., Danon A., Wagner D., Hideg E., Göbel C., Feussner I., Nater M., Apel K. (2003) Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **15**:2320–2332.
- Capitani M., Sallese M. (2009) The KDEL receptor: New functions for an old protein. *FEBS Letters* **583**:3863–3871.
- Carrion C.A., Costa M.L., Martinez D.E., Mohr C., Humbeck K., Guamet J.J. (2013) In vivo inhibition of cysteine proteases provides evidence for the involvement of “senescence-associated vacuoles” in chloroplast protein degradation during dark-induced senescence of tobacco leaves. *Journal of Experimental Botany* **64**:4967–4980.
- Carter C. (2004) The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *The Plant Cell* **16**:3285–3303.
- Casey J.R., Grinstein S., Orlowski J. (2010) Sensors and regulators of intracellular pH. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**:50–61.
- Chen W., Provart N.J., Glazebrook J., Katagiri F., Chang H.-S., Eulgem T., Mauch F., Luan S., Zou G., Whitham S.A., Budworth P.R., Tao Y., Xie Z., Chen X., Lam S., Kreps J.A., Harper J.F., Si-Ammour A., Mauch-Mani B., Heinlein M., Kobayashi K., Hohn T., Dangl J.L., Wang X., Zhu T. (2002) Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *The Plant Cell* **14**:559–574.
- Chen X., Liu J., Lin G., Wang A., Wang Z., Lu G. (2013) Overexpression of AtWRKY28 and AtWRKY75 in *Arabidopsis* enhances resistance to oxalic acid and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Cell Reports* **32**:1589–1599.
- Cheng C., Krishnakumar V., Chan A., Schobel S. (2016) Araport11: a complete reannotation of the *Arabidopsis thaliana* reference genome. *bioRxiv*
- Chiba A., Ishida H., Nishizawa N.K., Makino A., Mae T. (2003) Exclusion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts by specific bodies in naturally senescing leaves of wheat. *Plant and Cell Physiology* **44**:914–921.
- Christ B., Hörtensteiner S. (2013) Mechanism and significance of chlorophyll breakdown. *Journal of Plant Growth Regulation* **33**:4–20.
- Christiansen M.W., 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.
- Christiansen M.W., Holm P.B., Gregersen P.L. (2011) Characterization of barley (*Hordeum vulgare* L.) NAC transcription factors suggests conserved functions compared to both monocots and dicots. *BMC Research Notes* **4**:302.
- Consortium T.I.B.G.S. (2013) A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* **491**:711–716.
- Costa M.L., Martinez D.E., Gomez F.M., Carrión C.A., Guamet J.J. (2013) Chloroplast protein degradation: Involvement of senescence-associated vacuoles. In: Biswal B, Krupinska K, Biswal UC (eds) *Plastid development in leaves during growth and senescence*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 417–433.

- Criado M.V., Roberts I.N., Echeverria M., Barneix A.J. (2007) Plant growth regulators and induction of leaf senescence in nitrogen-deprived wheat plants. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**:301–307.
- Dai N., Schaffer A., Petreikov M., Shahak Y., Giller Y., Ratner K., Levine A., Granot D. (1999) Overexpression of Arabidopsis hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *The Plant Cell* **11**:1253–1266.
- Davies P.J., Gan S. (2012) Towards an integrated view of monocarpic plant senescence. *Russian Journal of Plant Physiology* **59**:467–478.
- De Michele R., Formentin E., Todesco M., Toppo S., Carimi F., Zottini M., Barizza E., Ferrarini A., Delledonne M., Fontana P., Schiavo Lo F. (2009) Transcriptome analysis of *Medicago truncatula* leaf senescence: similarities and differences in metabolic and transcriptional regulations as compared with Arabidopsis, nodule senescence and nitric oxide signalling. *New Phytologist* **181**:563–575.
- Diaz C., Purdy S., Christ A., Morot-Gaudry J.-F., Wingler A., Masclaux-Daubresse C. (2005) Characterization of markers to determine the extent and variability of leaf senescence in Arabidopsis. A metabolic profiling approach. *Plant Physiology* **138**:898–908.
- Diaz-Mendoza M., Velasco-Arroyo B., González-Melendi P., Martínez M., Diaz I.I. (2014) C1A cysteine protease-cystatin interactions in leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **65**:3825–3833.
- Distelfeld A., Avni R., Fischer A.M. (2014) Senescence, nutrient remobilization, and yield in wheat and barley. *Journal of Experimental Botany* **65**:3783–3798.
- Distelfeld A., Korol A., Dubcovsky J., Uauy C., Blake T. (2008) Colinearity between the barley grain protein content (GPC) QTL on chromosome arm 6HS and the wheat Gpc-B1 region. *Molecular Breeding* **22**:25–38.
- Drake R., John I., Farrell A., Cooper W., Schuch W., Grierson D. (1996) Isolation and analysis of cDNAs encoding tomato cysteine proteases expressed during leaf senescence. *Plant Molecular Biology* **30**:755–767.
- Druka A., Muehlbauer G.J., Druka I., Caldo R.A., Baumann U., Rostoks N., Schreiber A., Wise R.P., Close T.J., Kleinhofs A., Graner A., Schulman A.H., Langridge P., Sato K., Hayes P., Mcnicol J., Marshall D.F., Waugh R. (2006) An atlas of gene expression from seed to seed through barley development. *Functional & Integrative Genomics* **6**:202–211.
- Duckert P., Brunak S., Blom N. (2004) Prediction of proprotein convertase cleavage sites. *Protein Engineering, Design & Selection* **17**:107–112.
- Eason J.R., West P.J., Brummell D.A., Watson L.M., Somerfield S.D., McLachlan A.R.G. (2014) Overexpression of the protease inhibitor BoCPI-1 in broccoli delays chlorophyll loss after harvest and causes down-regulation of cysteine protease gene expression. *Postharvest Biology and Technology* **97**:23–31.
- Egle K., Beschow H., Merbach W. (2015) Nitrogen allocation in barley: Relationships between amino acid transport and storage protein synthesis during grain filling. *Canadian Journal of Plant Science* **95**:451–459.
- Escobar-Gutiérrez A.J., Combe L. (2012) Senescence in field-grown maize: From flowering to harvest. *Field Crops Research* **134**:47–58.
- Feller U., Anders I., Mae T. (2008) Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. *Journal of Experimental Botany* **59**:1615–1624.

- Ferro M., Brugière S., Salvi D., Seigneurin-Berny D., Court M., Moyet L., Ramus C., Miras S., Mellal M., Le Gall S., Kieffer-Jaquinod S., Bruley C., Garin J., Joyard J., Masselon C., Rolland N. (2010) AT_CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins. *Molecular & Cellular Proteomics* **9**:1063–1084.
- Fischer A.M. (2012) The complex regulation of senescence. *Critical Reviews in Plant Sciences* **31**:124–147.
- Forsberg J., Strom J., Kieselbach T., Larsson H., Alexciev K., Engstrom A., Akerlund H.-E. (2005) Protease activities in the chloroplast capable of cleaving an LHClI N-terminal peptide. *Physiologia Plantarum* **123**:21–29.
- Funk V., Kositsup B., Zhao C., Beers E.P. (2002) The Arabidopsis xylem peptidase XCP1 is a tracheary element vacuolar protein that may be a papain ortholog. *Plant Physiology* **128**:84–94.
- Gadjev I., Vanderauwera S., Gechev T.S., Laloi C. (2006) Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology* **141**:436–445.
- Gan S., Amasino R.M. (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270**:1986–1988.
- García-Lorenzo M., Sjödin A., Jansson S., Funk C. (2006) Protease gene families in *Populus* and Arabidopsis. *BMC Plant Biology* **6**:30.
- Gepstein S. (1988) Photosynthesis. In: Noodén LD (ed) *Senescence and aging in plants*. Elsevier, Amsterdam, pp 85–109.
- Gepstein S. (2004) Leaf senescence - not just a “wear and tear” phenomenon. *Genome Biology* **5**:1.
- Gepstein S., Sabehi G., Carp M.-J., Hajouj T., Neshor M.F.O., Yariv I., Dor C., Bassani M. (2003) Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. *The Plant Journal* **36**:629–642.
- Ghosh S., Mahoney S.R., Penterman J.N., Peirson D., Dumbroff E.B. (2001) Ultrastructural and biochemical changes in chloroplasts during *Brassica napus* senescence. *Plant Physiology and Biochemistry* **39**:777–784.
- Gietl C., Schmid M. (2001) Ricinosomes: an organelle for developmentally regulated programmed cell death in senescing plant tissues. *Naturwissenschaften* **88**:49–58.
- Glass A. (2003) Nitrogen use efficiency of crop plants: physiological constraints upon nitrogen absorption. *Critical Reviews in Plant Sciences* **22**:453–470.
- Godfray H.C.J., Beddington J.R., Crute I.R., Haddad L., Lawrence D., Muir J.F., Pretty J., Robinson S., Thomas S.M., Toulmin C. (2010) Food security: The challenge of feeding 9 billion people. *Science* **327**:812–818.
- Gomord V., Denmat L.A., Lainé A.F., Satiat-Jeunemaitre B., Hawes C., Faye L. (1997) The C-terminal HDEL sequence is sufficient for retention of secretory proteins in the endoplasmic reticulum (ER) but promotes vacuolar targeting of proteins that escape the ER. *The Plant Journal* **11**:313–325.
- Gomord V., Wee E., Faye L. (1999) Protein retention and localization in the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Biochimie* **81**:607–618.
- Gonzalez A., Bermejo V., Gimeno B.S. (2010) Effect of different physiological traits on grain yield in barley grown under irrigated and terminal water deficit conditions. *Journal of Agricultural Science* **148**:319–328.
- Grant E.H., Fujino T., Beers E.P., Brunner A.M. (2010) Characterization of NAC domain transcription factors implicated in control of vascular cell differentiation in Arabidopsis and *Populus*. *Planta* **232**:337–352.

- Gregersen P.L., Holm P.B. (2006) Transcriptome analysis of senescence in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnology Journal* **5**:192–206.
- Gregersen P.L., Culetic A., Boschian L., Krupinska K. (2013) Plant senescence and crop productivity. *Plant Molecular Biology* **82**:603–622.
- Gregersen P.L., Holm P.B., Krupinska K. (2008) Leaf senescence and nutrient remobilisation in barley and wheat. *Plant Biology* **10**:37–49.
- Groover A., Jones A. (1999) Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. *Plant Physiology* **119**:375–384.
- Grudkowska M., Zagdanska B. (2004) Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica* **51**:609–624.
- Gu C., Shabab M., Strasser R., Wolters P.J., Shindo T., Niemer M., Kaschani F., Mach L., Van der Hoorn R.A.L. (2012) Post-translational regulation and trafficking of the granulin-containing protease RD21 of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* **7**:e32422.
- Guiboileau A., Masclaux-Daubresse C. (2012) Autophagic processes in plants: mechanisms, regulation and function. *Comptes Rendus Biologies* **335**:375–388.
- Guiboileau A., Sormani R., Meyer C., Masclaux-Daubresse C. (2010) Senescence and death of plant organs: nutrient recycling and developmental regulation. *Comptes Rendus Biologies* **333**:382–391.
- Guo Y. (2013) Towards systems biological understanding of leaf senescence. *Plant Molecular Biology* **82**:519–528.
- Guo Y., Gan S. (2006) AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *The Plant Journal* **46**:601–612.
- Guo Y., Cai Z., Gan S. (2004) Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence. *Plant Cell and Environment* **27**:521–549.
- Guo Z., Kan Y., Chen X., Li D., Wang D. (2004) Characterization of a rice WRKY gene whose expression is induced upon pathogen attack and mechanical wounding. *Acta Botanica Sinica* **46**:955–964.
- Gutierrez-Carbonell E., Takahashi D., Lattanzio G., Rodríguez-Celma J., Kehr J., Soll J., Philippar K., Uemura M., Abadía J., López-Millán A.F. (2014) The distinct functional roles of the inner and outer chloroplast envelope of Pea (*Pisum sativum*) as revealed by proteomic approaches. *Journal of Proteome Research* **13**:2941–2953.
- Haussühl K., Andersson B., Adamska I. (2001) A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II. *The EMBO Journal* **20**:713–722.
- He X., Kermode A.R. (2003) Proteases associated with programmed cell death of megagametophyte cells after germination of white spruce (*Picea glauca*) seeds. *Plant Molecular Biology* **52**:729–744.
- He Y., Tang W., Swain J.D., Green A.L., Jack T.P., Gan S. (2001) Networking senescence-regulating pathways by using Arabidopsis enhancer trap lines. *Plant Physiology* **126**:707–716.
- Heidlebaugh N.M., Trethewey B.R., Jukanti A.K., Parrott D.L., Martin J.M., Fischer A.M. (2008) Effects of a barley (*Hordeum vulgare*) chromosome 6 grain protein content locus on whole-plant nitrogen reallocation under two different fertilisation regimes. *Functional Plant Biology* **35**:619.
- Hensel L.L., Grbić V., Baumgarten D.A., Bleecker A.B. (1993) Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in arabidopsis. *The Plant Cell* **5**:553–564.

- Hidema J., Makino A., Kurita Y., Mae T., Ojima K. (1992) Changes in the levels of chlorophyll and light-harvesting chlorophyll a/b protein of PS II in rice leaves aged under different irradiances from full expansion through senescence. *Plant and Cell Physiology* **33**:1209–1214.
- Hierl G., Höwing T., Isono E., Lottspeich F., Gietl C. (2014) Ex vivo processing for maturation of Arabidopsis KDEL-tailed cysteine endopeptidase 2 (AtCEP2) pro-enzyme and its storage in endoplasmic reticulum derived organelles. *Plant Molecular Biology* **84**:605–620.
- Hilditch P.I., Thomas H., Thomas B.J., Rogers L.J. (1989) Leaf senescence in a non-yellowing mutant of *Festuca pratensis*: proteins of photosystem II. *Planta* **177**:265–272.
- Hinderhofer K., Zentgraf U. (2001) Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence. *Planta* **213**:469–473.
- Hirel B., Le Gouis J., Ney B., Gallais A. (2007) The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *Journal of Experimental Botany* **58**:2369–2387.
- Hörtensteiner S., Feller U. (2002) Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *Journal of Experimental Botany* **53**:927–937.
- Hörtensteiner S., Kräutler B. (2011) Chlorophyll breakdown in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta* **1807**:977–988.
- Huffaker R.C. (1990) Proteolytic activity during senescence of plants. *New Phytologist* **116**:199–231.
- Humbeck K. (2013) Epigenetic and small RNA regulation of senescence. *Plant Molecular Biology* **82**:529–537.
- Humbeck K., Klopstech K., Krupinska K. (1994) Expression of early light-inducible proteins in flag leaves of field-grown barley. *Plant Physiology* **105**:1217–1222.
- Humbeck K., Quast S., Krupinska K. (1996) Functional and molecular changes in the photosynthetic apparatus during senescence of flag leaves from field-grown barley plants. *Plant Cell and Environment* **19**:337–344.
- Hurkman W.J. (1979) Ultrastructural changes of chloroplasts in attached and detached, aging primary wheat leaves. *American Journal of Botany* **66**:64–70.
- Ishida H., Yoshimoto K. (2008) Chloroplasts are partially mobilized to the vacuole by autophagy. *Autophagy* **4**:961–962.
- Ishida H., Shimizu S., Makino A., Mae T. (1998) Light-dependent fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in chloroplasts isolated from wheat leaves. *Planta* **204**:305–309.
- Jansson S., Thomas H. (2008) Senescence: developmental program or timetable? *New Phytologist* **179**:575–579.
- Jaspers P., Blomster T., Brosché M., Salojärvi J., Ahlfors R., Vainonen J.P., Reddy R.A., Immink R., Angenent G., Turck F., Overmyer K., Kangasjärvi J. (2009) Unequally redundant RCD1 and SRO1 mediate stress and developmental responses and interact with transcription factors. *The Plant Journal* **60**:268–279.
- Järvi S., Gollan P.J., Aro E.-M. (2012) Understanding the roles of the thylakoid lumen in photosynthesis regulation. *Frontiers in Plant Science* **4**:434–434.
- Jenkins G.I., Woolhouse H.W. (1981) Photosynthetic electron transport during senescence of the primary leaves of *Phaseolus vulgaris* L.: I. non-cyclic electron transport. *Journal of Experimental Botany* **32**:467–478.

- Jenkins G.I., Baker N.R., Woolhouse H.W. (1981) Changes in chlorophyll content and organization during senescence of the primary leaves of *Phaseolus vulgaris* L. in relation to photosynthetic electron transport. *Journal of Experimental Botany* **32**:1009–1020.
- Jiang L., Rogers J.C. (1999) Functional analysis of a Golgi-localized Kex2p-like protease in tobacco suspension culture cells. *The Plant Journal* **18**:23–32.
- Jibrán R., Hunter D., Dijkwel P. (2013) Hormonal regulation of leaf senescence through integration of developmental and stress signals. *Plant Molecular Biology* **82**:547–561.
- Jin J., Zhang H., Kong L., Gao G., Luo J. (2014) PlantTFDB 3.0: a portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors. *Nucleic Acids Research* **42**:D1182–7.
- John C.F., Morris K., Jordan B.R., Thomas B., Mackerness S.A.H. (2001) Ultraviolet-B exposure leads to up-regulation of senescence-associated genes in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **52**:1367–1373.
- Jukanti A.K., Fischer A.M. (2008) A high-grain protein content locus on barley (*Hordeum vulgare*) chromosome 6 is associated with increased flag leaf proteolysis and nitrogen remobilization. *Physiologia Plantarum* **132**:426–439.
- Jukanti A.K., Heidlebaugh N.M., Parrott D.L., Fischer I.A., McInnerney K., Fischer A.M. (2008) Comparative transcriptome profiling of near-isogenic barley (*Hordeum vulgare*) lines differing in the allelic state of a major grain protein content locus identifies genes with possible roles in leaf senescence and nitrogen reallocation. *New Phytologist* **177**:333–349.
- Juvany M., Müller M., Munné-Bosch S. (2013) Photo-oxidative stress in emerging and senescing leaves: a mirror image? *Journal of Experimental Botany* **64**:3087–3098.
- Kamal A.H.M., Cho K., Komatsu S., Uozumi N., Choi J.-S., Woo S.H. (2011) Towards an understanding of wheat chloroplasts: a methodical investigation of thylakoid proteome. *Molecular Biology Reports* **39**:5069–5083.
- Kant S., Bi Y.-M., Rothstein S.J. (2011) Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. *Journal of Experimental Botany* **62**:1499–1509.
- Karrer K.M., Peiffer S.L., DiTomas M.E. (1993) Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**:3063–3067.
- Kato Y., Murakami S., Yamamoto Y., Chatani H., Kondo Y., Nakano T., Yokota A., Sato F. (2004) The DNA-binding protease, CND41, and the degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in senescent leaves of tobacco. *Planta* **220**:97–104.
- Kato Y., Sakamoto W. (2013) Plastid protein degradation during leaf development and senescence: Role of proteases and chaperones. In: Biswal B, Krupinska K, Biswal UC (eds) *Plastid development in leaves during growth and senescence*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 307–335.
- Kato Y., Yamamoto Y., Murakami S., Sato F. (2005) Post-translational regulation of CND41 protease activity in senescent tobacco leaves. *Planta* **222**:643–651.
- Kelly M.O., Davies P.J. (1986) Genetic and photoperiodic control of the relative rates of reproductive and vegetative development in peas. *Annals of Botany* **58**:13–21.
- Khanna-Chopra R. (2012) Leaf senescence and abiotic stresses share reactive oxygen species-mediated chloroplast degradation. *Protoplasma* **249**:469–481.
- Kim C., Apel K. (2013) Singlet oxygen-mediated signaling in plants: moving from flu to wild type reveals an increasing complexity. *Photosynthesis Research* **116**:455–464.

- Kim C., Meskauskiene R., Zhang S., Lee K.P., Lakshmanan Ashok M., Blajecka K., Herrfurth C., Feussner I., Apel K. (2012) Chloroplasts of *Arabidopsis* are the source and a primary target of a plant-specific programmed cell death signaling pathway. *Plant Cell* **24**:3026–3039.
- Kim J., Lee H., Lee H.N., Kim S.H., Shin K.D., Chung T. (2014) Autophagy-related proteins are required for degradation of peroxisomes in *Arabidopsis* hypocotyls during seedling growth. *Plant Cell* **25**:4956–4966.
- Kjaersgaard T., Jensen M.K., Christiansen M.W., Gregersen P., Kragelund B.B., Skriver K. (2011) Senescence-associated barley NAC (NAM, ATAF1,2, CUC) transcription factor interacts with radical-induced cell death 1 through a disordered regulatory domain. *Journal of Biological Chemistry* **286**:35418–35429.
- Kleber-Janke T., 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.
- Kleffmann T., Russenberger D., Zychlinski von A., Christopher W., Sjölander K., Grissem W., Baginsky S. (2004) The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. *Current Biology* **14**:354–362.
- Koeslin-Findeklee F., Rizi V.S., Becker M.A., Parra-Londono S., Arif M., Balazadeh S., Mueller-Roeber B., Kunze R., Horst W.J. (2015) Transcriptomic analysis of nitrogen starvation- and cultivar-specific leaf senescence in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant science* **233**:174–185.
- Kohl S., Hollmann J., Blattner F.R., Radchuk V., Andersch F., Steuernagel B., Schmutzer T., Scholz U., Krupinska K., Weber H., Weschke W. (2012) A putative role for amino acid permeases in sink-source communication of barley tissues uncovered by RNA-seq. *BMC Plant Biology* **12**:1–1.
- Kohl S., Hollmann J., Erban A., Kopka J., Riewe D., Weschke W., Weber H. (2015) Metabolic and transcriptional transitions in barley glumes reveal a role as transitory resource buffers during endosperm filling. *Journal of Experimental Botany* **66**:1397–1411.
- Kong L., Wang F., Si J., Feng B., Zhang B., Li S., Wang Z. (2013) Increasing in ROS levels and callose deposition in peduncle vascular bundles of wheat (*Triticum aestivum* L.) grown under nitrogen deficiency. *Journal of Plant Interactions* **8**:109–116.
- Kramer D.M., Sacksteder C.A., Cruz J.A. (1999) How acidic is the lumen? *Photosynthesis Research* **60**:151–163.
- Krieger-Liszkay A., Trösch M., Krupinska K. (2015) Generation of reactive oxygen species in thylakoids from senescing flag leaves of the barley varieties Lomerit and Carina. *Planta* **241**:1497–1508.
- Krupinska K. (2006) Fate and activities of plastids during leaf senescence. *Advances in Photosynthesis and Respiration* **23**:433–449.
- Kura-Hotta M., Satoh K., Katoh S. (1987) Relationship between photosynthesis and chlorophyll content during leaf senescence of rice seedlings. *Plant and Cell Physiology* **28**:1321–1329.
- Lee T.A., Wetering S.W.V., Brusslan J.A. (2013) Stromal protein degradation is incomplete in *Arabidopsis thaliana* autophagy mutants undergoing natural senescence. *BMC Research Notes* **6**:1–1.
- Lemaître T., Gaufichon L., Boutet-Mercey S., Christ A., Masclaux-Daubresse C. (2008) Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in *Arabidopsis thaliana* Wassileskija accession. *Plant and Cell Physiology* **49**:1056–1065.
- Leopold A.C. (1961) Senescence in Plant Development: The death of plants or plant parts may be of positive ecological or physiological value. *Science* **134**:1727–1732.

- LfL Bayern (2004) Abstammungskatalog der Gerstensorten. **1**:1–57.
- Lichtenthaler H.K. (1969) Die Plastoglobuli von Spinat, ihre Größe und Zusammensetzung während der Chloroplastendegeneration. *Protoplasma* **68**:315–326.
- Lim P.O., Nam H.G. (2007) Aging and senescence of the leaf organ. *Journal of Plant Biology* **50**:291–300.
- Lim P.O., Kim H.J., Nam H.G. (2007) Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology* **58**:115–136.
- Lin J.-F., Wu S.-H. (2004) Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal* **39**:612–628.
- Lin M., Pang C., Fan S., Song M., Wei H., Yu S. (2015) Global analysis of the *Gossypium hirsutum* L. transcriptome during leaf senescence by RNA-Seq. *BMC Plant Biology* **15**:43.
- Lin W., Wittenbach V.A. (1981) Subcellular localization of proteases in wheat and corn mesophyll protoplasts. *Plant Physiology* **67**:969–972.
- Lindahl M., Spetea C., Hundal T., Oppenheim A.B., Adam Z., Andersson B. (2000) The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *The Plant Cell* **12**:419–431.
- Lindahl M., Yang D.H., Andersson B. (1995) Regulatory proteolysis of the major light-harvesting chlorophyll *a/b* protein of photosystem II by a light-induced membrane-associated enzymic system. *European Journal of Biochemistry* **231**:503–509.
- Liu L., White M.J., MacRae T.H. (1999) Transcription factors and their genes in higher plants. *European Journal of Biochemistry* **262**:247–257.
- Liu L., Zhou Y., Szczerba M.W., Li X., Lin Y. (2010) Identification and application of a rice senescence-associated promoter. *Plant Physiology* **153**:1239–1249.
- Liu L., Zhou Y., Zhou G., Ye R., Zhao L., Li X., Lin Y. (2008) Identification of early senescence-associated genes in rice flag leaves. *Plant Molecular Biology* **67**:37–55.
- Lohman K.N., Gan S., Amasino J., Amasino R.M., Manorama C. (1994) Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **92**:322–328.
- Lopes M.S., Cortadellas N., Kichey T., Dubois F., Habash D.Z., Araus J.L. (2006) Wheat nitrogen metabolism during grain filling: comparative role of glumes and the flag leaf. *Planta* **225**:165–181.
- Lopez-Fernandez M.P., Maldonado S. (2013) Ricinosomes provide an early indicator of suspensor and endosperm cells destined to die during late seed development in quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Annals of Botany* **112**:1253–1262.
- Maillard A., Diquélou S., Billard V., Laîné P., Garnica M., Prudent M., Garcia-Mina J.-M., Yvin J.-C., Ourry A. (2015) Leaf mineral nutrient remobilization during leaf senescence and modulation by nutrient deficiency. *Frontiers in Plant Science* **6**:685.
- Martienssen R. (1997) Cell death: Fatal induction in plants. *Current Biology* **7**:R534–R537.
- Martin S.H.C. (1884) Papain-digestion. *Journal of Physiology* **5**:213–230.
- Martinez D.E., Bartoli C.G., Grbić V., Guiamet J.J. (2007) Vacuolar cysteine proteases of wheat (*Triticum aestivum* L.) are common to leaf senescence induced by different factors. *Journal of Experimental Botany* **58**:1099–1107.
- Martinez D.E., Costa M.L., Guiamet J.J. (2008) Senescence-associated degradation of chloroplast proteins inside and outside the organelle. *Plant Biology* **10**:15–22.

- Martínez M., Diaz I.I. (2007) The origin and evolution of plant cystatins and their target cysteine proteinases indicate a complex functional relationship. *BMC Evolutionary Biology* **8**:198–198.
- Martínez M., Cambra I., Carrillo L., Diaz-Mendoza M., Diaz I.I. (2009) Characterization of the entire cystatin gene family in barley and their target cathepsin L-like cysteine-proteases, partners in the hordein mobilization during seed germination. *Plant Physiology* **151**:1531–1545.
- Martre P., Jamieson P.D., Semenov M.A., Zyskowski R.F., Porter J.R., Triboi E. (2006) Modelling protein content and composition in relation to crop nitrogen dynamics for wheat. *European Journal of Agronomy* **25**:138–154.
- Masclaux-Daubresse C., Chardon F. (2011) Exploring nitrogen remobilization for seed filling using natural variation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **62**:2131–2142.
- Masclaux-Daubresse C., Daniel-Vedele F., Dechorgnat J., Chardon F., Gaufichon L., Suzuki A. (2010) Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* **105**:1141–1157.
- Masclaux-Daubresse C., Reisdorf-Cren M., Orsel M. (2008) Leaf nitrogen remobilisation for plant development and grain filling. *Plant Biology* **10**:23–36.
- Masclaux-Daubresse C., Valadier M.H., Brugière N., Morot-Gaudry J.F., Hirel B. (2000) Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* **211**:510–518.
- McLellan H., Gilroy E.M., Yun B.-W., Birch P.R.J., Loake G.J. (2009) Functional redundancy in the *Arabidopsis* Cathepsin B gene family contributes to basal defence, the hypersensitive response and senescence. *New Phytologist* **183**:408–418.
- Melis A. (1991) Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. *BBA - Bioenergetics* **1058**:87–106.
- Miao Y., Laun T., Zimmermann P., Zentgraf U. (2004) Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **55**:853–867.
- Miersch I., Heise J., Zelmer I., Humbeck K. (2000) Differential degradation of the photosynthetic apparatus during leaf senescence in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Biology* **2**:618–623.
- Miller J.D., Arteca R.N., Pell E.J. (1999) Senescence-associated gene expression during ozone-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **120**:1015–1024.
- Minamikawa T., Toyooka K., Okamoto T., Hara-Nishimura I., Nishimura M. (2001) Degradation of ribulose-bisphosphate carboxylase by vacuolar enzymes of senescing French bean leaves: Immunocytochemical and ultrastructural observations. *Protoplasma* **218**:144–153.
- Mitsuhashi W., Minamikawa T. (1989) Synthesis and posttranslational activation of sulfhydryl-endopeptidase in cotyledons of germinating *Vigna mungo* seeds. *Plant Physiology* **89**:274–279.
- Mizushima N., Noda T., Yoshimori T., Tanaka Y., Ishii T., George M.D., Klionsky D.J., Ohsumi M., Ohsumi Y. (1998) A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* **395**:395–398.
- Mizushima N., Yoshimori T., Ohsumi Y. (2011) The role of ATG proteins in autophagosome formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **27**:107–132.
- Mollenhauer H.H., Totten C. (1970) Studies on seeds: v. microbodies, glyoxysomes, and ricinosomes of castor bean endosperm. *Plant Physiology* **46**:794–799.
- Montesinos J.C., Pastor-Cantizano N., Robinson D.G., Marcote M.J., Aniento F. (2014) *Arabidopsis* p24δ5 and p24δ9 facilitate coat protein I-dependent transport of the K/HDEL receptor ERD2 from the golgi to the endoplasmic reticulum. *The Plant Journal* **80**:1014–1030.

- Moschen S., Luoni S.B., Di Rienzo J.A., Del Pilar Caro M., Tohge T., Watanabe M., Hollmann J., Gonzalez S., Rivarola M., García-García F., Dopazo J., Hopp H.E., Hoefgen R., Fernie A.R., Paniego N., Fernandez P., Heinz R.A. (2016) Integrating transcriptomic and metabolomic analysis to understand natural leaf senescence in sunflower. *Plant Biotechnology Journal* **14**:1–16.
- Mothes K. (1960) Über das Altern der Blätter und die Möglichkeit ihrer Wiederverjüngung. *Naturwissenschaften* **47**:337–351.
- Mulisch M., Krupinska K. (2013) Ultrastructural analyses of senescence associated dismantling of chloroplasts revisited. In: Biswal B, Krupinska K, Biswal UC (eds) *Plastid development in leaves during growth and senescence*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 307–335.
- Mulisch M., Asp T., Krupinska K., Hollmann J., Holm P.B. (2013) The Tr-cp 14 cysteine protease in white clover (*Trifolium repens*) is localized to the endoplasmic reticulum and is associated with programmed cell death during development of tracheary elements. *Protoplasma* **250**:623–629.
- Mullineaux P.M., Baker N.R. (2010) Oxidative stress: antagonistic signaling for acclimation or cell death? *Plant Physiology* **154**:521–525.
- Munné-Bosch S. (2008) Do perennials really senesce? *Trends in Plant Science* **13**:216–220.
- Munné-Bosch S., L A. (2002) Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts. *Planta* **214**:608–615.
- Munro S., Pelham H.R. (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**:899–907.
- Murakami S., Kondo Y., Nakano T., Sato F. (2000) Protease activity of CND41, a chloroplast nucleoid DNA-binding protein, isolated from cultured tobacco cells. *FEBS Letters* **468**:15–18.
- Müntz K. (2007) Protein dynamics and proteolysis in plant vacuoles. *Journal of Experimental Botany* **58**:2391–2407.
- Nakabayashi K., Ito M., Kiyosue T., Shinozaki K., Watanabe A. (1999) Identification of *c/p* genes expressed in senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant and Cell Physiology* **40**:504–514.
- Nakano T., Murakami S., Shoji T., Yoshida S., Yamada Y., Sato F. (1997) A novel protein with DNA binding activity from tobacco chloroplast nucleoids. *The Plant Cell* **9**:1673–1682.
- Napier R.M., Fowke L.C., Hawes C., Lewis M., Pelham H.R. (1992) Immunological evidence that plants use both HDEL and KDEL for targeting proteins to the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science* **102**:261–271.
- Nath K., Phee B.-K., Jeong S., Lee S.Y., Tateno Y., Allakhverdiev S.I., Lee C.-H., Nam H.G. (2013) Age-dependent changes in the functions and compositions of photosynthetic complexes in the thylakoid membranes of *Arabidopsis thaliana*. *Photosynthesis Research* **117**:547–556.
- Nishimura K., Kato Y., Sakamoto W. (2016) Chloroplast proteases: Updates on proteolysis within and across suborganellar compartments. *Plant Physiology* **171**:2280–2293.
- Noh Y.-S., Amasino R.M. (1999) Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of SAG12. *Plant Molecular Biology* **41**:181–194.
- Noodén L.D. (2013) Defining senescence and death in photosynthetic tissues. In: Biswal B, Krupinska K, Biswal UC (eds) *Plastid development in leaves during growth and senescence*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 283–306.
- Noodén L.D., Guiamet J.J., John I. (1997) Senescence mechanisms. *Physiologia Plantarum* **101**:746–753.

- Okamoto T. (2003) C-Terminal KDEL sequence of s KDEL-tailed cysteine proteinase (sulfhydryl-endopeptidase) is involved in formation of KDEL vesicle and in efficient vacuolar transport of sulfhydryl-endopeptidase. *Plant Physiology* **132**:1892–1900.
- Okamoto T., Toyooka K., Minamikawa T. (2000) Identification of a membrane-associated cysteine protease with possible dual roles in the endoplasmic reticulum and protein storage vacuole. *Journal of Biological Chemistry* **276**:742–751.
- Ono K., Watanabe A. (1997) Levels of endogenous sugars, transcripts of *rbcS* and *rbcL*, and of RuBisCO protein in senescing sunflower leaves. *Plant and Cell Physiology* **38**:1032–1038.
- Ono K., Nishi Y., Watanabe A., Terashima I. (2001) Possible mechanisms of adaptive leaf senescence. *Plant Biology* **3**:234–243.
- Ono K., Terashima I., Watanabe A. (1996) Interaction between nitrogen deficit of a plant and nitrogen content in the old leaves. *Plant and Cell Physiology* **37**:1083–1089.
- Otegui M.S., Noh Y.-S., Martinez D.E., Vila Petroff M.G., Staehelin L.A., Amasino R.M., Guiamet J.J. (2005) Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of Arabidopsis and soybean. *The Plant Journal* **41**:831–844.
- Pagny S., Lerouge P., Faye L., Gomord V. (1999) Signals and mechanisms for protein retention in the endoplasmic reticulum. *Journal of Experimental Botany* **50**:157–164.
- Palenchar P.M., Kouranov A., Lejay L.V., Coruzzi G.M. (2004) Genome-wide patterns of carbon and nitrogen regulation of gene expression validate the combined carbon and nitrogen (CN)-signaling hypothesis in plants. *Genome Biology* **5**:R91.
- Park J.-H., Oh S.A., Kim Y.H., Woo H.R., Nam H.G. (1998) Differential expression of senescence-associated mRNAs during leaf senescence induced by different senescence-inducing factors in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* **37**:445–454.
- Parrott D.L., Martin J.M., 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.
- Parrott D.L., McInerney K., Feller U., Fischer A.M. (2007) Steam-girdling of barley (*Hordeum vulgare*) leaves leads to carbohydrate accumulation and accelerated leaf senescence, facilitating transcriptomic analysis of senescence-associated genes. *New Phytologist* **176**:56–69.
- Parrott D.L., Yang L., Shama L., Fischer A.M. (2005) Senescence is accelerated, and several proteases are induced by carbon “feast” conditions in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Planta* **222**:989–1000.
- Paul M.J., Driscoll S.P. (1997) Sugar repression of photosynthesis: the role of carbohydrates in signalling nitrogen deficiency through source:sink imbalance. *Plant Cell and Environment* **20**:110–116.
- Paul M.J., Foyer C.H. (2001) Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **52**:1383–1400.
- Peltier J.B., Ytterberg A.J., Sun Q., van Wijk K.J. (2004) New functions of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* revealed by a simple, fast, and versatile fractionation strategy. *Journal of Biological Chemistry* **279**:49367–49383.
- Penfold C.A., Buchanan-Wollaston V. (2014) Modelling transcriptional networks in leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **65**:3859–3873.

