

**Methyljasmonat induzierte Seneszenz in Chloroplasten aus
Primärblättern der Gerste (*Hordeum vulgare* L.):
Analyse der Ultrastruktur und des Proteinimports**

Dissertation
zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
an der Fakultät für
Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von
Armin Springer
Diplom-Biologe
aus Feldgeding (Oberbayern)

Bayreuth, Juni 2007

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Die praktischen Arbeiten wurden in der Zeit von August 1999 bis Mai 2004 am Lehrstuhl Pflanzenphysiologie der Universität Bayreuth unter Betreuung von Frau Prof. Dr. Christiane Reinbothe und Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Erwin Beck und in der Abteilung Elektronenmikroskopie der Fachgruppe Biologie der Universität Bayreuth unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Georg Acker durchgeführt.

Die Arbeit wurde eingereicht am:

13. Juni 2007

Das Kolloquium fand statt am:

24. Oktober 2007

Der Prüfungsausschuss bestand aus:

Herrn Prof. Dr. Gerhard Krauss (Vorsitzender)
Frau Prof. Dr. Christiane Reinbothe (Erstgutachterin)
Herrn Prof. Dr. Benedikt Westermann (Zweitgutachter)
Herrn Prof. Dr. Georg Acker
Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Erwin Beck

Folgende wissenschaftliche Beiträge sind aus der vorliegenden Arbeit entstanden:

Publikationen:

POLLMANN, S., SPRINGER, A., BUHR, F., LAHROUSSI, A., SAMOL, I., BONNEVILLE, J.-., TICHTINSKY, G., VON WETTSTEIN, D., REINBOTHE, C. and REINBOTHE, S., 2007. A plant porphyria related to defects in plastid import of protochlorophyllide oxidoreductase A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**(6), pp. 2019-2023.

REINBOTHE, S., POLLMANN, S., SPRINGER, A., JAMES, R.J., TICHTINSKY, G. and REINBOTHE, C., 2005. A role of Toc33 in the protochlorophyllide-dependent plastid import pathway of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase (POR) A. *Plant Journal*, **42**(1), pp. 1-12.

REINBOTHE, S., QUIGLEY, F., SPRINGER, A., SCHEMENEWITZ, A. and REINBOTHE, C., 2004. The outer plastid envelope protein Oep16: Role as precursor translocase in import of protochlorophyllide oxidoreductase A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**(7), pp. 2203-2208.

Bildbeitrag:

ROSWITHA HARRER, 2003. Aus Licht wird Leben. Proteine der Photosynthese. *Chemie in unserer Zeit*, **37** (4), pp. 234-241.

Tagungsbeiträge:

ARMIN SPRINGER, GEORG ACKER, ERWIN BECK, CHRISTIANE REINBOTHE, 2001. Senescence and Chloroplasts: Specific Changes in Ultrastructure of Primary Leaf Tissue Chloroplasts of Barley (*Hordeum vulgare* cv Scarlett. Posterbeitrag. Dreiländertagung für Elektronenmikroskopie; Innsbruck. eigenfinanziert

ARMIN SPRINGER, GEORG ACKER, ERWIN BECK, CHRISTIANE REINBOTHE, 2002. Senescence and Chloroplasts: Specific Changes in Ultrastructure of Primary Leaf Tissue Chloroplasts of Barley (*Hordeum vulgare* cv Scarlett. Posterbeitrag. Botanikertagung Freiburg i. Br.. eigenfinanziert

ARMIN SPRINGER, GEORG ACKER, ERWIN BECK, CHRISTIANE REINBOTHE, 2003. SDS-digested Freeze-fracture Replica Labeling (SDS-FRL): Darstellung einer Komponente des Standard-Importapparates der äußeren Chloroplastenhüllmembran. Posterbeitrag. Tagung des Arbeitskreises „Analytische Elektronenmikroskopie in Biologie und Medizin. Hannover. eigenfinanziert

ARMIN SPRINGER, GEORG ACKER, ERWIN BECK, CHRISTIANE REINBOTHE, 2003. SDS-digested Freeze-fracture Replica Labeling (SDS-FRL) as a Tool to Investigate Subtle Changes in the Plastid Envelope. Posterbeitrag. Microscopy Conference MC 2003, Dresden. eigenfinanziert

Weitere, mit der vorliegenden Arbeit zusammenhängende Aktivitäten; Förderung:

Vortbildungen/Workshops:

„Kryosubstitution und Kryopräparation“, Fa. Leica, Bensheim, September 2002, finanziert durch die Abteilung EM der Universität Bayreuth

„Praktische Einführung in die Kryo Ultramikrotomie mit Gold/Silver Staining“, Max Plank Institute of Molekular Cell Biology and Genetics, Dresden, November 2002, eigenfinanziert

„Analytische Elektronenmikroskopie in Biologie und Medizin“, Universität des Saarlandes; Service Einheit EM, Anatomie und Zellbiologie, Homburg, September 2004, eigenfinanziert

Förderungen:

DFG: Projekt: For 222/3-1 TP H: 8/1999 – 9/2001 (Personen- und Sachmittel)

Universität Bayreuth: Stipendium zur Förderung des künstlerischen und wissenschaftlichen Nachwuchses: 1/2002 – 12/2003 (Personenmittel)

meinen Eltern

Gertraud und Rudolf Springer

INHALTSVERZEICHNIS

	Inhaltsverzeichnis	I
	Verwendete Abkürzungen	VII
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Seneszenz, Blattseneszenz, strukturelle und funktionelle Aspekte des Chloroplasten und dessen Standardproteimportapparates	1
1.1.1.	Seneszenz im Vergleich zu Apoptose und Alterung	1
1.1.2.	Blattseneszenz als abschließende Phase der Blattentwicklung	2
1.1.3.	Plastiden als primärer Wirkort der Seneszenz	3
1.1.4.	Bedeutung der (doppelten) Hüllmembran des Plastiden	4
1.1.5.	Proteintransport der Plastiden	4
1.1.6.	Komponenten und Funktionen des Standardproteimportapparats (TIC - TOC Komplex)	5
1.1.6.1.	Komponenten und Funktionen des TOC Multiproteinkomplexes	5
1.1.6.2.	Komponenten und Funktionen des TIC Multiproteinkomplexes	8
1.2.	Experimentelles System zur Untersuchung und Charakterisierung der Seneszenz und dessen Auswirkungen auf die Plastidenhülle	9
1.2.1.	Untersuchung der Seneszenz am natürlichen System	9
1.2.2.	Experimentelles System zur künstlichen Auslösung (Induktion) und Beschleunigung der Seneszenz bei Gerstenprimärblättern	10
1.2.2.1.	Seneszenzauslösende und -beschleunigende Faktoren	11
1.2.2.2.	Künstliche Auslösung (Induktion) und Beschleunigung der Seneszenz bei Gerstenprimärblättern mit Methyljasmonat (Jasmonsäuremethylester)	11
1.2.2.2.1.	Endogene Entstehung von Jasmonsäure (bzw. Methyljasmonat) in Pflanzen - der Octadecanoid-Stoffwechselweg	12
1.2.2.2.2.	Die Wirkungen von exogen applizierter Jasmonsäure (bzw. Methyljasmonat) auf physiologischer, zellulärer und molekularbiologischer Ebene	12
1.3.	Zielsetzung	14

2.	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1.	Pflanzenmaterial, Anzucht- und Inkubations-Bedingungen	16
2.1.1.	Pflanzenmaterial	16
2.1.2.	Anzuchtbedingungen zur Untersuchung der natürlichen Seneszenz	16
2.1.3.	Anzucht- und Inkubationsbedingungen für durch Methyljasmonat induzierte Seneszenz an abgeschnittenen Gerstenprimärblättern	17
2.1.4.	Anzucht- und Inkubationsbedingungen zur künstlichen Auslösung und Verstärkung der Seneszenz mit Phytohormonen oder durch Physikalische Verfahren an ganzen Gerstenpflanzen	18
2.2.	Subzelluläre Fraktionierung von Gerstenprimär-Blattgewebe	20
2.2.1.	Isolierung von Protoplasten	20
2.2.2.	Isolierung von Chloroplasten	21
2.3.	Proteinchemische Untersuchungsmethoden	22
2.3.1.	Gesamtproteinextraktion unter denaturierenden Bedingungen	22
2.3.2.	Konzentration von Proteinproben	22
2.3.2.1.	Trichloressigsäure- (TCA-) Fällung	22
2.3.2.2.	Konzentration von Proteinproben durch semipermeable Membranen	23
2.3.3.	Bestimmung des löslichen Gesamtproteingehalts	23
2.3.3.1.	Bestimmung des löslichen Gesamtproteingehalts mittels BCA Test	23
2.3.3.2.	Bestimmung des löslichen Gesamtproteingehalts nach ESEN (1978)	24
2.3.4.	Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE)	25
2.3.5.	Färbemethoden zum unspezifischen Nachweis von Proteinen	27
2.3.5.1.	<i>Coomassie</i> Blau Färbung	27
2.3.5.2.	Silberfärbung	27
2.3.6.	Immunonachweis zur spezifischen Identifikation von Proteinen	28
2.3.6.1.	Proteintransfer und Immobilisierung (<i>Western Blotting</i>)	28
2.3.6.2.	Spezifische Proteinidentifikation mit Antikörpern	28
2.4.	Photometrische Pigmentanalysen	29
2.4.1.	Bestimmung des Chlorophyllgehalts in DMF nach PORRA <i>et al.</i> (1989)	29
2.4.2.	Chlorophyllgehaltbestimmung in Methanol nach LICHTENTHALER (1987)	30

2.5.	Elektronenmikroskopische Methoden	31
2.5.1.	Methoden zur Untersuchung der Ultrastruktur durch die Transmissions- elektronenmikroskopie	31
2.5.1.1.	Negativkontrastierung von Chloroplasten	31
2.5.1.2.	Standardpräparationsverfahren biologischer Proben zur Trans- missionselektronenmikroskopie (Ultramikrotomie und Gefrierbruch)	32
2.5.1.2.1.	Konventionelle Einbettung in Epoxidharz (nach SPURR; 1969) zur Ultramikrotomie	32
2.5.1.2.2.	Konventionelle Gefrierbruchtechnik (Gefrierbruch und -ätzen)	35
2.5.2.	Immuncytologische Untersuchungsmethoden (TEM)	37
2.5.2.1.	Immungoldmarkierung isolierter Chloroplasten (Suspension)	38
2.5.2.2.	Immungoldmarkierung an Ultradünnschnitten	38
2.5.2.2.1.	Standard-Einbettungsverfahren in Acrylatharz (Lowycryl-K4M) zur Ultramikrotomie	39
2.5.2.2.2.	Immungoldmarkierung von Proteinen an Ultradünnschnitten	41
2.5.2.2.3.	Kontrastierung und Mikroskopie der immunmarkierten Proben	42
2.5.2.3.	Immungoldmarkierung an Gefrierbruch-Abdrücken (SDS-FRL = <i>SDS- digested Freeze-fracture Replica Labeling</i> ; FUJIMOTO, 1995)	42
2.5.2.3.1.	Chemische Fixierung und Gefrierschutz bei Chloroplasten	43
2.5.2.3.2.	Immundekoration von Proteinen an Gefrierbruch-Abdrücken (<i>Freeze- fracture Replica Labeling</i>)	44
2.5.2.3.3.	Fixieren und Mikroskopie der immunmarkierten Replika	44
2.5.3.	Methoden zur Untersuchung der Ultrastruktur durch die Rasterelektronenmikroskopie (REM)	44
2.5.3.1.	Konventionelle REM	45
2.5.3.1.1.	Vorbehandlung von isolierten Chloroplasten für die konventionelle REM	45
2.5.3.1.2.	Trocknung der Proben am Kritischen Punkt (KPT; ANDERSON, 1951 und 1953, COHEN 1974)	46
2.5.3.1.3.	Aufbringen elektrisch leitender Schichten (Gold, Kohlenstoff)	47
2.5.3.3.	REM unter Umgebungsbedingungen (ESEM = <i>Environmental Scanning Electron Microscope</i>)	48
2.5.4.	Immuncytologische Untersuchungsmethoden (REM)	48
2.5.4.1.	Immuncytologische Untersuchungsmethoden im REM	49
2.5.4.1.1.	Vorbereitung von isolierten Chloroplasten für die konventionelle immuncytologische REM (chemische Fixierung und Immobilisierung)	49
2.5.4.1.2.	Immundekoration peripherer Membranproteine an isolierten, intakten Chloroplasten	49

2.5.4.1.3.	Abschlussfixierung, Entwässerung, KPT, Beschichtung und Mikroskopie der immundekorierten Proben	50
2.5.4.2.	Immuncytologische Untersuchungsmethoden im ESEM	50
2.5.5.	Bilderfassung, Bildbearbeitung und Bildauswertung	51
2.5.5.1.	Bilderfassung	51
2.5.5.1.1.	Elektronenmikrografie	51
2.5.5.1.2.	Digitale Bildaufzeichnung	52
2.5.5.2.	Bildbearbeitung und Bildauswertung	52
2.6.	Molekularbiologische Methoden	52
2.6.1.	Extraktion der RNA aus Gerstenprimärblättern	52
2.6.2.	Bestimmung von Konzentration und Reinheit der isolierten RNA	53
2.6.3.	Ethanol-Präzipitation	54
2.6.4.	Trennung und Nachweis der RNA	54
2.6.4.1.	Agarose-Gelelektrophorese	54
2.6.4.2.	Alkalischer <i>Northern Blot</i>	56
2.6.4.3.	RNA-Nachweis durch Sonden-Hybridisierung	56
2.6.4.3.1.	Markierung der verwendeten Sonde	57
2.6.4.3.2.	Hybridisierung der verwendeten Sonde	57
2.6.5.	Proteinimportstudien und Identifizierung möglicher Interaktionspartner durch Vernetzungs-Experimente (<i>Crosslinking</i>)	58
2.6.5.1.	Herstellung von cDNA-Konstrukten, die für transA-DHFR-Fusions- proteine kodieren und Amber-Stop-Kodonen im TransA-Teil enthalten	58
2.6.5.2.	Synthese von (Tmd)Phe-haltigen, radioaktiv markierten transA-DHFR- Polypeptiden sowie der radioaktiv markierten pPORA, pPORB, transA- DHFR und transB-DHFR Präkursoren durch gekoppelte In-vitro- Transkription/Translation	59
2.6.5.3.	<i>In-vitro</i> -Import von Vorstufenproteinen in isolierte Chloroplasten und <i>Photocrosslinking</i>	60
2.6.5.4.	Proteinextraktion und Analyse der <i>Crosslink</i> -Produkte durch Auto- radiographie und nach Immunpräzipitation	60
2.7.	Statistische Auswertung	61

3.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	62
3.1.	Auswahl eines experimentellen Systems zur Seneszenzinduktion mit Hilfe seneszenz-spezifischer Marker	62
3.1.1.	Veränderungen des Chlorophyllgehalts in Abhängigkeit von der Behandlung der Primärblätter	63
3.1.2.	Behandlungsbedingte Veränderungen der Ultrastruktur der Chloroplasten	69
3.2.	Vergleich von natürlich ablaufender mit methyljasmonat-induzierter Seneszenz	73
3.2.1.	Gesamtchlorophyllgehalte von Gerstenprimärblättern bei natürlich ablaufender und Methyljasmonat-induzierter Seneszenz	74
3.2.2.	Vergleich der zellulären und subzellulären Struktur von Gerstenprimärblattparenchym bei natürlicher und durch Methyljasmonat induzierter Seneszenz.	77
3.2.2.1.	Änderungen der Zellgröße	78
3.2.2.2.	Änderungen der Anzahl und Größe der Plastiden pro Zelle	81
3.2.2.2.1.	Änderungen der Anzahl der Plastiden pro Parenchymzelle	81
3.2.2.2.2.	Änderungen der Größe der Plastiden in Parenchymzellen	85
3.2.2.2.3.	Änderungen der mittleren Größe des Plastoms pro Parenchymzelle	88
3.2.2.3.	Entwicklungsbedingte Änderungen der Plastiden	91
3.2.2.3.1.	Entwicklungsphasenspezifische Formen der Plastiden	91
3.2.2.3.2.	Spezielle ultrastrukturelle Merkmale der Gerontoplasten	93
3.2.2.4.	Änderungen der Anzahl und Größe der Plastoglobuli pro Plastid	95
3.2.2.4.1.	Änderungen der Anzahl der Plastoglobuli pro Plastid	95
3.2.2.4.2.	Änderung der Größe der Plastoglobuli	97
3.3.	Der Proteinimport als Monitor für Methyljasmonat-induzierte Veränderungen in der Plastidenhülle	100
3.3.1.	Veränderungen im Proteinspektrum von Gerstenblättern nach Methyljasmonatinkubation	101
3.3.2.	Quantitative Veränderungen des Rubisco Gehalts im Plastiden unter Methyljasmonateinfluss	103
3.3.3.	Quantitative Veränderungen des LHC-II Gehalts im Plastiden unter Methyljasmonateinfluss	107
3.3.4.	Analyse der Genexpressionsmuster von chloroplastidären Proteinen	111
3.3.5.	Seneszenzbedingte Veränderungen in der Proteinzusammensetzung der Plastidenhülle	116

3.3.5.1.	Import der Isoenzyme A und B der NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (pPORA und pPORB) in Plastiden	117
3.3.5.2.	Untersuchungen des Importverhaltens von pPORA und pPORB in Chloroplasten in Abhängigkeit von der Vorbehandlung der Blätter (d. h. Seneszenzstadium)	118
3.4.	Spezielle elektronenmikroskopische Untersuchungen von Veränderungen des Standard-Proteinimportapparates in der äußeren Plastidenhülle in Folge einer Methyljasmonat-Behandlung	125
3.4.1.	Mögliche Veränderungen des integralen Membranproteins TOC 75 der äußeren Plastidenhüllmembran während der durch Methyljasmonat ausgelösten Seneszenz	125
3.4.1.1.	Identifizierung von TOC 75 an Ultradünnschnitten von Gerstenprimärblättern durch Immunogoldmarkierung	125
3.4.1.2.	Topographische Darstellung und topologische Identifizierung der inneren und äußeren Plastidenhüllmembran im Gefrierbruch	126
3.4.1.3.	Darstellung und Identifizierung von TOC 75 in der äußeren Plastidenhüllmembran durch <i>SDS Freeze-Fracture Replica Labeling</i> (SDS-FRL)	129
3.4.1.4.	Analyse der TOC 75 Dichte in der äußeren Plastidenhüllmembran während der durch Methyljasmonat vermittelten Seneszenz mit Hilfe der SDS-FRL	132
3.4.2.	Darstellung des peripheren Teils des Membranproteins TOC 159 der äußeren Plastidenhüllmembran	138
3.4.2.1.	Immunologischer Nachweis von TOC 159 an ganzen isolierten Plastiden mit anschließender Negativ Kontrastierung (TEM)	138
3.4.2.2.	Darstellung von isolierten Plastiden bzw. der Oberfläche der äußeren Plastidenhüllmembran im Rasterelektronenmikroskop (REM)	140
3.4.2.3.	Immuno-rasterelektronenmikroskopischer Nachweis von TOC 159 an ganzen isolierten Plastiden	141
4.	ZUSAMMENFASSUNG	146
5.	SUMMARY	151
6.	LITERATUR	155
7.	ANHANG	185

Verwendete Abkürzungen

A	Absorption
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ANOVA	<i>Analysis Of Variance</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
A _x	Absorption bei x nm
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-phosphat-p-toluidinsalz
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
BSE	<i>back scattered electrons</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cab	Chlorophyll a/b-bindende Proteine
cDNA	copyDNA
Chl a/b	Chlorophyll a/b
Chlid	Chlorophyllid
Chlida	Chlorophyllid a
Ci	Curie
cm	Zentimeter
CP	Chloroplast
cv	Sorte/Kultivar
1-D	eindimensional
2-D	zweidimensional
3-D	dreidimensional
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ESEM	<i>Environmental Scanning Electron Microscope</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDX	<i>energy dispersive X-ray spectroscopy</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)
EM	Elektronenmikroskopie
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
EtBr	Ethidiumbromid
evtl.	eventuell
Fa.	Firma
FA	Formaldehyd

FCCs	<i>fluorescing chlorophyll catabolites</i>
FEG	Feldemmissionskathode
G	Goldpartikel
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung
GAP	<i>globule associated protein</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GP	Gesamtprotein
GT	Granathylakoide
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
hPa	Hektopascal
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N`-(2-ethansulfonsäure)
<i>H. vulgare</i> L.	<i>Hordeum vulgare</i> L. = Gerste
Hsp	<i>Heat shock protein</i>
IE-PF	<i>Inner Envelope Protoplasmatic Fracture Face</i>
IE-PS	<i>Inner Envelope Protoplasmatic Fracture Surface</i>
IgG	Immunglobulin G
JIPs	<i>jasmonate-induced proteins</i>
kDa	kiloDalton
KOH	Kaliumhydroxid
KPT	Kritisch Punkt Trocknung
kV	kiloVolt
(L.)	Linné
l	Liter
LLS1	<i>Lethal Leaf Spot1</i>
LHC	<i>light-harvesting complex</i> = Lichtsammelkomplex
LOX	<i>Lip oxygenase</i>
13-LOX	13-Lipoxygenase
LSU	<i>large subunit (of Rubisco)</i>
λ	Wellenlänge
μE	Mikro-Einstein
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol
M	Molar
mA	Milliampère
MCS	<i>metal celating substance</i>
MeJa	Methyljasmonat
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure

mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MOG	Monooxygenase
MPa	Megapasqual
mRNA	messenger-RNA
MW	Molekulargewichtsstandard
β-Me	β-Mercaptoethanol
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (red.)
NBT	p-Nitrotetrazoliumblauschwarz
Nr.	Nummer
NTP (ATP, TTP, CTP, GTP)	<u>N</u> ucleosid- <u>t</u> ri- <u>p</u> hosphat (A <u>d</u> enosin-, T <u>h</u> ymidin-, C <u>y</u> tidin-, G <u>u</u> anosin- <u>t</u> ri- <u>p</u> hosphat)
nm	Nanometer
OE-EF	<i>Outer Envelope Exoplasmatic Fracture Face</i>
OPDA	12-Oxo-Phytodiensäure
OPDA-JA	Vorstufe von Jasmonsäure
OPR	OPDA-Reduktase
p	Signifikanzniveau
<i>p</i>	Druck
p. a.	<i>per a</i> nalyse = zur Analyse
PTC	<i>P</i> hloide- <i>d</i> e- <i>p</i> endent <i>t</i> ranslocon <i>c</i> omplex
pPORA	Präkursor der NADPH:Protochlorophyllid Oxidoreduktase A
pPORB	Präkursor der NADPH:Protochlorophyllid Oxidoreduktase B
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAR	<i>P</i> hotosynthetic <i>A</i> ctive <i>R</i> adiation
PBS	<i>p</i> hosphate- <i>b</i> uffered <i>s</i> aline = Kochsalzlösung, phosphat-haltig
PAO	Pheophorbid <i>a</i> Oxygenase
PCR	<i>p</i> olymerase <i>c</i> hain <i>r</i> eaction
Pheid a	Phaeophorbid <i>a</i>
PG	Plastoglobuli
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration
Pkt.	Punkt
PS I + II	Photosystem I + II
REM	Rasterelektronenmikroskop
red	reduziert
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>r</i> eactive <i>o</i> xxygen <i>s</i> pecies
rpm	<i>r</i> otations <i>p</i> er <i>m</i> inute = Umdrehungen pro Minute

RT	Raumtemperatur
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxygenase/oxygenase
S.	Seite
s.	siehe
SE	<i>secondary electrons</i>
s. o.	siehe oben
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-FRL	<i>SDS-Freeze Fracture Labeling</i>
sec	Sekunde
SEM	<i>Scanning electron Microscope</i> = REM
SPP	<i>stromal processing peptidase</i>
SSC	<i>sodium-chloride, sodium-citrate</i>
SSU	<i>small subunit (of Rubisco)</i>
ST	Stromathylakoide
STK	Stärkekorner
T	Thylakoide
Tab.	Tabelle
TAE	<u>T</u> ris- <u>a</u> cetat- <u>E</u> DTA
TBS	<u>T</u> ris- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline = Kochsalzlösung, trishaltig
TCA	Trichloressigsäure
TE	<u>T</u> ricin- <u>E</u> DTA
TEM	<u>T</u> ransmissions <u>e</u> lektronen <u>m</u> ikroskop
TmdPhe	L-[3-(Trifluoromethyl)-3-diazirin-3H-yl]phenylalanin
Thy	Thylakoide
TIC	<i>Translocon of the inner chloroplast envelope</i>
TOC	<i>Translocon of the outer chloroplast envelope</i>
Tricin	N-2-Hydroxyl-1,1-bis(hydroxymethyl)ethylglycin
Tris	N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-glycin
TrP	Transferpuffer
Tween	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
ÜNK	über-Nacht-Kultur
UV	Ultraviolett
UVA	Ultraviolett-A-Strahlung
UVB	Ultraviolett-B-Strahlung
UZ	Ultra-zentrifugation
V	Volt
v. a.	vor allem
v/v	Volumenprozent (Volumen/Volumen)
VE	voll entsalzt
Vis	<i>visible light</i>
W	Watt
w/v	Gewichtsprozent (Gewicht/Volumen)
w/w	Gewichtsprozent (Gewicht/Gewicht)
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Seneszenz, Blattseneszenz, strukturelle und funktionelle Aspekte des Chloroplasten und dessen Standardproteimportapparates

1.1.1. Seneszenz im Vergleich zu Apoptose und Alterung

In der pflanzenphysiologischen Literatur werden die Begriffe Seneszenz, Apoptose und Alterung häufig synonym verwendet, obwohl zumindest die jeweiligen Anfangsstadien dieser Prozesse deutlich zu unterscheiden sind. Gemäß NOODEN (1988) wird unter **Alterung** eine eher stochastisch-passiv ablaufende, den gesamten Organismus betreffende Degeneration verstanden, die durch externe Faktoren ausgelöst und endogen durch einen nicht mehr kontrollierbaren (oft oxidativen) Stress vorangetrieben wird. Demnach ist die Alterung ein fortlaufender Prozess der Pflanzenentwicklung, dessen Symptome oft erst nach Abschluss der Entwicklung eines Organs oder Individuums augenfällig werden. Ihr Verlauf ist unkontrolliert und in Ausmaß und Art unterschiedlich. Somit kann der Alterungsprozess als zeitabhängige, allmähliche Akkumulation von physiologischen Veränderungen definiert werden (NOODEN *et al.*, 1978). Mit zunehmendem Alter gewinnen Dysfunktionen, die durch Stress noch intensivierbar sind, immer mehr an Bedeutung, so dass die Gesamtheit der passiven Degenerationsereignisse schließlich zum Absterben des Organismus führt.