- Peoples M.B., Dalling M.J. (1988) The interplay between proteolysis and amino acid metabolism during senescence and nitrogen reallocation. In: Noodén LD (ed) *Senescence and aging in plants*. Elsevier, pp 181–217.
- Peterson L.W., Huffaker R.C. (1975) Loss of ribulose 1,5-diphosphate carboxylase and increase in proteolytic activity during senescence of detached primary barley leaves. *Plant Physiology* **55**:1009–1015.
- Pourtau N., Jennings R., Pelzer E., Pallas J., Wingler A. (2006) Effect of sugar-induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in Arabidopsis. *Planta* **224**:556–568.
- Price J., Laxmi A., Martin S.K.S., Jang J.-C. (2004) Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in Arabidopsis. *The Plant Cell* **16**:2128–2150.
- Pruneda-Paz J.L., Breton G., Nagel D.H., Kang S.E., Bonaldi K., Doherty C.J., Ravelo S., Galli M., Ecker J.R., Kay S.A. (2014) A genome-scale resource for the functional characterization of Arabidopsis transcription factors. *Cell Reports* **8**:622–632.
- Rawlings N.D., Barrett A.J. (1993) Evolutionary families of peptidases. *The Biochemical Journal* **290**:205–218.
- Rawlings N.D., Morton F.R., Kok C.Y., Kong J., Barrett A.J. (2008) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research* **36**:D320–5.
- Reape T.J., Molony E.M., McCabe P.F. (2008) Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. *Journal of Experimental Botany* **59**:435–444.
- Reiland S., Messerli G., Baerenfaller K., Gerrits B., Endler A., Grossmann J., Gruissem W., Baginsky S. (2009) Large-Scale Arabidopsis Phosphoproteome Profiling Reveals Novel Chloroplast Kinase Substrates and Phosphorylation Networks. *Plant Physiology* **150**:889–903.
- Richau K.H., Kaschani F., Verdoes M., Pansuriya T.C., Niessen S., Stuber K., Colby T., Overkleeft H.S., Bogyo M., Van der Hoorn R.A.L. (2012) Subclassification and biochemical analysis of plant papain-like cysteine proteases displays subfamily-specific characteristics. *Plant Physiology* **158**:1583–1599.
- Rizhsky L., Liang H., Shuman J., Shulaev V., Davletova S., Mittler R. (2004) When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology* **134**:1683–1696.
- Robatzek S., 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.
- Roberts D.R., Thompson J.E., Dumbroff E.B., Gepstein S., Mattoo A.K. (1987) Differential changes in the synthesis and steady-state levels of thylakoid proteins during bean leaf senescence. *Plant Molecular Biology* **9**:343–353.
- Roberts I.N., Caputo C., Criado M.V., Funk C. (2012) Senescence-associated proteases in plants. *Physiologia Plantarum* **145**:130–139.
- Rumeau D., Peltier G., Cournac L. (2007) Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. *Plant Cell and Environment* **30**:1041–1051.
- Ruuska S.A., Lewis D.C., Kennedy G., Furbank R.T., Jenkins C.L.D., Tabe L.M. (2008) Large scale transcriptome analysis of the effects of nitrogen nutrition on accumulation of stem carbohydrate reserves in reproductive stage wheat. *Plant Molecular Biology* **66**:15–32.
- Sakamoto W. (2006) Protein degradation machineries in plastids. *Annual Review of Plant Biology* **57**:599–621.

- Schaffnit-Chatterjee C. (2009) Lebensmittel – Eine Welt voller Spannung. Deutsche Bank Research:1–44.
- Schaller A. (2004) A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* **220**:183–197.
- Scharrenberg C., Falk J., Quast S., Haussühl K., Humbeck K., Krupinska K. (2003) Isolation of senescence-related cDNAs from flag leaves of field grown barley plants. *Physiologia Plantarum* **118**:278–288.
- Schildhauer J., Wiedemuth K., Humbeck K. (2008) Supply of nitrogen can reverse senescence processes and affect expression of genes coding for plastidic glutamine synthetase and lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase. *Plant Biology* **10**:76–84.
- Schippers J.H. (2015) Transcriptional networks in leaf senescence. *Current Opinion in Plant Biology* **27**:77–83.
- Schippers J.H.M., Schmidt R., Wagstaff C., Jing H.-C. (2015) Living to die and dying to live: The survival strategy behind leaf senescence. *Plant Physiology* **169**:914–930.
- Schmid M., Simpson D., Gietl C. (1999) Programmed cell death in castor bean endosperm is associated with the accumulation and release of a cysteine endopeptidase from ricinosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**:14159–14164.
- Schmid M., Simpson D., Kalousek F., Gietl C. (1998) A cysteine endopeptidase with a C-terminal KDEL motif isolated from castor bean endosperm is a marker enzyme for the ricinosome, a putative lytic compartment. *Planta* **206**:466–475.
- Schmid M., Simpson D.J., Sarioglu H., Lottspeich F., Gietl C. (2001) The ricinosomes of senescing plant tissue bud from the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**:5353–5358.
- Schulze W., Schulze E.-D., Stadler J., Heilmeyer H., Stitt M., Mooney H.A. (1994) Growth and reproduction of *Arabidopsis thaliana* in relation to storage of starch and nitrate in the wild-type and in starch-deficient and nitrate-uptake-deficient mutants. *Plant Cell and Environment* **17**:795–809.
- Senatore A., Trobacher C.P., Greenwood J.S. (2008) Ricinosomes predict programmed cell death leading to anther dehiscence in tomato. *Plant Physiology* **149**:775–790.
- Serrago R.A., Alzueta I., Savin R., Slafer G.A. (2013) Understanding grain yield responses to source–sink ratios during grain filling in wheat and barley under contrasting environments. *Field Crops Research* **150**:42–51.
- Shen J., Zeng Y., Zhuang X., Sun L., Yao X., Pimpl P., Jiang L. (2014) Organelle pH in the *Arabidopsis* endomembrane system. *Molecular Plant* **6**:1419–1437.
- Simm S., Papatotiriou D.G., Ibrahim M., Leisegang M.S., Müller B., Schorge T., Karas M., Mirus O., Sommer M.S., Schleiff E. (2013) Defining the core proteome of the chloroplast envelope membranes. *Frontiers in Plant Science* **4**:11.
- Simpson D.J., Machold O., Høyer-Hansen G., Wettstein von D. (1985) Chlorina mutants of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Carlsberg research communications* **50**:223.
- Simpson R.J., Lambers H., Dalling M.J. (1983) Nitrogen redistribution during grain growth in wheat (*Triticum aestivum* L.) IV. Development of a quantitative model of the translocation of nitrogen to the grain. *Plant Physiology* **71**:7–14.
- Singh K.B. (1998) Transcriptional regulation in plants: the importance of combinatorial control. *Plant Physiology* **118**:1111–1120.

- Sitte P. (1977) Chromoplasten — bunte Objekte der modernen Zellbiologie. *Biologie in unserer Zeit* **7**:65–74.
- Smart C.M. (1994) Gene expression during leaf senescence. *New Phytologist* **126**:419–448.
- Sokolenko A., Altschmied L., Herrmann R.G. (1997) Sodium dodecyl sulfate-stable proteases in chloroplasts. *Plant Physiology* **115**:827–832.
- Sperotto R.A., Ricachenevsky F.K., Duarte G.L., Boff T., Lopes K.L., Sperb E.R., Grusak M.A., Fett J.P. (2009) Identification of up-regulated genes in flag leaves during rice grain filling and characterization of OsNAC5, a new ABA-dependent transcription factor. *Planta* **230**:985–1002.
- Spitzer C., Li F., Buono R., Roschztardt H., Chung T., Zhang M., Osteryoung K.W., Vierstra R.D., Otegui M.S. (2015) The endosomal protein CHARGED MULTIVESICULAR BODY PROTEIN1 regulates the autophagic turnover of plastids in Arabidopsis. *Plant Cell* **27**:391–402.
- Springer A., Acker G., Bartsch S., Bauerschmitt H., Reinbothe S., Reinbothe C. (2015) Differences in gene expression between natural and artificially induced leaf senescence in barley. *Journal of Plant Physiology* **176**:180–191.
- Sreenivasulu N., Usadel B., Winter A., Radchuk V., Scholz U., Stein N., Weschke W., Strickert M., Close T.J., Stitt M., Graner A., Wobus U. (2008) Barley grain maturation and germination: Metabolic pathway and regulatory network commonalities and differences highlighted by new MapMan/PageMan profiling tools. *Plant Physiology* **146**:1738–1758.
- Srivalli B., Bharti S., Khanna-Chopra R. (2001) Vacuole cysteine proteases and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase degradation during monocarpic senescence in cowpea leaves. *Photosynthetica* **39**:87–93.
- Stamp P., Herzog H. (1976) Flag-leaf senescence and grain growth in certain German varieties of spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Zeitschrift fuer Pflanzenzuechtung* **77**:330–338.
- Stigter K.A., Plaxton W.C. (2014) Molecular mechanisms of phosphorus metabolism and transport during leaf senescence. *Plants* **4**:773–798.
- Stornaiuolo M., Lotti L., Borgese N., Torrisi M., Mottola G., Martire G., Bonatti S. (2003) KDEL and KKXX retrieval signals appended to the same reporter protein determine different trafficking between endoplasmic reticulum, intermediate compartment, and Golgi complex. *Molecular Biology Of The Cell* **14**:889–902.
- Stoy V. (1973) Assimilate synthesis and distribution as components of yield formation in cereals. *Angewandte Botanik* **47**:17–26.
- Špundová M., Popelkova H., Ilík P., Skotnica J., Novotný R., Nauš J.A.N. (2003) Ultra-structural and functional changes in the chloroplasts of detached barley leaves senescing under dark and light conditions. *Journal of Plant Physiology* **160**:1051–1058.
- Tanaka T., Minamikawa T., Yamauchi D., Ogushi Y. (1993) Expression of an endopeptidase (EP-C1) in *Phaseolus vulgaris* plants. *Plant Physiology* **101**:421–428.
- Tang Y., Wen X., 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.
- Taylor M.A., Baker K.C., Briggs G.S., Connerton I.F., Cummings N.J., Pratt K.A., Revell D.F., Freedman R.B., Goodenough P.W. (1995) Recombinant pro-regions from papain and papaya proteinase IV are selective high affinity inhibitors of the mature papaya enzymes. *Protein Engineering* **8**:59–62.
- Teotia S., Lamb R.S. (2011) RCD1 and SRO1 are necessary to maintain meristematic fate in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **62**:1271–1284.

- Tester M., Langridge P. (2010) Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science* **327**:818–822.
- Thiel J., Hollmann J., Rutten T., Weber H., Scholz U., Weschke W. (2012) 454 transcriptome sequencing suggests a role for two-component signalling in cellularization and differentiation of barley endosperm transfer cells. *PLoS ONE* **7**:e41867.
- Thomas H. (1994) Aging in the plant and animal kingdoms – the role of cell death. *Reviews in Clinical Gerontology* **4**:5–20.
- Thomas H. (2013) Senescence, ageing and death of the whole plant. *New Phytologist* **197**:696–711.
- Thomas H., Ougham H.J., Wagstaff C., Stead A.D. (2003) Defining senescence and death. *Journal of Experimental Botany* **54**:1127–1132.
- Tilman D., Cassman K.G., Matson P.A., Naylor R., Polasky S. (2002) Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* **418**:671–677.
- Toyooka K., Okamoto T., Minamikawa T. (2000) Mass transport of proform of a KDEL-tailed cysteine proteinase (Sh-EP) to protein storage vacuoles by endoplasmic reticulum-derived vesicle is involved in protein mobilization in germinating seeds. *The Journal of Cell Biology* **148**:453–464.
- Trobacher C.P., Senatore A., Holley C., Greenwood J.S. (2012) Induction of a ricinosomal-protease and programmed cell death in tomato endosperm by gibberellic acid. *Planta* **237**:665–679.
- Tuquet C., Newman D.W. (1980) Aging and regreening in soybean cotyledons. 1 Ultrastructural changes in plastids and plastoglobuli. *Cytobios* **29**:43–59.
- Turk V., Turk B., Turk D. (2001) Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *The EMBO Journal* **20**:4629–4633.
- Uauy C., Distelfeld A., Fahima T., Blechl A., Dubcovsky J. (2006) A NAC Gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *Science* **314**:1298–1301.
- Van Breusegem F. (2006) Reactive Oxygen Species in Plant Cell Death. *Plant Physiology* **141**:384–390.
- van der Graaff E., Schwacke R., Schneider A., Desimone M., Flügge U.-I., Kunze R. (2006) Transcription analysis of arabidopsis membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiology* **141**:776–792.
- Van der Hoorn R.A.L. (2008) Plant proteases: From phenotypes to molecular mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* **59**:191–223.
- van Doorn W.G. (2005) Plant programmed cell death and the point of no return. *Trends in Plant Science* **10**:478–483.
- van Doorn W.G. (2008) Is the onset of senescence in leaf cells of intact plants due to low or high sugar levels? *Journal of Experimental Botany* **59**:1963–1972.
- van Doorn W.G., Woltering E.J. (2004) Senescence and programmed cell death: substance or semantics? *Journal of Experimental Botany* **55**:2147–2153.
- Villarejo A., Burén S., Larsson S., Déjardin A., Monné M., Rudhe C., Karlsson J., Jansson S., Lerouge P., Rolland N., Heijne von G., Grebe M., Bako L., Samuelsson G. (2005) Evidence for a protein transported through the secretory pathway en route to the higher plant chloroplast. *Nature Cell Biology* **7**:1224–1231.
- Vos J., van der Putten P.E.L. (1998) Effect of nitrogen supply on leaf growth, leaf nitrogen economy and photosynthetic capacity in potato. *Field Crops Research* **59**:63–72.

- Wada S., Ishida H. (2013) Autophagy of chloroplasts during leaf senescence. In: Biswal B, Krupinska K, Biswal UC (eds) *Plastid development in leaves during growth and senescence*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 435–451.
- Wagstaff C., Malcolm P., Rafiq A., Leverenz M., Griffiths G., Thomas B., Stead A., Rogers H. (2003) Programmed cell death (PCD) processes begin extremely early in *Alstroemeria* petal senescence. *New Phytologist* **160**:49–59.
- Wang S., Blumwald E. (2014) Stress-induced chloroplast degradation in *Arabidopsis* is regulated via a process independent of autophagy and senescence-associated vacuoles. *Plant Cell* **26**:4875–4888.
- Wang Y., Zhang J., Yu J., Jiang X., Sun L., Wu M., Chen G., Lv C. (2014) Photosynthetic changes of flag leaves during senescence stage in super high-yield hybrid rice LYPJ grown in field condition. *Plant Physiology and Biochemistry* **82**:194–201.
- Warner N.M. (2008) *Unravelling the roles of two senescent enhanced MYB transcription factors in the regulation of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis thaliana*. Warwick
- Weaver L.M., Gan S., Quirino B., Amasino R.M. (1998) A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Molecular Biology* **37**:455–469.
- Wiedemuth K., Müller J., Kahlau A., Amme S., Mock H.-P., Grzam A., Hell R., Egle K., Beschow H., Humbeck K. (2005) Successive maturation and senescence of individual leaves during barley whole plant ontogeny reveals temporal and spatial regulation of photosynthetic function in conjunction with C and N metabolism. *Journal of Plant Physiology* **162**:1226–1236.
- Wiederanders B., Kaulmann G., Schilling K. (2003) Functions of propeptide parts in cysteine proteases. *Current Protein & Peptide Science* **4**:309–326.
- Wingler A. (2005) The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **57**:391–399.
- Wingler A., Roitsch T. (2008) Metabolic regulation of leaf senescence: interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress responses. *Plant Biology* **10 Suppl 1**:50–62.
- Wittenbach V.A. (1978) Breakdown of ribulose bisphosphate carboxylase and change in proteolytic activity during dark-induced senescence of wheat seedlings. *Plant Physiology* **62**:604–608.
- Wittenbach V.A., Lin W., Hebert R.R. (1982) Vacuolar localization of proteases and degradation of chloroplasts in mesophyll protoplasts from senescing primary wheat leaves. *Plant Physiology* **69**:98–102.
- Wolf F.T. (1956) Changes in chlorophylls A and B in autumn leaves. *American Journal of Botany* **43**:714.
- Woo H.R., Kim H.J., Nam H.G., Lim P.O. (2013) Plant leaf senescence and death - regulation by multiple layers of control and implications for aging in general. *Journal of Cell Science* **126**:4823–4833.
- Xie Q., Michaeli S., Peled-Zehavi H., Galili G. (2015) Chloroplast degradation: one organelle, multiple degradation pathways. *Trends in Plant Science* **20**:264–265.
- Xiong Y., Contento A.L., Bassham D.C. (2005) AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **42**:535–546.
- Yamada K., Hara-Nishimura I., Nishimura M. (2011) Unique defense strategy by the endoplasmic reticulum body in plants. *Plant and Cell Physiology* **52**:2039–2049.

- Yamada K., Matsushima R., Nishimura M., Hara-Nishimura I. (2001) A slow maturation of a cysteine protease with a granulin domain in the vacuoles of senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology* **127**:1626–1634.
- Yang D.H., Webster J., Adam Z., Lindahl M., Andersson B. (1998) Induction of acclimative proteolysis of the light-harvesting chlorophyll a/b protein of photosystem II in response to elevated light intensities. *Plant Physiology* **118**:827–834.
- Yang L., Mickelson S., See D., Blake T.K., Fischer A.M. (2004) Genetic analysis of the function of major leaf proteases in barley (*Hordeum vulgare* L.) nitrogen remobilization. *Journal of Experimental Botany* **55**:2607–2616.
- Yen C.-H., Yang C.-H. (1998) Evidence for programmed cell death during leaf senescence in plants. *Plant Cell Physiology* **39**:922–927.
- Yoshida S. (2003) Molecular regulation of leaf senescence. *Current Opinion in Plant Biology* **6**:79–84.
- Yoshida T.T., Minamikawa T.T. (1996) Successive amino-terminal proteolysis of the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by vacuolar enzymes from French bean leaves. *The FEBS Journal* **238**:317–324.
- Yoshimoto K., Jikumaru Y., Kamiya Y., Kusano M., Consonni C., Panstruga R., Ohsumi Y., Shirasu K. (2009) Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**:2914–2927.
- Zavaleta-Mancera H.A., Thomas B.J., Thomas H., Scott I.M. (1999) Regreening of senescent *Nicotiana* leaves II. Redifferentiation of plastids. *Journal of Experimental Botany* **50**:1683–1689.
- Zentgraf U., Laun T., Miao Y. (2010) The complex regulation of WRKY53 during leaf senescence of *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Cell Biology* **89**:133–137.
- Zhang H., Sreenivasulu N., Weschke W., Stein N., Rudd S., Radchuk V., Potokina E., Scholz U., Schweizer P., Zierold U., Langridge P., Varshney R.K., Wobus U., Graner A. (2004) Large-scale analysis of the barley transcriptome based on expressed sequence tags. *The Plant Journal* **40**:276–290.
- Zhang K., 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.
- Zhang L.-F., Rui Q., Zhang P., Wang X.-Y., Xu L.-L. (2007) A novel 51-kDa fragment of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase formed in the stroma of chloroplasts in dark-induced senescing wheat leaves. *Physiologia Plantarum* **131**:64–71.
- Zhao C., Avci U., Grant E.H., Haigler C.H., Beers E.P. (2007) XND1, a member of the NAC domain family in *Arabidopsis thaliana*, negatively regulates lignocellulose synthesis and programmed cell death in xylem. *The Plant Journal* **53**:425–436.
- Zhu T., Wang X. (2000) Large-scale profiling of the *Arabidopsis* transcriptome. *Plant Physiology* **124**:1472–1476.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Julien-Alexander Hollmann
Geburtsdatum	27.03.1983
Geburtsort	Wilhelmshaven
Staatsangehörigkeit	deutsch
Heimatort	Horsten

Ausbildung

- seit 9. 2014 Promotion am Botanischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Betreuung durch Prof. Dr. Karin Krupinska
8. 2013 – 7. 2014 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am „Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences“ (IBERS) der Universität Aberystwyth, Wales, in der Arbeitsgruppe von Dr. Daniel Thorogood (Marie Curie Initial Training Network: CropLife)
7. 2009 – 7. 2013 Promotion am Botanischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Betreuung durch Prof. Dr. Karin Krupinska
10. 2004 – 5. 2009 Biologiestudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Schwerpunkte: Zellbiologie, Botanik und Phytopathologie
Abschluss: Diplom
Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dr. Bosch
10. 2003 – 9. 2004 Biologiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
7. 1995 – 6. 2002 Gymnasium, Cäcilienchule Wilhelmshaven
Abschluss: Abitur

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit – abgesehen von der Beratung durch meine Betreuerin – nach Inhalt und Form meine Arbeit ist und unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft angefertigt wurde. Diese Arbeit wurde bis jetzt weder vollständig noch in Teilen einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Teile der Arbeit sind zur Veröffentlichung eingereicht:

Arbeit III **Hollmann, J.**, Frank, S., Mulisch, M., Matros, A., Carrión, C., Mock, H-P., Krupinska, K. (2016). The senescence upregulated gene *HvPAP14* encodes a cysteine protease associated to thylakoid membranes after activation. *The Plant Journal*, eingereicht am 19.09.2016

Teile der Arbeit sind in folgenden Veröffentlichungen enthalten:

Arbeit II **Hollmann, J.**, Gregersen, P. L., 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.

Arbeit I Krupinska, K., Mulisch, M., **Hollmann, J.**, Tokarz, K., Zschiesche, W., Kage, H., Humbeck, K., Bilger, W. (2012). An alternative strategy of dismantling of the chloroplasts during leaf senescence observed in a high-yield variety of barley. *Physiologia Plantarum* 144:189–200.

Kohl, S., **Hollmann, J.**, Erban, A., Kopka, J., Riewe, D., Weschke, W., Weber, H. (2015). Metabolic and transcriptional transitions in barley glumes reveal a role as transitory resource buffers during endosperm filling. *Journal of Experimental Botany* 66: 1397–1411.

Kohl, S.*, **Hollmann, J.***, Blattner, F. R., Radchuk, V., Andersch, F., Steuernagel, B., Schmutzer, T., Scholz, U., Krupinska, K., Weber, H., Weschke, W. (2012). A putative role for amino acid permeases insink-source communication of barley tissuesuncovered by RNA-seq. *BMC Plant Biology* 12: 154.

* geteilte Erstautorenschaft

Thiel, J., **Hollmann, J.**, Rutten, T., Weber, H., Scholz, U., Weschke, W. (2012). 454 Transcriptome Sequencing Suggests a Role for Two-Component Signalling in Cellularization and Differentiation of Barley Endosperm Transfer Cells. *PLoS ONE* 7: e41867.

Kiel, den

Julien-Alexander Hollmann

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Zuallererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Karin Krupinska bedanken, für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas, die hervorragende Betreuung dieser Arbeit, die Freiheit bei der Durchführung der Arbeit sowie den wissenschaftlichen Rat und die gute und angenehme Zusammenarbeit.

Besonders danken möchte ich auch dem Team aus der Zentralen Mikroskopie, Dr. Maria Mulisch, Marita und Cay für ihren unermüdlichen Einsatz.

Mein besonderer Dank geht nach La Plata, an Prof. Dr. Juan Guiamet und Cristian für die Einweisung in die Affinitätsaufreinigung.

Dr. Hans-Peter Mock und Dr. Andrea Matros möchte ich für die Massenspektrometrieanalysen danken.

Herzlich danken möchte ich Dr. Per Gregersen für die Zusammenarbeit bei den Genexpressionsanalysen und für die Einführung in die Tiefen von „R“.

Dr. Winfriede Weschke und Dr. Hans Weber möchte ich für die intensive Zusammenarbeit am Transkriptom der Gerste danken.

Ein großes Dankeschön geht auch an Andrea, Susanne, Ulrike und Anke für die fachkundige Unterstützung, die wertvollen Tipps und Tricks und für die kleinen Treffen zum Kaffee.

Besonders danke ich meinen jetzigen und ehemaligen Kollegen Susann, Svenja, Mirl, Wera, Christine, Uwe, Andrea, Luca, Rena, Joanna und Kathleen für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen sowie für die sehr nette Arbeitsatmosphäre.

Herzlich danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihr Verständnis, die Unterstützung und den Rückhalt, den sie mir zu jeder Zeit der Arbeit entgegengebracht haben. Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin Henrike, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Anhang

Arbeit I

An alternative strategy of dismantling of the chloroplasts during leaf senescence observed in a high-yield variety of barley

Karin Krupinska^{a,*}, Maria Mulisch^a, Julien Hollmann^a, Krzysztof Tokarz^b, Wiebke Zschiesche^c, Henning Kage^d, Klaus Humbeck^c and Wolfgang Bilger^a

^aInstitute of Botany, Christian-Albrechts-University of Kiel, Kiel, Germany

^bInstitute of Plant Physiology, Polish Academy of Sciences, Crakow, Poland

^cInstitute of Biology, Martin-Luther University, Halle, Germany

^dInstitute of Agronomy and Crop Science, Christian-Albrechts-University of Kiel, Kiel, Germany

Correspondence

*Corresponding author,
e-mail: kkrupinska@bot.uni-kiel.de

Received 1 September 2011;
revised 4 October 2011

doi:10.1111/j.1399-3054.2011.01545.x

Changes in function and composition of the photosynthetic apparatus as well as the ultrastructure of chloroplasts in mesophyll cells were analyzed in flag leaves of the high-yield barley (*Hordeum vulgare*) variety cv. Lomerit during senescence under field conditions in two successive years. In contrast to previous results obtained with the elder variety cv. Carina photosystem II efficiency measured by F_v/F_m was found to be rather stable until a very late stage of senescence. Chlorophyll *a* fluorescence and P700 absorbance measurements revealed that the activities of the two photosystems declined in parallel. An increase in the chlorophyll *a/b* ratio at a late stage of senescence was observed to coincide with a decline in the level of the Lhcb1 apoprotein of the light harvesting complex (LHC) and the level of the corresponding transcript. Ultrastructural investigations revealed the presence of gerontoplasts that have long, single or pairwise thylakoids and lack large grana stacks. It is hypothesized that the early degradation of grana thylakoids harboring the major LHC reduced the risk of photoinhibition and might be causally related to the high yield of the barley variety cv. Lomerit.

Introduction

Leaf senescence is the final phase of leaf development characterized by a highly regulated breakdown of chloroplast components, which are remobilized to still growing vegetative parts and to seeds and fruits. Hence, senescence is of pivotal importance for productivity of crop plants, which might be limited when senescence is prematurely induced by adverse environmental situations such as heat and drought (Gregersen et al. 2008).

The proteins of the photosynthetic apparatus are the major source of nitrogen remobilized during leaf senescence. Besides RuBisCO containing up to 35% of the total leaf nitrogen and up to 70% of chloroplast nitrogen (Hörtensteiner and Feller 2002) most nitrogen is bound to the apoproteins of the light harvesting complexes (LHCs) primarily located in grana thylakoids (Matile 1992).

The thylakoid membrane system is differentiated into appressed grana thylakoids and non-appressed stromal thylakoids. This is the morphological reflection

Abbreviations – CAU, Christian-Albrechts-University of Kiel; CET, Central European Time; Chl, chlorophyll; HPLC, high-performance liquid chromatography; LHC, light harvesting complex; LSU, large subunit of RuBisCO; PCR, polymerase chain reaction; PSI, photosystem I; PSII, photosystem II; qRT-PCR, quantitative real time-PCR; SSU, small subunit of RuBisCO.

of a non-random distribution of the supramolecular complexes of the photosynthetic apparatus known as lateral heterogeneity (Anderson 1999). While photosystem I (PSI) together with the ATP synthase is found in stroma thylakoids, the LHC together with photosystem II (PSII) is mainly found in grana thylakoids. The cytochrome b_6/f complex was found to be located at the edges of grana and also in stromal thylakoids (Anderson and Andersson 1981).

At the structural level, the decline in photosynthetic activity during degradation of chloroplast proteins was observed to be accompanied by a transformation of photosynthetically active chloroplasts into gerontoplasts (Hurkman 1979, Biswal and Biswal 1988, Gepstein 1988). Although intensively investigated, the sequence of events taking place during this process has not been fully elucidated and might vary under different environmental conditions. The major characteristics of gerontoplasts in a senescing leaf are a high number of large plastoglobuli (Lichtenthaler 1969) and prevalent loosened stacks of grana thylakoids without interconnecting membranes (Hurkman 1979, Gepstein 1988). This indicates that stroma thylakoids are degraded before the grana thylakoids containing the major LHC (for a review see Krupinska 2006). An early degradation of stroma thylakoids would imply that PSI is degraded before PSII. However, reports on the sequence of degradation of the two photosystems during senescence are rather contradictory (Krupinska and Humbeck 2004). While in most studies indeed an early loss of PSI was observed (Miersch et al. 2000, Tang et al. 2005), others report on a higher stability of PSI (Hilditch et al. 1986).

Breeding for higher yield is an important task to meet the demands of a still increasing world population. It would be desirable to have crop plants with highly stable productivity even under adverse environmental conditions. For breeding of such varieties a profound knowledge on senescence processes and their induction is required. Most studies on senescence have, however, been performed with model species grown under standardized conditions. In an attempt to understand senescence processes in crop plants under field conditions in previous studies we have analyzed functional and molecular changes in the photosynthetic apparatus of flag leaves of barley collected in fields and used this material for isolation of senescence associated genes (Humbeck et al. 1994, Humbeck et al. 1996, Scharrenberg et al. 2003). These studies, however, were performed with the barley variety cv. Carina which had been introduced 30–40 years ago.

Breeding for improved productivity shaped modern barley varieties and most likely has affected also senescence processes and their regulation. Therefore,

we have chosen the modern high-yield barley variety Lomerit for characterization of functional and molecular changes in the photosynthetic apparatus of senescing flag leaves. To get insight into the mechanism of chloroplast dismantling in this variety, we additionally performed a detailed ultrastructural analysis. Our data revealed that the high yield of this variety coincides with an alternative way of chloroplast dismantling, enabling the photosynthetic apparatus to work with high efficiency until the final death of the leaf.

Materials and methods

Plant material

The studies were performed with the cultivar Lomerit of barley (*Hordeum vulgare* cv. Lomerit) which was since its introduction in 2001 for several years one of the most cultivated winter barley varieties in Germany. It is known for its high yield and is used as forage barley. Plants of cv. Lomerit were grown in 2009 and in 2010 in field plots of 3 × 8 m with a density of 300 plants m^{-2} at the Experimental Station Hohenschulen belonging to the Agricultural Faculty of the University of Kiel. Field plots were fertilized with a total N supply of 80 kg hectare $^{-1}$. This level of N-supply is less than optimal and was sufficient to realize about 80 (2009) and 77% (2010) of the seed yield at optimum N-supply (934 g m^{-2} in 2009; 1038 g m^{-2} in 2010). Heading time in 2009 was May 10. Flag leaves were collected and analyzed from four different plots every other day beginning May 27 and ending June 18. Sample collections and measurements were always performed between 9.00 and 11.30 CET (Central European Time). Samples for chlorophyll fluorescence measurements were layered on wet tissue in a dark box and transported to the laboratory. For determination of pigments, leaf discs (area: 0.84 cm^2) were excised from the center of the leaf blade (Fig. 1B), immediately frozen in liquid nitrogen and thereafter stored at $-80^{\circ}C$. In contrast to 2009, in 2010 pigment determinations were done on leaf powder obtained from entire leaves, which were freeze dried after freezing in liquid nitrogen. Leaves used for RNA and protein extraction were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at $-80^{\circ}C$. For ultrastructural analyses 1.5 mm leaf segments were taken basal from the hole resulting from excision of leaf discs and were immediately transferred into ice cold fixation solution. For comparison, ultrastructural investigations were performed with flag leaf segments of spring barley cv. Carina, grown in 2011 in Hohenschulen, Christian-Albrechts-University of Kiel (CAU), Germany, under the same N supply as Lomerit in 2009 and 2010.

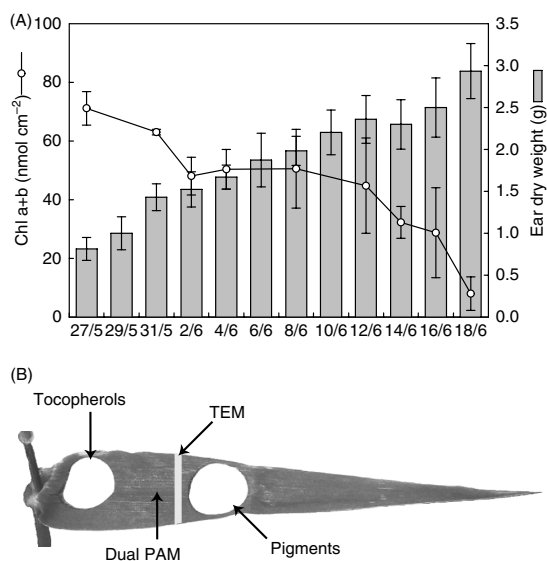


Fig. 1. Characterization of flag leaves collected from field plots of *cv. Lomerit* in 2009. (A) Chlorophyll content was analyzed every other day from May 27 to June 18, 2009. For comparison the changes in dry weight of ears are shown. (B) Scheme depicting the areas of the flag leaf blade used for analyses of pigments, for chlorophyll fluorescence and P700 absorbance change measurements and for ultrastructural analyses (TEM). On a further sample contents of α -tocopherol were measured which will be reported in a forthcoming publication.

For determination of the dry weight of ears, four ears were collected from each plot and were dried until the weight was constant. Data on changes in air temperature, rainfall and global radiation were obtained from a meteorological station situated at the field in Hohenschulen, CAU Kiel, Germany.

Measurement of gas exchange

A portable open gas exchange system (LI-6400; Li-Cor, Lincoln, NE) was used to measure photosynthesis of attached flag leaves in the field. The measurements were conducted on flag leaves in the fields every second day in 2009 at ambient air conditions and at a light intensity of $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. In 2010, saturating CO_2 was applied. The measurements started in the morning after evaporation of the morning dew and were continued till afternoon with a break at noon when the midday depression occurred. A mean of the 15 instrumental and 5 biological repetitions were taken as a value for each of four plots.

Chlorophyll fluorescence measurements

Fluorescence measurements for determination of F_v/F_m were performed with three leaves at the base of the blades, which was a position below the hole resulting

from excision of the leaf disc for pigment analysis in 2009 (Fig. 1B). Activities of PSI and PSII were determined using a Dual-PAM-100 apparatus (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany) on leaves transported to the lab in a humid chamber. Two leaves from each plot were pre-illuminated at low irradiance ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) using fluorescent tubes for at least 20 min before the measurements. On each leaf, a rapid light curve was measured with the following combinations of irradiances and times [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ s]: 6/20; 13/20; 22/20; 53/20; 95/30; 126/40; 216/40; 339/40; 531/40 and 825/40. Data obtained at the highest irradiance are shown in Fig. 3 and Fig. S4. Photochemical quantum yields of PSI and PSII were determined by the application of saturating light pulses (irradiance of $10\,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 300 ms duration) calculated by the software of the Dual-PAM fluorometer according to Klughammer and Schreiber (1994) and Genty et al. (1989), respectively. 30% of F_0 were considered to be derived from PSI and were automatically subtracted from all values.

Analysis of pigment contents

Two leaf discs (area: 0.84 cm^2) from each plot were excised for pigment analysis acropetal of the area used for chlorophyll fluorescence analyses and ultrastructural analyses and were immediately frozen in liquid nitrogen (Fig. 1B). Until analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC) the samples were stored in a freezer at -80°C . For extraction, the leaf discs were ground in the frozen state along with five glass beads in a Geno Grinder (Type 2000; SPEX CertiPrep, Munich, Germany) with 0.5 ml 80% (v/v) acetone buffered with 20 mM Tris, pH 7.8. After centrifugation, the pellet was extracted twice with 200 μl 100% acetone. From the unified extracts, 50 μl were used for HPLC analysis on an Agilent 1100 system (Agilent, Waldbronn, Germany) with Diode Array Detector (DAD) detection. The protocol was the same as published before (Niinemets et al. 1998).

Immunological analysis of protein levels

Proteins were extracted from whole flag leaves as described by Pötter and Kloppstech (1993). Protein concentrations were determined according to Lowry's protocol (Lowry et al. 1951). Equal amounts of proteins were subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and were transferred on nitrocellulose filters as described previously (Humbek et al. 1996). Immunoreactive protein bands were visualized using a peroxidase coupled secondary anti-serum with chemiluminescence detection (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Primary antibodies directed

toward Lhcb1, D1, PsbO, PsaA and RuBisCO large and small subunits (LSU and SSU) were purchased from Agrisera (Vännäs, Sweden). Antibodies directed toward cytochrome *b*₅₅₉ and cytochrome *f* (Bruce and Malkin 1991) were the same as used previously (Humbeck et al. 1996, Humbeck and Krupinska 2003).

Isolation and analysis of RNA by qRT-PCR

Total RNA was isolated according to Chomczynski and Mackey (Chomczynski and Mackey 1995) and was quantified spectrophotometrically. The RNA was treated with DNaseI (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) and cDNA was synthesized using the SuperScript™ III Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the supplier's instructions. Polymerase chain reaction (PCR) was carried out in the iCycler (Bio-Rad, Munich, Germany) in a total volume of 20 µl including 1 × Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), 0.3 µM of each gene-specific primer and 10 nM fluorescein (Bio-Rad) as passive reference dye for well factor calibration. Gene-specific primers were *HvS40for* (ACC AAC GAC GCG AAG AGG AAC, 21bp), *HvS40rev* (GCC GGT GCA CAT GGA GTA GG, 20bp), *HvrbcSfor* (CTA CCA CCG TCG CAC CCT TCC, 21bp), *HvrbcSrev* (TGA TCC TTC CGC CAT TGC TGA C, 22bp), *HvrbcLfor* (CTC GCG GTA TCT TTT TCA CTC AGG, 24bp), *HvrbcLrev* (CGT CCC CAA AGA TTT CGG TCA GA, 23bp), *Hvlhcb1for* (CTG ACC AAG GCG GGG CTG ATG AAC, 24bp) and *Hvlhcb1rev* (TCG TGG GGC GGG AGG CTG TAG, 21bp). Different cDNA dilutions (1/4, 1/16, 1/64 for genes of interest and 1/256, 1/1024, 1/4096 for the reference 18S rRNA) were used to calculate PCR efficiencies. The following PCR program was used: one cycle at 95°C for 2 min, followed by 50 cycles with 94°C for 20 s, 56°C for 30 s and 72°C for 10 s. At the end, the melting curve of the amplified PCR products was determined. To calculate the relative expression rate of the genes of interest in treated plants relative to the untreated controls, an established model for relative quantification in RealTime-PCR (RT-PCR) (Pfaffl 2001) was used.