Die **Apoptose** ist, im Gegensatz zur Alterung, ein (genetisch) gesteuertes Programm in der Pflanzenentwicklung, das ein "vorzeitiges" Absterben einzelner Zellen oder Zellverbände mit dem Ziel der Funktionserlangung (z. B. Differenzierung der Wasserleitungsbahnen) oder als Schutzmaßnahme zum Überlebensvorteil des Individuums (z. B. Abwehrreaktionen bei Pathogenbefall) bewirkt (THOMAS *et al.*, 2003; VAN DOORN und WOLTERING, 2004).

Auch die **Seneszenz** ist ein aktiver, hoch koordinierter, genetisch regulierter und hormonell gesteuerter, degenerativer Prozess der Entwicklung. Anders als bei Alterung oder Apoptose sind hierbei einzelne Organe oder Teile einer Pflanze betroffen, die im Verlauf der Seneszenz gezielt absterben (STODDART und

THOMAS, 1982; SPICKERS, 1999; THOMAS *et al.*, 2003). So führen Prozesse, die für eine Remobilisierung von Ressourcen verantwortlich zeichnen, zwangsläufig zur Desintegration von Zellen und deren Organellen. Als Beispiel dafür ist der Blattabwurf der (sommergrünen) Bäume (im Herbst) zu nennen, bei dem die frei werdenden Ressourcen in Spross und Wurzeln gespeichert werden. Auch bei der monokarpischen Seneszenz, dem kompletten Absterben einjähriger Pflanzen, wird unter anderem das stickstoffhaltige Material der Mutterpflanze während der finalen Entwicklungsphase in die Samen verlagert (BUCHANAN-WOLLASTON, 1997; THOMAS und HILDITCH, 1987). Da sowohl die Seneszenz als auch die Alterung letztendlich zum Zell- und Organtod führen, lassen sie sich im fortgeschrittenen Stadium phänomenologisch nicht mehr voneinander unterscheiden.

1.1.2. Blattseneszenz als abschließende Phase der Blattentwicklung

Die Seneszenz eines Blattes umfasst dessen abschließende Phase im pflanzlichen Entwicklungsprozess und stellt somit eine der wichtigsten Schlüsselpositionen im Lebens- und Entwicklungszyklus des Individuums dar. Sie ist gekennzeichnet durch hoch komplexe, stark regulierte Prozesse, die durch eine serielle Abfolge physiologischer Ereignisse zur Mobilisierung und Rückgewinnung von Mineralstoffen, Kohlenhydraten und vor allem stickstoffhaltiger Verbindungen führt (BUCHANAN-WOLLASTON, 1997; THOMAS und HILDITCH, 1987; NOODEN und GUIAMET, 1997; SMART, 1994). Daher sind dramatische Veränderungen auf strukturellem und proteinchemischem Niveau untrennbar mit der Seneszenz verbunden. Dazu zählen vor allem die Degradation, aber auch die Neusynthese verschiedener Pigmente (z. B. Carotinoide) und Proteine wie z. B. Proteasen und Enzyme des Lipidstoffwechsels (BUCHANAN-WOLLASTON, 1997; THOMAS und HILDITCH, 1987; SMART, 1994), sowie die damit einhergehenden Veränderungen im Expressionsmuster spezifischer Gene (KAWAKAMI und WATANABE 1988a). Weitere Facetten der Blattseneszenz treten als ultrastrukturelle Veränderungen von Blatt-(parenchym)-zellen und deren Organellen zu Tage und wurden bereits früh erkannt und beschrieben (BAILEY und WHYBORN, 1963; BUTLER und SIMON, 1970; THOMAS, 1977; WOOLHOUSE und BATT, 1976). So ist eine Reduktion

sowohl der Anzahl als auch der Größe der Parenchymzellplastiden im Verlauf der Blattseneszenz evident (KURA-HOTTA *et al.*, 1990; MORTINOIA *et al.*, 1983).

1.1.3. Plastiden als primärer Wirkort der Seneszenz

Das für das unbewaffnete Auge auffälligste Merkmal der Blattseneszenz ist der Verlust an grünem Pigment und somit das "Vergilben" der Blätter. Dieser sowohl zum Schutz als auch aus Gründen der Mobilisierung von Nährstoffen notwendige Abbau des Chlorophylls und der Chlorophyll bindenden Proteine findet in den photosynthetisch aktiven Organellen, den Chloroplasten, statt und hat eine fortschreitende Verringerung ihrer photosynthetischen Kapazität zur Folge (BUCHANAN-WOLLASTON, 1997; HIDEWA *et al.* 1992; KAWAKAMI und WATANABE 1988b; ROBERTS *et al.* 1987; Wilson *et al.* 2002). Des weiteren wirkt sich der Ablauf des Programms Seneszenz auch in gravierender Weise auf die Ultrastruktur der Plastiden aus; durch Desintegration des internen Membransystems - vor allem der Granathylakoide - und durch das massive Auftreten osmiophiler globulärer Strukturen - so genannter Plastoglobuli – entwickeln sich die Chloroplasten im Verlauf der Seneszenz (siehe Schema in Abbildung 1) zu so genannten Gerontoplasten (LICHTENTHALER, 1968; LICHTENTHALER und PEVELING, 1968; PARTHIER, 1988; GHOSH *et al.*, 2001).

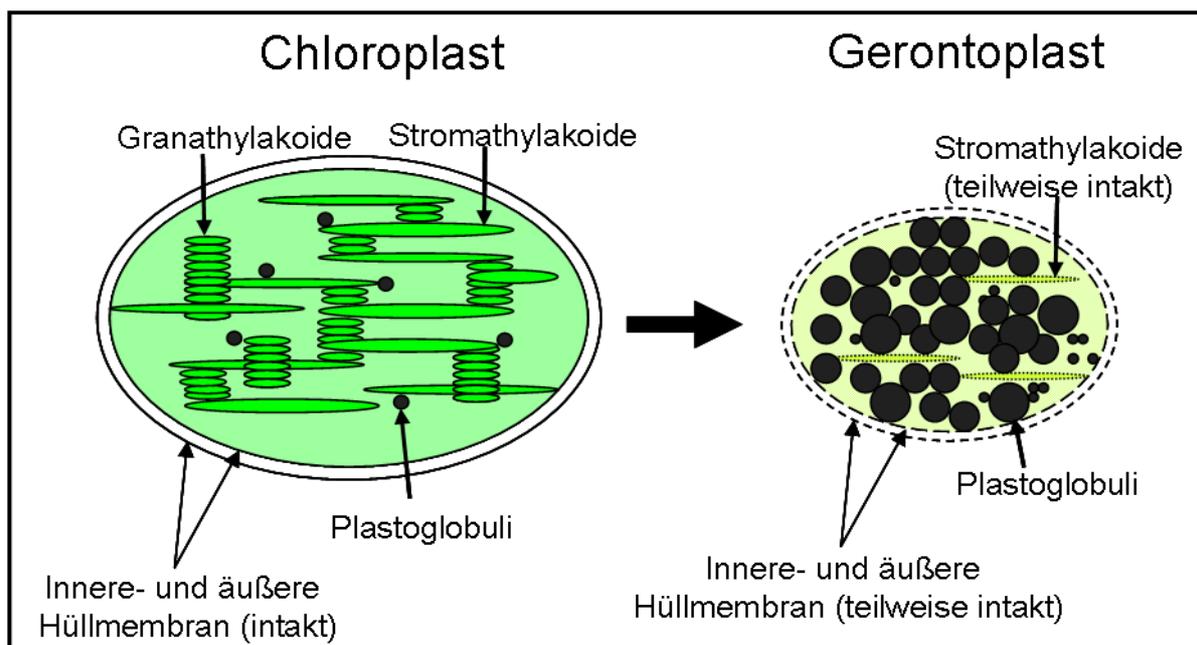


Abb. 1: Chloroplast – Gerontoplast, schematische Darstellung

1.1.4. Bedeutung der (doppelten) Hüllmembran des Plastiden

Während der Entwicklung des Plastiden wird seine Integrität durch die doppelte Hüllmembran garantiert, die das Organell gegenüber den übrigen Reaktionsräumen (Cytoplasma und andere Organellen) der Wirtszelle abgrenzt. Desweiteren hat die Plastidenhülle eine Vielzahl essentieller Funktionen, wie etwa die Biosynthese von Fettsäuren und Pigmenten, den Export von Produkten der Photosynthese und anderer Metabolite, sowie den selektiven Import von Proteinen zu erfüllen. Dadurch könnte man u. a. auch die Meinung vertreten, dass die Plastidenhülle bis in späte Seneszenzphasen unverändert bleibt (WOOLHOUSE, 1984), um den kontrollierten Abbau und Abtransport von Chloroplastenbestandteilen zu gewährleisten. THOMAS und STODDART (1980) sehen Veränderungen auf Ebene der Hüllmembranen, die zu einem teilweisen oder ganzen Verlust ihrer Integrität und Funktionalität führen, als initiales Ereignis der Seneszenz an. In bestimmten Seneszenzstadien kann es infolge dessen sogar zu einem regelrechten Exodus an Masse, in Form des Durchtritts plastoglobuli-ähnlicher Strukturen durch die Hüllmembranen kommen (GUIAMET *et al.*, 1999). Während ein Teil der chloroplastidären Komponenten seneszenzbedingt außerhalb des Organells, also im Cytosol oder der Vakuole, abgebaut wird, muss, für andere katabolische Prozesse innerhalb der Plastiden, eine Synthese kernkodierter plastidenspezifischer Proteine erfolgen, die mit dem gerichteten Transport ihrer cytosolischen Vorstufen in den seneszenten Plastiden (Gerontoplasten) verbunden ist. Vergleichende Importanalysen seneszenzinduzierter Proteine in präseneszenzente bzw. seneszenzente Plastiden zeigen, dass tatsächlich ein bevorzugter Import bestimmter, für den Gesamtprozess notwendiger Proteine in die Gerontoplasten erfolgt (KAWAKAMI und WATANABE 1993).

1.1.5. Proteintransport der Plastiden

Als semiautonome Zellorganellen besitzen Plastiden zwar ihre eigene DNA und eigene Ribosomen (KUNG, 1977; JOY und ELLIS, 1975; ELLIS und HARTLEY, 1971), sind darüber hinaus jedoch auch auf eine Vielzahl von im Genom der Wirtszelle kodierten und im Cytosol synthetisierter Proteine angewiesen (REUMANN *et al.*, 1999). Diese werden als Vorstufenproteine (Präkursor-Proteine) im Cytosol

gebildet und anschließend für jede Entwicklungsstufe spezifisch in den Plastiden transportiert. Um den Transport durch die Hüllmembranen zu gewährleisten, besitzt das eigentliche Protein N-terminal eine spezifische Transitsequenz mit einer Größe von 20 bis 120 Aminosäuren (KEEGSTRA *et al.* 1989; VOJTA *et al.*, 2004). Der Import der Vorstufenproteine erfolgt an bestimmten Orten der Hüllmembranen, an denen jeweils ein Multiproteinkomplex der äußeren- (TOC = *Translocon of the Outer Chloroplast Envelope*) und der inneren- (TIC = *Translocon of the Inner Chloroplast Envelope*) Plastidenmembran in Wechselwirkung treten und topologisch angenähert sind (JARVIS und SOLL, 2001). Gemäß PERRY und KEEGSTRA (1994) wird das Transportgeschehen durch die energieunabhängige Bindung des Vorstufenproteins an einen Rezeptor an der Plastidenoberfläche initiiert. Der daran anschließende partielle Transport durch die äußere Hüllmembran ist energieabhängig und erfolgt unter GTP- und ATP-Verbrauch (OLSEN und KEEGSTRA, 1992; YOUNG *et al.*, 1989). Auch der übrige, komplette Transport des Vorstufenproteins durch beide Hüllmembranen in das Stroma erfolgt nur unter ATP Hydrolyse (THEG *et al.*, 1989).