Ultrastructural analysis

Leaf sections (1–1.3 mm) were excised in the field at the upper edge of the flag leaf area later used for chlorophyll fluorescence measurements and were immediately transferred into the fixation solution. Fixation was in 2.5% (v/v) glutaraldehyde and 1% (v/v) formaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate (pH 7.4) at 4°C over night, and postfixation for 2 h in buffered 1% (w/v) osmium tetroxide on ice. Washing was with 0.1 M sodium cacodylate (pH 7.4). The specimens were dehydrated in a graded

series of ethanol and embedded in LR White resin (London Resin Company, Reading, UK). Polymerization was in gelatin capsules at 60°C over night. Ultrathin sections of the specimens were cut with a diamond knife at a Leica Ultracut UCT ultramicrotome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and placed on copper grids. Sections were stained with uranyl acetate (Reynolds 1963) and with lead citrate (Watson 1958) and observed in a Philips CM10 TEM (FEI, Eindhoven, The Netherlands).

Results

Characterization of plant development

During the sampling period in 2009 the average temperature was rather moderate and did not show extreme fluctuations. Intensive rainfall occurred before the onset of senescence (Fig. S1). Sampling of flag leaf material was done every other day between 9.00 and 11.30 (CET). During the entire sampling period weight of the ears continuously increased. Flag leaf blades were fully developed on May 27 as examined by length measurements. Until June 12, total chlorophyll content decreased slowly and thereafter rapidly (Fig. 1A). Accordingly, we decided to choose June 12 as onset of visible senescence. The period of senescence thereafter mounted up to 6 days.

In 2010, the average temperature in June was higher and final development of flag leaves from full expansion until senescence was shortened in comparison to 2009 (Fig. S1 and Table S1). Nevertheless, the final phase of flag leaf development starting on June 24 when chlorophyll content rapidly declined amounted to 6 days as in 2009 (Fig. S2).

Changes in photosynthetic activity and chlorophyll fluorescence

CO₂ fixation measured on attached leaves under ambient CO₂ supply in 2009 declined on June 6. On June 8 and June 10, the values were almost identical and thereafter a steady decline was observed paralleling the decline in chlorophyll content (Fig. 2). In 2010, CO₂ fixation increased until June 20, stayed constant until June 24 and thereafter continuously declined in parallel to the decline in chlorophyll content (Figs. S2 and S3).

In our previous study on flag leaf senescence under field conditions (Humbeck et al. 1996) performed with the spring variety cv. Carina, *F_v/F_m* had decreased to a value of 0.4 when the rate of oxygen evolution was decreased by 50% (Humbeck et al. 1996). In contrast to these previous investigations, *F_v/F_m* measured with flag leaves of cv. Lomerit collected in 2009 was rather constant having high values throughout the sampling

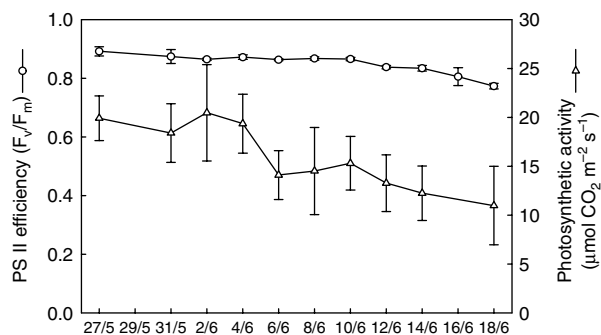


Fig. 2. Photosynthetic characteristics of flag leaves of cv. Lomerit during maturation and senescence in field plots in 2009. Measurements of photosynthetic activity by carbon dioxide fixation were done at ambient CO_2 with saturating irradiance of $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Photochemical quantum efficiency of photosystem II (F_v/F_m) was determined by chlorophyll a fluorescence measured as described in the section Material and methods. SD were calculated for measurements with 20 leaves (five leaves from four plots, respectively).

period until June 10. Thereafter, during the period of senescence F_v/F_m slightly declined reaching a value of 0.78 on June 18 (Fig. 2). In 2010, when the temperature was higher and less rain occurred, a value of 0.7 was measured at the end of senescence. When CO_2 fixation was reduced by 50% F_v/F_m values were still in the range of 0.75 until 0.8 (Fig. S3).

Photochemical quantum yields of the two photosystems

F_v/F_m data indicate that remaining PSII centers functioned with high efficiency during senescence of flag leaves from cv. Lomerit. To elucidate whether the two photosystems differed in their functionality during senescence, in addition, photochemical and nonphotochemical quantum yields of PSI were analyzed with a Dual-PAM measuring system. The data obtained showed that during the period of senescence beginning on June 12 quantum yields, determined at an irradiance of $825 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, of both photosystems declined in parallel (Fig. 3). A similar observation was made in 2010 (Fig. S4).

Changes in chlorophyll content and chlorophyll a/b ratio

The compositions of pigments extracted from leaf punch biopsies were analyzed by HPLC. Chlorophyll a/b ratio had an almost constant value of 3.8 until June 12 (Fig. 4). On June 16 it reached a value of 4.3 and 2 days later on June 18 it had a value of 6.6. A similar increase occurred also in 2010 (Fig. S5).

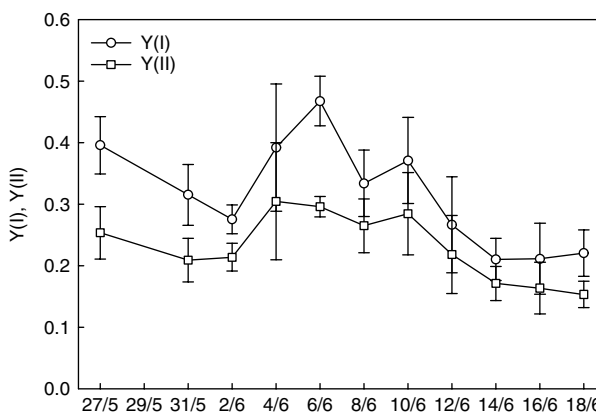


Fig. 3. Photochemical quantum yields of photosystem I and II measured with a Dual-PAM device (see section Material and methods) at an irradiance of $825 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ on flag leaves collected every other day from field plots in 2009.

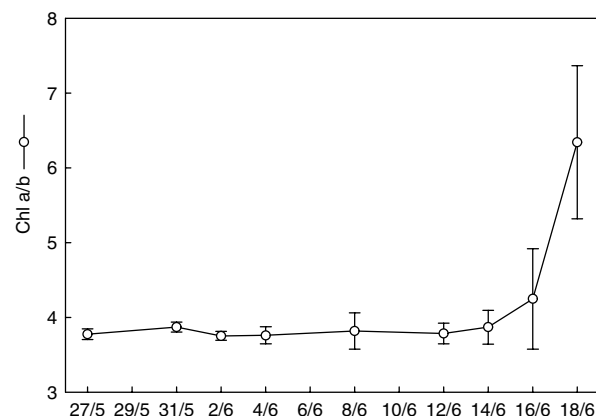


Fig. 4. Molar ratio of chlorophyll a to chlorophyll b of the flag leaves analyzed for chlorophyll content as shown in Fig. 1A.

Changes in the levels of proteins related to photosynthesis

To analyze senescence-associated changes in the protein composition of the photosynthetic apparatus, the relative levels of several PSII proteins were compared with those of PSI proteins as well as with the levels of the major light-harvesting complex and RuBisCO subunits. For PSII relative levels of D1 (PsbA), cytochrome b_{559} apoprotein a (PsbE) and the 33 kDa manganese-stabilizing protein PsbO were examined. For PSI the relative level of PsaA was examined. Immunoblotting revealed that the core proteins of both photosystems declined in parallel starting June 12. Immunoblot analyses with antibodies specific for cytochrome b_{559} and cytochrome f showed a slightly retarded decline of the levels of these proteins. The decline in the relative levels of RuBisCO subunits

and LHC II apoproteins paralleled the decline in the levels of cytochromes (Fig. 5). The relative level of the Lhcb1 apoprotein of the LHC declined in parallel with those of the core proteins of the photosystems (Fig. 5).

These results are in contrast with the previously published results on changes in the levels of proteins related to photosynthesis in flag leaves of the spring barley variety Carina (Humbeck et al. 1996). In flag leaves of cv. Carina the levels of apoproteins of the major LHC were observed to be very stable until the very end of senescence.

Changes in the levels of mRNA for RuBisCO subunits and LHC II

To investigate whether the unexpected early decline in the level of LHC in flag leaves of cv. Lomerit might be caused by a premature decline in the mRNA supply, the level of *lhcb1*-mRNA was investigated via quantitative real time-PCR (qRT-PCR). This analysis showed that the

level of *lhcb1* mRNA declined with a similar kinetics as the level of the *rbcS* mRNA. The decline in the levels of both mRNAs was biphasic. After an early decline the level remained similar on June 4 and June 8. Thereafter from June 12 to June 16 (June 20) the expression level was reduced by 80% in comparison to the level on June 8 (Fig. 6). It seems that the biphasic change paralleled the biphasic change in chlorophyll content (Fig. 1). In comparison to the level of *rbcS* mRNA the level of plastid *rbcL* showed a slower decline. The decline in mRNA levels preceded the declines in protein levels and hence could limit a resynthesis of the proteins.

In the current as well as in our previous study with cv. Carina (Humbeck et al. 1996) the level of the *HvS40* RNA (Becker and Apel 1993, Krupinska et al. 2002) was found to be an excellent marker of late senescence (Fig. 6). Transcript levels slightly increased on June 8 and June 12. In later stages, the level of the senescence-associated gene *HvS40* RNA dramatically increased.

Ultrastructural analyses

The increase in chlorophyll *a/b* ratio during senescence and the decline in the levels of LHC apoproteins observed in flag leaves of cv. Lomerit was unexpected with respect to our previous findings on a drop in the chlorophyll *a/b* ratio during late senescence of flag leaves of cv. Carina as well as of the winter barley cv. Trixi (unpublished data on flag leaf material analyzed for other purposes) (Humbeck et al. 1994, Humbeck et al. 1996). To elucidate whether the structure of chloroplasts and gerontoplasts in mesophyll cells of this variety has special features, we compared it with the structure of chloroplasts and gerontoplasts in mesophyll cells of flag leaves of the spring barley variety Carina (Fig. 7), which for this purpose was grown in 2011 in a field under the same nitrogen supply as Lomerit in 2009. In mature leaves before senescence, the thylakoid membrane system showed the typical differentiation of grana and stroma thylakoids. No obvious differences were observed between the two varieties (Fig. 7).

However, when gerontoplasts observed in leaves at late stages of senescence were compared between the two varieties striking differences became obvious. While gerontoplasts of cv. Carina showed the typical structure characterized by high loosened grana stacks without interconnecting stroma thylakoids (Hurkman 1979, Biswal and Biswal 1988, Gepstein 1988, Krupinska 2006), gerontoplasts observed in leaves of cv. Lomerit were almost devoid of grana (Fig. 7), which is in accordance with the high-chlorophyll *a/b* ratio of the leaves and the early degradation of LHCs.

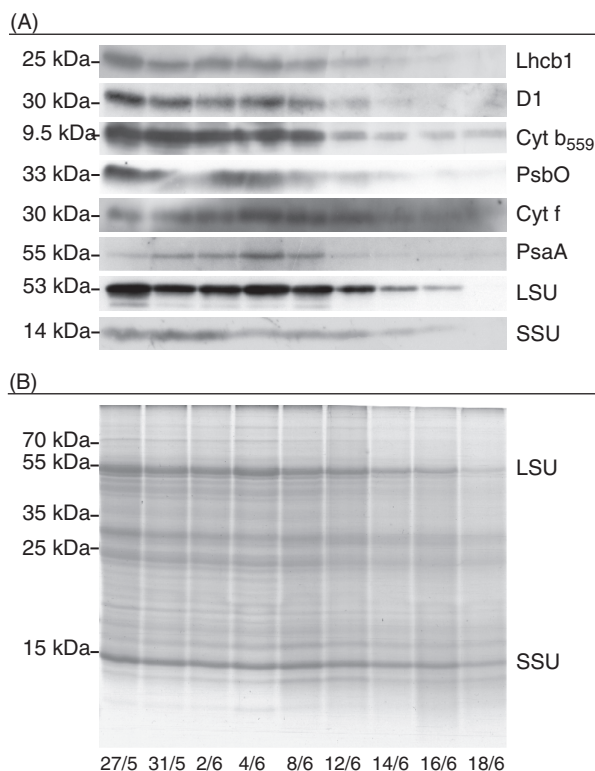


Fig. 5. (A) Immunoblot analyses of selected proteins of photosystem II and I as well as of RuBisCO small and large subunits. Proteins were extracted from flag leaves collected every other day in the period from May 27 to June 18 in 2009. Equal amounts of proteins were loaded for gel electrophoresis. (B) To show loading of proteins, Coomassie staining of the gel is shown. The large and the small subunits of RuBisCO (LSU and SSU) are indicated. Antibodies were used as described in the section material and methods.

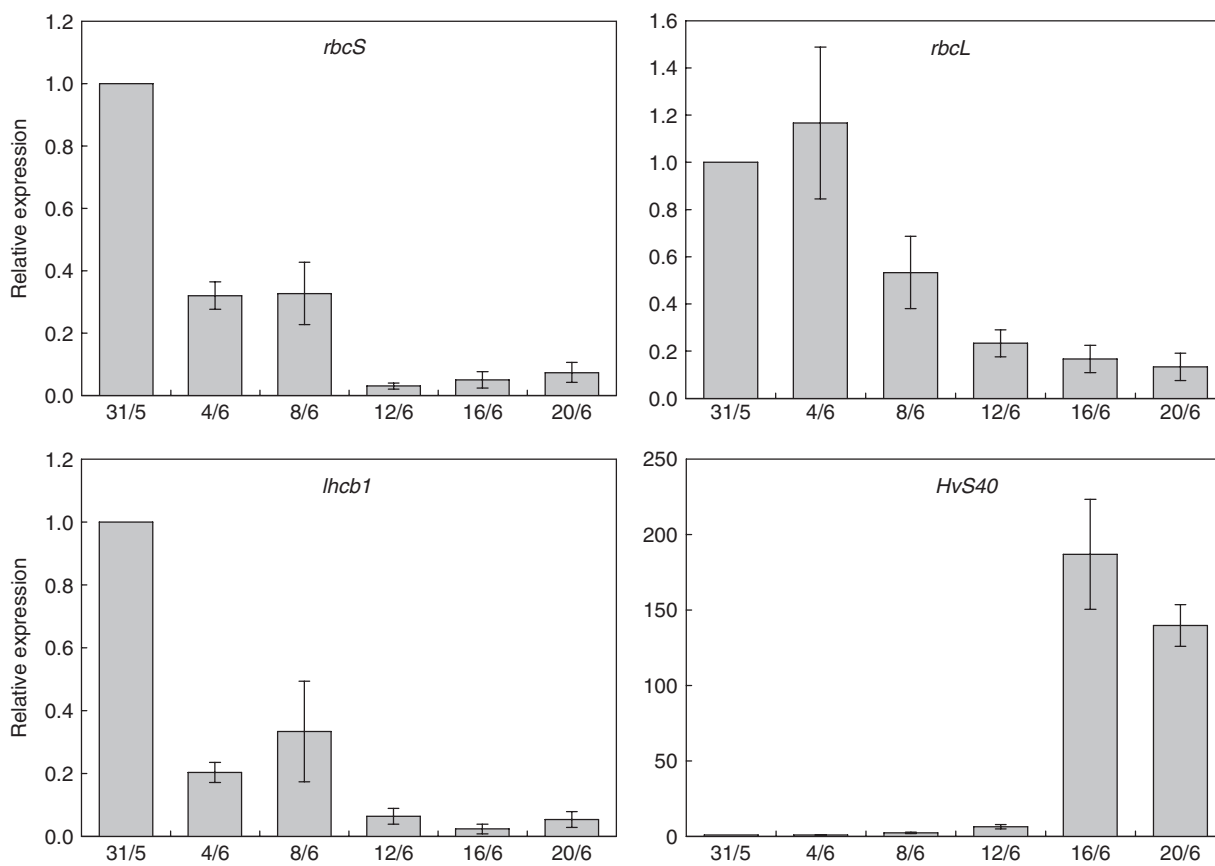


Fig. 6. Quantitative real time PCR analysis of *rbcS*, *rbcL*, *lhcb1* and *Hvs40* transcript levels. RNA was extracted from flag leaf blades collected every fourth day from May 31 to June 20. The level of mRNA in each case is normalized to the level of the 18S rRNA as reference, and the mature control leaf is set as 1. Error bars indicate the sd ($n = 9$).

Another typical feature of gerontoplasts is the accumulation of large plastoglobuli (Lichtenthaler 1969). In gerontoplasts of cv. Carina plastoglobuli with electron dense material were found to be located at the edges of grana (Fig. 7). This arrangement is typical for most plants (type 1). In comparison, plastoglobuli in gerontoplasts of cv. Lomerit (type 2) were found to be located in arrays between long single or double thylakoids. Moreover, it seemed that gerontoplasts of type 2 contain more plastoglobuli than gerontoplasts of type 1 and that these plastoglobuli under the particular conditions of preparation have a lower electron density (Fig. 7).

To further examine the development of gerontoplasts in cv. Lomerit, different stages of senescence were examined by transmission electron microscopy. In specimens examined on June 12 representing an early stage of senescence when chlorophyll content had declined by 10% in comparison with June 10, thylakoid membranes were loosely packed (not as well appressed as in mature chloroplasts before senescence). On June 16, when chlorophyll content was reduced by 20%

in comparison to June 10 gerontoplasts with a high number of large plastoglobuli and mostly single or paired thylakoids were observed (Fig. 8). This type of gerontoplast was found to be prevalent in a considerable proportion of the mesophyll cells but not in all cells. Besides cells with gerontoplasts also cells with mature chloroplasts were found at this stage of senescence. When chlorophyll a/b ratio was 6.5 on June 18, however, all cells contained gerontoplasts of type 2. This indicates that during senescence of flag leaves from cv. Lomerit, the percentage of cells containing gerontoplasts increased. At the late stage of senescence on June 18 plastid remnants were found inside the vacuole (Fig. 8). Remnants were clearly discernible within the vacuole by plastoglobuli and few residual thylakoids surrounding the plastoglobuli.

Discussion

Our study on leaf senescence with the high-yield winter barley variety Lomerit revealed that in the same species

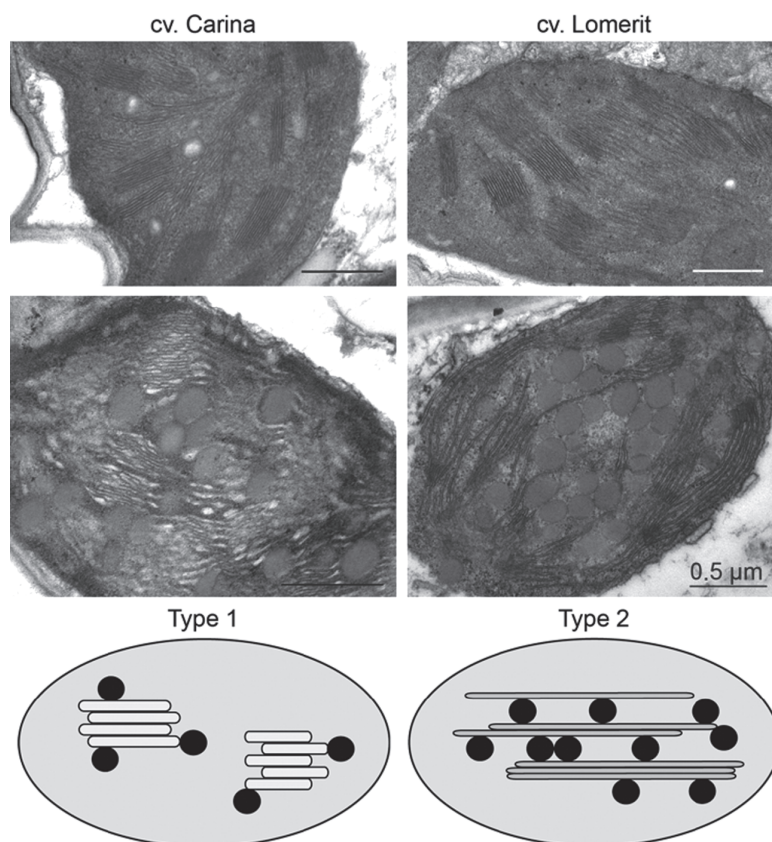


Fig. 7. Ultrastructure of chloroplasts and gerontoplasts in mesophyll cells of flag leaves from *cv. Lomerit* and *cv. Carina*. At the top chloroplasts before senescence and below gerontoplasts from leaves having lost more than 50% of chlorophylls are shown (16/6 for *cv. Lomerit*, see Fig. 1). Bars indicate 0.5 μm . The differences in ultrastructure of gerontoplasts detected in *cv. Carina* (type 1) and *cv. Lomerit* (type 2) are highlighted by a schematic drawing.

chloroplasts might be degraded by different mechanisms. In most crop cultivars so far analyzed including the spring barley variety *Carina* and the winter variety *Trixi* (unpublished data on the same material as used for Humbeck et al. 1994, 1996) the chlorophyll *a/b* ratio declined during leaf senescence as in most wild species including trees showing autumnal senescence (Wolf 1956). In contrast, the chlorophyll *a/b* ratio in this study on senescence of flag leaves of the barley variety *Lomerit* was shown to increase. Immunoblot analyses and ultrastructural analyses showed that a preferential degradation of grana and proteins associated with the granal thylakoids is responsible for this unexpected change in the chlorophyll *a/b* ratio. The senescence-associated increase of the chlorophyll *a/b* ratio occurred under two contrasting weather scenarios in 2009 and 2010 (Fig. S1 and Table S1).

Variations in the chlorophyll *a/b* ratio are likely to reflect changes in the architecture of thylakoids because most of the chlorophyll *b* is associated with the LHC

of granal thylakoids (Anderson and Andersson 1982, Melis 1991). The average length ratio of appressed to non-appressed membranes ranges from 4 to 5 in shade plants and from 1 to 1.5 in sun plants and also differs within a single leaf (Anderson et al. 1988). In most studies on chloroplast dismantling during senescence, grana thylakoids were reported to have a higher stability compared to stromal thylakoids resulting in lower chlorophyll *a/b* ratios of senescent leaves (Wolf 1956, Kura-Hotta et al. 1987). In accordance with this the levels of the LHC apoproteins were reported to be rather stable during senescence (Roberts et al. 1987, Hidema et al. 1992, Humbeck et al. 1996). Even when grana stacks were observed to decline during senescence, the level of LHC II remained stable.

Immunoblot analyses on the protein composition of chloroplasts during senescence of flag leaves from *cv. Lomerit*, however, showed that the relative level of the LHC II, which is binding most of the chlorophyll *b* in the photosynthetic apparatus declined in parallel with

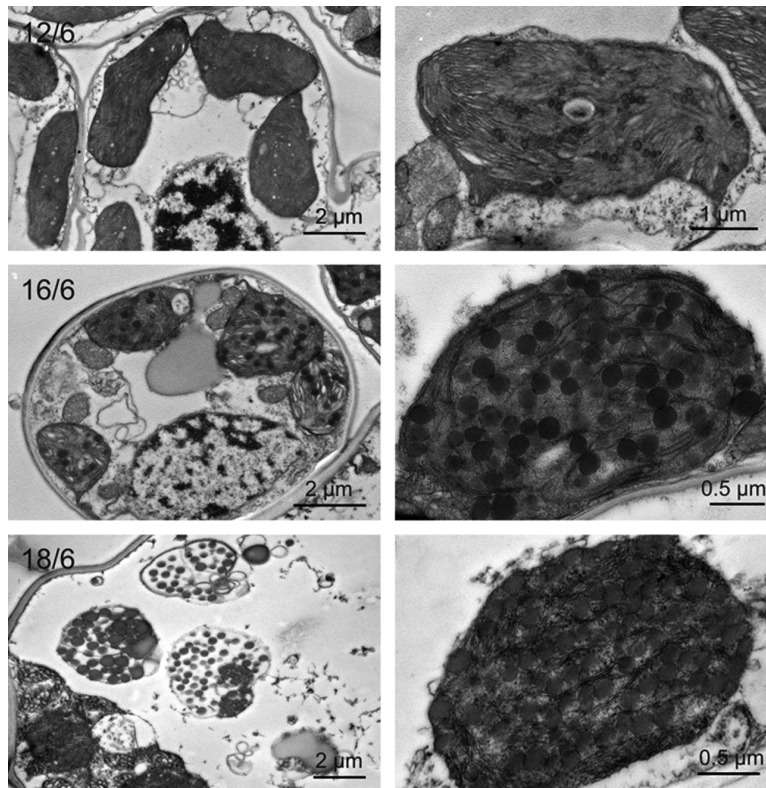


Fig. 8. Stages of gerontoplast development in flag leaves of cv. Lomerit collected on June 12, June 16 and June 18. On the left, an overview of cellular ultrastructure is shown, and on the right the ultrastructures of typical plastids are shown. Bars indicate 0.5, 1 or 2 μm .

the relative levels of selected PSII proteins. The decline in the level of LHC II in leaves of cv. Lomerit could be caused by the decline in the mRNA level. In our previous study with the spring barley variety Carina (Humbeck et al. 1996) and other studies, however, it had been shown that the LHC is rather stable and that the absence of an apparent change in the level of the apoproteins was caused by a very low rate of turnover (Hidema et al. 1992).

In only few other studies on leaf senescence the chlorophyll a/b ratio was shown either not to change or to slightly increase during senescence. When barley leaf segments were incubated under continuous illumination ($90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a slight increase in the chlorophyll a/b ratio up to 4.3 was observed (Spundova et al. 2003). The authors explained this unexpected result by a high light dosage. However, this is rather unlikely considering that native plants and crop plants in the fields are exposed to irradiances up to $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at midday. We rather think that the different way of chloroplast dismantling is an intrinsic property of the barley variety Akcent used in that study. In a study on autumnal senescence of *Platanus occidentalis*, the chlorophyll a/b ratio did not show changes while

mean values of F_v/F_m remained rather stable over a wide range of chlorophyll content and did not drop below 0.6 (Adams et al. 1990). The authors concluded that chloroplast dismantling in these leaves is highly controlled preventing the occurrence of imbalances in the remaining photosynthetic apparatus.

In accordance with the increase in the chlorophyll a/b ratio and the decline in the relative level of apoproteins of LHC, ultrastructural analyses of chloroplasts at different stages of development of the flag leaves of cv. Lomerit revealed that grana thylakoids are degraded during senescence before stroma thylakoids. Analyses of mesophyll cells at different time points during senescence revealed that cells possessing the typical gerontoplasts deficient in grana are located close to cells having still intact mature chloroplasts. Only at the very late stage of senescence, almost all cells were observed to contain gerontoplasts. Our data indicate that leaf senescence is rather characterized by an increase in the proportion of cells possessing rapidly formed gerontoplasts than by a slow differentiation of chloroplasts into gerontoplasts.

The alternative way of chloroplast dismantling as revealed by our study on the high-yield barley variety

Lomerit might have at least two consequences. On one hand, the parallel degradation of LHCs and PSII core proteins minimizes the risk for photoinhibition by overexcitation of PSII. On the other hand, specific energy requirements for chloroplast breakdown are better met, because this highly regulated energy consuming process requires the coordinated activity of many ATP dependent enzymes involved in degradation of chlorophyll, lipids and proteins. It would be indeed favorable for the plant's photosynthetic performance to maintain stroma thylakoids with the ATP synthesis machinery. ATP synthesis is not solely dependent on linear electron flow but can also be maintained with cyclic electron transport involving PSI. Specific activation of cyclic electron transport at PSI has been reported to occur during senescence or stress conditions when high rates of ATP synthesis are needed (Rumeau et al. 2007).

In this article, we propose that preferential degradation of grana thylakoids is a favorable alternative strategy of chloroplast dismantling selected during breeding of barley because it coincides with high and stable plant productivity. Indeed, degradation of grana thylakoids could be a means to avoid formation of singlet oxygen known to induce cell death processes (Apel and Hirt 2004). Accordingly, the results obtained by chlorophyll fluorescence and P700 absorbance change measurements as well as immunoblot analyses did not indicate any imbalance in the photosynthetic apparatus occurring during its senescence associated degradation. PSI and PSII activities declined in parallel with similar kinetics and the efficiency of the remaining PSII centers stayed at a high level. We hence hypothesize that senescence of flag leaves of cv. Lomerit is not accompanied by an increase in oxidative stress, which was proposed to be an intrinsic unavoidable feature of leaf senescence (Zimmermann and Zentgraf 2005). Future research on leaf senescence of the two barley cultivars will focus on the levels of reactive oxygen species and antioxidative systems.

Acknowledgements—We thank Anke Schäfer, Susanne Braun, Jens Hermann and Ulrike Voigt (Institute of Botany, CAU, Kiel) and Marita Beese (Central Microscopy, CAU, Kiel) for excellent technical assistance. We also thank Rüdiger Stroeh (farm manager of Hohenschulen, CAU Kiel, Germany) and his co-workers for preparation of field plots. We thank the German Research Foundation (DFG) for financial support (KR1350/14-1; HU376/15-1).

References

Adams WW, Winter K, Schreiber U, Schramel P (1990) Photosynthesis and chlorophyll fluorescence

characteristics in relationship to changes in pigment and element composition of leaves of *Platanus occidentalis* L. during autumnal leaf senescence. *Plant Physiol* 92: 1184–1190

Anderson JM (1999) Insights into the consequence of grana stacking of thylakoid membranes in vascular plants: a personal perspective. *Aust J Plant Physiol* 26: 625–639

Anderson JM, Andersson B (1981) Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll-protein complexes in spinach thylakoid membranes. *Proc Aust Biochem Soc* 14: 124–124

Anderson JM, Andersson B (1982) The architecture of photosynthetic membranes – lateral and transverse organization. *Trends Biochem Sci* 7: 288–292

Anderson JM, Chow WS, Goodchild DJ (1988) Thylakoid membrane organization in sun shade acclimation. *Aust J Plant Physiol* 15: 11–26

Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 55: 373–399

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

Biswal UC, Biswal B (1988) Ultrastructural modifications and biochemical changes during senescence of chloroplasts. *Int Rev Cytol* 13: 271–321

Bruce BD, Malkin R (1991) Biosynthesis of the chloroplast cytochrome b6f complex – studies in a photosynthetic mutant of *Lemna*. *Plant Cell* 3: 203–212

Chomczynski P, Mackey K (1995) Modification of the tri-reagent (Tm) procedure for isolation of RNA from polysaccharide rich and proteoglycan rich sources. *Biotechniques* 19: 942–945

Genty B, Briantais J-M, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 990: 87–92

Gepstein S (1988) Photosynthesis. In: Noodén LD, Leopold AC (eds) *Senescence and Aging in Plants*. Academic Press Inc, San Diego, CA, pp 85–109

Gregersen PL, Holm PB, Krupinska K (2008) Leaf senescence and nutrient remobilisation in barley and wheat. *Plant Biol* 10: 37–49

Hidema J, Makino A, Kurita Y, Mae T, Ojima K (1992) Changes in the levels of chlorophyll and light-harvesting chlorophyll a/b protein of PSII in rice leaves aged under different irradiances from full expansion through senescence. *Plant Cell Physiol* 33: 1209–1214

Hilditch P, Thomas H, Rogers L (1986) Leaf senescence in a nonyellowing mutant of *Festuca pratensis* – photosynthesis and photosynthetic electron transport. *Planta* 167: 146–151

Hörtensteiner S, Feller U (2002) Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *J Exp Bot* 53: 927–937

- Humbeck K, Krupinska K (2003) The abundance of minor chlorophyll a/b-binding proteins CP29 and LHCl of barley (*Hordeum vulgare* L.) during leaf senescence is controlled by light. *J Exp Bot* 54: 375–383
- Humbeck K, Klopstech K, Krupinska K (1994) Expression of early light inducible proteins (ELIP) in flag leaves of field grown barley. *Plant Physiol* 105: 1217–1222
- Humbeck K, Quast S, Krupinska K (1996) Functional and molecular changes in the photosynthetic apparatus during senescence of flag leaves from field-grown barley plants. *Plant Cell Environ* 19: 337–344
- Hurkman WJ (1979) Ultrastructural changes of chloroplasts in attached and detached, aging primary wheat leaves. *Am J Bot* 66: 64–70
- Klughammer C, Schreiber U (1994) An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700⁺-absorbance changes at 830 nm. *Planta* 192: 261–268
- Krupinska K (2006) Fate and activities of plastids during leaf senescence. In: Wise R, Hooper J (eds) *The Structure and Function of Plastids*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 433–449
- Krupinska K, Humbeck K (2004) Photosynthesis and chloroplast breakdown (review). In: Noóden LD (ed) *Plant Cell Death Processes*. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, pp 169–188
- Krupinska K, Haussühl K, Schäfer A, van der Kooij TA, Leckband G, Lörz H, Falk J (2002) A novel nucleus-targeted protein is expressed in barley leaves during senescence and pathogen infection. *Plant Physiol* 130: 1172–1180
- Kura-Hotta M, Satoh K, Katoh S (1987) Relationship between photosynthesis and chlorophyll content during leaf senescence of rice seedlings. *Plant Cell Physiol* 28: 1321–1329
- Lichtenthaler HK (1969) Die Plastoglobuli von Spinat, ihre Größe und Zusammensetzung während der Chloroplastendegeneration. *Protoplasma* 68: 315–326
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275
- Matile P (1992) Chloroplast senescence. In: Baker NR, Thomas H (eds) *Crop Photosynthesis: Spatial and Temporal Determinants*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp 423–440
- Melis A (1991) Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. *Biochim Biophys Acta* 1058: 87–106
- Miersch I, Heise J, Zelmer I, Humbeck K (2000) Differential degradation of the photosynthetic apparatus during leaf senescence in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Biol* 2: 618–623
- Niinemets Ü, Bilger W, Kull O, Tenhunen JD (1998) Acclimation to high irradiance in temperate deciduous trees in the field: changes in xanthophyll cycle pool size and in photosynthetic capacity along a canopy light gradient. *Plant Cell Environ* 21: 1205–1218
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45
- Pötter E, Klopstech K (1993) Effects of light stress on the expression of early light-inducible proteins in barley. *Eur J Biochem* 214: 779–786
- Reynolds ES (1963) Use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17: 208
- Roberts DR, Thompson JE, Dumbroff EB, Gepstein S, Mattoo AK (1987) Differential changes in the synthesis and steady state level of thylakoid proteins during bean leaf senescence. *Plant Mol Biol* 9: 343–353
- Rumeau D, Peltier G, Cournac L (2007) Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. *Plant Cell Environ* 30: 1041–1051
- Scharrenberg C, Falk J, Quast S, Haussühl K, Humbeck K, Krupinska K (2003) Isolation of senescence-related cDNAs from flag leaves of field grown barley plants. *Physiol Plant* 118: 278–288
- Spundova M, Popelkova H, Ilik P, Skotnica J, Novotny R, Naus J (2003) Ultra-structural and functional changes in the chloroplasts of detached barley leaves senescing under dark and light conditions. *J Plant Physiol* 160: 1051–1058
- Tang YL, Wen XG, Lu CM (2005) Differential changes in degradation of chlorophyll-protein complexes of photosystem I and photosystem II during flag leaf senescence of rice. *Plant Physiol Biochem* 43: 193–201
- Watson ML (1958) Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol* 4: 475–478
- Wolf FT (1956) Changes in chlorophyll-a and chlorophyll-b in autumn leaves. *Am J Bot* 43: 714–718
- Zimmermann P, Zentgraf U (2005) The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cell Mol Biol Lett* 10: 515–534

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Mean values of temperature, radiation and rainfall in the months April, May and June in 2009 and 2010, respectively. In addition the long term average values are indicated.

Figure S1. Weather situation in the sampling periods ranging from May 27 until June 18 in 2009 and from June 12 to July 2 in 2010. The diagrams show the

average daily temperature ($^{\circ}\text{C}$, black circles), daily rainfall (mm, open triangles) and average daily global radiation (W m^{-2} , columns).

Figure S2. Characterization of flag leaves collected from field plots of cv. Lomerit in 2010. Chlorophyll content was analyzed every other day from June 12 to July 30. For comparison the changes in dry weight of ears are shown.

Figure S3. Photosynthetic activities of flag leaves of cv. Lomerit during maturation and senescence in field plots in 2010. Measurements of carbon dioxide fixation were done at saturating CO_2 and at light intensity of $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Efficiency of photosystem II was measured as described in the section material and

methods. SD were calculated for measurements with 20 leaves (five leaves from four plots, respectively).

Figure S4. Photochemical quantum yields of photosystem I and II, measured with a dual PAM device on flag leaves collected every other day from field plots in 2010.