1.1.6. Komponenten und Funktionen des Standardproteinimportapparats (TIC - TOC Komplex)

Aus den bisher bekannten Bestandteilen und Funktionen der beiden Multiproteinkomplexe TIC und TOC ergibt sich gemäß KEEGSTRA und CLINE (1999) und MAY und SOLL (1999) folgendes Bild (siehe Abb. 2): Die Aufgaben des in der äußeren Plastidenhülle lokalisierten Multiproteinkomplexes (TOC) sind demnach die spezifische Erkennung der Transitsequenz, die Initiation der Translokation und der Transfer des Vorstufenproteins zum in der inneren Hüllmembran befindlichen TIC Komplex, der den weiteren Transport ins Stroma des Plastiden vermittelt.

1.1.6.1. Komponenten und Funktionen des TOC Multiproteinkomplexes

Bisher wurden mehrere Komponenten des TOC Komplexes isoliert, wobei bei dreien, die den so genannten *Core*-TOC-Komplex formen (BÉDARD und JARVIS, 2005), sowohl deren Funktion als auch ihre Lage zueinander innerhalb der äußeren Plastidenhüllmembran als identifiziert gilt: Es handelt sich um Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 160 kDa (=TOC 160), 75 kDa (=TOC 75) und 34 kDa (=TOC 34) (MAY und SOLL, 1999; BÉDARD und JARVIS, 2005).

TOC 160, oft auch als TOC 159 bezeichnet, fungiert als Rezeptor, der die spezifische Erkennung (MA *et al.*, 1996) der Transitsequenz vermittelt und somit den ersten Kontakt - vermutlich über elektrostatische Interaktionen der N-terminalen Domäne mit dem zu transportierenden Vorstufenprotein (LITHGOW, 2000) - herstellt (HIRSCH, 1994; KESSLER, 1994); dabei wird das Vorstufenprotein zunächst unter ATP Verbrauch reversibel gebunden (OLSEN und KEEGSTRA, 1992). Verantwortlich dafür ist hauptsächlich der 86 kDa große proteolytisch sensitive Polypeptidanteil des in drei Domänen strukturierten TOC 160, der an der Oberfläche der äußeren Plastidenhüllmembran lokalisiert ist und in das Cytosol hinein ragt (BÖLTER *et al.*, 1998; KEEGSTRA und CLINE, 1999; CHEN *et al.*, 2000). Die dritte, C-terminale Domäne dieses Proteins fungiert offensichtlich als Verankerung in der Membran (CHEN *et al.*, 2000).

Konsistent mit seiner zentralen Rolle im Proteinimportmechanismus des Chloroplasten ist **TOC 75** das quantitativ häufigste Protein der äußeren Plastidenhüllmembran (CLINE *et al.*, 1984; JOYARD *et al.*, 1983). TOC 75 bildet nicht nur während des Transports und in unmittelbarer Nähe des Vorstufenproteins (SCHNELL *et al.*, 1994; PERRY und KEEGSTRA, 1994) einen temporär begrenzten Multiproteinkomplex mit den anderen Komponenten des TOC, sondern ist auch in Abwesenheit des Vorstufenproteins mit TOC 160, TOC 34 und weiteren Komponenten stabil assoziiert (MA *et al.*, 1996; SOHRT und SOLL, 2000). Topologische Studien des TOC 75 Proteins sagen eine β -*barrel*-Struktur - bestehend aus 16 Transmembran- β -Faltblattstrukturen - voraus (HINNAH *et al.*, 1997; SVESHNIKOVA, 2000), wodurch auf dessen Kanal-bildende Eigenschaft in der äußeren Hüllmembran geschlossen werden kann (SCHNELL *et al.*, 1994). Der größte Teil des Proteins ist offensichtlich als integrales Membranprotein tief in die äußeren Plastidenhüllmembran eingebettet und bildet somit die zentrale

Komponente des TOC Multiproteinkomplexes (MAY und SOLL, 1999). Daten aus *crosslinking* Studien erhärten den Befund, dass TOC 75 der Hauptbestandteil des Translokationskanals ist, da der Grad der Vernetzung (*crosslinking*) zwischen dem zu transportierendem Vorstufenprotein und TOC 75 während der späteren Phasen des Imports merklich zunimmt (MA *et al.*, 1996; KOURANOV und SCHNELL, 1997) und seinen Maximalwert dann erreicht, wenn das Vorstufenprotein durch beide Hüllmembranen (bzw. durch den gesamten TIC-TOC Komplex) inseriert ist (SCHNELL, 1997).

TOC 34 stellt eine weitere Komponente des TOC- Multiproteinkomplexes dar. Es gehört zur selben Klasse von GTP-bindenden Proteinen wie TOC 160, da es, außerhalb des konservierten GTP-Bindungs-Motivs, einige signifikante Homologien zu TOC 160 aufweist (KESSLER *et al.*, 1994). TOC 34 ist ebenso wie TOC 160 ein an der äußeren Hüllmembran ins Cytosol ragendes, integrales Membranprotein, das mit seinem C-terminalen Ende in der Membran verankert ist (KESSLER *et al.*, 1994; SEEDORF *et al.*, 1995). Gemäß MARSHALL *et al.* (1990) und SCHNELL *et al.* (1994) formt TOC 34 einen stabilen Komplex mit TOC 160 und anderen Translokationskomponenten, der sogar in Abwesenheit eines gebundenen Vorstufenproteins identifizierbar ist (SEEDORF *et al.*, 1995; NIELSEN *et al.*, 1997; KOURANOV *et al.*, 1998; SHORT und SOLL, 2000). Über *crosslinking* Experimente fanden KOURANOV und SCHNELL (1997), dass TOC 34 Moleküle sich während der energie-unabhängigen Bindung des Vorstufenproteins in dessen nächster Umgebung befinden. Nach weiteren Befunden von DAHLIN und CLINE (1991) und SVESHNIKOVA *et al.*, (2000) spielt TOC 34 eine wichtige Rolle bei der Erkennung der Transitsequenz des Vorstufenproteins und bei der Regulation (vermutlich durch den Phosphorylierungs-Status des TOC 34) des Proteinimports.

In jüngster Zeit wurden noch weitere Komponenten, die mit dem TOC-Komplex an sich in Verbindung stehen oder zumindest beim Transport der kernkodierte Proteine in den Plastiden eine Rolle spielen, identifiziert (BÉDARD und JARVIS, 2005). Neben zwei cytosolischen Proteinen (Hsp70, 14-3-3) wurde auch noch TOC 64, das evtl. eine Rolle bei der Erkennung und/oder Translokation des zu importierenden Proteins in frühen Phasen des Importgeschehens übernimmt (SOHRT und SOLL, 2000), und TOC 12, das evtl. eine regulatorische Funktion auf der Basis des Redox-Zustandes des Intermembranraumes besitzt, gefunden (BECKER *et al.*, 2004a).

1.1.6.2. Komponenten und Funktionen des TIC Multiproteinkomplexes

Ein völlig anderes Set an speziellen Proteinen – in seiner Gesamtheit als TIC-Multiproteinkomplex bezeichnet - wird für den energieabhängigen (stromabürtiges ATP; OLSEN und KEEGSTRA, 1992; SCOTT und THEG, 1996) Weitertransport des Vorstufenproteins durch die innere Plastidenhüllmembran benötigt. Ähnliche biochemische Studien wie für den TOC-Komplex resultierten in der Isolierung und Identifikation von mehreren Komponenten des TIC-Multiproteinkomplexes: bis jetzt konnten mehrere Proteine mit Molekulargewichten von 110 kDa, 62 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 32 kDa, 22 kDa und 20 kDa isoliert und zugeordnet werden (SCHNELL *et al.*, 1994; LUBECK *et al.*, 1996; CALIEBE *et al.*, 1997, STAHL, 1999; WU *et al.*, 1994; KOURANOV und SCHNELL, 1997; MA *et al.*, 1996; CHEN *et al.*, 2002; INABA *et al.*, 2003; BÉDARD und JARVIS, 2005). Deren Bedeutung und Funktion innerhalb des Proteintransports in den Plastiden ist noch wenig erforscht und wird zudem in der Literatur kontrovers diskutiert (KESSLER *et al.*, 1996; CALIEBE *et al.*, 1997; HIDALGO *et al.*, 1997; GRAY *et al.*, 1997; PFANNSCHMIDT *et al.*, 1999; OSWALD *et al.*, 2001; BÉDARD und JARVIS, 2005). Der eigentliche Transportkanal wird möglicherweise von TIC110 und/oder TIC 20 gebildet (KOUANOV *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 2002), wobei TIC 110 auch eine Rolle bei der Erkennung der Transportsequenzen des Proteins zukommen könnte (WU *et al.*, 1994). TIC 62, TIC 55 und TIC 32 könnten in der Lage sein, auf unterschiedliche Redox-Zustände zu reagieren und könnten somit an der Regelung des Imports über Redox-Signale beteiligt sein (CALIEBE *et al.*, 1997; KÜCHLER *et al.*, 2002; HÖRMANN *et al.*, 2004). Weitere, in irgend einer Weise am Importgeschehen beteiligte, im Stroma befindliche Proteine sind Hsp93, Hsp70, Cpn60 und eine *stromal processing peptidase* (SPP), die das Transitpeptid nach erfolgtem Import abtrennt.

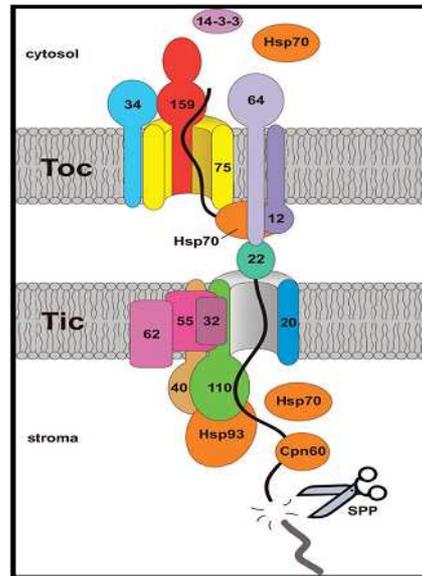


Abb. 2: Proteinimportapparat des Chloroplasten (gemäß JARVIS und ROBINSON, 2004): Schematische Darstellung der an der Translokation von Proteinen durch die Hüllmembranen des Plastiden beteiligten Komponenten. Die Komponenten der äußeren Plastidenhülle formen den TOC-Komplex, die Komponenten der inneren Hüllmembran den TIC-Komplex. Einzelne Komponenten sind durch ihre Molekulargewichte (in kDa) bezeichnet. Weitere Erklärungen: siehe obigen Text.

1.2. Experimentelles System zur Untersuchung und Charakterisierung der Seneszenz und dessen Auswirkungen auf die Plastidenhülle

1.2.1. Untersuchung der Seneszenz am natürlichen System

Die natürliche Seneszenz der Blätter ist im Allgemeinen kein synchron ablaufender, präzise vorhersagbarer Prozess. Dabei unterscheiden sich einzelne Blätter der Individuen oft stark in Bezug auf den Eintritt in die Seneszenzphase (BECKER und APEL, 1993; SMART, 1994). Darüber hinaus gibt es auch innerhalb jedes Blattes eine unterschiedliche Ausprägung der Seneszenz entlang der Blattspreite; so ist die Blattspitze "älter" als die Blattbasis (DAHLIN und CLINE, 1991), was am früheren Einsetzen des "Vergilbens" (Chlorophyllverlust) zu erkennen ist. Diese große individuelle Variabilität ist es, die eine experimentelle Erfassung, vor allem der physiologischen Auswirkungen des Phänomens Seneszenz auf zellulärer, subzellulärer und molekularer Ebene, am natürlichen System stark behindert. Auch

ist es nahezu unmöglich, aus Blättern eines bestimmten Alters (ab ca. drei Wochen) noch qualitativ und quantitativ hinreichend gute Plastiden zu gewinnen.

Daher ist es nur möglich, Verfahren zur Untersuchung heranzuziehen, bei denen entweder ein individuelles, ganzes Blatt verwertet wird (z.B. DNA-, RNA-Gehalte, Chlorophyll- und Gesamtproteinbestimmungen auf Blattflächenbasis) oder mit extrem geringen Mengen an Blattmaterial aus genau definierten Blattbereichen gearbeitet werden kann (z. B. transmissionselektronenmikroskopische Standardverfahren zur Klärung der Ultrastruktur und Immunocytochemie am Ultradünnschnitt). Es ist jedoch nichtsdestoweniger notwendig, mit Hilfe dieser Methoden die charakteristischen Veränderungen während der natürlichen Seneszenz zu beschreiben und damit die geeigneten, spezifischen Marker der Seneszenz zu erfassen.

1.2.2. Experimentelles System zur künstlichen Auslösung (Induktion) und Beschleunigung der Seneszenz bei Gerstenprimärblättern

Gegenüber der natürlichen bietet die künstlich ausgelöste und beschleunigte Seneszenz einige Vorteile: Bei Verwendung gleich alter (Gerstenprimär-) Blätter erhält man Untersuchungsmaterial mit Zellen von annähernd gleichem (synchronen) physiologischen Status und ohne den üblichen "Altersgradienten" entlang der Blattbreite. Darüber hinaus sind die Bedingungen der Experimente genau determiniert, von äußeren Einflüssen, wie sie bei der Anzucht im Gewächshaus auftreten (Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsschwankungen, unterschiedliche Lichtverhältnisse der einzelnen Gerstenprimärblätter durch ganzes oder teilweises gegenseitiges Beschatten im Bestand, *Source - Sink* Beziehungen), nahezu unabhängig und somit leichter reproduzierbar. Der beschleunigte Ablauf der Seneszenz lässt zudem mehr Experimente und Untersuchungen pro Zeiteinheit zu und gewährleistet, auf Grund des geringeren Gesamtalters der Blätter, aus diesen noch qualitativ und quantitativ hinreichend gute Plastiden zu gewinnen; diese können dann mit Hilfe spezieller Methoden der Elektronenmikroskopie (z.B. konventionelles Gefrierbruchverfahren, *SDS-Freeze-Fracture Replica Labeling*, Immuno-Negativkontrast und Immuno-Rasterelektronenmikroskopie) und anderer Verfahren (z. B. Molekularbiologie, Proteinbiochemie und Spektroskopie) analysiert werden.

1.2.2.1. Seneszenzauslösende und -beschleunigende Faktoren

Die Seneszenz wird durch verschiedene innere und äußere Faktoren induziert und/oder vorangetrieben (SMART, 1994; NOODEN und GUIAMET, 1997). Zu den Auslösern zählen unter anderem physikalische Faktoren, wie etwa Verdunkelung über einen längeren Zeitraum (THIEMANN, 1980) oder Zusatzbestrahlung mit Licht im UV-Wellenlängenbereich (HABER *et al.*, 1969) und Phytohormone, wie beispielsweise Abscisinsäure, Ethylen oder Jasmonat (OSBORNE, 1967; MCKERSIE und THOMPSON, 1978; UEDA und KATO, 1981; WEIDHASE *et al.*, 1987; SMART, 1994). Während Cytokinine den Eintritt der Seneszenz verzögern und sogar bis zu einem gewissen Grad revertieren können (DYER und OSBORNE, 1971), besitzen die anderen Phytohormone, Abscisinsäure, Ethylen oder Jasmonat und dessen Methylester, seneszenzauslösende und -beschleunigende Wirkung (WITTENBACH, 1977; NOODEN und LEOPOLD, 1980; SMART, 1994).

1.2.2.2. Künstliche Auslösung (Induktion) und Beschleunigung der Seneszenz bei Gerstenprimärblättern mit Methyljasmonat (Jasmonsäuremethylester)

Jasmonsäuremethylester (Methyljasmonat) ist als wohlriechender Bestandteil des Jasmin-Öls (und anderer Spezies) schon seit den frühen 60iger Jahren (DEMOLE *et al.*, 1962) gut bekannt. Das Vermögen, Seneszenzsymptome wie etwa den Abbau von Chlorophyll und wichtiger Proteine, oder auch das Verstärken von Protease- und Peroxidaseaktivitäten, durch exogene Applikation von Jasmonsäure bzw. dessen Methylester an Blättern oder ganzen Pflanzen herbeizuführen (UEDA und KATO, 1980; UEDA und KATO, 1981; WEIDHASE 1987) und der Umstand der leichten Verfügbarkeit dieser Substanz (da in der Parfum-Industrie verwendet), macht es zu einem idealen Werkzeug bei der experimentellen Untersuchung und Charakterisierung der Seneszenz bei Gerstenprimärblättern. Darüber hinaus waren Jasmonate bis jetzt in mehr als 160 Pflanzenfamilien (Angio-, Gymnospermae, Pteridophyta und Algae) zu finden (MAYER *et al.*, 1984; UEDA *et al.*, 1991; PARTHIER *et al.*, 1992; SEMBDNER und PARTHIER, 1993) und konnten auch in

einigen Pilzen (ALDRIDGE, 1971; MIERSCH *et al.*, 1987; MIERSCH *et al.*, 1991) nachgewiesen werden.

1.2.2.2.1. Endogene Entstehung von Jasmonsäure (bzw. Methyljasmonat) in Pflanzen - der Octadecanoid-Stoffwechselweg

Der Octadecanoid-Stoffwechselweg führt zur Produktion des Cyclopentanons Jasmonsäure und Methyljasmonat, welche kollektiv als Jasmonate in Pflanzen bezeichnet werden (AGRAWAL *et al.*, 2004). Interessanterweise ist dieser Stoffwechselweg sehr ähnlich dem des aus Cyclopentanon-Fettsäuren (z.B. Prostaglandine und Leukotrin A₄) bestehenden Säugetier-Immunsystems (SCHALLER, 2001; BEALE und WARD, 1998).

In Pflanzen stellt Jasmonsäure das Schlüsselprodukt des Octadecanoid-Stoffwechselwegs dar. Es wird über eine Serie von Stoffwechselschritten gebildet, die mit der Freisetzung von α -Linolsäure durch eine Lipase beginnt. Nach der Umwandlung dieser in (13S)-Hydroperoxy-Linolsäure durch 13-Lipoxygenase (13-LOX) und anschließender, sequentieller Aktivität der Enzyme Allenoxid-Synthase und Allenoxid-Cyclase wird 12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA) - als Vorstufe der Jasmonsäure (OPDA-JA) - gebildet. Der nächste Schritt umfasst die Reduktion des Cyclopentanon-Rings der OPDA durch OPDA-Reduktase (OPR), der anschließend von drei Zyklen einer β -Oxidation am Phytodien-Rest zur Jasmonsäure führt (MUELLER, 1997; SCHALLER, 2001). Jasmonsäure kann dann weiterhin durch Jasmonsäure-Carboxyl-Methyltransferase in ihr flüchtiges Pendant Methyljasmonat catabolisiert werden (SEO *et al.*, 2001).

1.2.2.2.2. Die Wirkungen von exogen applizierter Jasmonsäure (bzw. Methyljasmonat) auf physiologischer, zellulärer und molekularbiologischer Ebene

Exogen appliziertes Jasmonat zeigt an Pflanzen eine sehr breite Palette an entweder induzierenden, vorantreibenden oder inhibitorischen Effekten, die sich in physiologischen und/oder morphologischen Änderungen niederschlagen. Die

jasmonat-induzierte Blattseneszenz beispielsweise zeichnet sich unter anderem durch den Abbau von Chlorophyll, Proteinbestandteilen des Photosystems und des Enzyms Rubisco aus (KODA, 1992; MASLENKOVA *et al.*, 1990; POPOVA *et al.*, 1988; WEIDHASE *et al.*, 1987; REINBOTHE *et al.*, 1993 a, b; REINBOTHE *et al.*, 1994 b). Neben einer Verminderung der photosynthetischen Aktivität wird unter anderem ein Ansteigen von Protease- und Peroxidaseaktivitäten festgestellt (WEIDHASE *et al.*, 1987; POPOVA *et al.*, 1988; MASLENKOVA *et al.*, 1990; PARTHIER, 1990; KODA, 1992; WASTERACK und HAUSE, 2002; CHEONG und CHOI, 2003). Auf zellulärer und molekularbiologischer Ebene führt sowohl die endogene Freisetzung von Jasmonaten (z.B. in Folge von Stressreaktionen) als auch ihre Akkumulation im Gewebe nach externer Applikation von Methyljasmonat zu Änderungen auf dem Niveau der Genexpression (REYMOND und FARMER, 1998; REYMOND *et al.*, 2000); So wird beispielsweise eine neue Klasse von Proteinen, die sogenannten JIPs (= Jasmonat Induzierte Proteine), unter Methyljasmonateinfluß generiert (WEIDHASE *et al.*, 1987; HERRMANN *et al.*, 1989; REINBOTHE *et al.*, 1992).

Die Effizienz der Wirkung von Jasmonsäure bei externer Applikation kann - wahrscheinlich durch unterschiedliche Aufnahmeraten bei den einzelnen Pflanzenarten - von derer der Methylester-Form variieren (YAMANE *et al.*, 1981). Generell ist aber Jasmonsäure bzw. Methyljasmonat in mittleren Konzentrationen von 10^{-6} M bis 10^{-4} M hoch aktiv. In speziellen Fällen, wie etwa der Inhibition der Blütenknospenentwicklung oder des Wachstums von Mykorrhizapilzen wird eine Wirkung schon bei niedrigeren Konzentrationen von etwa 10^{-7} M beobachtet (BARANDESE und CROES, 1985; GOGALA, 1991).

Ein System zur künstlichen Auslösung (Induktion) und Beschleunigung der Seneszenz bei Gerstenprimärblättern kann nicht global zur Untersuchung aller seneszenzspezifischen Prozesse gleichermaßen herangezogen werden (BECKER und APEL, 1993); geeignet scheint ein solches System jedoch, um grundlegende eigentliche Regulations- und Wirkmechanismen - die unabhängig vom auslösenden Ereignis immer gleich oder sehr ähnlich ablaufen - zu erfassen (SMART, 1994).

1.3. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten seneszenzbedingte Veränderungen an Plastiden untersucht werden. Dabei sollte die Frage beantwortet werden, ob, es bereits in einem relativ frühen Stadium der Seneszenz zu Veränderungen in der Zusammensetzung und Struktur der Plastidenhülle kommt oder ob die Plastidenhülle, so wie auch spekuliert werden könnte, bis zu einem relativ späten Seneszenzstadium unverändert bleibt. Zu dieser Analyse sollte der Transport von Vorstufenproteinen aus dem Cytosol in die Plastiden gewissermaßen als Monitor dienen. Da der Import von Proteinen durch Multiproteinkomplexe erfolgt, deren Komponenten zumindest partiell in die Plastidenhüllmembran integriert sind, sollten sich Veränderungen, beispielsweise der Lipidzusammensetzung, indirekt auf die Funktionalität der Proteinimportmaschinerie auswirken. Neben einem solchen eher unspezifischen Einfluss auf den Import sollte die Möglichkeit von Seneszenz-spezifischen Veränderungen des plastidären Proteinimportapparates geprüft werden.

Da frühere Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe zum Proteinimport vor allem mit Plastiden aus Gerstenprimärblättern durchgeführt worden waren, wurden diese als Untersuchungsobjekt ausgewählt. Zu Beginn der Arbeiten musste der Ablauf der natürlichen Seneszenz in Gerstenprimärblättern charakterisiert werden. Da die Blätter monokotyler Pflanzen von der Blattbasis bis zur -spitze einen Gradienten in der Plastidenentwicklung aufweisen, also keinen einheitlichen Plastidentyp in Bezug auf die Seneszenz besitzen, sollte eine Möglichkeit gefunden werden, Seneszenz in den Primärblättern „künstlich“ auszulösen und damit zumindest in der Blattmitte ein einheitliches Seneszenzstadium von Plastiden zu erhalten. Eine weitere Problematik der natürlichen Seneszenz in Gerstenprimärblättern ist durch die Länge dieses Entwicklungsprozesses (mehrere Wochen) begründet, die sich auf experimentelle Arbeiten negativ auswirkt. Aus diesen Gründen sollte

- zunächst ein experimentelles System ausgewählt und etabliert werden, mit dem es möglich wäre, Seneszenz in Primärblättern der Gerste gezielt zu induzieren und deren Ablauf, im Vergleich zur natürlichen Seneszenz, zu beschleunigen.