Figure S5. Molar ratio of chlorophyll *a* to chlorophyll *b* of the flag leaves analyzed for chlorophyll content in Fig. S2.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Table S1. Mean values of temperature, radiation and rainfall in the months April, May and June in 2009 and 2010, respectively. In addition the long term average value are indicated.

	temperature [°C]			radiation [MJ/(m ² d)]			rainfall [mm/month]		
	2009	2010	average	2009	2010	average	2009	2010	average
April	10,4	7,5	8,0	17,7	15,4	12,1	7,0	17,0	44,0
May	11,7	8,8	11,9	20,4	14,6	16,3	52,0	50,0	62,0
June	13,2	14,3	14,8	19,9	21,3	16,6	104,0	50,0	69,0

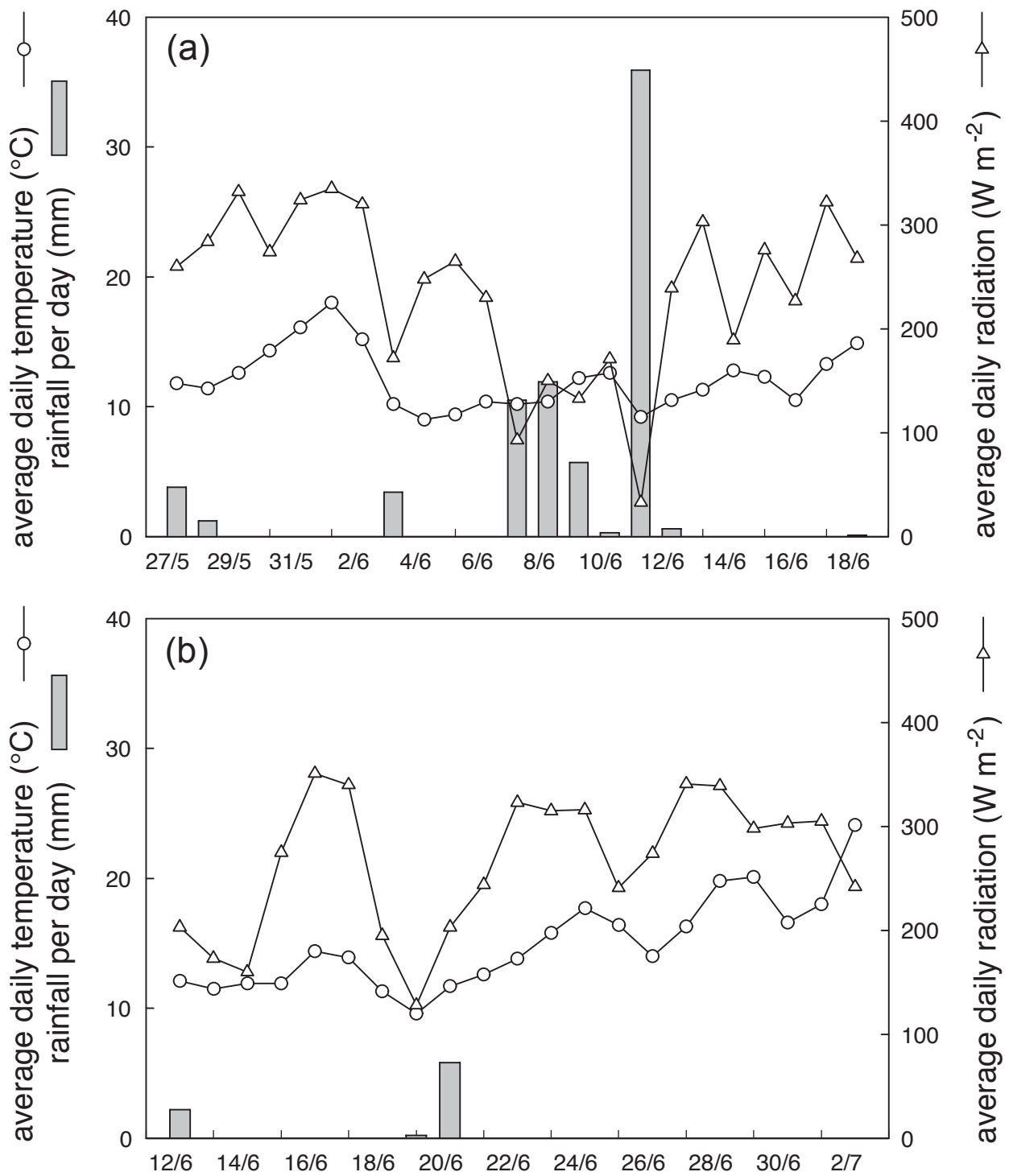


Figure S1. Weather situation in the sampling periods ranging from 27 May until 18 June in 2009 and from 12 June until 2 July in 2010.

The diagrams show the average daily temperature ($^{\circ}C$, circles), daily rainfall (mm, triangles) and average daily global radiation ($W m^{-2}$, columns).

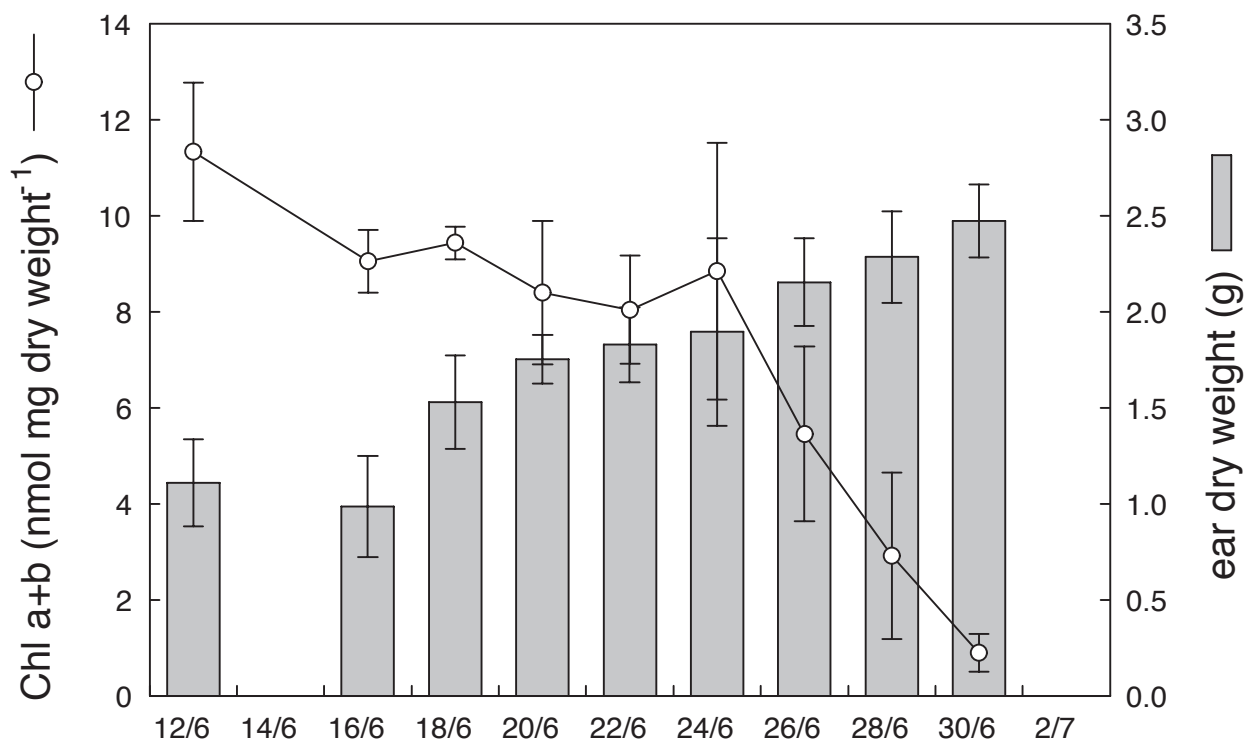


Figure S2. Characterization of flag leaves collected from field plots of cv. Lomerit in 2010. Chlorophyll content was analysed every other day from 12 June until 30. July. For comparison the changes in dry weight of ears are shown.

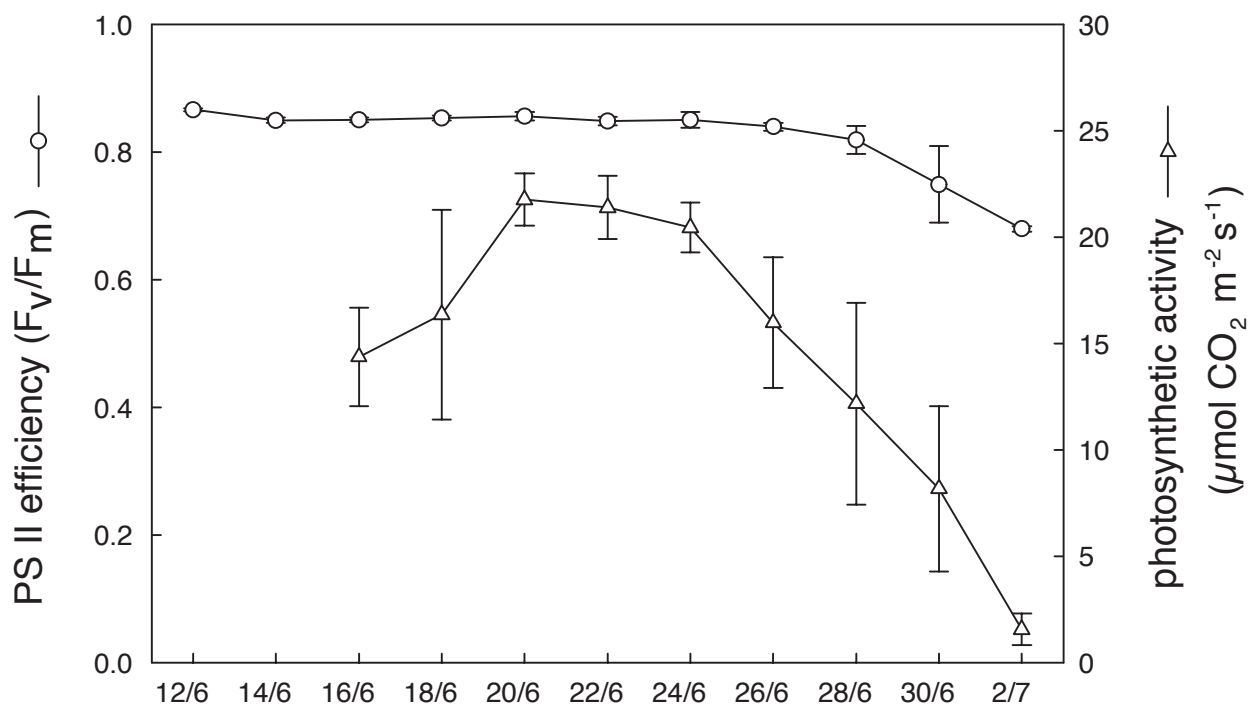


Figure S3. Photosynthetic activities of flag leaves of cv. Lomerit during maturation and senescence in field plots in 2010. Measurements of carbon dioxide fixation were done at saturating CO₂ and at light intensity of 2000 μmol m⁻² s⁻¹. Efficiency of photosystem II was measured as described in 'Material and Methods'. Standard deviations were calculated for measurements with 20 leaves (5 leaves from four plots, respectively).

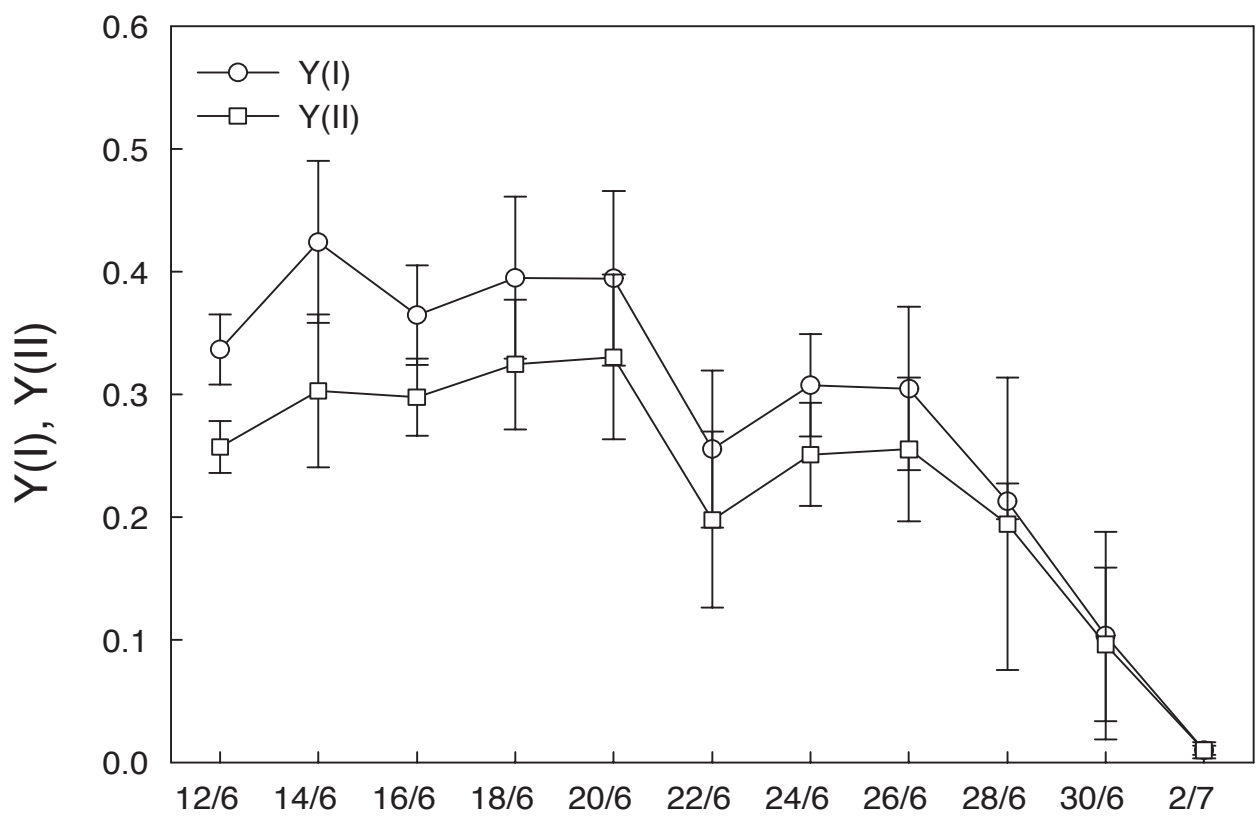


Figure S4. Photochemical quantum yields of photosystem I and II, measured with a dual PAM device on flag leaves collected every other day from field plots in 2010.

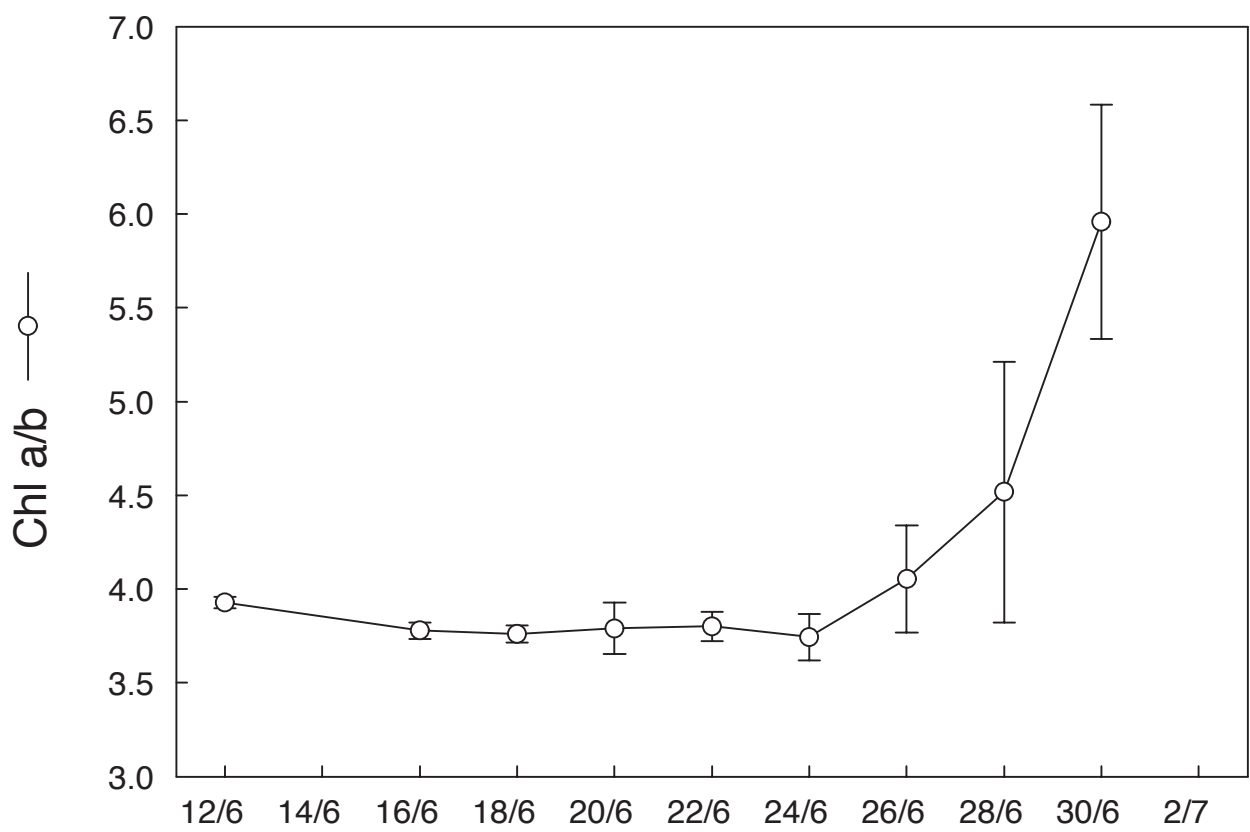


Figure S5. Molar ratio of chlorophyll a to chlorophyll b of the flag leaves analyzed for chlorophyll content in Figure 2 of the Supporting Information.

Arbeit II

RESEARCH PAPER

Identification of predominant genes involved in regulation and execution of senescence-associated nitrogen remobilization in flag leaves of field grown barley

Julien Hollmann¹, Per L. Gregersen² and Karin Krupinska^{1,*}¹ Institute of Botany, Christian-Albrechts-University of Kiel, Olshausenstraße 40, 24098 Kiel, Germany² Department of Molecular Biology and Genetics, Aarhus University, AU-Flakkebjerg, DK-4200 Slagelse, Denmark* To whom correspondence should be addressed. E-mail: kkrupinska@bot.uni-kiel.de

Received 19 December 2013; Revised 7 February 2014; Accepted 10 February 2014

Abstract

The transcriptomes of senescing flag leaves collected from barley field plots with standard or high nitrogen supply were compared to identify genes specifically associated with nitrogen remobilization during leaf senescence under agronomically relevant conditions. In flag leaves collected in field plots with high nitrogen supply, the decline in chlorophyll content was delayed. By comparing changes in gene expression for the two nitrogen levels, it was possible to discriminate genes related to nitrogen remobilization during senescence and genes involved in other processes associated with the late development of leaves under field conditions. Predominant genes that were more strongly upregulated during senescence of flag leaves from plants with standard nitrogen supply included genes encoding the transcription factor HvNAC026, serine type protease SCPL51, and the autophagy factors APG7 and ATG18F. Elevated expression of these genes in senescing leaves from plants with standard nitrogen supply indicates important roles of the corresponding proteins in nitrogen remobilization. In comparison, the genes upregulated in both flag leaf samples might have roles in general senescence processes associated with late leaf development. Among these genes were the transcription factor genes *HvNAC001*, *HvNAC005*, *HvNAC013*, *HvWRKY12* and *MYB*, genes encoding the papain-like cysteine peptidases HvPAP14 and HvPAP20, as well as a subtilase gene.

Key words: Barley, field experiment, flag leaf, *Hordeum vulgare* L., nitrogen remobilization, nitrogen supply, leaf senescence, HvNAC026.

Introduction

Leaf senescence is a highly regulated complex developmental process terminated by death of the organ. The purpose of senescence is to remobilize nutrients, in particular nitrogen, from the senescing organs to still growing plant parts, and finally to the developing seeds. In crop plants such as cereals, senescence is a slow process, whereas in other plants, in particular *Arabidopsis*, senescence might occur quickly, and hence has been discussed as a cell-death process (Jansson and Thomas, 2008).

In crop plants, leaf senescence is of pivotal importance for yield (Gregersen *et al.*, 2013). It has been estimated that during seed filling of most annual crop plants more than 70% of the leaf nitrogen is exported from the senescing leaves (Peoples and Dalling, 1988). Chloroplast proteins are the major source for grain nitrogen (Hörtensteiner and Feller, 2002). Up to 70% of the chloroplast nitrogen is assembled into ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco). Another major fraction is contained in the

Abbreviations: HN, high nitrogen; qRT-PCR, quantitative real-time PCR; Rubisco, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase; SD, standard deviation; SN, standard nitrogen; SP2 splicing factor 2.

© The Author 2014. Published by Oxford University Press on behalf of the Society for Experimental Biology.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membrane. As long as chlorophyll is bound to these proteins, they are not accessible to proteases (Hörtensteiner and Feller, 2002). The decline in chlorophyll content preceding the degradation of the membrane proteins is therefore an excellent marker of leaf senescence (Humbeck *et al.*, 1996).

Senescence can be accelerated under situations of low nitrogen supply (Schulze *et al.*, 1994), or it can be delayed or even reversed by excess nitrogen supply (Diaz *et al.*, 2005; Schildhauer *et al.*, 2008). A low nitrogen nutrition status during senescence is also known to promote proteolysis (Masclaux *et al.*, 2000). Despite their importance for plant productivity, knowledge of the genes encoding the major proteases involved in senescence-associated degradation of chloroplast proteins and the factors regulating protein breakdown remains scarce. Based on gene expression studies, several proteases that are encoded by genes upregulated during senescence were identified, but their substrates are not known (Bhalerao *et al.*, 2003; Gepstein *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2004a; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Gregersen and Holm, 2006).

The intention of this study was to identify genes in barley encoding proteins that might be important for nitrogen remobilization during leaf senescence under agronomically relevant conditions in the field. For this purpose the transcriptomes of flag leaves collected from field plots supplied with two different levels of nitrogen were analysed. Flag leaves have been chosen because their senescence is known to be most important for seed filling (Stoy, 1973; Stamp and Herzog, 1976). Senescence symptoms in flag leaves of plants grown at high nitrogen supply were suppressed compared with flag leaves from plots with standard nitrogen supply. To identify key factors involved in regulation of nitrogen remobilization the first goal of this microarray analysis was to identify genes encoding transcription factors. The second goal was to identify genes encoding enzymes putatively involved in protein degradation.

Materials and methods

Plant material

The winter barley cultivar Lomerit (*Hordeum vulgare* L., cv. Lomerit), introduced in 2001, has been one of the most cultivated winter barley varieties in Germany for several years. The field trials were conducted at the Experimental Station Hohenschulen belonging to the Agricultural Faculty of the University of Kiel (see also Krupinska *et al.*, 2012). Plants were grown with a density of 300 plants m⁻² in plots of 3 × 8 m. The plots were distributed within a large field. The field used in 2010 was adjacent to the field used in 2009. For both fields, rapeseed, wheat, and oat were used as previous crops. During crop rotation rapeseed and oat were consistently fertilized, wheat and barley plots were inversely fertilized. Thus, the nitrogen content of the soil before application of fertilizer was probably similar in both years.

Barley field plots fertilized with a total standard nitrogen supply of 80 kg per hectare were designated as standard nitrogen plots (SN) and those fertilized with a total nitrogen supply of 240 kg per hectare were designated as plots with high nitrogen supply (HN). Flag leaves from four plots each of SN and HN were collected between 9.00 and 11:30 CET (Central European Time) from 27 May to

20 June in 2009, and from 12 June to 4 July in 2010. Meteorological data on air temperature (107 Temperature Probe, Campbell Scientific, Bremen, Germany), rainfall (Ombrometer, Thies Clima, Göttingen, Germany) and global radiation (SP-Lite, Thies Clima, Göttingen, Germany) were acquired from devices installed next to the field (Krupinska *et al.*, 2012).

Determination of chlorophyll contents

The relative chlorophyll content of flag leaves was determined in the field non-destructively using a Minolta SPAD-502 (Konica Minolta Sensing, Osaka, Japan). The measurements were done 2 cm above the bases of the leaves (20 leaves in each plot, four plots in total).

Determination of the ear dry weight

To determine the average dry weights of the ears, ears were collected at each time of leaf sampling (four plants in each plot, four plots in total) and were dried until their weights were constant.

Determination of the leaf protein content

For protein determination eight flag leaves (two leaves from each plot, four plots in total) were frozen and powdered in liquid nitrogen. Before freezing, leaf area was determined using SigmaScan (Systat, San José, California, USA). Proteins were extracted as previously described (Pötter and Kloppstech, 1993). The protein content was determined using the Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany) according to manufacturer's instructions.

Isolation of RNA

Samples were frozen and powdered in liquid nitrogen, total RNA was extracted using the Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma, Steinheim, Germany) according to manufacturer's instructions. RNA concentrations were determined by using a NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, Delaware, USA), quality was verified by electrophoresis on 1% agarose gels. RNA samples used for the microarray experiment were additionally verified by using a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA) conducted by ImaGenes (Berlin, Germany).

Microarray analysis

Microarray analyses were performed using three replicate samples of flag leaves collected from SN as well as HN field plots in 2009. Preparation and hybridizations of the samples to the 4x44k barley gene expression microarrays (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA) were conducted by ImaGenes (Berlin, Germany).

For data analysis, the limma package version 2.2.0 (Smyth, 2005) of the R software version 2.2.0 (R development core team, 2005) was used. Raw data sets were corrected for background signals using the limma function "half". Normalization between arrays was done by using the 'quantile' function (Bolstad *et al.*, 2003). Differentially expressed genes were identified using the 'lmFit' and the 'contrast.fit' functions of the limma package. The Blast algorithm was used to screen the microarray dataset as well as publicly available databases. Redundancies of the probes of the 44k microarray were eliminated by a BlastN search of the barley genome assembly (Mayer *et al.*, 2011) and the HarvEST 35 assembly, both available at HarvEST (<http://www.harvest-web.org>, last accessed 24 February 2014), as well as by a BlastN search of a recently generated transcriptome assembly (Kohl *et al.*, 2012). Initially, functional classification and annotation of genes was performed using the Mercator software (Usadel *et al.*, 2009). Results were subsequently checked by BlastX searches of the non-redundant database from NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, last accessed 24 February 2014) and the MEROPS

peptidase database (Rawlings *et al.*, 2012). To generate heat maps, the Cluster 3.0 Software and TreeViewer 1.1.3 were used. For simplicity, sequences included on the microarray or in the qRT-PCR were designated in this work as genes.

Quantitative real-time PCR

RNA samples from leaves collected in 2010 were used for cDNA synthesis using the SuperScript II Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer's instructions. All reactions were done in three biological replicates, and for each of the biological replicates three technical replicates were measured. Primer design and quantitative real-time PCR were performed as described previously (Christiansen *et al.*, 2011) using the ABI Prism7900HT Sequence Detection System and the Power SYBR Green PCR master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA). As references the gene encoding the 18S ribosomal RNA (*AK251731*) and the gene encoding the splicing factor 2 (SP2) (*AK249101*) (Fig. 3A) were used. The primer sequences are listed in Supplementary Table S2 (available at *JXB* online).

Ct values and fold changes were calculated by the R software (R developmental core team, 2005) using the HTqPCR package (Dvinge and Bertone, 2009).

Results

Senescence of flag leaves in the field at standard nitrogen supply

For characterization of senescence of flag leaves from the 2009 field plots, the relative chlorophyll contents and protein contents were determined (Fig. 1A, B). Although the relative chlorophyll content of leaves from standard-nitrogen plots (SN) in the sampling period from 4 until 20 June 2009 declined by 80%, the chlorophyll content of leaves from high-nitrogen plots (HN) declined by only 24% during the same period. By 12 June 2009, the decrease in chlorophyll content was accelerated in leaves collected from plots of both nitrogen supplies. This date was defined as the day of senescence onset (Krupinska *et al.*, 2012). The protein content decreased in SN leaves during the whole sampling period until 16 June 2009 to a level of 42% compared with the initial protein content. In HN leaves the protein content decreased from 27 May 2009 until 4 June 2009 to a level of 55% compared with the initial protein content, and stayed almost constant thereafter (Fig. 1B). Grain filling was monitored by ear dry weight, which increased continuously during the sampling period and reached a maximum at 18 June 2009 (Fig. 1C). No significant differences were observed between the dry weight of SN ears and HN ears indicating that the standard nitrogen supply did not limit the filling of the kernels.

In comparison to 2009 the development of the plants in 2010 was delayed by about 20 days (days of flowering were 11 May 2009 and 31 May 2010). This was compensated partly by a shorter period between the heading date and the onset of senescence (Fig. 1; Supplementary Fig. S1, available at *JXB* online).

Gene expression analyses by microarrays

To identify the predominant genes important for nitrogen-remobilization processes, senescing flag leaves from SN field

plots were compared with flag leaves collected at the same time from HN field plots. Changes in gene expression during senescence were analysed using the 4x44k barley microarray. Raw datasets generated by scanning of the hybridized arrays are available on ArrayExpress (E-MTAB-2202).

The leaves collected on 4 June 2009 from SN and HN plots (SN1, HN1) were chosen as non-senescent control leaves. Expression changes between senescing SN leaves and SN control leaves that were not senescing (SN2 vs. SN1) were

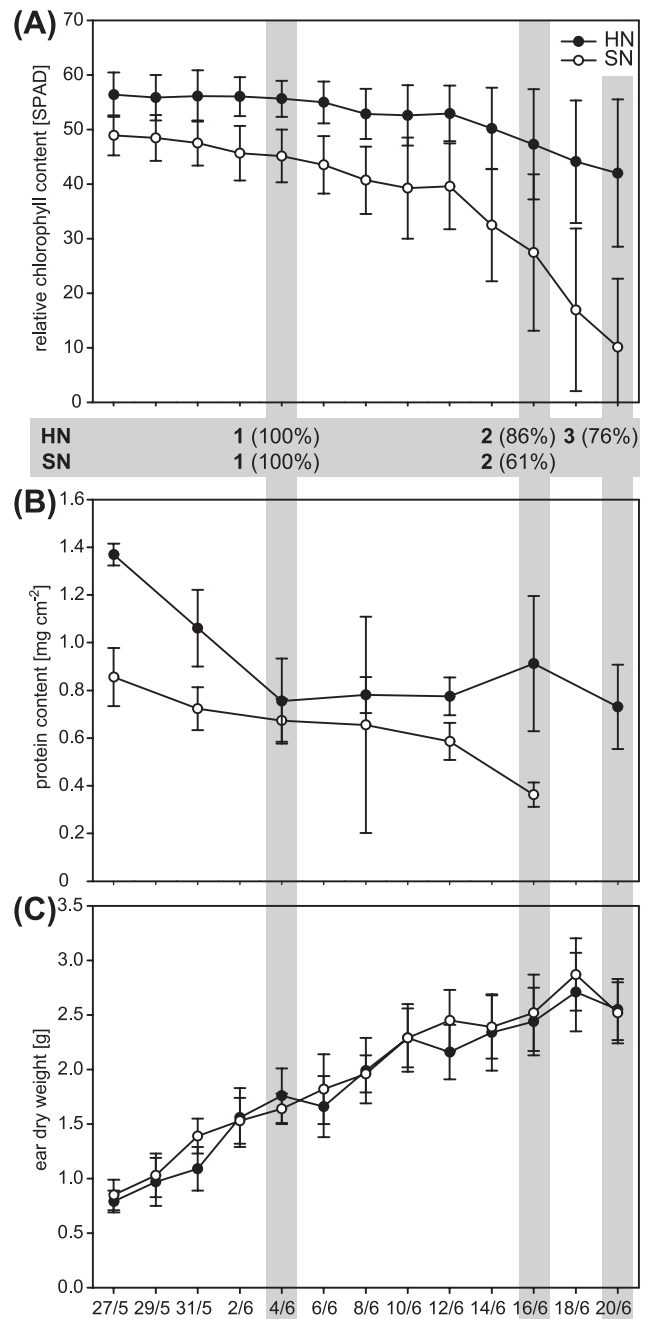


Fig. 1. Characterization of flag leaves and ears collected from barley plants grown in field plots supplied with standard (SN) or high nitrogen (HN) in the period from 27 May (16 days after flowering of SN and HN plants) until 20 June 2009. Samples used for microarray analyses are highlighted in grey. (A) Relative chlorophyll content. Error bars indicate standard deviations (SD), $n=80$. (B) Protein content of leaves. Error bars indicate SD, $n=8$. (C) Dry weight of the ears. Error bars indicate SD, $n=16$.

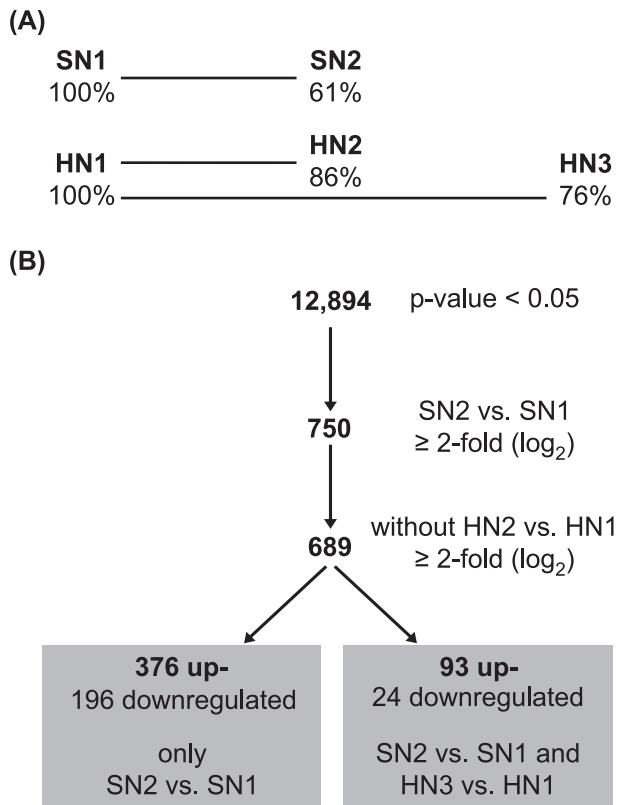


Fig. 2. (A) Microarray design used to analyse differences between non-senescent and senescent samples from plants grown under standard nitrogen (SN) or high nitrogen (HN) supply. Relative chlorophyll contents (Fig. 1A) are given in percentages. Each line represents one comparison. (B) Filtering of the microarray results. Conditions for each filtering step are given. The procedure resulted in two groups of genes: genes only differentially expressed in the comparison SN2 vs. SN1 and genes differentially expressed in both comparisons SN2 vs. SN1 and HN3 vs. HN1.

compared with the changes in gene expression occurring in the same period of time in HN leaves (HN2 vs. HN1) (Fig. 2A). At the second sampling time point (SN2, HN2) the chlorophyll content in SN flag leaves was reduced by 39%, whereas in HN leaves it was reduced by only 14%. Importantly, both samples were collected at the same time of the day. It is expected that changes in gene expression caused by environmental factors such as light and temperature occur simultaneously in both samples and are eliminated by the subtraction of the datasets (Fig. 2B). To distinguish between genes involved in nitrogen remobilization and other developmentally regulated genes, expression changes during senescence of SN leaves (SN2 vs. SN1) were compared with changes in gene expression in the oldest HN leaves (HN3 vs. HN1), which were collected at 20 June 2009 (Fig. 2B). At this third sampling time point (HN3) the chlorophyll content in HN3 flag leaves was reduced by only 24% compared with the first time point (HN1).

Reduction of redundancies of the probes on the 44k barley microarray and statistical analysis in limma resulted in 12,894 genes that appeared to be unique and had an adjusted *P*-value smaller than 0.05 in the combined analysis for differentially expressed genes (Fig. 2B). Of the differentially expressed genes, 750 showed at least 2-fold (\log_2) changes in expression in the comparison of SN2 vs. SN1 (Fig. 2B;

Supplementary Table S1, available at *JXB* online) and these were chosen for further analysis. To eliminate expression changes due to environmental factors, the 61 genes, which were also differentially expressed during the same period in HN leaves (HN2 vs. HN1), were subtracted from this gene pool (Fig. 2B; Supplementary Table S1, available at *JXB* online).

Among the remaining 689 genes, 117 (93 up- and 24 down-regulated) were also differentially expressed during further development of HN leaves (HN3 vs. HN1) and 572 (376 up- and 196 down-regulated) genes were differentially expressed in senescing SN leaves (SN2 vs. SN1) (Fig. 2B; Supplementary Table S1, available at *JXB* online). 75 of the 117 genes differentially expressed in both SN and HN leaves (SN2 vs. SN1 and HN3 vs. HN1) as well as 330 of the 572 genes with altered expression levels in SN leaves (only in SN2 vs. SN1) could be assigned with high accuracy to a total of 27 functional categories called BIN codes (Thimm *et al.*, 2004) (Supplementary Fig. S2; Supplementary Table S1, available at *JXB* online). Overall, the genes identified as differentially expressed belong mainly to the categories transport, development, signalling, protein, and RNA (Supplementary Table S1, available at *JXB* online). With regard to nitrogen remobilization, the analysis was focused on genes involved in degradation and regulation processes (Table 1).

The 93 genes upregulated at late developmental stages from both SN (SN2 vs. SN1) and HN (HN3 vs. HN1) plots might play roles in age-dependent processes occurring independent of nitrogen supply. Among these 93 genes, five genes were identified encoding transcription factors and 13 genes encoding proteins putatively involved in processes associated with protein degradation (Table 1A). The transcription factors included MYB, HvNAC013, HvNAC005 and HvWRKY12. Among the genes associated with protein degradation, four encoded peptidases including HvSAG12, seven encoded factors of the ubiquitin-proteasome-system and one was the barley orthologue of the *Arabidopsis* autophagy-related gene *ATG8*. *HvSAG12* and one of its orthologues in *Arabidopsis*, encode a cysteine protease which is used as a senescence marker gene (Lohman *et al.*, 1994). Its senescence-associated upregulation was previously shown in barley (Jukanti *et al.*, 2008; Parrott *et al.*, 2010) and wheat (Gregersen and Holm, 2006; Ruuska *et al.*, 2008).

Leaves of plants with standard nitrogen supply (SN) showed typical symptoms of senescence. The genes strongly upregulated in these leaves (SN2 vs. SN1) hence might play roles in proteolysis and nitrogen remobilization. The two genes with highest upregulation during senescence of SN leaves were *HvPAP20*, encoding a cysteine peptidase, and *HvNAC026*, encoding a NAC transcription factor (Table 1B). Furthermore, 13 genes encoding putative transcription factors and 29 genes putatively involved in protein degradation processes were identified. Most of the transcription factors can be assigned to the NAC, C2C2(Zn), C2H2, and IAA families. The other genes encode eight peptidases, 11 factors of the ubiquitin-proteasome-system (UPS), seven autophagy-related factors, and three other proteins putatively involved in protein degradation.