-
- dieses induzierbare System mit der natürlich auftretenden Seneszenz auf biochemischer, molekularbiologischer, makroskopischer und elektronenmikroskopischer Ebene verglichen werden.
 - die Eignung verschiedener physiologischer Parameter als verlässliche, seneszenzspezifische Marker hin untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial, Anzucht- und Inkubationsbedingungen

2.1.1. Pflanzenmaterial

Die Auswahl der Versuchspflanzen erfolgte vor dem Hintergrund, dass neben der wissenschaftlichen auch der guten Verfügbarkeit mit gleich bleibender Qualität des Saatguts (durch dessen wirtschaftlicher Bedeutung) Rechnung getragen wurde.

Hordeum vulgare (L.) ist eine einjährige Monokotyledone aus der Familie der Poaceae. Die verwendete Varietät Scarlett ist eine in Bayern weit verbreitete Braugerste (Sommergerste). Das Saatgut zur Anzucht wurde von der Firma BayWa in Bayreuth bezogen.

2.1.2. Anzuchtbedingungen zur Untersuchung der natürlichen Seneszenz

Als Substrat zur Pflanzenanzucht wurde eine Mischung aus 500 l Torfkultursubstrat 1 (TKS 1; Fa. Floragrad), 400 l Lauberde, 160 l Bims, 160 l Lava, 80 l Sand und 2500 g eines mineralischen Langzeitvolldüngers (Osmocote 15 % N - 5 % P - 20 % K - 2 % Ca; mit einer Wirkzeit von 3 - 4 Monaten) verwendet.

Es wurden jeweils 5 Gerstensamen direkt in 20 cm x 20 cm Pflanzcontainer (Fa. Pöppelmann) ausgesät, mit einer 0,5 cm dicken Schicht Substrat bedeckt und mit Leitungswasser angegossen. Es wurden anfangs 9 Pflanzcontainer pro m² aufgestellt und bei Bedarf auf 4 bis 6 Pflanzcontainer pro m² reduziert, so dass die Pflanzen genügend Raum für eine optimale Entwicklung nutzen konnten.

Die Anzucht erfolgte in den Gewächshäusern der Universität Bayreuth, bei 22°C bis 28°C unter Langtagbedingungen (16h Licht, 8h Dunkel) mit Zusatzbelichtung durch Halogenmetalldampflampen (ES Leistungsstrahler, Typ 412/252, 50 - 60 Hz, 250 W) mit einer Photonenflussdichte von 235 μE (μ Einstein = $\mu\text{mol Photonen/m}^2 \text{ s}^{-1}$ PAR;

PAR = *photosynthetic active radiation*: 400 nm - 700 nm; gemessen mit einem Quantumsensor Li 185 - 13, Fa. Licor).

Da für die Experimente nur die Primärblätter der Gerstenpflanzen Verwendung fanden, wurde die Dauer der Anzucht bis zum völligen Zugrunde gehen (Vergilbung und Austrocknung) der Primärblätter fortgesetzt (unter den genannten Bedingungen typischerweise 8 Wochen).

2.1.3. Anzucht- und Inkubationsbedingungen für durch Methyljasmonat induzierte Seneszenz an abgeschnittenen Gerstenprimärblättern

Anzucht:

Für die Inkubationsexperimente mit dem Phytohormon Methyljasmonat wurden 7 Tage alte Gerstenprimärblätter verwendet; dazu wurden jeweils 25 g Gerstensamen direkt in 25 cm x 25 cm Pflanzcontainer (Fa. Pöppelmann) ausgesät (Substrat wie in 2.1.2), mit einer 0,5 cm dicken Schicht Substrat bedeckt und mit Leitungswasser gegossen. Die weitere Anzucht erfolgte 7 Tage lang wie unter 2.1.2. beschrieben.

Inkubation:

Zur Induktion der Seneszenz wurden 7 Tage alte Gerstenprimärblätter abgeschnitten, mit der Blattunterseite auf eine 45 μ M Methyljasmonatlösung (in Leitungswasser) gelegt, mit einer Glasplatte abgedeckt und unter leichtem Schwenken bei RT (Raumtemperatur) inkubiert. Bei Inkubationszeiten länger als 24h wurde jeweils nach 48h die Methyljasmonatlösung erneuert.

Kontrolle I (zur Inkubation):

Die Kontrolle zur Inkubation mit Methyljasmonat stellten 7 Tage alte Gerstenprimärblätter dar, die abgeschnitten und mit der Blattunterseite auf Leitungswasser gelegt, mit einer Glasplatte abgedeckt und unter leichtem Schwenken bei RT inkubiert wurden.

Kontrolle II (Anfangs- und Endwert):

Als Anfangswert dienten jeweils unmittelbar vor Inkubationsbeginn frisch abgeschnittene Gerstenprimärblätter.

Als Endwert wurden jeweils unmittelbar nach Inkubationsende abgeschnittene Gerstenprimärblätter (siehe Anzucht: 2.1.3.) verwendet.

2.1.4. Anzucht- und Inkubationsbedingungen zur künstlichen Auslösung und Verstärkung der Seneszenz mit Phytohormonen oder durch physikalische Verfahren an ganzen Gerstenpflanzen

200 g Gerstensamen wurden in mit Substrat gefüllten (siehe 2.1.2) Pikierschalen (40 cm x 60 cm; EWG Piki Box, Fa. Wiesau Plast) ausgesät, mit Leitungswasser gegossen und bei den Bedingungen, wie unter 2.1.2. beschrieben, kultiviert.

Inkubation mit Methyljasmonat:

5 Tage nach der Aussaat wurden die Pikierschalen mit den Gerstenkeimlingen in Plastikkisten (60 cm x 40 cm x 50 cm; Fa. Neolab) gestellt, bei Bedarf gegossen und mit 200 µl 95% Methyljasmonatlösung (4 x 50 µl) auf 3 MM Filterpapierstreifen (Fa. Schleicher und Schuell GmbH) inkubiert. Mit einer Glasscheibe abgedeckt wurden sie wie unter 2.1.2 kultiviert, wobei während dieser Zeit alle 12 h die gleiche Menge Methyljasmonat erneut appliziert wurde.

Inkubation mit Ethylen:

5 Tage nach der Aussaat wurden die Pikierschalen mit den Gerstenkeimlingen in Plastikkisten (60 cm x 40 cm x 50 cm; Fa. Neolab) gestellt und bei Bedarf gegossen. Zur Ethylenherzeugung dienten 4 reife Äpfel der Sorte Jonagold, die gemäß MIR *et al.*, (1999) etwa $1,2 \text{ nmol kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$ Ethylen freisetzen. Das entspricht ca. 0,75 µl Ethylen pro l Luft pro Stunde in den abgedeckten Plastikkisten und übersteigt somit die für Pflanzen wirksame Dosis von $\geq 0,01 \text{ µl l}^{-1}$ (REID, 1995) deutlich. Mit einer Glasscheibe abgedeckt wurden sie wie unter 2.1.2 kultiviert, wobei während dieser Zeit die Äpfel alle 2 Tage ausgetauscht wurden.

Inkubation im Dunklen:

5 Tage nach der Aussaat wurden die Pikierschalen mit den Gerstenkeimlingen in Plastikkisten (60 cm x 40 cm x 50 cm; Fa. Neolab) gestellt mit einer Glasplatte abgedeckt und mit schwarzem, lichtundurchlässigem Baumwollstoff verdunkelt. Um ein Ansteigen der Temperatur zu vermeiden, wurden die Plastikkisten unter dem Gewächshaustisch gelagert.

Inkubation mit zusätzlicher UV-Bestrahlung:

5 Tage nach der Aussaat wurden die Pikierschalen mit den Gerstenkeimlingen in Plastikkisten (60 cm x 40 cm x 50 cm; Fa. Neolab) gestellt und bei Bedarf gegossen. Zusätzlich zur Zusatzbelichtung durch Halogenmetалldampflampen (ES Leistungsstrahler, Typ 412 / 252, 50 - 60 Hz, 250 W) mit einer Photonenflussdichte von 235 μE (entspricht 15 W m^{-2}) erfolgte eine gesonderte UV-Bestrahlung (Osram UV-Röhre, Typ UV A+B, $\lambda = 280 \text{ nm} - 400 \text{ nm}$; 50 Hz, 250 W) von 30 W m^{-2} (gemessen mit einem Quantumsensor Li 185 - 13, Fa. Licor) in den Lichtphasen (16 h).

Kontrolle I (natürliche Entwicklung):

Zur Kontrolle wurden Gerstenkeimlinge wie unter 2.1.4. angezogen und unter denselben Bedingungen, jedoch ohne senszenauslösende und -fördernde Applikation, kultiviert.

Kontrolle II (Anfangs- und Endwert):

Als Anfangswert dienten jeweils unmittelbar vor Applikationsbeginn frisch abgeschnittene Gerstenprimärblätter.

Als Endwert wurden jeweils unmittelbar nach Versuchende gleichalte, frisch abgeschnittene Gerstenprimärblätter (siehe Anzucht 2.1.4.) verwendet.

2.2. Subzelluläre Fraktionierung von Gerstenprimärblattgewebe

Für die weiteren Untersuchungen war es notwendig, aus dem Gerstenprimärblattgewebe Protoplasten und Chloroplasten zu gewinnen. Die Isolierung erfolgte gemäß TOWIN *et al.* (1996), wurde aber je nach den speziellen Verwendungszwecken modifiziert.

2.2.1. Isolierung von Protoplasten

Von 25 zufällig ausgewählten Gerstenprimärblättern wurde mittels eines Skalpell die Epidermis der Blattunterseite abpräpariert, wobei 1 cm von der Blattspitze mit abgeschnitten und verworfen wurde. Die so behandelten Blätter wurden sofort mit der Blattunterseite auf 40 ml „Digestions“-Puffer (400 mM Sorbitol, 10 mM MES/KOH, pH 5,5, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgSO_4 , 1,5 % (w/v) Cellulase Onozuka R-10) in einer Plastikschaale (13 cm x 13 cm; Fa. Neolab) gelegt, mit einer Glasplatte abgedeckt und bei 37 °C 2,5 h lang inkubiert. Nach leichtem Schwenken wurde die Protoplastenrohsuspension durch ein feines Edelstahlsieb in ein eisgekühltes 50 ml Plastik-Reagiergefäß (Fa. Sarstedt AG und Co.) gefüllt und 5 min lang in der Kühlzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Rotor A-4-44, Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH) zentrifugiert (250 x g, 4°C, Beschleunigungsstufe 6 und freier Auslauf). Ab hier wurde auf Eis und mit eisgekühlten Puffern gearbeitet. Der Niederschlag wurde in 10 ml eiskaltem Puffer 3 (400 mM Sorbitol, 25 mM Tricin/KOH, pH 7,5, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgSO_4 , 35 % (v/v) Percoll) mit Hilfe eines feinen Pinsels (Fa. Pelikan; Stärke 2) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension gleichmäßig auf 2 eisgekühlte Corex-Zentrifugengläser (30 ml, 8445 Corex II Tube, Fa. Corning Inc.) aufgeteilt und nacheinander mit 2 ml eiskaltem Puffer 2 (400 mM Sorbitol, 25 mM Tricin / KOH, pH 7,2, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgSO_4 , 25 % (v/v) Percoll) und 1 ml Puffer 1 (400 mM Sorbitol, 10 mM MES / KOH, pH 5,5, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgSO_4) überschichtet, so dass sich ein diskontinuierlicher Dichtegradient ergab und 1 h lang auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Dichtegradienten 5 min lang in der Kühlzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5804 R,

Rotor A-4-44, Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH mit Gummieinsätzen Typ 8445, Fa. Corning) zentrifugiert (300 x g, 4 °C, Beschleunigungsstufe 6 und freier Auslauf). Die intakte Protoplasten enthaltende Fraktion (an der Dichtephasengrenze zwischen Puffer 1 und Puffer 2) wurde unter Verwendung einer abgeschnittenen 1-ml Pipettenspitze vorsichtig abgenommen, in ein gekühltes Corex Zentrifugenglas überführt, mit dem doppelten Volumen eiskaltem Puffer 4 (330 mM Sorbitol, 50 mM Tricin/KOH, pH 7,8, 2 mM EGTA, 2,5 mM MgSO₄, 1 mM MnSO₄) verdünnt und sofort 5 min. lang zentrifugiert (160 x g, 4°C, Beschleunigungsstufe 6 und freier Auslauf). Der Überstand wurde möglichst vollständig abgenommen und verworfen. Die im Niederschlag enthaltenen, gereinigten und intakten Protoplasten wurden nach Zugabe des gleichen Volumens Puffer 4 resuspendiert. Zur lichtmikroskopischen Qualitätskontrolle wurden 5 µl der gereinigten und intakten Protoplastensuspension entnommen und auf Glasobjektträger mit Vertiefung (76 mm x 26 mm, Fa. Elka) bei 400-facher Vergrößerung untersucht (Phasenkontrast-Lichtmikroskop BH 2, Fa. Olympus).