Table 1. Fold changes in expression as determined by the microarray hybridization of genes assigned to the categories 'RNA/regulation of transcription' and 'protein/degradation'. (A) Genes upregulated (min. 2-fold log₂) in both senescing flag leaves of plants from plots with standard (SN2 vs. SN1) and excess (HN3 vs. HN1) nitrogen supply. (B) Genes exclusively upregulated (min. 2-fold log₂) in senescing flag leaves of plants from plots with standard nitrogen supply (SN2 vs. SN1). If possible, gene names are indicated for either barley or for the orthologous genes in Arabidopsis. Genes tested by qRT-PCR are marked by asterisks.

Accession	Name	BIN Description	SN	HN		SN vs. HN		
			2 vs. 1	2 vs. 1	3 vs. 1	1 vs. 1	2 vs. 2	2 vs. 3
(A) protein.degradation								
CA019173			2,60	1,93	3,32	2,02	2,69	1,30
TA40019_4513	ATG8	autophagy	2,82	1,27	2,16	0,63	2,18	1,30
AM941123*	HvSAG12	cysteine protease	2,59	1,38	2,18	0,92	2,13	1,33
AM941124*	HvPAP14	cysteine protease	5,26	1,17	2,92	0,55	4,64	2,89
BF256720	RD21	cysteine protease	2,18	1,06	2,17	0,35	1,47	0,35
TA42918_4513*	Subtilase	subtilases	6,13	1,91	4,03	0,43	4,66	2,53
TA36132_4513	UBC5	ubiquitin.E2	3,76	1,28	2,71	1,18	3,66	2,23
BG414942		ubiquitin.E3.RING	3,65	1,28	2,46	0,72	3,09	1,92
TA46919_4513		ubiquitin.E3.RING	3,57	1,53	2,20	0,67	2,72	2,04
CA008354		ubiquitin.E3.RING	2,99	1,28	2,10	0,87	2,58	1,76
TA37012_4513	RGLG2	ubiquitin.E3.RING	2,22	1,03	2,04	0,17	1,36	0,34
TA35901_4513		ubiquitin.E3.SCF.FBOX	3,84	1,58	2,57	0,57	2,82	1,84
TA35023_4513	UBP5	ubiquitin.ubiquitin protease	2,61	0,65	2,78	-0,13	1,83	-0,30
RNA.regulation of transcription								
TA48008_4513*	MYB	MYB-related transcription factor family	3,91	0,77	2,10	0,27	3,42	2,08
TC163636*	HvNAC013	NAC domain transcription factor family	3,32	1,45	2,90	0,77	2,64	1,18
AK251058*	HvNAC005	NAC domain transcription factor family	2,15	1,88	2,34	1,15	1,43	0,96
TC164038		putative transcription regulator	3,48	1,02	2,32	0,98	3,45	2,14
BM370440*	HvWRKY12	WRKY domain transcription factor family	3,24	1,64	2,72	0,40	2,00	0,91
(B) protein.degradation								
BF258397			2,60	0,73	1,41	0,35	2,22	1,53
BU985502	AAH-2		2,16	0,58	1,17	0,49	2,07	1,48
TA38933_4513		AAA type	2,34	0,39	0,52	0,21	2,16	2,03
TA52242_4513*	APG7	autophagy	3,80	-0,66	0,50	-1,06	3,40	2,23
BF622783	ATG3	autophagy	3,16	0,59	1,66	0,43	3,00	1,93
BE216622	APG8A	autophagy	3,12	0,94	1,99	0,58	2,77	1,72
BQ471466		autophagy	2,56	0,61	1,25	0,58	2,53	1,88
AM085509	APG9	autophagy	2,40	0,64	1,43	0,42	2,19	1,39
TA56628_4513*	ATG18F	autophagy	2,35	0,44	1,19	0,92	2,83	2,08
BF628472	ATG8C	autophagy	2,13	0,86	1,08	0,18	1,45	1,23
AM941127*	HvPAP20	cysteine protease	4,27	0,84	1,69	-0,10	3,32	2,48
AM941122	XBCP3	cysteine protease	3,66	1,14	1,98	-0,02	2,50	1,65
AM941116		cysteine protease	2,37	0,62	1,01	0,42	2,18	1,79
TA45222_4513		cysteine protease	2,36	0,44	0,97	0,31	2,23	1,71
EX594583		cysteine protease	2,24	0,78	1,38	0,52	1,98	1,38
CD663018	RD19	cysteine protease	2,17	0,72	1,32	0,38	1,82	1,22
AK251038*	SCPL51	serine protease	3,56	1,14	1,63	0,30	2,72	2,23
TA57593_4513	ATRBL1	serine protease	2,61	0,15	0,48	-0,13	2,33	1,99
BY868089	UBC11	ubiquitin.E2	2,24	0,66	0,96	0,32	1,91	1,61
TA53580_4513		ubiquitin.E3.BTB/POZ	3,93	0,10	1,64	0,50	4,33	2,79
BY868672		ubiquitin.E3.BTB/POZ Cullin3.BTB/POZ	2,43	0,49	0,86	0,07	2,01	1,63
TA44869_4513		ubiquitin.E3.RING	2,92	1,28	1,60	0,22	1,86	1,54
CA008421		ubiquitin.E3.RING	2,35	0,72	1,49	0,38	2,01	1,25
BM816188		ubiquitin.E3.RING	2,13	0,56	1,11	0,38	1,95	1,40

Table 1. *Continued*

Accession	Name	BIN Description	SN	HN		SN vs. HN		
			2 vs. 1	2 vs. 1	3 vs. 1	1 vs. 1	2 vs. 2	2 vs. 3
TA34605_4513		ubiquitin.E3.SCF.FBOX	2,80	0,70	1,14	0,51	2,61	2,17
AK248328		ubiquitin.E3.SCF.FBOX	2,25	0,42	1,16	0,30	2,13	1,39
CX632454		ubiquitin.E3.SCF.FBOX	2,10	0,38	1,01	-0,30	1,41	0,79
TA31497_4513		ubiquitin.proteasome	2,03	0,76	1,31	0,22	1,49	0,93
TA57316_4513	UBQ3	ubiquitin.ubiquitin	2,72	1,45	1,55	0,14	1,41	1,31
RNA.regulation of transcription								
BE421551	IAA16	Aux/IAA family	3,22	0,04	0,84	0,56	3,74	2,94
EX590103		C2C2(Zn) CO-like	2,03	0,41	0,90	0,11	1,73	1,25
AK250112	AFO	C2C2(Zn) YABBY family	2,42	0,37	0,65	0,33	2,38	2,10
DQ151543		C2H2 zinc finger family	2,17	0,42	1,32	-0,03	1,72	0,82
TC164854*	HvNAC026	NAC domain transcription factor family	4,20	0,32	1,02	-0,05	3,83	3,14
EX573211*	HvNAC001	NAC domain transcription factor family	2,22	1,09	-1,30	0,17	1,30	1,19
TA39240_4513	HvNAC	NAC domain transcription factor family	3,06	1,45	1,28	0,20	1,81	1,98
CK124370		putative transcription regulator	3,01	0,41	1,20	0,47	3,07	2,29
TA39614_4513		putative transcription regulator	2,71	1,11	1,70	0,25	1,86	1,27
BJ448756		putative transcription regulator	2,51	0,48	0,72	0,48	2,51	2,28
TA43937_4513		unclassified	2,49	-0,15	0,21	-0,56	2,08	1,72
TA43565_4513		unclassified	2,38	0,81	1,83	0,53	2,11	1,08
EX578789	ATG18D	unclassified	2,34	0,64	1,25	0,03	1,74	1,12

Quantitative analyses of the expression of selected genes

Microarray analysis showed that 376 genes were highly upregulated mainly in senescing SN leaves (SN2), whereas 93 genes were upregulated in both senescing SN (SN2 vs. SN1) and HN (HN3 vs. HN1) flag leaves. To investigate whether the differences in expression levels of genes selected by microarray hybridizations are indeed caused by different quantities of nitrogen supply in the field, barley plants were grown in the following year (2010) in field plots supplied with the same two quantities of nitrogen. Again, flag leaves were collected from SN and HN plots. Expression of selected genes was analysed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) (Table 1, marked by asterisk; Fig. 3B, C).

qRT-PCR was done with RNA from flag leaves collected in 2010 at five stages of development. These stages were characterised by the relative chlorophyll (Supplementary Fig. S1A, available at *JXB* online) and protein contents (Supplementary Fig. S1B, available at *JXB* online) of the leaves. In addition, ear dry weight was determined (Supplementary Fig. S1C, available at *JXB* online). The relative chlorophyll content in HN and SN flag leaves at 12 June was set to 100%. Typically for senescing leaves, the transcript level of the gene coding for the small subunit of Rubisco (HvRBCS) declined in SN leaves during the sampling period, whereas in HN flag leaves its level was rather stable (Fig. 3A). Inversely, the transcript level of the senescence marker gene *HvSAG12* (Jukanti *et al.*, 2008; Parrott *et al.*, 2010) increased during development in both SN and HN leaves

(Fig. 3A). Genes showing senescence-associated upregulation in both SN and HN leaves such as the *SAG12* gene (Fig. 3A) might have functions in other senescence-associated processes than in nitrogen remobilization. Additional genes, which showed upregulation during leaf development independent of the nitrogen supply, encode the transcription factors MYB, HvNAC001, HvNAC005, HvNAC013, and HvWRKY12, as well as the two papain-like cysteine peptidases HvPAP14 and HvPAP20, and a gene encoding a subtilase (Fig. 3B). Among the genes showing highly increased expression during senescence of SN leaves were the genes encoding the transcription factor HvNAC026, a gene encoding an orthologue of the serine protease SCPL51 in *Arabidopsis* as well as two genes homologous to the genes encoding autophagy-associated proteins ATG7 and ATG18F in *Arabidopsis* (Fig. 3C).

Most of the genes selected by microarray hybridizations (Table 1) showed comparable tendencies in the expression profiles by qRT-PCR analysis (Fig. 3). Exceptions were the genes *HvNAC001* and *HvPAP20*, which in 2010 showed again a strong upregulation in senescing SN leaves but also in the elder HN leaves. The expression of the subtilase gene in SN leaves differed in 2010 from the previous year.

Discussion

Characterization of senescence of flag leaves collected from field-grown barley plants and determination of kernel weight during the time of leaf sampling showed that the standard

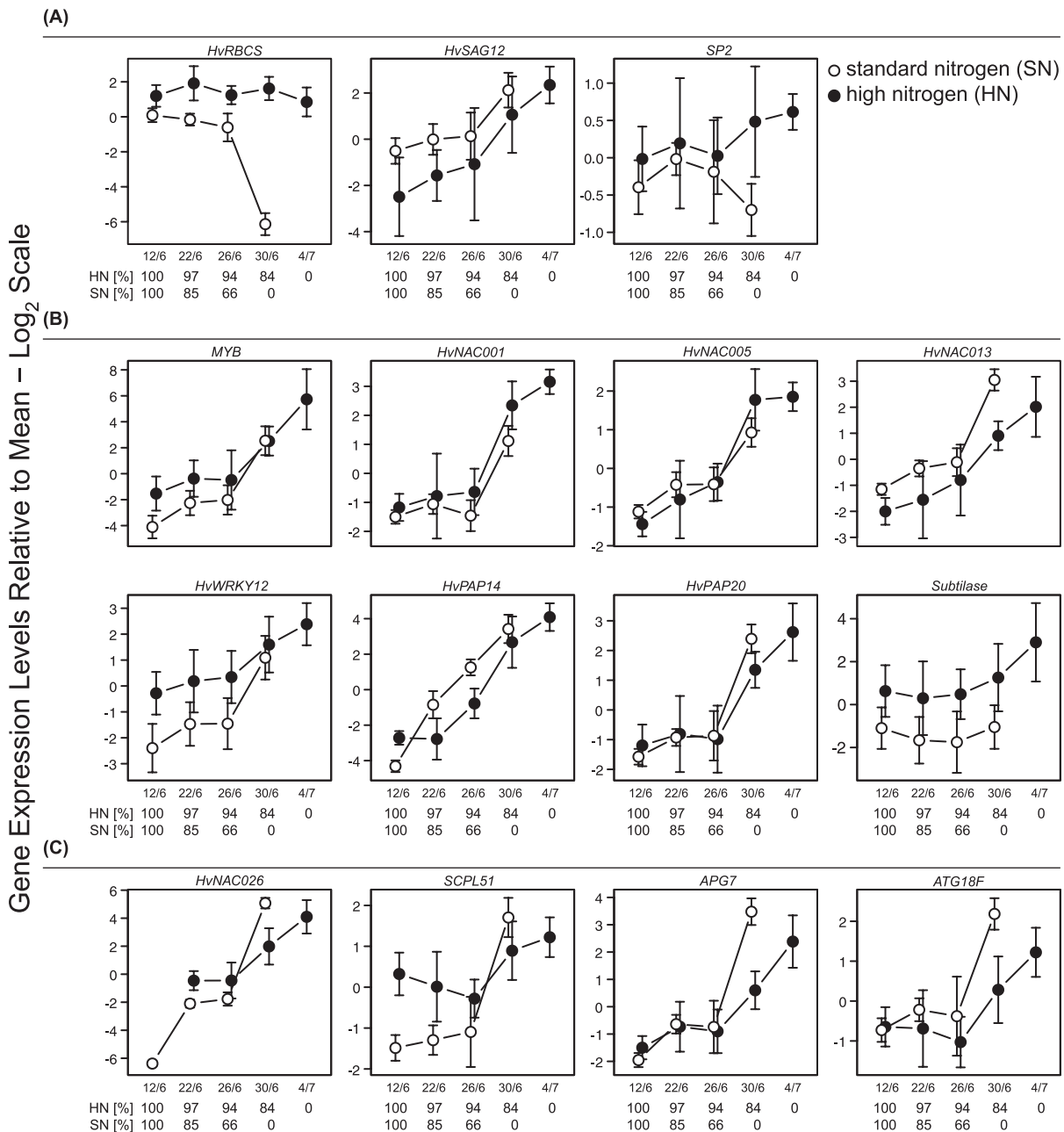


Fig. 3. Relative expression levels of selected genes as analysed by quantitative real-time PCR. RNA samples were prepared from leaves of plants with standard nitrogen supply (SN) and high nitrogen supply (HN), respectively. Leaves were collected every fourth day from 12 June (12 days after flowering of SN and HN plants) until 4 July 2010. The relative chlorophyll content at 12 June was set to 100% (Supplementary Fig. S1A, available at *JXB* online). The expression data are scaled relative to the overall mean, error bars indicate SD and are derived from three biological replicates, $n=3$. (A) Controls and senescence marker, (B) genes showing higher expression in HN than in SN samples, and (C) genes showing higher expression in SN than in HN samples.

nitrogen supply provided in this study did not limit the filling of the kernels (Fig. 1; Supplementary Fig. S1, available at *JXB* online). The high nitrogen supply in HN plots was in excess and hence could diminish/suppress the development of senescence symptoms such as chlorophyll degradation. This situation allowed identification of genes putatively involved in protein degradation and regulation processes important under nitrogen-limiting conditions using the pool of genes upregulated mainly in SN (SN2 vs. SN1) flag leaves.

For this study flag leaves were chosen, because their senescence is of pivotal importance for grain filling (Stoy, 1973; Stamp and Herzog, 1976). The most prominent changes in

gene expression were detected in the SN treatment (SN2 vs. SN1). To identify genes specifically involved in nitrogen remobilization during senescence occurring at standard nitrogen supply (SN), genes upregulated during development of flag leaves independent of the nitrogen supply (HN) were excluded from this gene pool. The number of genes relevant for nitrogen remobilization was furthermore reduced by a very stringent minimum fold change of 2 (\log_2). By this approach 13 genes encoding transcription factors, and 29 genes encoding proteins putatively involved in protein degradation processes were identified as most strongly upregulated in senescing SN leaves (Table 1B). A qRT-PCR with similar samples collected

in 2010 further reduced the number of relevant genes. Among the genes selected by microarray hybridization only the genes encoding the transcription factor HvNAC26 as well as the genes *SCPL51*, *APG7*, and *ATG18F* were reproducibly upregulated specifically in leaves undergoing nitrogen remobilization. As these analyses were done on material grown in the fields and in addition in two consecutive years several environmental factors could influence the development and behaviour of the plants. Thus, the weather conditions in 2010 (Krupinska *et al.*, 2012) led to a delayed flowering time point and shortened time between flowering and senescence (Fig. 1A; Supplementary Fig. S1, available at *JXB* online). However, by using two adjacent fields cultivated in the same crop rotation and fertilized with equal amounts for several years, differences of the initial nitrogen amount in the soil were reduced as much as possible.

Transcription factors

In senescent leaves from plots with standard (SN2 vs. SN1) or excess (HN3 vs. HN1) nitrogen supply, genes encoding transcription factors could be identified that might play roles in age-related processes other than leaf nitrogen remobilization. This group of genes included genes encoding a MYB transcription factor, two NAC transcription factors (HvNAC013, HvNAC005) and the transcription factor HvWRKY12 (Table 1A). By qRT-PCR with samples collected in 2010 these results could be confirmed (Fig. 3B). Expression of the gene encoding the MYB factor was also shown to be upregulated in germinating seeds (Zhang *et al.*, 2004), as well as in developing seeds 14–21 days past anthesis (Jukanti and Fischer, 2008). The *HvNAC013* gene was shown to be elevated in response to abscisic acid (ABA) and methyl jasmonate (MeJA) (Christiansen *et al.*, 2011). The HvNAC013 protein was shown to interact with the barley RADICAL-INDUCED CELL DEATH 1 protein (RCD1) (Kjaersgaard *et al.*, 2011), which is involved in regulation of genes responsive to stress and regulated during development (Teotia and Lamb, 2011). *HvNAC005* (Christiansen *et al.*, 2011) and *ANAC029/AtNAP*, the orthologous gene in *Arabidopsis* (Guo *et al.*, 2004a), were already described as upregulated during senescence. *HvNAC005* was furthermore shown to be markedly upregulated by ABA treatment (Christiansen *et al.*, 2011).

The hybridization of the microarray identified *HvWRKY12* as the only gene encoding a WRKY factor upregulated during senescence. Its transcript level increased during development in both SN (SN2 vs. SN1) and HN (HN3 vs. HN1) leaves (Table 1A). This result was also confirmed by qRT-PCR using samples collected in the second year (Fig. 3B). Interestingly, the *HvWRKY12* gene was not upregulated during senescence induced by carbohydrate accumulation as a result of steam girdling (Parrot *et al.*, 2007). *AtWRKY75*, its orthologous gene in *Arabidopsis* (Mangelsen *et al.*, 2008), was reported to be upregulated during senescence (Guo *et al.*, 2004b) and in response to pathogens (Chen *et al.*, 2013). *OsWRKY72*, its orthologous gene in rice, could be induced by treatment with ABA (Xie *et al.*, 2005).

In previous studies on senescence-associated gene expression, genes encoding members of the NAC and WRKY

transcription factors were shown to have high levels of expression in senescent leaves (Guo *et al.*, 2004a; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Balazadeh *et al.*, 2008; Breeze *et al.*, 2011; Fischer, 2012). Here, the two NAC genes *HvNAC001* and *HvNAC026* were shown to have highest upregulation in senescent leaves from SN plots in 2009 as analysed by microarrays (Table 1B). This result was similar for *HvNAC026* during qRT-PCR using samples collected in 2010 even if an upregulation in HN plots was also shown (Fig. 3C). For the *HvNAC026* gene an upregulation in senescing barley flag leaves and in the grain at the dough stage was shown (Christiansen *et al.*, 2011). The orthologous gene in *Arabidopsis*, *XND1*, was described to negatively regulate lignocellulose synthesis and programmed cell death in the xylem (Zhao *et al.*, 2007). Orthologues in poplar are involved in xylem formation, leaf growth, and development (Grant *et al.*, 2010). It is likely that during leaf senescence, HvNAC026 acts as a suppressor of cell death processes, thereby allowing efficient nitrogen remobilization. Whether nitrogen remobilization is hampered in transgenic barley plants with reduced level of HvNAC026 remains to be investigated. The *HvNAC001* gene was also upregulated in senescing leaves from SN plots but the transcript level was higher in leaves from HN plots (Fig. 3B). Thus, it is unlikely that HvNAC001 is a regulator of nitrogen remobilization. In other studies on *HvNAC001*, a slight upregulation in senescent leaves and in leaves treated with ABA, but an intensive upregulation in older grains was reported (Christiansen *et al.*, 2011).

Genes encoding proteins putatively involved in protein degradation during senescence

The second focus of the microarray analyses was on genes encoding proteins involved in protein degradation, in particular proteases. Several proteases have been described to be associated with protein degradation during senescence (Gepstein *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2004a; Schaller, 2004; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Parrott *et al.*, 2005, 2007), but for most of them their functional roles in nitrogen remobilization remain to be shown.

HvPAP20 and HvPAP14 are both cysteine peptidases of the papain type. *HvPAP14* was one of the most upregulated genes during development of flag leaves from SN field plots (Table 1A). The gene encodes a HDEL-tailed papain cysteine peptidase. For the orthologous genes in *Ricinus communis* and *Arabidopsis*, an involvement in plant cell death was shown (Gietl and Schmid, 2001; Hierl *et al.*, 2012). Expression patterns of both genes, *HvPAP20* and *HvPAP14*, showed similarities to the expression pattern of the senescence-associated gene *HvSAG12* (Fig. 3A, B), which codes for another papain-type cysteine peptidase. In time course experiments on *Arabidopsis* leaf senescence, *AtSAG12* was upregulated at a later stage of senescence (Breeze *et al.*, 2011). *OsSAG12-1*, the orthologous gene in rice was described as a negative regulator of cell death (Singh *et al.*, 2013). Furthermore, the gene encoding a subtilase-type serine peptidase showed a high upregulation in senescing SN and HN leaves in the microarray experiment (Table 1A). qRT-PCR showed that the expression increased during development only in HN

leaves (Fig. 3B). The orthologous gene in *Arabidopsis* codes for a protein identified in the vacuole (Carter, 2004). It was shown to be upregulated in mutants devoid of the microRNA *miR159*, which is involved in the regulation of programmed cell death (Alonso-Peral *et al.*, 2010).

Eight genes encoding cysteine peptidases and two genes encoding serine peptidases were identified as highly upregulated in senescing SN (SN2 vs. SN1) leaves (Table 1B). Two of these genes were selected for further analysis by qRT-PCR with samples collected in the field in 2010. The first gene is *HvPAP20* encoding a cysteine type peptidase, and the second gene is *SCPL51* encoding a serine type protease (Table 1B). qRT-PCR confirmed a higher upregulation during senescence of SN leaves compared with HN leaves for *SCPL51* (Fig. 3C), but not for *HvPAP20* (Fig. 3B). In previous studies, *SCPL51* was shown to be upregulated in germinating barley seeds (Druka *et al.*, 2006; Sreenivasulu *et al.*, 2008), and after anthesis in leaves of a high-grain-protein variety compared with the leaves of a low-grain-protein variety (Jukanti *et al.*, 2008). These results are in accordance with the idea that *SCPL51* is involved in nitrogen remobilization, which is likewise important for senescence and germination (Thomas and Smart, 1993; Thomas and Howarth, 2000; Palma *et al.*, 2002; Schaller, 2004). Although *HvPAP20* was upregulated during senescence of SN leaves, its transcript level was higher in the older HN leaves. *HvPAP20* encodes a cathepsin-b-like cysteine protease (Martínez and Diaz, 2008) known to be also upregulated during germination of barley (Druka *et al.*, 2006; Sreenivasulu *et al.*, 2008).

The high upregulation of *ATG7* and *ATG18F* in senescent SN leaves indicates that autophagy is also involved in nitrogen degradation and remobilization in barley flag leaves under field conditions (Table 1B, Fig. 3C). The protein encoded by *ATG7* in barley is involved in the protein conjugation reaction (Mizushima *et al.*, 1998). The autophagy-related gene *ATG18F* was also shown to be upregulated in *Arabidopsis* seedlings exposed to sucrose or nitrogen starvation (Xiong *et al.*, 2005). Besides its role in accomplishment of protein degradation (Guiboileau *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013), autophagy might suppress cell death by controlling the NPR1-dependent salicylic acid signalling process (Yoshimoto *et al.*, 2009).

In conclusion, the gene expression analyses presented here indicate that the NAC transcription factor *HvNAC026*, the serine type protease *SCPL51*, and the autophagy factors *APG7* and *ATG18F* might be major regulators and executors of nitrogen remobilization during barley leaf senescence in the field. Both *HvNAC026* and autophagy might be important for remobilization through their negative impact on cell-death processes.

Supplementary Data

Supplementary data are available at *JXB* online.

Figure S1. Characterization of flag leaves and ears in 2010.

Figure S2. Heat map of the selected and annotated genes identified by the microarray experiment.

Table S1. Microarray expression values.

Table S2. Sequences of primers used for quantitative real-time PCR.

Acknowledgements

We thank Anke Schäfer, Susanne Braun, and Ulrike Voigt (Institute of Botany, CAU, Kiel, Germany) for excellent technical assistance. We thank Rüdiger Stroeh (farm manager of Hohenschulen, CAU, Kiel, Germany) and his co-workers for preparation of field plots. We also thank the two reviewers for their valuable comments. This work was supported by the German Research Foundation (DFG; KR1350/13-1, KR1350/14-1)

References

- Alonso-Peral MM, Li J, Li Y, Allen RS, Schnippenkoetter W, Ohms S, White RG, Millar AA. 2010. The microRNA159-regulated GAMYB-like genes inhibit growth and promote programmed cell death in *Arabidopsis*. *Plant Biology* **154**, 757–771.
- Balazadeh S, Riano-Pachon DM, Mueller-Roeber B. 2008. Transcription factors regulating leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology* **10**, 63–75.
- Bhalerao R, Keskitalo J, Sterky F, *et al.* 2003. Gene expression in autumn leaves. *Plant Biology* **131**, 430–442.
- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. 2003. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* **19**, 185–193.
- Breeze E, Harrison E, McHattie S, *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.
- Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, *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.
- Carter C. 2004. The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *The Plant Cell Online* **16**, 3285–3303.
- Chen X, Liu J, Lin G, Wang A, Wang Z, Lu G. 2013. Overexpression of AtWRKY28 and AtWRKY75 in *Arabidopsis* enhances resistance to oxalic acid and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Cell Reports* **32**, 1589–1599.
- Christiansen MW, Holm PB, Gregersen PL. 2011. Characterization of barley (*Hordeum vulgare* L.) NAC transcription factors suggests conserved functions compared to both monocots and dicots. *BMC Research Notes* **4**, 302.
- Diaz C, Purdy S, Christ A, Morot-Gaudry J-F, Wingler A, Masclaux-Daubresse C. 2005. Characterization of markers to determine the extent and variability of leaf senescence in *Arabidopsis*. A metabolic profiling approach. *Plant Biology* **138**, 898–908.
- Druka A, Muehlbauer GJ, Druka I, *et al.* 2006. An atlas of gene expression from seed to seed through barley development. *Functional & Integrative Genomics* **6**, 202–211.
- Dvinge H, Bertone P. 2009. HTqPCR: high-throughput analysis and visualization of quantitative real-time PCR data in R. *Bioinformatics* **25**, 3325–3326.
- Fischer AM. 2012. The complex regulation of senescence. *Critical Reviews in Plant Sciences* **31**, 124–147.
- Gepstein S, Sabehi G, Carp M-J, Hajouj T, Neshor MFO, Yariv I, Dor C, Bassani M. 2003. Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. *The Plant Journal* **36**, 629–642.
- Gietl C, Schmid M. 2001. Ricinosomes: an organelle for developmentally regulated programmed cell death in senescing plant tissues. *Naturwissenschaften* **88**, 49–58.
- Grant EH, Fujino T, Beers EP, Brunner AM. 2010. Characterization of NAC domain transcription factors implicated in control of vascular cell differentiation in *Arabidopsis* and *Populus*. *Planta* **232**, 337–352.
- Gregersen PL, Holm PB. 2006. Transcriptome analysis of senescence in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnology Journal* **5**, 192–206.
- Gregersen PL, Culetic A, Boschian L, Krupinska K. 2013. Plant senescence and crop productivity. *Plant Molecular Biology* **82**, 603–622.
- Guiboileau A, Yoshimoto K, Soulay F, Bataillé M-P, Avice J-C, Masclaux-Daubresse C. 2012. Autophagy machinery controls nitrogen

remobilization at the whole-plant level under both limiting and ample nitrate conditions in *Arabidopsis*. *New Phytologist* **194**, 732–740.

Guo Y, Cai Z, Gan S. 2004a. Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Cell and Environment* **27**, 521–549.

Guo Z, Kan Y, Chen X, Li D, Wang D. 2004b. Characterization of a rice WRKY gene whose expression is induced upon pathogen attack and mechanical wounding. *Acta Botanica Sinica* **46**, 955–964.

Hierl G, Voithknecht U, Gietl C. 2012. Programmed cell death in *Ricinus* and *Arabidopsis*: the function of KDEL cysteine peptidases in development. *Physiologia Plantarum* **145**, 103–113.

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

Humbeck K, Quast S, Krupinska K. 1996. Functional and molecular changes in the photosynthetic apparatus during senescence of flag leaves from field-grown barley plants. *Plant Cell and Environment* **19**, 337–344.

Jansson S, Thomas H. 2008. Senescence: developmental program or timetable? *The New Phytologist* **179**, 575–579.

Jukanti AK, Fischer AM. 2008. A high-grain protein content locus on barley (*Hordeum vulgare*) chromosome 6 is associated with increased flag leaf proteolysis and nitrogen remobilization. *Physiologia Plantarum* **132**, 426–439.

Jukanti AK, Heidlebaugh NM, Parrott DL, Fischer IA, McInnerney K, Fischer AM. 2008. Comparative transcriptome profiling of near-isogenic barley (*Hordeum vulgare*) lines differing in the allelic state of a major grain protein content locus identifies genes with possible roles in leaf senescence and nitrogen reallocation. *The New Phytologist* **177**, 333–349.

Kjaersgaard T, Jensen MK, Christiansen MW, Gregersen PL, Kragelund BB, Skriver K. 2011. Senescence-associated barley NAC (NAM, ATAF1,2, CUC) transcription factor interacts with radical-induced cell death 1 through a disordered regulatory domain. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 35418–35429.

Kohl S, Hollmann J, Blattner FR *et al.* 2012. A putative role for amino acid permeases in sink-source communication of barley tissues uncovered by RNA-seq. *BMC Plant Biology* **12**, 154.

Krupinska K, Mulisch M, Hollmann J, Tokarz K, Zschiesche W, Kage H, Humbeck K, Bilger W. 2012. An alternative strategy of dismantling of the chloroplasts during leaf senescence observed in a high-yield variety of barley. *Physiologia Plantarum* **144**, 189–200.

Lee TA, Wetering SWV, Brusslan JA. 2013. Stromal protein degradation is incomplete in *Arabidopsis thaliana* autophagy mutants undergoing natural senescence. *BMC Research Notes* **6**, 1–1.

Lohman KN, Gan S, Amasino J, Amasino RM, Manorama C. 1994. Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **92**, 322–328.

Mangelsen E, Kilian J, Berendzen KW, Kolukisaoglu UH, Harter K, Jansson C, Wanke D. 2008. Phylogenetic and comparative gene expression analysis of barley (*Hordeum vulgare*) WRKY transcription factor family reveals putatively retained functions between monocots and dicots. *BMC Genomics* **9**, 194.

Martínez M, Diaz II. 2008. The origin and evolution of plant cystatins and their target cysteine proteinases indicate a complex functional relationship. *BMC Evolutionary Biology* **8**, 198.

Masclaux C, Valadier MH, Brugière N, Morot-Gaudry JF, Hirel B. 2000. Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* **211**, 510–518.

Mayer KFX, Martis M, Hedley PE, *et al.* 2011. Unlocking the barley genome by chromosomal and comparative genomics. *The Plant Cell Online* **23**, 1249–1263.

Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD, Klionsky DJ, Ohsumi M, Ohsumi Y. 1998. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* **395**, 395–398.

Palma JM, Sandalio LM, Javier Corpas F, Romero-Puertas MC, McCarthy I, del Río LA. 2002. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 521–530.

Parrott DL, John MM, Fischer AM. 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. *The New Phytologist* **187**, 313–331.

Parrott DL, McInnerney K, Feller U, Fischer AM. 2007. Steam-girdling of barley (*Hordeum vulgare*) leaves leads to carbohydrate accumulation and accelerated leaf senescence, facilitating transcriptomic analysis of senescence-associated genes. *The New Phytologist* **176**, 56–69.

Parrott DL, Yang L, Shama L, Fischer AM. 2005. Senescence is accelerated, and several proteases are induced by carbon ‘feast’ conditions in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Planta* **222**, 989–1000.

Peoples MB, Dalling MJ. 1988. The interplay between proteolysis and amino acid metabolism during senescence and nitrogen reallocation. In: Noodén LD, Leopold AC, eds. *Senescence and Aging in Plants*. San Diego: Academic Press, 181–217.

Pötter E, Kloppstech K. 1993. Effects of light stress on the expression of early light-inducible proteins in barley. *European Journal of Biochemistry* **214**, 779–786.

Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. 2012. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research* **40**, 343–350.

Ruuska SA, Lewis DC, Kennedy G, Furbank RT, Jenkins CLD, Tabe LM. 2008. Large scale transcriptome analysis of the effects of nitrogen nutrition on accumulation of stem carbohydrate reserves in reproductive stage wheat. *Plant Molecular Biology* **66**, 15–32.

Schaller A. 2004. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* **220**, 183–197.

Schildhauer J, Wiedemuth K, Humbeck K. 2008. Supply of nitrogen can reverse senescence processes and affect expression of genes coding for plastidic glutamine synthetase and lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase. *Plant Biology* **10**, 76–84.

Schulze W, Schulze E-D, Stadler J, Heilmeier H, Stitt M, Mooney HA. 1994. Growth and reproduction of *Arabidopsis thaliana* in relation to storage of starch and nitrate in the wild-type and in starch-deficient and nitrate-uptake-deficient mutants. *Plant Cell and Environment* **17**, 795–809.

Singh S, Giri MK, Singh PK, Siddiqui A, Nandi AK. 2013. Down-regulation of OsSAG12-1 results in enhanced senescence and pathogen-induced cell death in transgenic rice plants. *Journal of Biosciences* **38**, 583–592.

Smyth GK. 2005. Limma: linear models for microarray data. In: Gentleman R, Carey VJ, Huber W, Irizarry RA, Dudoit S, eds. *Statistics for Biology and Health. Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor*. New York: Springer-Verlag, 397–420.

Sreenivasulu N, Usadel B, Winter A, *et al.* 2008. Barley grain maturation and germination: metabolic pathway and regulatory network commonalities and differences highlighted by new mapman/pageman profiling tools. *Plant Biology* **146**, 1738–1758.

Stamp P, Herzog H. 1976. Flag-leaf senescence and grain growth in certain German varieties of spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Zeitschrift fuer Pflanzenzuechtung* **77**, 330–338.

Stoy V. 1973. Assimilate synthesis and distribution as components of yield formation in cereals. *Angewandte Botanik* **47**, 17–26.

Teotia S, Lamb RS. 2011. RCD1 and SRO1 are necessary to maintain meristematic fate in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1271–1284.

Thimm OO, Bläsing OO, Gibon YY, Nagel AA, Meyer SS, Krüger PP, Selbig JJ, Müller LAL, Rhee SYS, Stitt MM. 2004. MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal* **37**, 914–939.

Thomas H, Howarth CJ. 2000. Five ways to stay green. *Journal of Experimental Botany* **51**, 329–337.

Thomas H, Smart CM. 1993. Crops that stay green. *Annals of Applied Biology* **123**, 193–219.

Usadel B, Poree F, Nagel A, Lohse M, Czedit-Eysenberg A, Stitt M. 2009. A guide to using MapMan to visualize and compare omics data in plants: a case study in the crop species maize. *Plant Cell and Environment* **32**, 1211–1229.

Xie Z, Zhang Z-L, Zou X, Huang J, Ruas P, Thompson D, Shen QJ. 2005. Annotations and functional analyses of the rice WRKY gene

superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells. *Plant Physiology* **137**, 176–189.

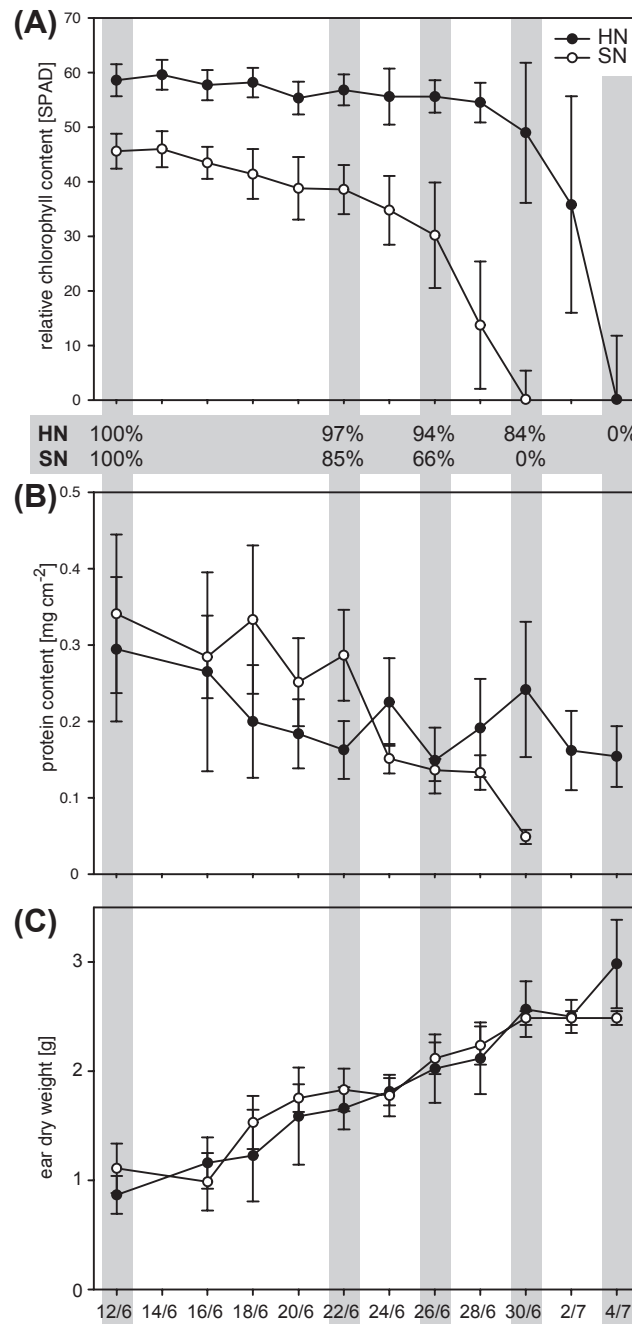
Xiong Y, Contento AL, Bassham DC. 2005. AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **42**, 535–546.