2.2.2. Isolierung von Chloroplasten

Die unter 2.2.1.1. gewonnene Protoplastensuspension wurde zunächst mit dem 5-fachen Volumen an Puffer 4 verdünnt. Zum Aufbrechen der Protoplasten wurde die Suspension 3-mal mit einer Plastikspritze (10 ml Eppendorf Combitips Plus, Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH) durch eine Nylonmembran (Nytal 25 TII-20, Maschenweite 20 µm; bezogen durch Fa. Sefar AG; Filter und Siebtechnik GmbH, München) gepresst und in ein gekühltes Corex Zentrifugenglas gefüllt. Sofort im Anschluss daran wurde 4 min. lang zentrifugiert (160 x g, 4 °C, Beschleunigungsstufe 6 und freier Auslauf). Der Überstand wurde mit einer Glaspasteurpipette abgenommen und verworfen; die im Niederschlag enthaltenen, intakten Chloroplasten wurden nach Zugabe des gleichen Volumens Puffer 4 resuspendiert. Zur lichtmikroskopischen Qualitätskontrolle wurden 2 µl der Chloroplastensuspension entnommen und auf Glasobjektträger (76 mm x 26 mm, Fa. Elka) bei geeigneter Vergrößerung und mit geeignetem Phasenkontrast untersucht (Phasenkontrast-Lichtmikroskop BH 2, Fa. Olympus).

2.3. Proteinchemische Untersuchungsmethoden

2.3.1. Gesamtproteinextraktion unter denaturierenden Bedingungen

Zur Extraktion des löslichen Gesamtproteins wurde aus zufällig ausgewählten Gerstenprimärblättern jeweils aus der Blattmitte ein kreisförmiges Blattscheibchen (Durchmesser 0,7 cm) mit Hilfe eines Korkbohrers (Fa. Laborcenter GmbH und Co. Großhandels KG) ausgestanzt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen (ERG; Fa. Eppendorf-Netheler-hinz GmbH) bei -80 °C. Zur Extraktion des löslichen Gesamtproteins wurden die schockgefrorenen Blattproben in einem gekühlten Mörser mit 40 ml flüssigem N₂ übergossen und zu einem feinen Pulver zermahlen. Zum Auftauen wurde das Pulver mit 250 µl SDS-Dissoziationspuffer (62,5 mM Tris-HCl; pH 6,8, 10 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol) versetzt. Bis zum vollständigen Auftauen der Probe wurde in kurzen Zeitabständen gemörsert; nach dem vollständigen Auftauen wurde die Suspension in ein 1,5 ml ERG überführt und nochmals gemischt (10 sec lang; Vortex VF 2, Fa. Jahnke und Kunkel IKA Labortechnik). Nach kurzer zentrifugation (5 sec, 12000 rpm, RT, Eppendorf Centrifuge 5415 D, Rotor F 45-24-11) wurden die Proteinextrakte 5 min lang bei 95 °C im Heizblock (HLC Blockthermostat BT 1302, Fa. Scientific Plastics Ltd.) weiter denaturiert. Im Anschluss daran, wurden die Proben auf RT abgekühlt und 5 min lang (12000 rpm, RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues 1,5 ml ERG überführt und sofort weiterverarbeitet oder in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.2. Konzentration von Proteinproben

2.3.2.1. Trichloressigsäure- (TCA-) Fällung

Die wie unter 2.3.1. gewonnenen Proteinproben wurden gegen SDS freiem Puffer (62,5 mM Tris-HCl; pH 6,8, 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol) dialysiert, in ein neues 1,5 ml ERG überführt und mit 1/3 Volumen 20 % (w/v) TCA gemischt. Die Fällung der

Proteine erfolgte über Nacht bei 4 °C im Dunklen. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (10 min lang, 12000 rpm, 4 °C; Eppendorf Centrifuge 5804 R, Rotor F 45-30-11, Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH). Der Niederschlag wurde, um vorhandene TCA Rückstände zu entfernen, 3 mal mit je 1 ml Aceton p.a. und Ethanol p.a. gewaschen. Dazwischen wurde jeweils 10 min lang zentrifugiert (4°C, 12000 rpm); nach dem letzten Waschschrift wurden die Proben bei RT an der Luft getrocknet, bis letzte Ethanolreste verdunstet waren. Die gefällten und gereinigten Proteinproben wurden in 20 bis 50 µl SDS-Dissoziationspuffer (siehe 2.3.1.) resuspendiert, in flüssigem N₂ schockgefroren und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.3.2.2. Konzentration von Proteinproben durch semipermeable Membranen

Eine weitere Konzentration der wie unter 2.3.1. gewonnenen Proteinproben (ebenfalls gegen SDS freiem Puffer dialysiert, siehe oben) wurde mit Hilfe semipermeabler Membranen (Nanosep Centrifugal Devices mit Omega TM Membran der Fa. Pall Life Sciences) mit einer Ausschlussgröße von 3000 Da erreicht. Dazu wurden die Säulen mit maximal 500 µl Probenvolumen beladen und 30 min lang zentrifugiert (7500 x g, 4 °C; Eppendorf Centrifuge 5804 R, Rotor F 45-30-11). Bei einem Probenvolumen über der maximalen Säulenkapazität von 500 µl wurde dieser Vorgang mehrmals wiederholt. War auf das gewünschte Volumen eingeeengt, wurde das Proteinkonzentrat von der Membran abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.3.3. Bestimmung des löslichen Gesamtproteingehalts

2.3.3.1. Bestimmung des löslichen Gesamtproteingehalts mittels BCA Test

Für die Bestimmung des Gesamtproteinanteils wurde der BCA™ Protein-Assay (23225, Pierce, Rockford, Illinois, USA) nach SMITH *et al.* (1985) verwendet. Der Test beruht auf dem Prinzip der proteinabhängigen Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ und der darauf folgenden Bildung eines Farbkomplexes mit 2,2'-Bicinchoninsäure. Dieser

Farbkomplex ist photometrisch bei 562 nm quantifizierbar. Zur genauen Quantifizierung der Gesamtproteinmenge wurde aus einem Proteinstandard (2 mg / ml BSA in 0,9 % (w/v) NaCl) eine Eichreihe (100 µg/ml bis 1200 µg/ml, mit 20-fach verdünntem SDS Dissoziationspuffer) erstellt.

Das Reagenz wurde gemäß dem Standardprotokoll frisch aus Reagent A (BCA, NaHCO₃, Na₂CO₃) und Reagent B (4% (w/v) CuSO₄ · 5 H₂O) im Mischungsverhältnis 50 : 1 hergestellt.

In die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (UV Starplate, 96 Wells, Flat Bottom, Greiner Labortechnik GmbH) wurden 20 µl der Probe in unterschiedlichen Verdünnungen pipettiert (Dreifachbestimmungen) und mit 200 µl der angesetzten Reagenzlösung (s. o.) versetzt. Es wurden bei jeder Messung je Mikrotiterplatte jeweils zwei Eichreihen und Nullwerte (nur Reagenzlösung) mitgeführt. Die Mikrotiterplatten wurden mit einer Glasplatte abgedeckt und bei 37 °C 30 min lang im Brutschrank (Heraeus) inkubiert. Die anschließende Messung erfolgte mit einem Mikrotiterplatten-Reader (Power Wave X 340, Fa. Bio-Tek Instruments) bei einer Wellenlänge von 562 nm. Die Verdünnung der Proben musste so gewählt werden, dass nach 30 min die maximalen Extinktionswerte nicht über einem Wert von 1,3 lagen. Über die Regressionskoeffizienten der Eichkurve konnten die Gesamtproteinkonzentrationen in den Proben aus den Absorptionswerten ermittelt werden.

2.3.3.2. Bestimmung des löslichen Gesamtproteingehalts nach ESEN (1978)

War eine Bestimmung des löslichen Gesamtproteingehalts auf Grund zu hoher SDS-Konzentrationen in den Proben über den BCA-Test oder andere Methoden nicht möglich, wurde der Gesamtproteingehalt der Proben nach ESEN (1978) bestimmt.

Dazu wurden zunächst 2 µl einer Proteinprobe gleichmäßig auf ein 1 cm x 1 cm großes Quadrat aus 3 MM Filterpapier aufgetragen, anschließend luftgetrocknet und zur Fixierung der Proteine 5 min lang in Fixierlösung (25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure) geschwenkt. Anschließend wurde das Filterpapierpräparat 15 min lang in Färbelösung (25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,1 % (v/v) Coomassie Brilliant Blau G 250) inkubiert. Nach kurzem Spülen des Filterpapierpräparats mit Aqua bidest. wurde, um den nicht durch Protein

gebundenen *Coomassie* Farbstoff zu entfernen, das Filterpapierpräparat in siedendem Aqua bidest. Entfärbt (2 mal je 1 min lang); abschließend wurde das teilentfärbte Filterpapierpräparat mit kaltem Aqua bidest. gespült und 15 min bis 30 min lang auf einem Edelstahldrahtgitter 5 cm über einer Heizplatte bei 80°C getrocknet. Anschließend wurde das getrocknete, teilentfärbte Filterpapierpräparat in 1 ml Elutionslösung (0,5 % (w/v) SDS, Aqua bidest.) über Nacht bei RT im Dunkeln zur Freisetzung des proteingebundenen *Coomassie*-Farbstoffs inkubiert. Die anschließende Messung der Absorption erfolgte in Halbmikro-Küvetten (Fa. Brand GmbH und Co. KG) bei 578 nm (UV/Vis Spectrophotometer DU 650, Fa. Beckman). Zur Quantifizierung der Proteinkonzentration wurde ein BSA-Standard mit einer Konzentration von 5 mg/ml in SDS-Dissoziationspuffer als Richtwert herangezogen. Als Nullabgleich diente SDS-Dissoziationspuffer. Es wurden jeweils Doppelproben angefertigt und jede Messung wurde mindestens 2 mal wiederholt.

2.3.4. Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung der Proteine in den Proben nach ihrem Molekulargewicht wurde ein Elektrophoresesystem aus einer Polyacrylamid-Gelmatrix und einem Elektrodenpuffer nach LAEMMLI (1970) [25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS] verwendet.

Vor der Zugabe des SDS und dem Starten der Polymerisationsreaktion durch das Zusetzen von Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) wurden die Gellösungen (siehe Tab. 1) für Trenn- bzw. Sammelgel jeweils 10 min lang im Wasserstrahlvakuum entgast. Nach dem Gießen des Trenngels wurde dieses sofort mit wassergesättigtem n-Butanol überschichtet und bis zum vollständigen Polymerisieren erschütterungsfrei gelagert (ca. 1h, RT). Vor dem Aufbringen des Sammelgels wurde das n-Butanol abgenommen und durch mindestens dreimaliges Waschen mit Aqua bidest. entfernt.

Tab. 1: Komponenten der Gellösungen für SDS-PAGE. Das Verhältnis von Acrylamid zu N, N´-Methylenbisacrylamid betrug 37,5:1

Komponente	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid/Bisacrylamid	12,5% (w/v)	3,6% (w/v)
Tris-HCl	0,42 M (pH 8,8)	0,125 M (pH 6,8)
SDS	0,1% (w/v)	0,1% (w/v)
APS	0,5% (w/v)	0,5% (w/v)
TEMED	0,02% (v/v)	0,05% (v/v)

Um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu gewährleisten, wurden die bereits in Auftragspuffer (0,125 M Tris-HCl; 20 % (v/v) Glycerin, 4 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,001 % (w/v) Bromphenolblau; pH 6,8) vorliegenden Proben vor der Elektrophorese 5 min lang auf 95°C erhitzt. Das Auftragen der denaturierten Proben in die zuvor gründlich mit Laufpuffer (s. o.) gespülten Taschen des Sammelgels erfolgte mittels einer Hamilton-Spritze (Microliter™ Syringes, Hamilton; Bonaduz, Schweiz) bei RT. Zur Bestimmung der apparenten Molekülmassen wurde parallel zu den Proteinproben ein Proteinstandard (SDS VII; Sigma, Deisenhofen) verwendet. Die Elektrophorese in einem Biometra-Elektrophoresesystem (Multigel-Long, Biometra®, Göttingen in Kombination mit Stromquelle Power Pack 3000, Fa. BioRad Laboratories GmbH) wurde bei 4 °C und einer konstanten Stromstärke von 12,5 mA je Gel (Gelgröße 12,0 cm x 11,0 cm x 0,1 cm; Länge x Breite x Dicke) begonnen. Nachdem sich eine dünne, konzentrierte Farbstoffbande an der Trennlinie zwischen Sammel- und Trenngel gebildet hatte (nach ca. 1 h) wurde die elektrophoretische Auftrennung bei 4 °C und einer Stromstärke von 30 mA je Gel fortgesetzt, bis die Bromphenolblaufront begann am unteren Rand des Gels auszutreten (nach ca. 6 h).