Yoshimoto K, Jikumaru Y, Kamiya Y, Kusano M, Consonni C, Panstruga R, Ohsumi Y, Shirasu K. 2009. Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling

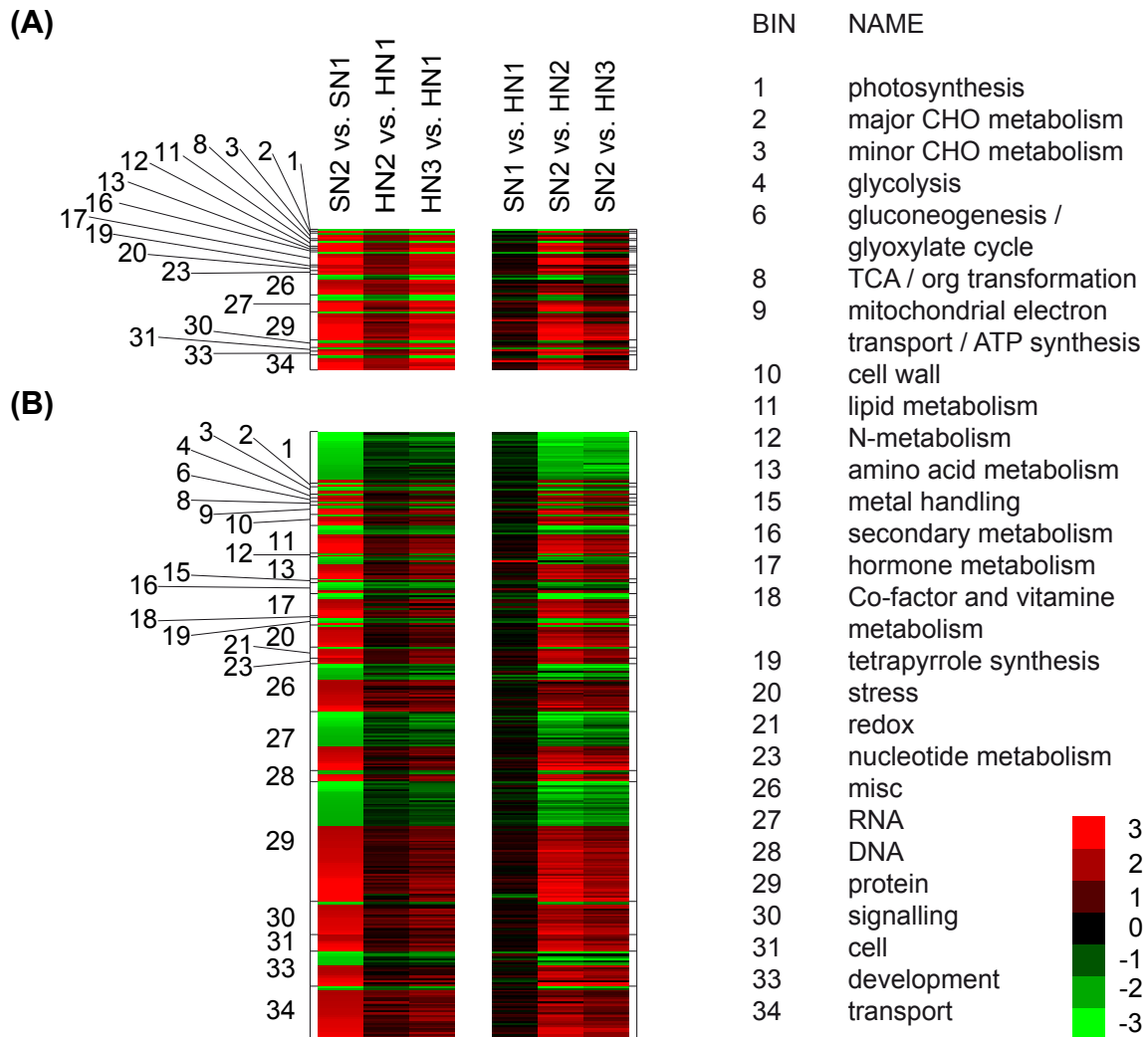
during senescence and the innate immune response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**, 2914–2927.

Zhang H, Sreenivasulu N, Weschke W, et al. 2004. Large-scale analysis of the barley transcriptome based on expressed sequence tags. *The Plant Journal* **40**, 276–290.

Zhao C, Avci U, Grant EH, Haigler CH, Beers EP. 2007. XND1, a member of the NAC domain family in *Arabidopsis thaliana*, negatively regulates lignocellulose synthesis and programmed cell death in xylem. *The Plant Journal* **53**, 425–436.



Supplementary Fig. S1. Characterisation of flag leaves and ears collected from barley plants grown in field plots supplied with standard (SN) or high nitrogen (HN) in the period from 12 June (12 days after flowering of SN and HN plants) until 4 July 2010. Samples used for qRT-PCR analyses are highlighted in grey. (A) Relative chlorophyll content. Error bars indicate SD, $n = 100$. (B) Protein content of leaves. Error bars indicate SD, $n = 20$. (C) Dry weight of the ears. Error bars indicate SD, $n = 12$.



Supplementary Fig. S2. Heat maps of genes differentially expressed between non-senescing and senescing samples from plants grown under standard nitrogen (SN) or high nitrogen (HN) supply after filtering as shown in Figure 2 B. (A) Group of genes min. 2-fold upregulated in the comparison SN2 vs. SN1. (B) Group of genes min. 2-fold upregulated in both comparisons SN2 vs. SN1 and HN3 vs. HN1. Annotations are given as BIN codes (Supplementary Table S1).

Table S1. Microarray expression values.

Die Tabelle ist auf der Homepage der Zeitschrift unter der doi:10.1093/jxb/eru094 hinterlegt.

Table S2. Sequences of primers used for quantitative real-time PCR.

Accession	Gene	Forward primer	Reverse primer
AY552749	18S ribosomal RNA	ACGGCTACCACATCCAAGGA	CAGGATTGGGTAATTTGCGC
AK249101	Splicing factor 2 (SP2)	GAAGGATGAGTAGGCGCTGG	CTGGGAGGTTCCCAACGTAA
AB020943	HvRCBS	TCTCCGTGAGCACAACAGC	TCCAGTATCGGCCGTCGTAG
AM941123	HvSAG12	ACGAGGAGCGAGCTATCATT	GACCATTGTACACGCCATTC
EX573211	HvNAC001	TCCACGAACTGCGACAAGAAGG	GCAGCCATCTGAGCAGACATGC
AK251058	HvNAC005	CCATGTGAACAGCAGCGGCAAC	CCGACGTTGAGGCTGGTGAATC
TC163636	HvNAC013	ATGCCGCCGCACATGATGTAC	ACAGGTCGCCGGAATTAGCG
TC164854	HvNAC026	GGTAGTTCACGCAAGCGGTCTC	CCTCCTGGTGGAAAGCTCACTTG
BM370440	HvWRKY12	ACCATGGTCAAGCAGCTGGCA	ACGGTGGTGGTGGCGATGAT
TA48008_4513	MYB	GCCTTAGTAAGCCTCCGACG	GACACCAAACCATTTGCTGGG
TA52242_4513	APG7	GGTCCCAAGAGCCACTGC	TTCCCAGGCGTTGGTATTTCC
TA56628_4513	ATG18F	TGGGAGTCCAGTTCAGTTCC	ACACTGCCGTTTGAACCAGG
AM941124	HvPAP14	ATGGACTTCGGCGACCAC	GAGATTTCAGAGCTCGTCATGGG
AM941127	HvPAP20	CGGCGAGGATTACTGGCTTC	TGCCACATTCATTCTTGCCCC
AK251038	SCPL51	TCTCATCTGCGCAACCAAGG	CAGTAGAGCGGCTTTCTGGG
TA42918_4513	Subtilase	CGTTCGGGTCGATCGAGTG	ACATCTCCGCAACCTTGCTC

Primer efficiencies were calculated and of 2 ± 0.2 were acceptable.

Arbeit III

The senescence upregulated gene *HvPAP14* encodes a cysteine protease associated to thylakoid membranes after activation

Julien Hollmann¹, Susann Frank¹, Maria Mulisch¹, Andrea Matros², Cristian Carrión³, Hans-Peter Mock², Karin Krupinska¹

¹Institute of Botany, Christian-Albrechts-University of Kiel, Olshausenstraße 40, 24098 Kiel, Germany

²Applied Biochemistry, Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Corrensstrasse 3, 06466 Gatersleben, Germany

³Instituto de Fisiología Vegetal, INFIVE, CONICET-UNLP, cc 327, 1900 La Plata, Argentina

Running title: A cysteine protease associated to thylakoid membranes

Keywords: HvPAP14 (CAQ00109), cysteine protease, senescence, chloroplast, thylakoid membranes, barley (*Hordeum vulgare* L.)

Author for correspondence:

Karin Krupinska

Tel: +49 431 880 4240

Fax: +49 431 880 4238

Email: kkrupinska@bot.uni-kiel.de

SUMMARY

Leaf senescence is characterized as a massive degradation of chloroplast proteins taking place in- and outside of the organelle. Using an affinity approach based on the probe DCG-04 and subsequent mass spectrometry, the cysteine protease HvPAP14 was identified in extracts from senescing barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. Proteolytic activity of recombinant HvPAP14 in fusion with the maltose binding protein, overexpressed in *Escherichia coli*, was shown to be activated by a low pH in the range of 4-5. Transient transformation of barley protoplasts with a *HvPAP14:RFP* fusion construct revealed that the protein is located in structures resembling the endoplasmic reticulum as well as in small bodies. Immunoblot analysis employing an antibody directed towards all forms of HvPAP14, showed that the accumulation of the probably inactive proenzyme during senescence of flag leaves inversely correlated with the chlorophyll content. Immunogold labelling showed that HvPAP14 proforms locate to microbodies and also to chloroplasts indicating dual targeting to the two compartments. In contrast the probably active mature form of HvPAP14 was only detected in chloroplasts where it was found in tight association with thylakoid membranes. The tight association with thylakoids might indicate that the enzyme after activation by low pH in the thylakoid lumen targets a membrane bound protein.

Significance statement

Leaf senescence is characterized by a massive degradation of chloroplast proteins. So far, only few proteases acting inside the senescing organelle have been characterized. The gene encoding the cysteine protease HvPAP14 was previously found to be highly expressed in senescing leaves. Here we show that HvPAP14 is synthesized at the endoplasmic reticulum and after cleavage of a ER retention motif is translocated to chloroplasts where its active form is detectable in association with thylakoid membranes.

INTRODUCTION

Leaf senescence is a massive recycling process involving degradation of chloroplast proteins and chlorophylls. The main purpose of senescence is to remobilize nitrogen and other nutrients released during dismantling of the photosynthetic machinery for providing nitrogen to sink organs such as young leaves or seeds. About 70% of the nitrogen in chloroplasts is localized in stromal proteins, whereby the majority is bound in Rubisco (Feller *et al.*, 2008; Peoples and Dalling, 1988). Most of the remaining 30% of the nitrogen is bound to proteins of the thylakoid located photosynthetic apparatus. Stromal proteins and thylakoid membrane proteins are degraded by different pathways as obvious in stay-green mutants that fail to degrade chlorophyll binding proteins whereas the breakdown of stromal proteins proceeds normally (Kusaba *et al.*, 2007; Thomas and Howarth, 2000).

In order to identify enzymes involved in the massive degradation of chloroplast proteins, genes upregulated during senescence were screened for putative genes encoding proteases (Hollmann *et al.*, 2014; Jukanti *et al.*, 2008; Parrott *et al.*, 2007). Although most of the proteins degraded during senescence are located in the plastid, senescence associated genes encoding proteases having a plastid target peptide for import by the canonical TOC/TIC system have not been found (Beers *et al.*, 2004; Nakabayashi *et al.*, 1999). Instead, many senescence associated genes encode members of the cysteine peptidases family being synthesized at the endoplasmic reticulum (ER) (Richau *et al.*, 2012). This result is in accordance with biochemical studies dating back to the 1970s that have shown that cysteine proteases are likely involved in degradation of Rubisco during senescence (Huffaker, 1990), for a review see (Feller *et al.*, 2008).

The maturation and activation of cysteine peptidases often is dependent on low pH (Wiederanders *et al.*, 2003). Therefore, most of the cysteine proteases were predicted to be targeted to the vacuole where in senescing leaves indeed the highest protease activity was found (Wittenbach *et al.*, 1982). In this regard, it is of interest that senescing cells contain numerous tiny vacuoles with a pH lower than that of their central vacuole. These so called senescence associated vacuoles (SAVs) were identified by fluorescence of the SAG12:GFP fusion protein in transgenic *Arabidopsis* plants (Otegui *et al.*, 2005).

The prevalent opinion about chloroplast protein degradation during senescence is that proteolytic activities in both chloroplasts and vacuoles are required (Martinez, Costa, Gomez, *et al.*, 2008; Kato and Sakamoto, 2013; Martinez, Costa and Guamet, 2008). Rubisco after oxidative modification (Desimone *et al.*, 1996) was proposed to be partially cleaved inside chloroplasts and then to be delivered to the vacuole for final degradation (Ono *et al.*, 2013; Feller *et al.*, 2008; Martinez, Costa and Guamet, 2008). The delivery of Rubisco and other

stromal proteins to vacuolar compartments involves at least two pathways (Xie *et al.*, 2015). The first pathway entails the formation of Rubisco containing bodies (RCBs) (Chiba *et al.*, 2003) and autophagy (Wada and Ishida, 2013). While the autophagy machinery is required for the release of RCBs into the cytoplasm, endosomal proteins are required for the delivery of the proteins to the vacuole (Spitzer *et al.*, 2015). A second pathway is independent of autophagy and involves small proteolytic vacuolar compartment accumulating during leaf senescence, i.e. senescence associated vacuoles (SAVs) (Otegui *et al.*, 2005; Martinez, Costa and Guamet, 2008). In contrast to RCBs, SAVs can also contain proteins of photosystem I (Costa *et al.*, 2013).

Recently, a third pathway depending on the chloroplast vesiculation protein (CV) has been described (Wang and Blumwald, 2014). CV-containing vesicles (CCVs) induced by CV were shown to contain stromal proteins, envelope membrane proteins and thylakoid membrane proteins. The CV protein was shown to interact with the photosystem II protein PSBO. Whether the CCVs are related to lipid-protein bodies observed to protrude from plastids in senescing soybean leaves (Guamet *et al.*, 1999) and/or the chlorophyll containing bodies/globules observed in cells of senescing broccoli (Terai *et al.*, 2000) remains to be investigated. It is possible that in the CCVs chlorophyll had been already catabolized to nonfluorescing catabolites (Hörtensteiner, 2006).

The relationship between the different chloroplast protein degradation pathways are unclear. Overexpression of the CV gene caused chloroplast disruption and early senescence. Inversely, silencing of the CV gene enhanced the stability of chloroplasts. Compromised autophagy in contrast was shown to accelerate senescence (Thompson *et al.*, 2005; Liu and Bassham, 2012).

So far, the contribution of chloroplast residing proteases to senescence associated chloroplast protein degradation is not known. Several prokaryotic proteases depending on ATP are present in plastids and were proposed to play roles in senescence and stress (Sakamoto, 2006). For photoinactivated D1/PsbA, a degradation by thylakoid membrane bound proteases such as DEGP2 and metalloprotease FTSH was reported (Haussühl *et al.*, 2001; Lindahl *et al.*, 2000). CND41, a nucleoid associated aspartic protease was proposed to be involved in degradation of Rubisco during senescence (Nakano *et al.*, 1997; Murakami *et al.*, 2000; Kato *et al.*, 2004).

In a previous study on senescence associated gene expression in flag leaves of field grown barley by microarray analyses, several genes encoding cysteine proteases were identified (Hollmann *et al.*, 2014). The cysteine protease gene with highest upregulation during senescence encodes a member of the family of papain-like proteases, i.e. HvPAP14. In this

study it is shown that a proform of the enzyme is dually targeted to microbodies and chloroplasts. Moreover, it is shown that the mature and putatively active form of HvPAP14 can be only found in association with thylakoid membranes.

RESULTS

Activity based identification of senescence-associated cysteine peptidases

To identify cysteine peptidases in senescing barley leaves, an activity-based labelling approach (Greenbaum et al., 2000; Van der Hoorn et al., 2004; Martinez et al., 2007) was used. The approach is based on binding of DCG-04, a biotinylated derivate of the inhibitor E-64, to the active sites of cysteine peptidases. After incubation of protein extracts from nonsenescent and senescent leaves, having about 70% of chlorophyll, with DCG-04, proteins were separated by SDS-PAGE and the DCG-04-labelled peptidases were detected using a conjugate of streptavidin with horseradish peroxidase (HRP) (Figure 1a). Four bands of 48, 44, 35 and 28 kDa, respectively, were detected in crude leaf extracts from nonsenescent leaves (Figure 1a) with the 35 kDa band being most abundant. When the labelled proteins from senescing leaves were analysed, in addition an abundant band of 32 kDa was detected. The specificity of this approach was checked by pre-incubation of leaf extracts with E-64 reducing the binding of DCG-04 (Figure 1a).

To isolate the proteins labelled by DCG-04 in crude extracts from nonsenescent and senescing leaves, sepharose coated magnetic beads were used. The proteins enriched by this affinity approach were separated by SDS-PAGE and stained by Coomassie Brilliant Blue. The area representing proteins of 32-35 kDa from nonsenescent (NS) and senescing leaves (S) were excised from the gel (Figure 1b). After digestion with trypsin the weights of the peptides were analysed by ESI-LC/MS. The resulting peptide masses could be assigned by a database comparison to eight protein sequences (Table S1). Five of them are peptidases, one metallopeptidase and four cysteine peptidases. Two of the cysteine peptidases (HvPAP14 and HvSAG12) were exclusively found in the sample from senescing leaves. HvSAG12 is a well-known senescence marker (Lohman et al., 1994). *HvPAP14* is one of the most upregulated genes in a microarray experiment analysing senescence of field grown barley (Hollmann *et al.*, 2014). Two other peptidases, HvPAP6 and the thiol protease aleurain, were detectable in senescing and nonsenescent leaf extracts.

The four cysteine proteases identified by this activity based affinity approach belong to the papain-like family (C1A) according to a MEROPS database analysis (Rawlings et al., 2008). The C1A family can be subdivided into nine subfamilies (Beers et al., 2004; Richau et al.,

2012). HvPAP14 belongs to subfamily 2, HvSAG12 to subfamily 6, HvPAP6 to subfamily 1 and the thiol protease aleurain to subfamily 8. For each of these peptidases a signal peptide and a propeptide region at the N-terminus and a mature peptidase region were predicted by using the three software tools InterPro, signalP and iPSORT (Petersen *et al.*, 2011; Hunter *et al.*, 2012; Bannai *et al.*, 2002). In addition, HvPAP14, HvSAG12 and HvPAP6 each have an ERFNIN motif (Karrer *et al.*, 1993) which has autoinhibitory function (Beers *et al.*, 2000). As in all other members of the C1A family the catalytic site contains the three amino acids Cysteine, Histidine and Asparagine (Figure S1) (Richau *et al.*, 2012; Rawlings *et al.*, 2008; Beers *et al.*, 2004). In the sequence of HvPAP14 but not of the other three proteases, a C-terminal HDEL motif was detected (Bannai *et al.*, 2002) which likely functions as retention signal for the endoplasmic reticulum (Munro and Pelham, 1987; Napier *et al.*, 1992; Gomord *et al.*, 1997). Due to its high expression in senescing flag leaves (Hollmann *et al.* 2014), the HvPAP14 protease was chosen for further analyses. As all papain-like cysteine proteases the HvPAP14 is synthesised as an inactive prepropeptidase (Wiederanders, 2002). Two potential cleavage sites were predicted between amino acid 74/75 and 303/304 by the ProP 1.0 software (Duckert *et al.*, 2004) (Figure 3a). The N-terminal cleavage site would cleave off the inhibitory proregion of the protein. The C-terminal cleavage would eliminate the ER retention motif.

A HvPAP14:RFP fusion construct is targeted to net-like structures and small bodies in the cytoplasm

With regard to the N-terminal signal peptide and the C-terminal ER retention motif (HDEL) HvPAP14 is predicted to be synthesized at the endoplasmic reticulum and also to reside in this compartment. To investigate its subcellular localisation in more detail, barley protoplasts were transiently transformed with the fusion construct of the full-length cDNA of *HvPAP14* fused to the *RFP* gene and as control with a *GFP* gene construct (Figure 2a). The fluorescence signal from GFP was detected in the cytoplasm and nucleus. In contrast to the uniform distribution of the GFP fluorescence in the cytoplasm, the RFP signal was observed in small vesicular bodies and in association with net-like structures resembling the endoplasmic reticulum as visualized by incubation with ER-Tracker Red (Figure 2b). The protoplasts with vesicular fluorescence and the protoplasts with fluorescence of net-like structures were obtained both from the same leaf material. The RFP fluorescence was also weakly detectable in chloroplasts (Figure 2b).

Activation of recombinant HvPAP14

To investigate its functional properties, HvPAP14 was in *E. coli* synthesized in fusion with the maltose binding protein (MBP). The obtained fusion protein was then affinity purified by

binding of the MBP to an amylose resin. The primary structure of HvPAP14 (Figure 3a) suggests, that the N-terminal inhibitory proenzyme domain needs to be cleaved off to activate the enzyme. This activation step could be pH-dependent as shown for other members of the C1A group of cysteine proteases (Wiederanders *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 1995; Schmid *et al.*, 2001). The activity of the recombinant protein was therefore tested at different pH-values using the fluorescent dye Z-FR-AMC. The results of these assays clearly showed, that the enzyme was only activated at a pH below 6 with highest activity around a pH of 4 to 4.5 (Figure 2c). After activation, however, the protease activity was independent of the pH in a range of 4.5 to 7 (Figure 2d) as shown before for the related Arabidopsis KDEL-tailed cysteine endopeptidase 2, i.e. AtCEP2 (Hierl *et al.*, 2014).

Immunological analyses

For further investigations on the subcellular localization of the HvPAP14 protein, antibodies were prepared using two peptides. The first peptide C-AEDAYPYKARQASS (HvPAP14_1) is located in the region of the mature protease whereas the second peptide C-QHTVARDLGEKARR (HvPAP14_2) is located in the inhibitory domain of the protein (Figure 3a). In leaf extracts from young primary foliage leaves specificity of the two antibodies in the detection of the respective peptide was shown by immunoblot assays with and without pre-absorption using the respective peptide (Figure 3b). Additionally, the HvPAP14:MBP fusion protein of 79.5 kDa overexpressed in *E. coli* was shown to be immunologically detected in protein extracts by both antibodies (Figure 3c).

The *HvPAP14* gene was shown to be highly upregulated during senescence of flag leaves from field grown barley (Hollmann *et al.* 2014). In order to detect HvPAP14 in protein extracts thereof, immunoblotting was performed using the antibody detecting all forms of HvPAP14 (HvPAP14_1) (Figure 4b). Flag leaves were collected from field plots supplied with either standard nitrogen (SN) or with high nitrogen (HN) (Hollmann *et al.* 2014). The developmental stages of the leaves were characterized by their relative chlorophyll contents (SPAD) (Figure 4a). Chlorophyll content of HN leaves was almost stable until 28 June and rapidly decreased thereafter. In comparison, the chlorophyll content of SN leaves started to decrease slightly already at 16 June and rapidly dropped at 26 June.

Immunoblot analysis showed two prominent bands of about 37 and 33 kDa (Figure 4b). These proteins have approximately the predicted protein masses of the potentially inactive preforms, either with or without the ER retention sequence (37 and 33 kDa). The protein of about 37 kDa accumulated more intensively and even earlier during senescence of SN compared to HN leaves. In contrast, the amount of the protein of about 33 kDa decreased during senescence in SN leaves, but stayed relatively constant in HN samples (Figure 4b).

After longer exposure of the immunodecorated blot, additional proteins were detected. A protein of 26 kDa might be the potentially active mature form. Its abundance was found to be rather stable during leaf development. Further proteins immunodetected might represent HvPAP14 forms having posttranslational modifications.

For comparison, the amounts of the senescence associated cysteine peptidase HvSAG12 and the light harvesting complex proteins LHCA1 and LHCB1 were determined immunologically. Furthermore, the amount of the large subunit of Rubisco (RbcL) was determined by staining with Coomassie Brilliant Blue (CBB). The 37 kDa proform of HvSAG12 accumulated during senescence of both SN and HN leaves. The 33 kDa processed form of HvSAG12 had a higher abundance during late senescence in HN leaves than in SN leaves, but was detectable earlier in SN leaves than in HN leaves (Figure 4b). The abundances of both light harvesting complex proteins decreased at late senescence stages in both HN and SN leaves. The abundance of RbcL changed in parallel to the chlorophyll content and thus decreased in both samples from SN and HN leaves but earlier in SN leaves (Figure 4b).

Immunoblot analyses with chloroplast subfractions

In order to get insight into the subcellular distribution of the different processed forms of HvPAP14, immunoblot analyses were performed with total protein extracts (TP), chloroplasts (CP) as well as membrane (M) and stroma (ST) fractions prepared from these chloroplasts. The protein fractions were prepared from flag leaves of field grown HN and SN fertilized plants collected either on 16 June or on 24 June (Figure 5a).

All the predicted forms of HvPAP14 were detected by the HvPAP14_1 antibody (Figure 3a). The pre-pro form of approximately 37 kDa was detected only in total leaf extracts, whereby the signals were stronger in the protein extracts from leaves collected on 24 June (Figure 5a). A 33 kDa form most likely lacking the ER retention motif (HDEL), was observed in total protein extracts, isolated chloroplasts and in the membrane fractions (Figure 5a). In isolated chloroplast and membrane fractions thereof, but not in total leaf extracts, the 26 kDa mature form of the peptidase was identified (Figure 5a). No distinct differences in signal intensities between high and standard nitrogen fertilization were detected. None of the HvPAP14 forms could be detected in the stroma.

To demonstrate purity of the fractions, antibodies directed towards the ER located luminal-binding protein (BIP2), towards the thylakoid bound chlorophyll a/b binding protein LHCB5 and the stroma located large subunit of Rubisco (RbcL) were used (Figure 5a).

These immunoblot analyses clearly indicated that both, the predicted 33 kDa proenzyme lacking the HDEL motif and the mature form of HvPAP14, are associated with the plastid

membrane system. To further specify the location of the HvPAP14 forms, thylakoid and luminal fractions were prepared from chloroplasts isolated from nonsenescent and senescent leaves. To have enough starting material, the fractions were prepared from primary foliage leaves of plants grown in the glasshouse. For preparation of the lumen, thylakoid membranes were treated with a French press. Fractions were separated by ultracentrifugation (Figure 5b).

As expected only the predicted 33 kDa proenzyme devoid of the HDEL motif and the predicted 26 kDa mature enzyme were detected in the thylakoid membrane fraction (TM) (Figure 5b). The abundance of both forms was higher in the fraction obtained from senescing leaves (S) in comparison to nonsenescent leaves (NS). In the lumen fraction (L) only the 33 kDa proenzyme was detectable. The purity of the fractions was demonstrated by immunological detection of the lumen located 33 kDa subunit of the oxygen evolving complex (PSBO) and the thylakoid membrane located core protein of photosystem 1 (PsaA) (Figure 5b). Although most of the PSBO protein was detected in the lumen fraction, a low amount was associated to the thylakoid membranes (Bricker and Frankel, 2011). PsaA was detected exclusively in thylakoid membranes (Figure 5b).

Subcellular localization of different forms of HvPAP14

To investigate the subcellular localization of HvPAP14 proenzyme forms and the mature enzyme, immunofluorescence analyses were performed employing the two antibodies recognizing either all forms of HvPAP14 (HvPAP14_1) or recognizing the 33 and 37 kDa proenzyme forms (HvPAP14_2). Since the antibodies did not bind to conventionally chemically fixed materials, the leaf samples were prepared by high pressure freezing and freeze substitution (HPF-FS). When the antibody HvPAP14_1 was used for immunofluorescence microscopy with sections from nonsenescent primary foliage leaves, intensive somehow speckled labelling was observed throughout the cytoplasm (Figure 6). In comparison to nonsenescent tissue, in senescent tissue fluorescence signals were more discretely associated to structures resembling chloroplasts (CP) in shape, size and distribution. Additionally, discrete fluorescing small bodies were detected (microbodies=MB). When the antibody detecting the 37 and 33 kDa proenzymes but not the mature peptidase was used (HvPAP14_2), in nonsenescent leaves small bodies were labelled whereas the areas probably representing the chloroplasts showed weakly speckled fluorescence. In senescent tissue, fluorescence of the chloroplast-like structures was more intensive as in nonsenescent tissue. Additionally, the fluorescence signals associated with the chloroplast-like structures seem to be distributed more homogeneously throughout the organelles.

To analyse the subcellular localization of HvPAP14 in more detail, immunogold labelling was performed on ultrathin sections of nonsenescent and senescent barley primary foliage leaves. When the antibody HvPAP14_1 recognizing all three forms of HvPAP14 in immunoblots (Figure 4, 5) was used, gold particles were observed inside chloroplasts as well as in small bodies of about 500 nm diameter being located in the vicinity of chloroplasts (Figure S2 a, as). They are named microbodies (MB), because in size and ultrastructure they resemble peroxisomes or glyoxisomes. The latter were proposed to develop in senescent leaves by conversion of peroxisomes (Nishimura et al. 1996, Palma et al. 2002). Labelling of plastids was similar in nonsenescent and senescent tissue where plastids contain large plastoglobuli (Figure S2). When the antibody recognizing the two 37 and 33 kDa proenzyme forms (HvPAP14_2) was used, gold labelling of chloroplasts (Figure S2 a2, as2) was evident but less dense as with the HvPAP14_1 antibody (Figure S2 a1, as1). Inside the microbodies, an accumulation of clustered gold particles was observed (Figure S2 a, as). Immunoblot analysis showed an accumulation of the 37 kDa proenzyme during leaf senescence (Figure 4b). With regard to the HDEL sequence and the ER localization of the HvPAP14:RFP fusion protein in transiently transformed protoplasts (Figure 2), antibody labelling at the ER was expected to increase during senescence. Surprisingly, neither in nonsenescent specimen nor in senescent tissue an accumulation of gold particles in association with the endoplasmic reticulum was observed.

To exclude that the discrepancy between the immunoblot analysis with flag leaf protein extracts and the results obtained by immunogold labelling of sections from primary foliage leaves are related to the different leaf materials, immunogold labelling was repeated with leaf sections from flag leaves collected in the same field plots as those used for immunoblot analyses. Flag leaves were collected either on 2 June (nonsenescent) or on 23 June (senescent) from a field with standard nitrogen supply. On 23 June leaves had lost about 20% of the initial chlorophyll content (Figure 4).

In nonsenescent tissue immunodecorated with the first antibody detecting all forms of HvPAP14 (HvPAP14_1), again gold particles were detected inside chloroplasts (CP) and in microbodies (MB) in the vicinity of chloroplasts (Figure 7 a, b). These bodies have diameters of 500-800 nm, the contents appear often fine fibrillar (Figure 7 a1). No distinct difference was observed between nonsenescent and senescent leaf sections except for a more condensed appearance of the contents of the microbodies (Figure 7 bs1).

When instead the proenzyme specific HvPAP14_2 antibody was used, in nonsenescent tissue gold labelling in chloroplasts was less dense whereas labelling in the bodies was more dense than with the HvPAP14_1 antibody (Figure 7 a1, a2, b1, b2). In contrast to the HvPAP14_1 antibody, the proenzyme specific antibody (HvPAP14_2) detected clustered

particles inside some oval-shaped microbodies. These oval-shaped microbodies were detected besides roundish microbodies containing gold particles without clustering in the same sections (Figure 7 a2). The results obtained by immunogold labelling of flag leaf sections confirm the results obtained by immunogold labelling of sections from primary foliage leaves (Figure S2). Neither in primary foliage leaves nor in flag leaves, gold particles accumulating at the ER during senescence could be detected. This suggests that the 37 kDa is rather not detectable by immunogold labelling as well as by immunofluorescence assays. Few gold particles are, however, associated to the endoplasmic reticulum in both nonsenescent and senescent tissue when the HvPAP14_2 antibody was used (Figure 7 d2, ds2). It is unlikely that these particles represent the 37 kDa form which is expected to strongly accumulate during senescence. More likely these particles represent the 33 kDa form formed after release from the endoplasmic reticulum.

The gold particles detected in chloroplasts by either of the two different antibodies appeared to be associated to thylakoids (Figure 7 a, as). When ruptured chloroplasts in the specimen of senescent leaves were analysed, gold particles, however, were found attached to the membranes only when the antibody recognizing all forms of HvPAP14 was used. This indicates that only the mature form of the enzyme exclusively detectable by the HvPAP14_1 antibody is tightly associated to thylakoid membranes (Figure 7 cs1). This result is in accordance with the immunoblot analysis performed with subfractions of chloroplasts (Figure 5). The same immunoblot analysis showed that the 33 kDa proenzyme is located in both membranes and lumen prepared from thylakoids (Figure 5). The lack of gold particles attached to thylakoids of ruptured chloroplasts after labelling with the proenzyme specific antibody (Figure 7 cs2) indicates that the association of the 33 kDa form to thylakoids is rather weak.

To investigate, whether the microbodies detected by the HvPAP14 antibodies are derived from chloroplasts or are related to SAVs or RCB, specimen from senescent flag leaves were labelled by an antibody directed toward the small subunit of Rubisco. While gold particles were detected inside chloroplasts, no gold particles bound to Rubisco were found outside of chloroplasts, neither in the microbodies nor in other vesicles (Figure S2 b).

DISCUSSION

The *HvPAP14* gene showed high upregulation in expression during senescence of flag leaves collected from barley fields (Hollmann *et al.*, 2014). It encodes a protein, whose proteolytic active form was isolated from senescing primary foliage leaves by cysteine

protease affinity labelling using DCG-04, a biotinylated derivative of the cysteine protease inhibitor E-64, and was identified by subsequent ESI-LC/MS.

HvPAP14 is a typical member of the K/HDEL-tagged group of cysteine endopeptidases (Cys-EP) of the C1A family, all having N-terminal signal peptides directing them to the endoplasmic reticulum (Figure S1) (Richau *et al.*, 2012). After cleavage of the signal peptide, the proform of the Cys-EP has a predicted molecular weight of approximately 37 kDa. As expected, transient transformation of protoplasts with a *HvPAP14:RFP* fusion construct showed an accumulation of the fluorescing fusion protein in net-like structures resembling the endoplasmic reticulum as well as in small bodies. When HvPAP14 in fusion with the maltose binding protein (MBP) was synthesized in *E. coli*, a recombinant protein with protease activity was obtained. The purified protein was shown to be activated at low pH (pH 4-5). As shown for the orthologous endopeptidase AtCEP2 of *Arabidopsis* (Hierl *et al.*, 2014) and the RcCysEP of *Ricinus communis* (Schmid *et al.*, 2001), activity was highest at a pH of 4.5. After activation the protease activity was shown to be pH-independent as shown also for the orthologous proteins AtCEP2 from *Arabidopsis thaliana* and RcCysEP from *Ricinus communis* (Hierl *et al.*, 2014).

By analyses of the amino acid sequence using the ProP 1.0 software (Duckert *et al.*, 2004), a cleavage site behind the inhibitory domain at position 74/75 was predicted. Cleavage would result in a 26 kDa form which most likely represents the active mature form of HvPAP14. To detect the different forms of HvPAP14 in leaves, two antibodies were prepared. The antibody HvPAP14_1 was raised against a peptide contained in the sequence of the mature enzyme. The antibody HvPAP14_2 was directed towards a peptide of the inhibitory prodomain of HvPAP14. While the HvPAP14_1 antibody detected all forms of the Cys-EP including the potential mature form of 26 kDa, the HvPAP14_2 antibody detected the two 33 and 37 kDa proforms only. The 33 kDa protein could correspond to a form of the proenzyme lacking the C-terminal part including the ER retention motif HDEL. Intermediate forms indicating a stepwise processing have been also detected in some tissues with antibodies directed towards the tomato Cys-EP SiCysEP (Trobacher *et al.*, 2012; Senatore *et al.*, 2008) and the well characterized Cys-EP form castor bean RcCysEP (Schmid *et al.*, 1998), the EP-C1 from common bean (Tanaka *et al.*, 1993), the proteinase A from common vetch (Becker *et al.*, 1997), the SH-EP from mungo bean (Mitsuhashi and Minamikawa, 1989; Minamikawa *et al.*, 2001), the Cys-EP from white spruce (He and Kermode, 2003), the LICYP from Easter lily (Battelli *et al.*, 2014), RcCys-EP from quinoa (Lopez-Fernandez and Maldonado, 2013) as well as the AtCEP2 from *Arabidopsis* (Hierl *et al.*, 2014).

Immunoblot analyses with protein extracts from barley flag leaves collected every second day from 4 June until 2 July from field plots of two different nitrogen supplies showed that the

37 kDa proenzyme accumulated with decreasing chlorophyll content of the leaves. In flag leaves from fields with standard nitrogen supply, chlorophyll content declined starting from 16 June, while in leaves from field with high nitrogen supply chlorophyll content declined not before 30 June (Figure 4). The increase in the amount of the 37 kDa proenzyme inversely followed the two different kinetics of chlorophyll loss of the leaves. This suggests that the enzyme plays a role during senescence associated dismantling of the chlorophyll containing proteins of the photosynthetic apparatus. In comparison to the 37 kDa proenzyme accumulating during senescence, the amounts of the 33 kDa proenzyme and the 26 kDa mature enzyme did not change during development of the leaves. Variations in the relative abundances of proforms and mature form within different samples have also been reported for other KDEL-tailed Cys-EP of the C1A class (Trobacher *et al.*, 2012; Becker *et al.*, 1997; Mitsunashi and Minamikawa, 1989; Minamikawa *et al.*, 2001; Schmid *et al.*, 1999; He and Kermode, 2003; Senatore *et al.*, 2008; Battelli *et al.*, 2014; Lopez-Fernandez and Maldonado, 2013).

The proenzyme of HvPAP14 having the HDEL sequence is expected to accumulate in the ER. This is supported by the transient expression of the *HvPAP14:RFP* fusion construct in protoplasts. Moreover, ER localization of some gold particles was shown by immunogold labelling using the HvPAP14 antibodies. It is unlikely, that these gold particles represent the 37 kDa proenzyme which showed in immunoblots a strong upregulation during leaf senescence. It is more likely that these gold particles represent the 33 kDa form released in ER inside vesicles. Cleavage of the HDEL sequence might occur during release of the vesicles from the ER. Such vesicles could fuse with pre-existing peroxisomes as reported (Mullen *et al.*, 2001).

Immunoblot analyses with total leaf extracts, chloroplasts and stroma as well as membrane fractions thereof showed that the 37kDa proenzyme is not contained in chloroplasts, whereas the 33 kDa proenzyme and the mature enzyme are found in the membrane fractions of chloroplasts from nonsenescent leaves as well as of gerontoplasts from senescent leaves (Table 1). In an earlier search for thylakoid associated proteases, a putative cysteine protease activity was found to be enriched in the luminal fraction from spinach chloroplasts (LP27) (Sokolenko *et al.*, 1997). Moreover, proteomes of chloroplast fractions have confirmed the presence of cysteine proteases or specific cysteine proteinase inhibitors in the organelle (Table S2). In a proteomic study performed with pea chloroplasts, the plastid localization of the cysteine protease OTL, a member of the OTU-like cysteine protease family (Makarova *et al.*, 2000) was confirmed by transient transformation using a yellow fluorescing protein fusion construct (Bayer *et al.*, 2011).

While the mature enzyme is located exclusively in plastids, the 33 kDa proform has been detected inside as well as outside of plastids (Table 1). This suggests that activation of the enzyme by cleavage of the inhibitory domain occurs not before the protein is imported into chloroplasts. While the potentially inactive 33 kDa proform of the protein was detected in the lumen as well as in the membrane fraction, the mature form was exclusively found in tight association with thylakoid membranes (Table 1). This indicates that activation by cleavage of the inhibitory prodomain likely occurs at the luminal side of thylakoid membranes where during photosynthesis a low pH is established (Kramer *et al.*, 1999; Järvi *et al.*, 2012). Activation inside the lumen is in accordance with the low pH required for activation. The association to thylakoids might be responsible for the speckled signals detected in chloroplasts by immunofluorescence microscopy using the antibody detecting all forms of the protein. In contrast, the distribution of the proenzyme in chloroplasts was much more homogeneous as shown by immunofluorescence with the antibody detecting the proenzymes only, which were found in both lumen and thylakoid membranes.

Association of the mature form of HvPAP14 with thylakoid membranes was further demonstrated by immunogold labelling. In chloroplasts ruptured by the preparation procedure, it was obvious that gold particles attached to the membranes were observed after labelling with the HvPAP14_1 antibody detecting all forms, but not with the proenzyme specific antibody HvPAP14_2. This result indicates that attachment of HvPAP14 to thylakoid membranes occurs after activation by cleavage of the inhibitory region from the 33 kDa proenzyme.

The accumulation of the proenzyme in parallel with the decrease in chlorophyll content of senescing leaves indicates a function during senescence associated degradation of chlorophyll containing membrane proteins. Activation of the enzyme by low pH is in accordance with the localization of both chloroplast forms in association with the thylakoids. Tight binding of the mature form to the membrane could indicate that the substrate of HvPAP14 in chloroplasts is a thylakoid membrane protein. It is possible that HvPAP14 is related to the proteases described to target light harvesting complex (LHC) proteins during light acclimation, which were described in pea (Forsberg *et al.*, 2005) as well as in spinach (Lindahl *et al.*, 1995). Due to its sensitivity towards E64 and activation by DTT this protease was assigned to the class of cysteine proteases. A protease expected to target LHC proteins as substrates should be present in nonsenescent as well as senescent leaves allowing to adjust the amount of LHC proteins to changes in light intensity. An increase in the large proform HvPAP14 during senescence could be related to a degradation of the thylakoid membrane proteins being an important source for nitrogen besides Rubisco.

Besides chloroplast located HvPAP14 forms, both antibodies detected proteins in small bodies, that are here called microbodies. Most K/HDEL-tailed Cys-EP so far immunolocalized have been detected in ER-derived bodies which in castor bean were first described as “dilated cisternae” (Vigil, 1970) or ricinosomes (Mollenhauer and Totten, 1970). An corresponding Cys-EP in root tips of *Arabidopsis thaliana* has been located in ER bodies, a round-shaped subfraction of them might be ricinosomes (Hierl *et al.*, 2014). Ricinosomes were shown to contain the proform of the Cys-EP (Schmid *et al.*, 1998; Schmid *et al.*, 1999; Schmid *et al.*, 2001). Activation occurs when the proform is released to the cytoplasm which during late stages of programmed cell death has low pH due to a rupture of the vacuole (Senatore *et al.*, 2008; Schmid *et al.*, 2001; Lopez-Fernandez and Maldonado, 2013). Activation of RcCysEP isolated from ricinosomes at pH 5.5 (Schmid *et al.*, 2001) or recombinant SiCysEP at pH 4.8 (Senatore *et al.*, 2008) has been demonstrated. Ricinosomes do not deliver RcCysEP to any further compartment but act as “suicide bombs”, releasing their content into the cytosol during the final stage of cell death (Gietl and Schmid, 2001). In contrast, similar bodies called “KDEL-tailed cysteine proteinase-accumulating vesicles” (KVs) were shown to deliver SH-EP, a KDEL-tagged Cys-EP of mungo bean as well as the orthologous protein EP-C1 of french bean, from the ER to protein storage vacuoles (Okamoto, 2003; Toyooka *et al.*, 2000; Minamikawa *et al.*, 2001). Biotechnological approaches aiming at accumulating KDEL-tagged protein in the endoplasmatic reticulum revealed that the intracellular trafficking of such proteins is variable and hence hardly predictable (De Meyer and Depicker, 2014).

Since 10 years it is known that proteins synthesized into the endoplasmic reticulum can be also delivered to chloroplasts from the ER via the Golgi apparatus by vesicles budding off from the trans Golgi (Radhamony and Theg, 2006; Jarvis and Lopez-Juez, 2013; Villarejo *et al.*, 2005). HvPAP14 is released from the ER likely after cleavage of the C-terminal HDEL motif containing sequence. The resulting 33 kDa proform has been found inside chloroplasts from nonsenescent leaves as well as in gerontoplasts from senescent leaves indicating that the import into chloroplasts is not changing during leaf development. The speckled occurrence of HvPAP14 in plastids of senescent leaves might indicate that the maturation occurs in a senescence dependent manner, although the mature form is constitutively present at all stages of development. It seems that not the processing itself, but the thylakoid association of the mature protein is enhanced during senescence. HvPAP14 in plastids of barley leaves might have two functions: a constitutive function in chloroplasts and a function during senescence associated thylakoid degradation. Senescence associated degradation of a thylakoid membrane protein could occur inside the intact plastid or after delivery of the complete chloroplast to the vacuole. Degradation of entire chloroplasts inside vacuoles has

been indeed frequently observed in senescing flag leaves collected from field plots (Mulisch and Krupinska, 2013).

The 33 kDa proform was detected both in chloroplasts and in microbodies indicating a dual targeting to both compartments. The data here presented do not give evidence for an activation of HvPAP14 located inside microbodies. It is unlikely that these microbodies, similarly as ricinosomes, act as suicide bombs, because there is no indication for an occurrence of active HvPAP14 outside of plastids. It is possible that the inactive form is transported via microbodies to the vacuole where the enzyme might get activated by low pH. It then could play a role in degradation of proteins after autophagic delivery of the microbodies to the vacuole. Such a process has been reported for the adjustment of the number of peroxisomes which are specialized forms of microbodies (Kim *et al.*, 2014; Van Wijk, 2015).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plant material

Hordeum vulgare L. cv. Lomerit, which was one of the most cultivated winter barley varieties in Germany for several years, was grown in the field or in the glasshouse. The field trial was conducted at the Experimental Station Hohenschulen, Agricultural Faculty, University of Kiel, Germany. Plants from the field trials were sown with a density of 300 plants per m². The field was divided in plots of 3x8 m, which were supplied with different amounts of nitrogen fertilizer. Plots supplied with a standard amount of nitrogen (80 kg per hectare) were designated as SN, plots fertilized with a high amount (240 kg per hectare) were designated as HN. For further information regarding growth conditions, sampling or microarray analysis the reader is referred to Hollmann *et al.* (2014).

Plants cultivated in the glasshouse were sown in standard soil and provided with supplemental artificial light in a day/night cycle of 15/9 h. The nonsenescent (NS) samples were collected 7 d after sowing when the primary leaf was fully developed (average relative chlorophyll content determined by SPAD meter: 38.2, n=10). 21 d after sowing the senescent (S) samples were collected (average relative chlorophyll content: 29.5, n=10).

For the isolation of protoplasts *Hordeum vulgare* cv. Golden Promise was grown in a climate chamber in a day/night cycle of 16/8 h. Primary foliage leaves were collected 12 d after sowing.

Determination of chlorophyll content

The relative chlorophyll content of leaves was determined at a position of 2 cm above the base of the leaves using a Minolta SPAD-502 (Konica Minolta Sensing, Osaka, Japan).

The total chlorophyll content was determined in 80% (v/v) acetone as described in (Porra *et al.*, 1989).

Activity based identification of cysteine proteases

DCG-04, a biotinylated derivative of the specific cysteine protease inhibitor E-64, was used for labelling of active cysteine proteases (Van der Hoorn *et al.*, 2004; Greenbaum *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2007; Carrion *et al.*, 2013). The biotin labelled proteases were either detected using streptavidin conjugated to horseradish peroxidase (HRP) or were purified using streptavidin coupled magnetic beads and then identified by ESI-LC/MS.

As a starting material, total leaf extracts were generated by grinding 600 mg of barley foliage primary leaves in liquid nitrogen. The powder was solubilized in 50 mM Na-acetate buffer (50 mM Na-acetate, 20 mM cysteine, 4 mM EDTA, 50 μ M AEBSF, 0.4 mM PMSF, 1.5% (w/v) PVPP and 0.05% (v/v) Triton X-100, pH 6) and centrifuged at 13000 x g for 10 min at 4°C. The supernatant or the chloroplast suspension were divided in two samples. One sample was incubated with 3 volumes of 5 μ M DCG-04 dissolved in 25 mM Na-acetate buffer (25 mM Na-acetate, 10 mM cysteine, pH 5) for 3 h at room temperature with gentle shaking. Before incubation with DCG04, the second sample was preincubated for 1 h in 100 μ M E-64 dissolved in 25 mM Na-acetate buffer to control the specificity of the DCG-04 labelling. After incubation, both samples were precipitated with acetone. Samples were either resuspended in gel loading buffer (25 mM Tris pH 6.8, 10% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS) for SDS-PAGE according to (Laemmli, 1970) or in 25 mM sodium phosphate buffer (0.05% (v/v) Triton X-100, 0.4 mM PMSF, 4 μ M EDTA, 20 μ M E-64, pH 7.4) for the isolation of labelled cysteine proteases. In this case the samples were then incubated in rinsed streptavidin coupled magnetic beads (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 1 h at room temperature with gentle shaking. After centrifugation at 2500 x g the supernatant was discarded and the beads were washed in PBS-T (8.0 mM potassium phosphate buffer, 150 mM NaCl, 0.02% v/v Tween-20, pH 7.4), resuspended in Laemmli buffer and boiled for 1 min before loading to a SDS containing 12% (w/v) polyacrylamide gel.

After electrophoresis the labelled proteases were either stained with Coomassie Brilliant Blue (CBB) or transferred to a nitrocellulose membrane and detected with streptavidin conjugated to horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich). Spots (NS and S) from stained protein bands (Figure 1b) were excised from the gel, in-gel digested with trypsin and subsequently analysed by ESI-LC/MS. Resulting mass spectra were processed and subjected to a

database search against UniRef90 protein database for plants supplemented by data for keratin and trypsin. Identified protein sequences were cross checked by sequence similarities to further database (Kohl *et al.*, 2012; Consortium, 2013).

Protoplast isolation and transformation

Protoplasts were isolated from primary foliage leaves collected from barley plants 12 d after sowing. After removal of the lower epidermis the leaves were incubated in digestion buffer (1% (w/v) Cellulase R-10, 0.3% (w/v) Macerozym R-10, 20 mM succinate, 0.5 M sorbitol, 0.5 mM KH₂PO₄, 1 mM KNO₃, 1 mM MgSO₄, 1 mM EDTA, 0.025% (w/v) BSA, pH 5.7) for 1 h at room temperature. The leaves were squeezed and the protoplast suspension was filtered through a nylon gauze (80 µm mesh size) and centrifuged at 63 x g for 5 min. The pellet was resuspended in a small amount of the digestion buffer, underlayered with flotation buffer (1 mM CaCl₂, 1 mM sucrose, 0.1 M sorbitol, 25 mM MES, pH 5.8) and overlaid with W5-solution (154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 5 mM glucose, pH 5.8). After centrifugation at 80 x g for 10 min (low acceleration and brake) the intact protoplasts were collected from the interphase and diluted with W5-solution.

The constructs used for transient transformations were *pUbi:PtGFP* and *pUbi:HvPAP14:RFP* containing an ubiquitin promoter. The HvPAP14 encoding sequence of the NIASHv2079N05 clone was amplified by PCR. The RFP coding sequence was inserted in the *HvPAP14* coding sequence that it is located in the resulting protein between Val306 and Lys307 of the HvPAP14 (Figure 3a). Thereby, the c-terminus of the *HvPAP14* protein sequence remained unchanged. The used primers were PAP14N_for (GAACTCTCGAGAAGCTTATGGCGAGAGCGATC) and PAP14N_rev (TCATTGGATCCGAATTCCACATCGCGCTTCAT) for the N-terminal part and PAP14C_for (AGAATGGATCCAAGGACAAGGAAGGGCTCT) and PAP14C_rev (TCATTTCTAGAGTCGACTCAGGCATGCTTCGGGT) for the C-terminal part of the HvPAP14 sequence.

For PEG-mediated protoplast transformation, 4 million protoplasts were sedimented by centrifugation at 80 x g for 5 min (low acceleration and brake) and resuspended in 500 µl MaMg-solution (0.8 M mannitol, 0.03 M MgCl₂, 0.2% (w/v) MES, pH 6.5). 40 µg plasmid DNA and 500 µl PEG-solution (40% (w/v) PEG 1500 in MaMg-solution) were added to the protoplasts before incubation for 30 min with gentle mixing. After stepwise addition of altogether 5 ml W5-solution, the protoplasts were sedimented at 80 x g for 10 min (low acceleration and brake) and resuspended in 1 ml W5-solution. The protoplasts were incubated at 22°C overnight in darkness and analysed by confocal laser scanning microscopy with the Leica TCS SP5 microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Excitations and emissions differed for RFP (λ_{ex} =543 nm, λ_{em} =590 nm - 615 nm),

GFP ($\lambda_{\text{ex}}=488$ nm, $\lambda_{\text{em}}=505$ nm - 530 nm) and chlorophyll ($\lambda_{\text{ex}}=633$ nm, $\lambda_{\text{em}}=660$ nm - 700 nm).

ER-Tracker staining

Protoplasts were incubated in W5-solution with 2 μM ER-Tracker Red (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 40 min and analysed by confocal laser scanning microscopy ($\lambda_{\text{ex}}=543$ nm, $\lambda_{\text{em}}=590$ nm - 615 nm).

Protein extraction

Leaves used for total protein extraction were immediately frozen in liquid nitrogen after harvest and stored at -80°C . The proteins were extracted as described previously (Pötter and Kloppstech, 1993), their concentrations were determined using Bradford reagent (BioRad Protein Assay, Hercules, CA, USA).

Isolation of chloroplasts und subfractions

Chloroplasts were isolated from flag leaves of field grown barley as described (Poulsen, 1983). For isolation of chloroplasts membrane and stroma fraction, chloroplasts were incubated in 10 mM HEPES (pH 7.6) for 30 min on ice. Membranes were collected by centrifugation at 50,000 x g for 16 min at 4°C .

For the preparation of thylakoid membranes and lumen intact chloroplasts were isolated from plants grown in the glasshouse as described in (Gruissem *et al.*, 1986; Krupinska, 1992) and fractionated (Sokolenko *et al.*, 1997).

Activity measurements with recombinant HvPAP14 produced in E. coli

The sequences encoding the mature HvPAP14 and the maltose binding protein (MBP) were fused. The cloning in the vector pMAL-c5X and protein purification were done by using the pMAL™ Protein Fusion & Purification System (NEB, Frankfurt am Main, Germany).

The activation of HvPAP14 was measured in pH-buffer (200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM HEPES, 20 mM MES, 20 mM TRIS, 20 mM sodium acetate, pH 3.5-9) with the fluorescing substrate Z-FR-AMC (20 μM) (Bachem, Bubendorf, Switzerland). The substrate turnover was analysed ratiometrically using the emission at 440 nm and 393 nm after excitation at 345 nm. For the activity measurements, HvPAP14 was activated in a small volume of pH-buffer with a pH of 4.5 and then incubated in a 10-fold volume of pH-buffer (pH 3.5-9) with Z-FR-AMC (final 20 μM).

Fixation of leaf segments for microscopic analyses

For immunofluorescence and immunogold analysis, leaf samples were fixed by high pressure freezing followed by freeze substitution (HPF-FS). Leaf pieces (2 mm in diameter) were punched out of leaves at a position of 1 cm below the leaf tip. The pieces were incubated in a solution of 8% (v/v) methanol in tap water containing 100 mM betaine monohydrate (B2754; Sigma-Aldrich), degassed therein for 15 min at 80 mbar and frozen in a Bal-Tec HPM010 high pressure freezing machine (Bal-Tec, Leica Microsystems). Freeze-substitution was performed in an EMAFS (Leica Microsystems) at -90°C in fixative (0.2% glutardialdehyde, 0.1% uranyl acetate in 100% acetone) for 23 h (primary foliage leaves) and 47 h (flag leaves) and at -60°C for 10 h (slope +2°C). The samples were washed using pure ethanol and infiltrated in a graded series of ethanol/LR white resin (London Resin Company, Reading, UK) at -4°C (slope +3°C). Embedding in LR white was at -4°C, polymerization in gelatin capsules at 50°C. Ultrathin sections were cut with a diamond knife in an Ultracut UCT ultramicrotome (Leica Microsystems).

Immunofluorescence microscopy

Semithin sections (1 µm) of the embedded leaf pieces were placed on slides and washed with 0.02 M glycine in PBS (8.1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7). Blocking was done in blocking buffer consisting of PBS supplemented with 0.2% fish gelatin (Sigma-Aldrich) and 0.2% BSA (Type V; Sigma-Aldrich). After incubation with one of the first antibodies (HvPAP14_1 or HvPAP14_2) the samples were washed with PBS and incubated with anti-rabbit IgG coupled to Alexa 568 (Molecular Probes, Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA). Observations were done in a Leica SP5 confocal microscope (Leica Microsystems).

Transmission electron microscopy

Ultrathin sections of the embedded leaf pieces were placed on gold grids and blocked like for immunofluorescence analyses. After incubation with one of the first antibodies (HvPAP14_1 or HvPAP14_2) the grids were washed and incubated with anti-rabbit IgG coupled to 10 nm gold particles (Aurion, Wageningen, The Netherlands). The sections finally were stained 10 min with uranyl acetate (Reynolds, 1963) and lead citrate (Watson, 1958). Observations were done with a Philips CM10 TEM and Tecnai G2 Biotwin (Phillips Electron Optics, Eindhoven, The Netherlands).

ACCESSION NUMBERS

HvPAP14 (CAQ00109)

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Marita Beese, Cay Kruse and Ulrike Voigt (Institute of Botany, CAU Kiel, Germany) for excellent technical assistance. We also thank Rüdiger Ströh (farm manager of Hohenschulen, CAU Kiel, Germany) and his co-workers for preparation of field-plots. We also thank Juan Guiamet (University La Plata, Argentina) for critical reading of the manuscript. This work was supported by the German Research Foundation (DFG: KR1350/13, KR1350/14).

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Figure S1. Sequence alignment of papain-like family (C1A) cysteine peptidases.

Figure S2. Immunogold labelling of sections from barley leaves.

Table S1. Results table of mass spectrometric (MS) analysis for protein identification.

Table S2. Screening of chloroplast proteomes.

References

- Bannai, H., Tamada, Y., Maruyama, O., Nakai, K. and Miyano, S.** (2002) Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics*, **18**, 298–305.
- Battelli, R., Lombardi, L., Picciarelli, P., Lorenzi, R., Frigerio, L. and Rogers, H.J.** (2014) Expression and localisation of a senescence-associated KDEL-cysteine protease from *Lilium longiflorum* tepals. *Plant Sci*, **214**, 38–46.
- Bayer, R.G., Stael, S., Csaszar, E. and Teige, M.** (2011) Mining the soluble chloroplast proteome by affinity chromatography. *Proteomics*, **11**, 1287–1299.
- Becker, C., Senyuk, V.I., Shutov, A.D., Nong, H., Fischer, J., Horstmann, C. and Müntz, K.** (1997) Proteinase A, a storage-globulin-degrading endopeptidase of vetch (*Vicia Sativa* L.) seeds, is not involved in early steps of storage-protein mobilization. *Eur J Biochem*, **248**, 304–312.
- Beers, E.P., Jones, A.M. and Dickerman, A.W.** (2004) The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in Arabidopsis. *Phytochemistry*, **65**, 43–58.
- Beers, E.P., Woffenden, B.J. and Zhao, C.** (2000) Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant Mol Biol*, **44**, 399–415.
- Bricker, T.M. and Frankel, L.K.** (2011) Auxiliary functions of the PsbO, PsbP and PsbQ proteins of higher plant Photosystem II: A critical analysis. *J Photochem Photobiol B*, **104**, 165–178.
- Carrion, C.A., Costa, M.L., Martinez, D.E., Mohr, C., Humbeck, K. and Guamet, J.J.** (2013) In vivo inhibition of cysteine proteases provides evidence for the involvement of “senescence-associated vacuoles” in chloroplast protein degradation during dark-induced senescence of tobacco leaves. *J Exp Bot*, **64**, 4967–4980.
- Chiba, A., Ishida, H., Nishizawa, N.K., Makino, A. and Mae, T.** (2003) Exclusion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts by specific bodies in naturally senescing leaves of wheat. *Plant Cell Physiol*, **44**, 914–921.
- Consortium, T.I.B.G.S.** (2013) A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature*, **491**, 711–716.
- Costa, M.L., Martinez, D.E., Gomez, F.M., Carrión, C.A. and Guamet, J.J.** (2013) Chloroplast protein degradation: involvement of senescence-associated vacuoles. In *Plastid development in leaves during growth and senescence*. Advances in Photosynthesis and Respiration. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 417–433.
- De Meyer, T. and Depicker, A.** (2014) Trafficking of endoplasmic reticulum-retained recombinant proteins is unpredictable in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci*, **5**, 473.
- Desimone, M., Henke, A. and Wagner, E.** (1996) Oxidative stress induces partial degradation of the large subunit of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in isolated chloroplasts of barley. *Annu Rev Plant Physiol*, **111**, 789–796.
- Duckert, P., Brunak, S. and Blom, N.** (2004) Prediction of proprotein convertase cleavage sites. *Protein Eng Des Sel*, **17**, 107–112.
- Feller, U., Anders, I. and Mae, T.** (2008) Rubisco lytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. *J Exp Bot*, **59**, 1615–1624.

- Forsberg, J., Strom, J., Kieselbach, T., Larsson, H., Alexciev, K., Engstrom, A. and Akerlund, H.-E.** (2005) Protease activities in the chloroplast capable of cleaving an LHCII N-terminal peptide. *Physiol Plant*, **123**, 21–29.
- Gietl, C. and Schmid, M.** (2001) Ricinosomes: an organelle for developmentally regulated programmed cell death in senescing plant tissues. *Naturwissenschaften*, **88**, 49–58.
- Gomord, V., Denmat, L.A., Lainé, A.F., Satiat-Jeunemaitre, B., Hawes, C. and Faye, L.** (1997) The C-terminal HDEL sequence is sufficient for retention of secretory proteins in the endoplasmic reticulum (ER) but promotes vacuolar targeting of proteins that escape the ER. *Plant J*, **11**, 313–325.
- Greenbaum, D., Medzihradszky, K.F., Burlingame, A. and Bogyo, M.** (2000) Epoxide electrophiles as activity-dependent cysteine protease profiling and discovery tools. *Chem Biol*, **7**, 569–581.
- Gruissem, W., Greenberg, B.M., Zurawski, G. and Hallick, R.B.** (1986) Chloroplast gene expression and promoter identification in chloroplast extracts. *Meth. Enzymol.*, **118**, 253–270.
- Guiamet, J.J., Pichersky, E. and Noodén, L.D.** (1999) Mass exodus from senescing soybean chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, **40**, 986–992.
- Haussühl, K., Andersson, B. and Adamska, I.** (2001) A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II. *EMBO J*, **20**, 713–722.
- He, X. and Kermode, A.R.** (2003) Proteases associated with programmed cell death of megagametophyte cells after germination of white spruce (*Picea glauca*) seeds. *Plant Mol Biol*, **52**, 729–744.
- Hierl, G., Höwing, T., Isono, E., Lottspeich, F. and Gietl, C.** (2014) Ex vivo processing for maturation of Arabidopsis KDEL-tailed cysteine endopeptidase 2 (AtCEP2) pro-enzyme and its storage in endoplasmic reticulum derived organelles. *Plant Mol Biol*, **84**, 605–620.
- 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. *J Exp Bot*, **65**, 3963–3973.
- Hörtensteiner, S.** (2006) Chlorophyll degradation during senescence. *Annu Rev Plant Biol*, **57**, 55–77.
- Huffaker, R.C.** (1990) Proteolytic activity during senescence of plants. *New Phytol*, **116**, 199–231.
- Hunter, S., Jones, P., Mitchell, A., et al.** (2012) InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database. *Nucleic Acids Res*, **40**, D306–12.
- Jarvis, P. and Lopez-Juez, E.** (2013) Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **14**, 787–802.
- Järvi, S., Gollan, P.J. and Aro, E.-M.** (2012) Understanding the roles of the thylakoid lumen in photosynthesis regulation. *Front Plant Sci*, **4**, 434–434.
- Jukanti, A.K., Heidlebaugh, N.M., Parrott, D.L., Fischer, I.A., McInnerney, K. and Fischer, A.M.** (2008) Comparative transcriptome profiling of near-isogenic barley (*Hordeum vulgare*) lines differing in the allelic state of a major grain protein content locus

- identifies genes with possible roles in leaf senescence and nitrogen reallocation. *New Phytol*, **177**, 333–349.
- Karrer, K.M., Peiffer, S.L. and DiTomas, M.E.** (1993) Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes. *Proc Natl Acad Sci*, **90**, 3063–3067.
- Kato, Y. and Sakamoto, W.** (2013) Plastid protein degradation during leaf development and senescence: role of proteases and chaperones. In *Plastid development in leaves during growth and senescence*. Advances in Photosynthesis and Respiration. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 453–477.
- Kato, Y., Murakami, S., Yamamoto, Y., Chatani, H., Kondo, Y., Nakano, T., Yokota, A. and Sato, F.** (2004) The DNA-binding protease, CND41, and the degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in senescent leaves of tobacco. *Planta*, **220**, 97–104.
- Kim, J., Lee, H., Lee, H.N., Kim, S.H., Shin, K.D. and Chung, T.** (2014) Autophagy-related proteins are required for degradation of peroxisomes in arabidopsis hypocotyls during seedling growth. *Plant Cell*, **25**, 4956–4966.
- Kohl, S., Hollmann, J., Blattner, F.R., et al.** (2012) A putative role for amino acid permeases insink-source communication of barley tissuesuncovered by RNA-seq. *BMC Plant Biol*, **12**, 1–1.
- Kramer, D.M., Sacksteder, C.A. and Cruz, J.A.** (1999) How acidic is the lumen? *Photosyn Res*, **60**, 151–163.
- Krupinska, K.** (1992) Transcriptional control of plastid gene expression during development of primary foliage leaves of barley grown under a daily light-dark regime. *Planta*, **186**, 294–303.
- Kusaba, M., Ito, H., Morita, R., et al.** (2007) Rice NON-YELLOW COLORING1 is involved in light-harvesting complex II and grana degradation during leaf senescence. *Plant Cell*, **19**, 1362–1375.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
- Lindahl, M., Spetea, C., Hundal, T., Oppenheim, A.B., Adam, Z. and Andersson, B.** (2000) The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *Plant Cell*, **12**, 419–431.
- Lindahl, M., Yang, D.H. and Andersson, B.** (1995) Regulatory proteolysis of the major light-harvesting chlorophyll a/b protein of photosystem II by a light-induced membrane-associated enzymic system. *Eur J Biochem*, **231**, 503–509.
- Liu, Y. and Bassham, D.C.** (2012) Autophagy: Pathways for Self-Eating in Plant Cells. *Annu Rev Plant Biol*, **63**, 215–237.
- Lohman, K.N., Gan, S., Amasino, J., Amasino, R.M. and Manorama, C.** (1994) Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant*, **92**, 322–328.
- Lopez-Fernandez, M.P. and Maldonado, S.** (2013) Ricinosomes provide an early indicator of suspensor and endosperm cells destined to die during late seed development in quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Ann Bot*, **112**, 1253–1262.
- Makarova, K.S., Aravind, L. and Koonin, E.V.** (2000) A novel superfamily of predicted

cysteine proteases from eukaryotes, viruses and *Chlamydia pneumoniae*. *Trends Biochem Sci*, **25**, 50–52.

- Martinez, D.E., Bartoli, C.G., Grbić, V. and Guamet, J.J.** (2007) Vacuolar cysteine proteases of wheat (*Triticum aestivum* L.) are common to leaf senescence induced by different factors. *J Exp Bot*, **58**, 1099–1107.
- Martinez, D.E., Costa, M.L. and Guamet, J.J.** (2008) Senescence-associated degradation of chloroplast proteins inside and outside the organelle. *Plant Biol*, **10**, 15–22.
- Martinez, D.E., Costa, M.L., Gomez, F.M., Otegui, M.S. and Guamet, J.J.** (2008) “Senescence-associated vacuoles” are involved in the degradation of chloroplast proteins in tobacco leaves. *Plant J*, **56**, 196–206.
- Minamikawa, T., Toyooka, K., Okamoto, T., Hara-Nishimura, I. and Nishimura, M.** (2001) Degradation of ribulose-bisphosphate carboxylase by vacuolar enzymes of senescing French bean leaves: Immunocytochemical and ultrastructural observations. *Protoplasma*, **218**, 144–153.
- Mitsuhashi, W. and Minamikawa, T.** (1989) Synthesis and posttranslational activation of sulfhydryl-endoropeptidase in cotyledons of germinating *Vigna mungo* seeds. *Plant Physiol*, **89**, 274–279.
- Mollenhauer, H.H. and Totten, C.** (1970) Studies on seeds: v. microbodies, glyoxysomes, and ricinosomes of castor bean endosperm. *Plant Physiol*, **46**, 794–799.
- Mulisch, M. and Krupinska, K.** (2013) Ultrastructural analyses of senescence associated dismantling of chloroplasts revisited. In *Plastid development in leaves during growth and senescence*. Advances in Photosynthesis and Respiration. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 307–335.
- Mullen, R.T., Flynn, C.R. and Trelease, R.N.** (2001) How are peroxisomes formed? The role of the endoplasmic reticulum and peroxins. *Trends Plant Sci*, **6**, 256–261.
- Munro, S. and Pelham, H.R.** (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*, **48**, 899–907.
- Murakami, S., Kondo, Y., Nakano, T. and Sato, F.** (2000) Protease activity of CND41, a chloroplast nucleoid DNA-binding protein, isolated from cultured tobacco cells. *Febs Lett*, **468**, 15–18.
- Nakabayashi, K., Ito, M., Kiyosue, T., Shinozaki, K. and Watanabe, A.** (1999) Identification of clp genes expressed in senescing Arabidopsis leaves. *Plant Cell Physiol*, **40**, 504–514.
- Nakano, T., Murakami, S., Shoji, T., Yoshida, S., Yamada, Y. and Sato, F.** (1997) A novel protein with DNA binding activity from tobacco chloroplast nucleoids. *Plant Cell*, **9**, 1673–1682.
- Napier, R.M., Fowke, L.C., Hawes, C., Lewis, M. and Pelham, H.R.** (1992) Immunological evidence that plants use both HDEL and KDEL for targeting proteins to the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci*, **102**, 261–271.
- Okamoto, T.** (2003) C-Terminal KDEL sequence of s KDEL-tailed cysteine proteinase (sulfhydryl-endoropeptidase) is involved in formation of KDEL vesicle and in efficient vacuolar transport of sulfhydryl-endoropeptidase. *Plant Physiol*, **132**, 1892–1900.

- Ono, Y., Wada, S., Izumi, M., Makino, A. and Ishida, H.** (2013) Evidence for contribution of autophagy to Rubisco degradation during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*, **36**, 1147–1159.
- Otegui, M.S., Noh, Y.-S., Martinez, D.E., Vila Petroff, M.G., Staehelin, L.A., Amasino, R.M. and Guamet, J.J.** (2005) Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of *Arabidopsis* and soybean. *Plant J*, **41**, 831–844.
- Parrott, D.L., McInnerney, K., Feller, U. and Fischer, A.M.** (2007) Steam-girdling of barley (*Hordeum vulgare*) leaves leads to carbohydrate accumulation and accelerated leaf senescence, facilitating transcriptomic analysis of senescence-associated genes. *New Phytol*, **176**, 56–69.
- Peoples, M.B. and Dalling, M.J.** (1988) The interplay between proteolysis and amino acid metabolism during senescence and nitrogen reallocation. In *Senescence and Aging in Plants*. Elsevier, pp. 181–217.
- Petersen, T.N., Brunak, S., Heijne, von, G. and Nielsen, H.** (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Meth*, **8**, 785–786.
- Porra, R.J., Thompson, W.A. and Kriedemann, P.E.** (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*, **975**, 384–394.
- Poulsen, C.** (1983) The barley chloroplast genome: Physical structure and transcriptional activity in vivo. *Carlsberg Res Commun*, **48**, 57–80.
- Pötter, E. and Klopstech, K.** (1993) Effects of light stress on the expression of early light-inducible proteins in barley. *Eur J Biochem*, **214**, 779–786.
- Radhamony, R.N. and Theg, S.M.** (2006) Evidence for an ER to Golgi to chloroplast protein transport pathway. *Trends Cell Biol*, **16**, 385–387.
- Rawlings, N.D., Morton, F.R., Kok, C.Y., Kong, J. and Barrett, A.J.** (2008) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*, **36**, D320–5.
- Reynolds, E.S.** (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol*, **17**, 208–212.
- Richau, K.H., Kaschani, F., Verdoes, M., et al.** (2012) Subclassification and biochemical analysis of plant papain-Like cysteine proteases displays subfamily-specific characteristics. *Plant Physiol*, **158**, 1583–1599.
- Sakamoto, W.** (2006) Protein degradation machineries in plastids. *Annu Rev Plant Biol*, **57**, 599–621.
- Schmid, M., Simpson, D. and Gietl, C.** (1999) Programmed cell death in castor bean endosperm is associated with the accumulation and release of a cysteine endopeptidase from ricinosomes. *Proc Natl Acad Sci*, **96**, 14159–14164.
- Schmid, M., Simpson, D., Kalousek, F. and Gietl, C.** (1998) A cysteine endopeptidase with a C-terminal KDEL motif isolated from castor bean endosperm is a marker enzyme for the ricinosome, a putative lytic compartment. *Planta*, **206**, 466–475.
- Schmid, M., Simpson, D.J., Sarioglu, H., Lottspeich, F. and Gietl, C.** (2001) The ricinosomes of senescing plant tissue bud from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl*

Acad Sci, **98**, 5353–5358.

- Senatore, A., Trobacher, C.P. and Greenwood, J.S.** (2008) Ricinosomes predict programmed cell death leading to anther dehiscence in tomato. *Plant Physiol*, **149**, 775–790.
- Sokolenko, A., Altschmied, L. and Herrmann, R.G.** (1997) Sodium Dodecyl Sulfate-Stable Proteases in Chloroplasts. *Plant Physiol*, **115**, 827–832.
- Spitzer, C., Li, F., Buono, R., Roschttardt, H., Chung, T., Zhang, M., Osteryoung, K.W., Vierstra, R.D. and Otegui, M.S.** (2015) The endosomal protein CHARGED MULTIVESICULAR BODY PROTEIN1 regulates the autophagic turnover of plastids in Arabidopsis. *Plant Cell*, **27**, 391–402.
- Tanaka, T., Minamikawa, T., Yamauchi, D. and Ogushi, Y.** (1993) Expression of an endopeptidase (EP-C1) in *Phaseolus vulgaris* plants. *Plant Physiol*, **101**, 421–428.
- Taylor, M.A., Baker, K.C., Briggs, G.S., Connerton, I.F., Cummings, N.J., Pratt, K.A., Revell, D.F., Freedman, R.B. and Goodenough, P.W.** (1995) Recombinant pro-regions from papain and papaya proteinase IV-are selective high affinity inhibitors of the mature papaya enzymes. *Protein Eng*, **8**, 59–62.
- Terai, H., Watada, A.E., Murphy, C.A. and Wergin, W.P.** (2000) Scanning electron microscopic study of modified chloroplasts in senescing broccoli florets. *HortScience*, **35**, 99–103.
- Thomas, H. and Howarth, C.J.** (2000) Five ways to stay green. *J Exp Bot*, **51 Spec No.**
- Thompson, A.R., Doelling, J.H., Suttangkakul, A. and Vierstra, R.D.** (2005) Autophagic nutrient recycling in Arabidopsis directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways. *Plant Physiol*, **138**, 2097–2110.
- Toyooka, K., Okamoto, T. and Minamikawa, T.** (2000) Mass transport of proform of a KDEL-tailed cysteine proteinase (Sh-EP) to protein storage vacuoles by endoplasmic reticulum-derived vesicle is involved in protein mobilization in germinating seeds. *J Cell Biol*, **148**, 453–464.
- Trobacher, C.P., Senatore, A., Holley, C. and Greenwood, J.S.** (2012) Induction of a ricinosomal-protease and programmed cell death in tomato endosperm by gibberellic acid. *Planta*, **237**, 665–679.
- Van der Hoorn, R.A.L., Leeuwenburgh, M.A., Bogyo, M., Joosten, M.H.A.J. and Peck, S.C.** (2004) Activity profiling of papain-like cysteine proteases in plants. *Plant Physiol*, **135**, 1170–1178.
- Van Wijk, K.J.** (2015) Protein maturation and proteolysis in plant plastids, mitochondria, and peroxisomes. *Annu Rev Plant Biol*, **66**, 75–111.
- Vigil, E.L.** (1970) Cytochemical and developmental changes in microbodies (glyoxysomes) and related organelles of castor bean endosperm. *J Cell Biol*, **46**, 435–454.
- Villarejo, A., Burén, S., Larsson, S., et al.** (2005) Evidence for a protein transported through the secretory pathway en route to the higher plant chloroplast. *Nat Cell Biol*, **7**, 1224–1231.
- Wada, S. and Ishida, H.** (2013) Autophagy of Chloroplasts During Leaf Senescence. In *Plastid development in leaves during growth and senescence*. Advances in

Photosynthesis and Respiration. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 435–451.

Wang, S. and Blumwald, E. (2014) Stress-induced chloroplast degradation in Arabidopsis is regulated via a process independent of autophagy and senescence-associated vacuoles. *Plant Cell*, **26**, 4875–4888.

Watson, M.L. (1958) Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol*, **4**, 475–478.

Wiederanders, B. (2002) Structure-function relationships in class CA1 cysteine peptidase propeptides. *Acta Biochim Pol*, **50**, 691–713.

Wiederanders, B., Kaulmann, G. and Schilling, K. (2003) Functions of propeptide parts in cysteine proteases. *Curr Protein Pept Sci*, **4**, 309–326.

Wittenbach, V.A., Lin, W. and Hebert, R.R. (1982) Vacuolar localization of proteases and degradation of chloroplasts in mesophyll protoplasts from senescing primary wheat leaves. *Plant Physiol*, **69**, 98–102.

Xie, Q., Michaeli, S., Peled-Zehavi, H. and Galili, G. (2015) Chloroplast degradation: one organelle, multiple degradation pathways. *Trends Plant Sci*, **20**, 264–265.

Table 1. Subcellular localizations of the different forms of HvPAP14 as localized by different methods.

method	material	37 kDa proenzyme (pro-pep-HDEL)	33 kDa proenzyme (processed pep)	26 kDa mature enzyme (mature pep)
transient transformation	barley protoplasts	endoplasmic reticulum, vesicles/microbodies	n. d.	n. d.
immunoblot	total leaf extract	+	+	-
	chloroplast membrane fraction	-	+	+
	lumen fraction	-	+	-
immunofluorescence	primary foliage leaves / flag leaves	n. d.	NS, S: microbodies S: chloroplasts	speckles inside chloroplasts
immunogold labelling	primary foliage leaves / flag leaves	n. d.	microbodies, chloroplasts (not attached to thylakoid membranes)	chloroplasts (attached to membranes)

n. d.: not distinguishable NS: nonsenescent, S: senescent

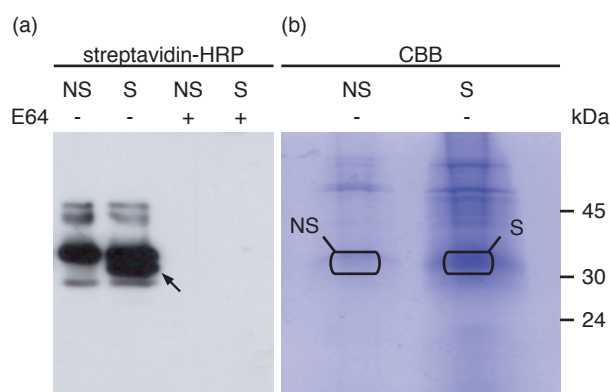


Figure 1. Identification of cysteine proteases in nonsenescent (NS) and senescent (S) primary barley leaves.

SDS-PAGE of cysteine proteases labelled with DCG-04, a biotinylated derivate of the specific cysteine protease inhibitor E-64. (a) Detection of labelled cysteine proteases by horseradish peroxidase (HRP) conjugated streptavidin. The arrow points at a protein band detected only in senescent leaves. Specificity of the approach was determined by pre-incubation of the samples with E-64. (b) Coomassie Brilliant Blue (CBB) staining of the labelled cysteine proteases after affinity purification using streptavidin coupled magnetic beads. Protein bands with similar size as in (a) were excised (NS and S) and analysed by ESI-LC/MS. Results are presented in Table S1.

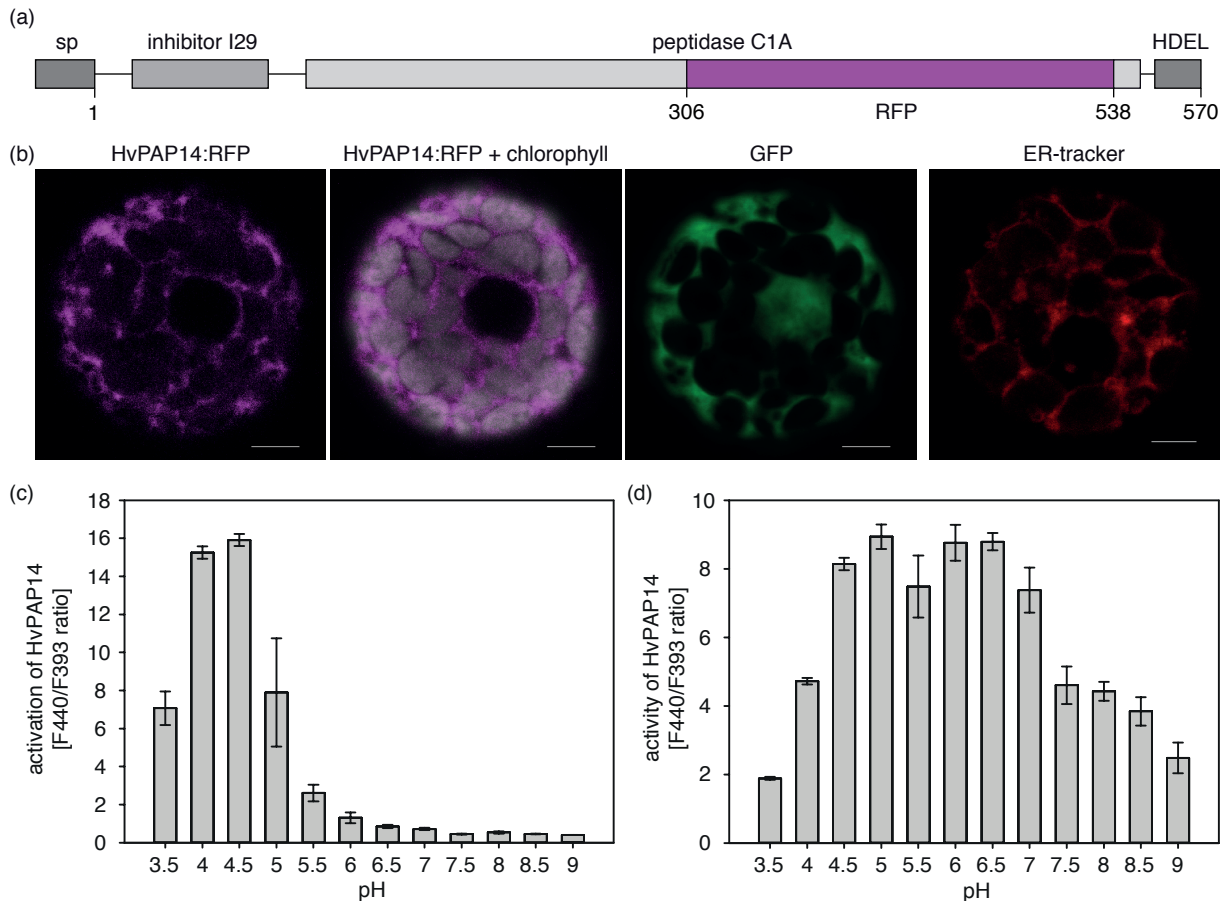


Figure 2. Localization of HvPAP14:RFP in ER, vesicles and chloroplasts and pH dependence of the activity/activation of recombinant HvPAP14. (a) Scheme of the fusion protein. RFP was inserted in the HvPAP14 sequence N-terminal to the HDEL sequence. (b) Fluorescence microscopic images of protoplasts from primary barley leaves that were transiently transformed with the HvPAP14:RFP construct and GFP or stained with ER-Tracker Red. (c) pH dependent activation of recombinant HvPAP14 was measured by the cleavage of Z-FR-AMC in buffer with pH 3.5 to 9. The ratios of the fluorescence intensities between cleaved (440 nm) and not cleaved (393 nm) substrate were calculated. (d) pH dependence of the activity of recombinant HvPAP14 was measured as before but using previously activated HvPAP14 (at pH 4.5). Error bars indicate SD, n=3.

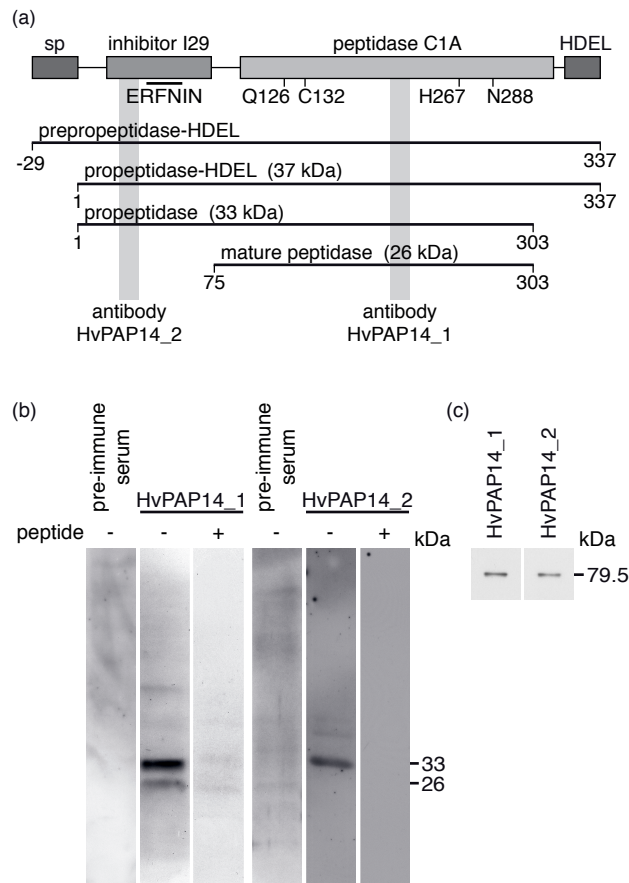


Figure 3. HvPAP14 protein forms and choice of peptides for antibody production. (a) Predicted forms of HvPAP14. Calculated sizes of the propeptidase, its processed forms and the mature peptidase are indicated. The positions of peptides chosen for antibody production are highlighted in grey. (b, c) Test of the HvPAP14 antibodies by immunoblotting. (b) Proteins from total leaf extracts were probed either with pre-immune serum and affinity purified antibody HvPAP14_1 or HvPAP14_2. Specificities of the detected signals were demonstrated by pre-absorption of the purified antibody with the peptide used for its generation. (c) Detection of recombinant HvPAP14:MBP by labelling with HvPAP14_1 or HvPAP14_2.

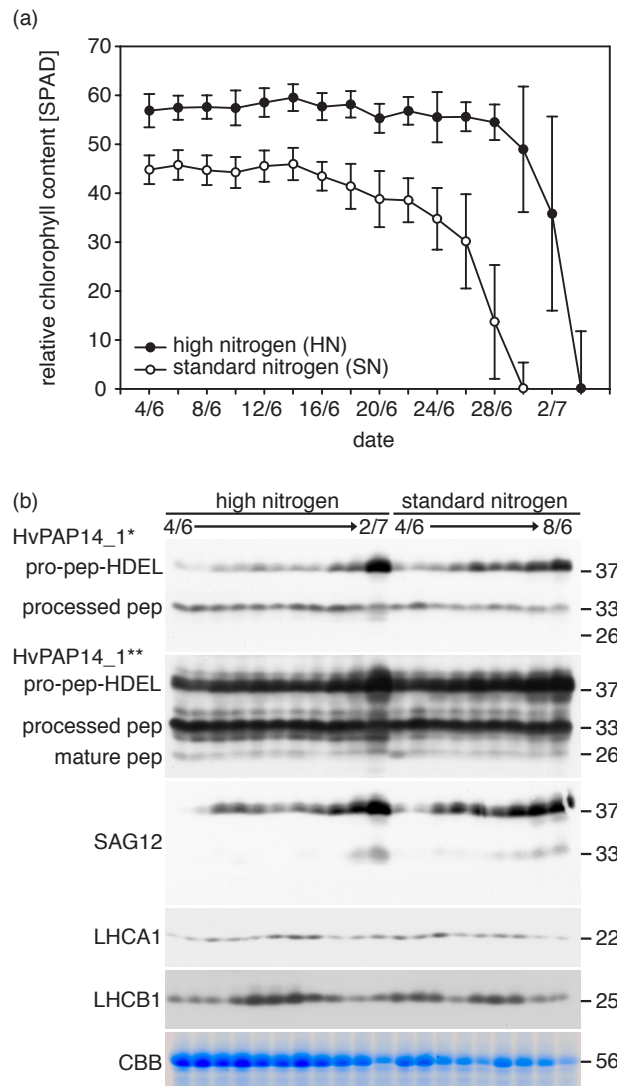


Figure 4. Immunological analysis of HvPAP14 abundance at different stages of barley flag leaf senescence employing the antibody HvPAP14_1. (a) Relative chlorophyll contents determined by SPAD measurements of flag leaves. Error bars indicate SD, n=100. (b) Immunodetection of HvPAP14 in protein extracts from flag leaves of field grown barley fertilized either with a standard (SN) or a high amount of nitrogen (HN). Samples were collected every second day from 4 June until 28 June (SN) and until 2 July 2010 (HN). The putative forms (Figure 3a) of the HvPAP14 protein are indicated. Asterisks indicate the exposure time of the immunodecorated blot of either 4* or 10** minutes. For comparison, immunoblots of SAG12 and two apoproteins of the light harvesting complexes I and II, LHCA1 and LHCb1 are shown. The prominent band in the Coomassie Brilliant Blue (CBB) gel corresponds to the molecular weight of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (55.6 kDa).

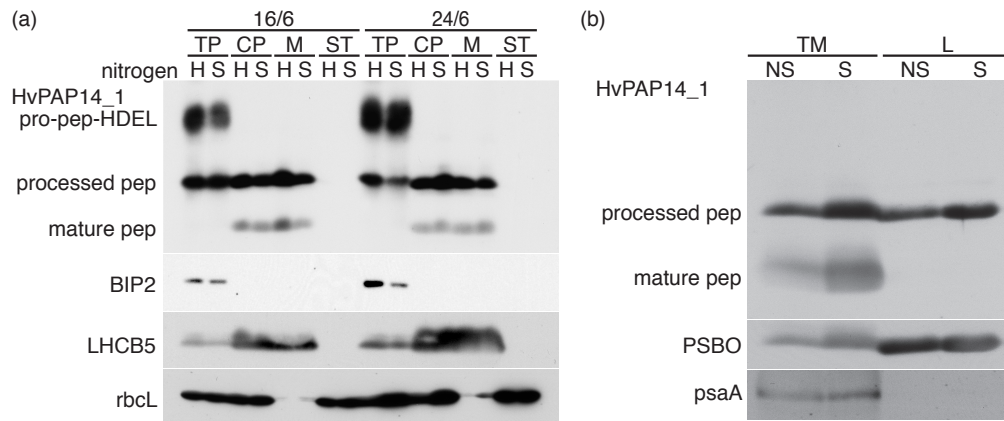


Figure 5. Localization of HvPAP14 in total protein and chloroplasts subfractions. (a) Immunoblot detection of HvPAP14_1 in total protein extracts (TP), chloroplasts (CP), plastid membranes (M) and stroma (ST) extracted from flag leaves of field grown barley collected at 16 June and 24 June 2010. The plants were fertilized either with a standard (S) or a high (H) amount of nitrogen. The putative forms (Figure 3a) of the HvPAP14 protein are indicated. To demonstrate the purity of the chloroplasts and subfractions, antibodies directed toward binding immunoglobulin protein 2 (BIP2), light harvesting complex of photosystem II 5 (LHCB5) and the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rbcL) were used. (b) Localization of HvPAP14 at the thylakoid membrane system isolated from 7 d (nonsenescent, NS) and 21 d (senescent, S) primary foliage leaves grown in the glasshouse. Immunoblot detection of HvPAP14 in the thylakoid membrane (TM) and lumen (L) fractions of isolated chloroplasts using the HvPAP14_1 antibody. To demonstrate the purity of the fractions, antibodies directed toward PSBO and psaA are shown.

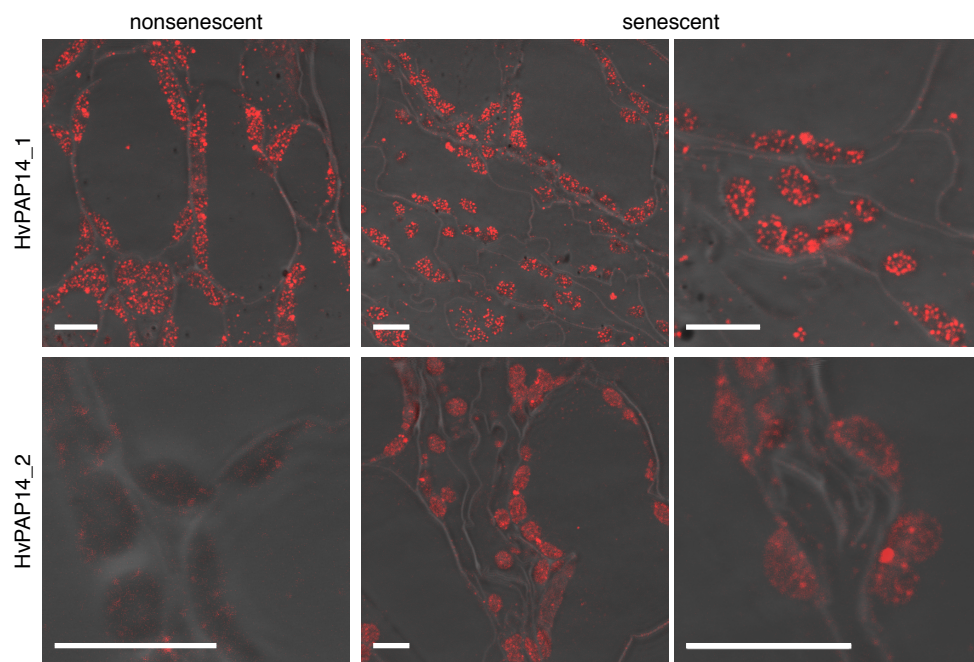


Figure 6. Immunofluorescence of leaf sections derived from HPF-FS specimen. Sections were either prepared from barley leaves collected 7 d (nonsenescent) or 21 d (senescent) after sowing from plants grown in the glasshouse. Detection of immunofluorescence was performed with either the HvPAP14_1 or the HvPAP14_2 antibody. Scale bars: 7.5 μ m.

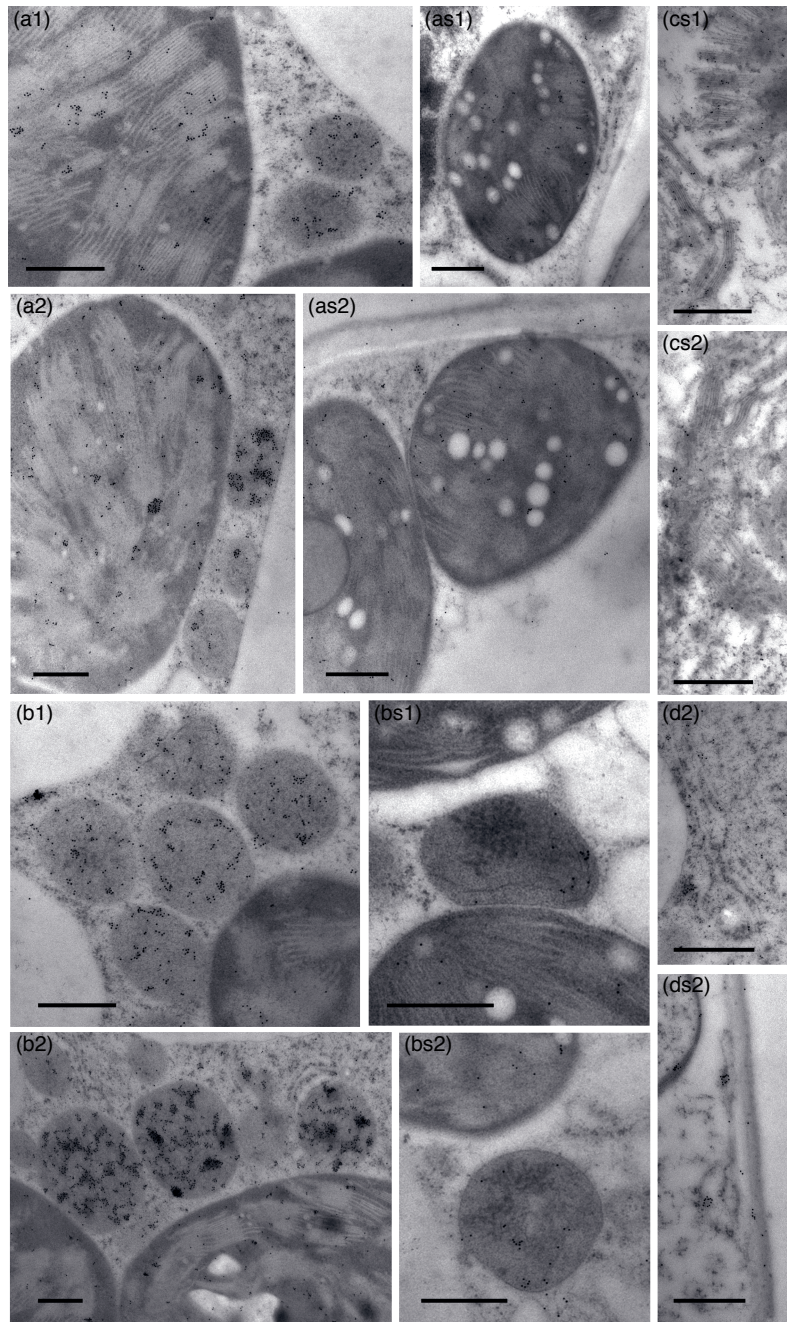


Figure 7. Immunogold labelling of leaf sections derived from HPF-FS specimen. Sections were either prepared from nonsenescent (a, b) or senescent (as, bs) barley leaves collected at 2 June (nonsenescent) or 23 June 2010 (senescent) from fields fertilized with a standard amount of nitrogen (Figure 4). Immunogold labelling was performed with either the HvPAP14_1 (a1, b1, cs1) or the HvPAP14_2 (a2, b2, cs2, ds2) antibody. (a) overviews, (b) details showing microbodies, (c) details showing thylakoids of broken plastids and (d) details showing endoplasmic reticulum. Scale bars: 500 nm.

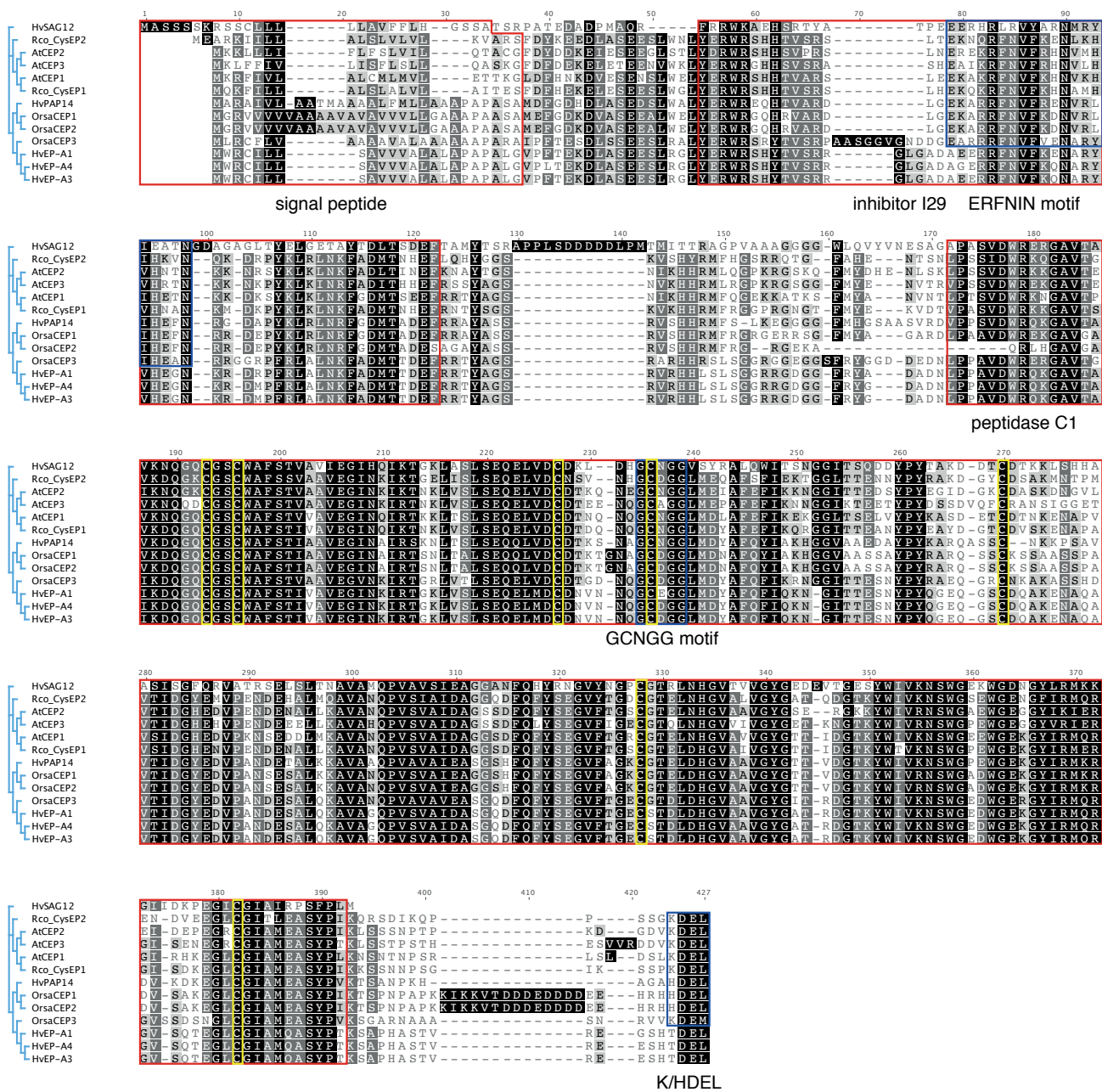


Figure S1. Sequence alignment of papain-like family (C1A) cysteine peptidases with a C-terminal endoplasmic reticulum retention signal from different species (modified from Hierl et al. 2012). Domains are highlighted in red, motifs are highlighted in blue and cysteines are highlighted in yellow.

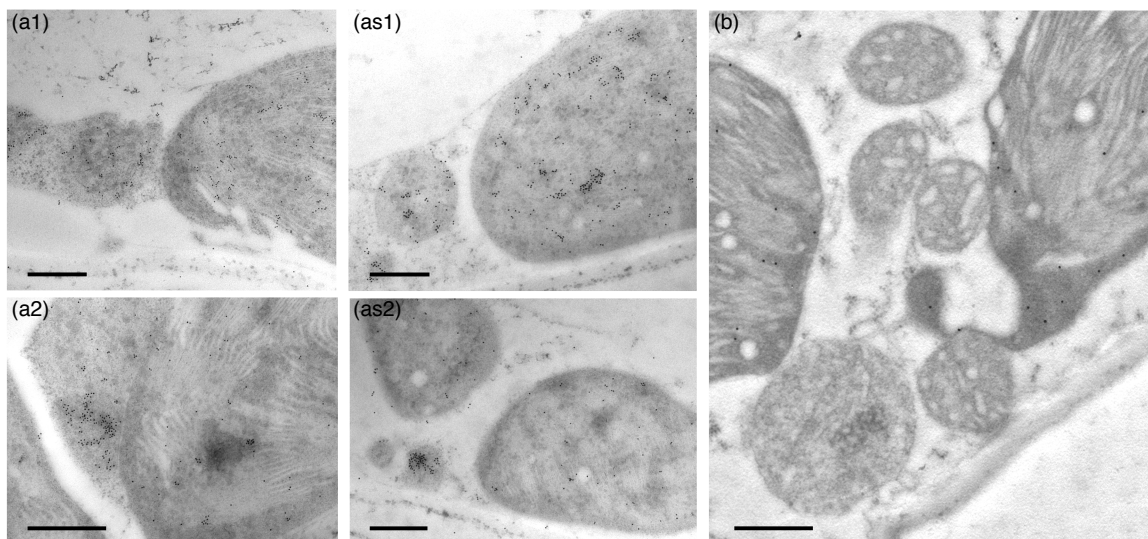


Figure S2. Immunogold labelling of sections from barley leaves.

(a) Sections from primary foliage leaves prepared by HPF-FS were immunolabelled using either the antibody HvPAP14_1 (a1, as1) or the antibody HvPAP14_2 (a2, as2). Nonsenescent leaves are compared with senescent (s) leaves. (b) Immunogold labelling of sections from chemically fixed flag leaves. The antibody was directed towards the small subunit of Rubisco (RBCS). Scale bars: 500 nm.

Table S1. Results table of mass spectrometric (MS) analysis for protein identification.

Protein spots of selected bands were manually excised from the SDS-PAGE gel, digested with trypsin and subjected to mass spectrometry as described previously (Kaspar et al., 2010). Database searches were conducted against a UniProt reference database, consisting of plant entries with 90% homology (July, 2010) complemented with sequences for human keratin, porcine trypsin and yeast enolase as they are either possible sources of contamination or spiked in reference proteins. Search parameters were: 10 ppm mass tolerance, automatic peptide fragment tolerance, 3 minimum fragment ion matches per peptide and 7 minimum fragment ion matches per protein, carbamidomethyl (Cys) and propionamide (C) as fixed modification, variable oxidation on (Met) and N-terminal acetylation modification and a false positive rate of 4%.

Protein name	Identified in sample: Non-Senescent (S) (NS)	UniRef90 accession number	Corresponding NCBI accession number	Theoretical mW (Da)	Theoretical pI (pH)	Protein score	Peptide score	Identified peptide sequence	Modifications
HVPAP14	X X	B4ESF2	CAQ00109.1	39764	6.91	13.03	54.90 58.67	(R)DVPPSVDWLR(Q) (K)HGGVAAEDAYPYK(A)	
HVPAP13 (HVSAG12)	X	B4ESF1	CAQ00108.1	39909	5.70	5.84	44.44	(K)WGDNGYLR(M)	
HVPAP6	X X X X X X	B4ESE8	CAQ00105.1	50193	4.85	13.03	65.59 48.48 58.06 50.62 27.54 52.17	(K)VVITIDGYEDVPVNSEK(S) (K)DYWLVR(N) (K)AVANQPISVAIEAGGR(A) (R)NSGWSVWGEDGYIR(M) (K)CGIAVEPSYPTK(T) (K)CGIAVEPSYPTK(T)	Propionamide C (1)
Thiol protease aleurain	X X	P05167	P05167.1	39097	6.42	13.03	60.78 67.90 64.71	(R)EDGIVSPVK(N) (K)YNGGIDTEESYPYK(G) (R)DAALPETK(D)	
Leucine aminopeptidase	X X X	Q43034	BAJ92683.1	30830	5.17	12.45	42.03 33.33	(K)DWREDGIVSPVK(N) (K)NSWGADWGDNGYFK(M)	
Lipase	X X	A1C0L3	ABL11233.1	38800	7.33	13.03	60.78 40.35	(R)VVDFLSTK(Y) (K)YGLPFLPPSK(S)	Oxidation M (6)
Fructose biphosphate aldolase	X X X X X X	A5BDH7/Q9LLD7	BAJ90789.1	41551	6.39	13.03	60.00 56.52 53.85 47.37 43.68 42.22	(R)IASIGLENTEANR(Q) (R)ATPEQVADYTLK(L) (R)TFEVAQK(V) (R)SAAYYQQGAR(F) (R)TVVSIPIPGPSELAVK(E) (K)EAAWGLAR(Y)	Acetyl N-term (N-Term)
Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Rbcl)	X X X X	B5SW42/Q9GIF9/C3KF10	YP_874661.1	53078	6.22	12.38	52.94 46.15 41.27 41.18 33.33	(K)DTDILAAFR(V) (R)PPTYSK(T) (R)EMTLGFVDLLR(D) (K)SQAETGEIK(G) (K)DDENVNSQPFMR(W)	Oxidation M (2) Oxidation M (11)

Table S2. Screening of chloroplast proteomes.

Author	Journal	Species	Fraction	Accession	Description	Predicted localisation
Yin et al. 2014	Physiologie Plantarum	<i>Arabidopsis thaliana</i>	stroma thylakoids	-	-	-
Gutierrez-Carbonell et al. 2014	Journal of Proteom Research	<i>Pisum sativum</i>	chloroplast, inner envelop thylakoid	At2g38025	OTU-like cysteine protease family protein	chloroplast transit peptide
Tomiziolo et al. 2014	Mo Cell Proteomics	<i>Arabidopsis thaliana</i>	thylakoid	-	-	-
Simm et al. 2013	Front Plant Sci	<i>Pisum sativum</i>	chloroplast, inner envelop chloroplast	At2g38025	OTU-like cysteine protease family protein	chloroplast transit peptide
Behrens et al. 2013	Journal of Proteomics			-	-	-
Kamal et al. 2011	Mol Biol Rep	<i>Triticum aestivum</i>	chloroplast	Q0JNR2	Cysteine proteinase inhibitor 12	secretory pathway
Bayer et al. 2011	Proteomics	<i>Arabidopsis thaliana</i>	soluble chloroplast	AT3G57810	OTU-like cysteine protease family protein	chloroplast transit peptide
Plöscher et al. 2011	Journal of Proteomics	<i>Hordeum vulgare</i>	chloroplast	-	-	-
Yuan et al. 2011	Molecular Biology Reports	<i>Populus simonii</i>	chloroplast	-	-	-
Ferro et al. 2010	Mo Cell Proteomics	<i>Arabidopsis thaliana</i>	chloroplast envelop	At2g38025	OTU-like cysteine protease family protein	chloroplast transit peptide
Reiland et al. 2009	Plant Physiol	<i>Arabidopsis thaliana</i>	chloroplast	AT4G00690	UB-like protease 1B	chloroplast transit peptide
Majeran et al. 2008	Mo Cell Proteomics	<i>Zea mays</i>	chloroplast membranes	-	-	-
Zybailov et al. 2008	PLoS ONE	<i>Arabidopsis thaliana</i>	chloroplast	-	-	-
Granvogl et al. 2006	Proteomics	<i>Hordeum vulgare</i>	thylakoid membrane	-	-	-
Giacomelli et al. 2006	Plant Physiol	<i>Arabidopsis thaliana</i>	thylakoid membrane	-	-	-
Peltier et al. 2004	JBC	<i>Arabidopsis thaliana</i>	chloroplast	At1g47128	cysteine proteinase RD21A	secretory pathway
Kleffmann et al. 2004	Current Biology	<i>Arabidopsis thaliana</i>	plastid	At1g47128	cysteine proteinase RD21A	secretory pathway
Friso et al. 2004	The Plant Cell	<i>Arabidopsis thaliana</i>	thylakoid membrane	-	-	-
Kieselbach et al. 2003	Photosynthesis resarch	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Spinacia oleracea</i> , <i>Pisum sativum</i> , <i>Synechocystis</i>	lumen	-	-	-
Ferro et al. 2003	Mo Cell Proteomics	<i>Arabidopsis thaliana</i>	chloroplast envelop	-	-	-
Peltier et al. 2002	The Plant Cell	<i>Arabidopsis thaliana</i>	thylakoid lumen	-	-	-
Schubert et al. 2002	JBC	<i>Arabidopsis thaliana</i>	chloroplast lumen	-	-	-
Ferro et al 2002	Plant Biology	<i>Spinacia oleracea</i>	chloroplast envelop	-	-	-
Peltier et al. 2000	The Plant Cell	<i>Pisum sativum</i>	thylakoids	-	-	-