2.3.5. Färbemethoden zum unspezifischen Nachweis von Proteinen

2.3.5.1. Coomassie Blau Färbung

Zum Nachweis der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurde das Gel nach Beendigung des Laufes einer *Coomassie*-Färbung unterzogen. Dazu wurde das Gel zunächst in Fixierlösung (7 % (v/v) Essigsäure, 30 % (v/v) Methanol) ca. 30 min lang unter leichtem Schütteln (Schüttler KL-2; Edmund Bühler, Bodelshausen) fixiert. Anschließend wurde das Gel in die Färbelösung [(10 % (v/v) Essigsäure, 50 % (v/v) Methanol, 0,1 % (w/v) *Coomassie*-Blau (Serva-Blue R; Serva, Heidelberg)] überführt und 90 min lang unter leichtem Schütteln gefärbt. Zum Entfärben des Hintergrundes wurde das Gel in eine Entfärbelösung [(7,5 % (v/v) Essigsäure, 5 % (v/v) Methanol)] gebracht und dort unter leichtem Schütteln bis zum optimalen Entfärbegrad belassen. Zur Konservierung der Gele wurden diese 10 min lang in einer 5 %igen (v/v) Glycerinlösung inkubiert und anschließend 2 h lang bei 80 °C getrocknet (Geltrockner der Fa. BioRad, Modell 583).

2.3.5.2. Silberfärbung

Zum Nachweis geringer Proteinmengen in SDS-PAGE-Gelen wurde eine Silberfärbung nach SHEVCHENKO *et al.* (1996) angewandt: Zuerst wurde das Gel 20 min lang bei RT und gleichmäßigem Schwenken fixiert [(5 % (v/v) Essigsäure, 50 % (v/v) Methanol)]. Anschließend wurde das Gel je 10 min lang in 50 % (v/v) Methanol und Aqua bidest. Bei RT gewaschen. Nach 1 minütiger Inkubation in jeweils frisch angesetzter 0,02%iger (w/v) Natriumthiosulfatlösung wurde das Gel 20 min lang in 0,1%iger (w/v) Silbernitratlösung geschwenkt. Nach dem Waschen (2 x je 1 min lang mit Aqua bidest., RT) wurde das Gel in 2 %iger (w/v) Natriumcarbonatlösung [(mit 0,04 % (v/v) Formaldehyd versetzt)] bis zur gewünschten Intensität der Proteinsignale entwickelt (bis zu 5 min). Die Entwicklungsreaktion wurde durch Inkubation in 5 % (v/v) Essigsäure gestoppt. Die Konservierung des Gels erfolgte wie unter 2.3.5.1. beschrieben.

2.3.6. Immunonachweis zur spezifischen Identifikation von Proteinen

Proteine, die durch *Blotting* auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und somit immobilisiert worden sind (siehe 2.3.6.1.), können durch eine gekoppelte Antikörper-Färbereaktion sichtbar gemacht werden. Ein Antikörper (Serum) bildet hierbei mit dem entsprechenden Antigen (immobilisiertes, aufgetrenntes Protein) auf der Membran ein Konjugat. Dieser primäre Antikörper dient nun wiederum als Antigen für einen sekundären Antikörper, an den kovalent ein Enzym wie z. B. Alkalische Phosphatase gebunden ist. Mittels dieses Enzyms kann dann eine sichtbare Farbreaktion katalysiert werden.

2.3.6.1. Proteintransfer und Immobilisierung (*Western Blotting*)

Für Nachweise mit Antikörpern (2.3.6.2.) müssen Proteine zunächst aus der Polyacrylamid-Gelmatrix auf eine geeignete Trägermembran transferiert und immobilisiert werden. Dazu wurde die *Tank-Blotting* Methode gemäß TOWBIN *et al.* (1979) verwendet.

Die Polyacrylamid-Gele wurden sofort nach der Elektrophorese (siehe 2.3.4.) mit einer in Aqua bidest. äquilibrierten Nitrocellulose-Membran (Reinforced NC, Optitran BA-S 85, Fa. Schleicher und Schuell GmbH) gleicher Größe luftblasenfrei bedeckt und zwischen insgesamt 6 Lagen mit Transferpuffer getränkten Filterpapier (Gel Blotting Paper, Fa. Schleicher und Schuell GmbH) gelegt. Mit je einem Schwammtuch pro Seite wurde das „*Sandwich*“ in eine *Blotting-Kassette* (20 cm x 15 cm) überführt und in den mit Transferpuffer [(192 mM Glycin und 25 mM Tris-HCl in 20 % (v/v) Methanol)] gefüllten *Blotting-Tank* eingesetzt. Der Proteintransfer aus der Polyacrylamid-Gelmatrix auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte über Nacht (12 – 15 h, 30 V, 100 mA, 4°C).

2.3.6.2. Spezifische Proteinidentifikation mit Antikörpern

Zur spezifischen Identifikation von Proteinen mit Antikörpern wurde die immobilisierte, Proteine tragende Nitrocellulose-Membran (siehe 2.3.6.1.) zur

Sättigung der unspezifischen Bindungsstellen 1 h lang bei RT und unter leichtem Schwenken in Blockierlösung (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,05 % (v/v) Tween 20, 5 % (w/v) Magermilchpulver) belassen. Anschließend wurde 1 h lang bei RT und unter leichtem Schwenken mit einer in Blockierlösung geeignet verdünnten Lösung an primären Antikörper (immunisiertes Tier: Kaninchen) inkubiert. Zum Entfernen von überschüssigem, nicht gebundenem primären Antikörper wurde die Membran 3 mal je 10 min lang mit 200 ml Blockierlösung gewaschen. Zur Verstärkung des Immunsignals erfolgte nun eine einstündige Inkubation mit in Blockierlösung verdünntem sekundären Antikörper (Verdünnung 1:1000; Anti-rabbit IgG, immunisiertes Tier: Ziege, Sigma Aldrich Chemie GmbH). Anschließend wurde die Membran 3 mal je 10 min lang mit 200 ml Blockierlösung gewaschen und darauf folgend wiederum 1 h lang mit einem tertiären Antikörper, gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase, in Blockierlösung (Verdünnung 1:1000; Anti-goat IgG, konjugiert mit Alkalischer Phosphatase, immunisiertes Tier: Kaninchen, Sigma Aldrich Chemie GmbH) inkubiert. Nachfolgend wurde die Membran 3-mal je 10 min lang mit TBS + Tween-20 Lösung [(500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,05 % (v/v) Tween-20)] gewaschen. Für die Idol-Farbreaktion wurde die Nitrocellulose Membran zunächst kurz mit Colour - Puffer (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 9,0) gespült und anschließend in einer Lösung aus 200 mM Tris-HCl, 0,015 % (w/v), 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat [(BCIP, 1,5 % (w/v) Stammlösung in DMF)], 0,03 % (w/v) 4-Nitroblautetrazoliumchlorid [(NBT, 3 % (w/v) Stammlösung in 70 % DMF)], pH 9,5 geschwenkt, bis deutlich sichtbare Signale auftraten. Durch Überführen in mit HCl angesäuertem Aqua bidest. wurde die Reaktion gestoppt und die Membran anschließend an der Luft getrocknet.

2.4. Photometrische Pigmentanalysen

2.4.1. Bestimmung des Chlorophyllgehalts in DMF nach PORRA *et al.* (1989)

Zur Bestimmung der Chlorophyllgehalte aus Blattgewebe wurden die Pigmente nach PORRA *et al.* (1989) extrahiert. Dazu wurden Blattscheiben mit 0,196 cm² Fläche mittels eines Korkbohrers aus den zu untersuchenden Blättern gestanzt, gewogen und anschließend mit 995 µl N,N'-Dimethylformamid (DMF, Fluka) bei -20 °C über

Nacht extrahiert. Blattstücke und unlösliche Bestandteile wurden durch 5 min langes zentrifugieren bei 16000 x g und RT (Eppendorf-Tischzentrifuge) sedimentiert. Die Absorption (A) des Überstandes wurde bei den Wellenlängen 646,8 nm, 663,8 nm und 750 nm photometrisch bestimmt (Lambda 2, Perkin Elmer, UV/Vis Spectrometer, Überlingen). Die Berechnung der Chlorophyllkonzentrationen in $\mu\text{g ml}^{-1}$ erfolgte mit Hilfe der unten aufgeführten Formeln. Die durch Lichtstreuung bedingte Absorption bei 750 nm wurde jeweils von den berechnungsrelevanten Absorptionen 646,8 nm und 663,8 nm subtrahiert.

Chlorophyllgehalt [$\mu\text{g ml}^{-1}$]

$$\text{Chl } a = 12,00 \times (A_{663,8} - A_{750}) - 3,11 \times (A_{646,8} - A_{750}) \quad (1)$$

$$\text{Chl } b = 20,78 \times (A_{646,8} - A_{750}) - 4,88 \times (A_{663,8} - A_{750}) \quad (2)$$

$$\text{Chl } a+b = 17,67 \times (A_{643,8} - A_{750}) + 7,12 \times (A_{663,8} - A_{750}) \quad (3)$$

Der Chlorophyllgehalt wurde anschließend flächenbezogen (pro m^2) berechnet.

2.4.2. Chlorophyllgehaltbestimmung in Methanol nach LICHTENTHALER (1987)

Zur Bestimmung der Chlorophyllgehalte aus Suspensionen wurden die Pigmente gemäß LICHTENTHALER (1987) extrahiert. Dazu wurden die in TE (2) 45 Puffer resuspendierten Proben (siehe 2.2.2.) mit 90 % (v/v) Methanol verdünnt (1:1000), gemischt und nachfolgend 10 min lang in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert (9000 rpm, RT). Der Überstand wurde in Küvetten (PlastiBrand Einweg-Küvetten, Volumen 1,5 ml, Fa. Brand GmbH und Co. KG) überführt und anschließend die Absorption des Überstandes bei einer Wellenlänge von 624 nm und 665 nm gemessen (UV/Vis Spectrophotometer DU 650, Fa. Beckman). Die Berechnung des Gesamtchlorophyllgehalts (mg Chl pro ml) erfolgte gemäß folgender Gleichung:

$$\text{Chl } a + b = (1,44 \times A_{665}) + (24,93 \times A_{624}) \quad (4)$$

Als Nullabgleich wurde TE (2) 45 Puffer mit 90 % (v/v) Methanol verdünnt (1:1000) verwendet.

2.5. Elektronenmikroskopische Methoden

Elektronenmikroskopische Methoden erlauben einen Einblick in Aufbau, Funktion und Ultrastruktur biologischer Systeme, die durch eine andere Methode nur schwer in gleicher visueller Weise erbracht werden könnte. Da in dieser Arbeit zum Teil neuartige elektronenmikroskopische Techniken (z. B. *SDS-Freeze Fracture Replica Labeling*, Immuno-Rasterelektronenmikroskopie, *Environmental Scanning Electron Microscopy*) zur Anwendung kamen, die eigens für die speziellen Anforderungen der Problemstellung dieser Arbeit adaptiert werden mussten, erfolgt eine umfassende Beschreibung dieser Methoden.

2.5.1. Methoden zur Untersuchung der Ultrastruktur durch die Transmissions-elektronenmikroskopie

2.5.1.1. Negativkontrastierung von Chloroplasten

Die Negativkontrastierung stellt eine schnelle Möglichkeit dar, kleine und kleinste 3D-Strukturen in der Größenordnung von μm oder nm , wie etwa Organellen oder Makromoleküle, im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) unter hoher Auflösung darzustellen.

Die suspendierten Chloroplasten (siehe 2.2.1.2.) wurden in 2 % (v/v) Glutaraldehyd-lösung (in Puffer 4) 1 min lang fixiert. Anschließend wurden 15 μl der Suspension auf Pioloform befilmte Gitternetzchen (Kupfer; 300 Maschen, Fa. W. Plannet GmbH) aufgebracht und 15 min lang bei RT und 1 x g sedimentiert (in einer feuchten Kammer). Anschließend wurde 3-mal je 5 min lang mit Aqua bidest. gewaschen. Das überschüssige Aqua bidest. des letzten Waschschriffs wurde mit Hilfe eines Papierfilterstücks (Rundfilter 589 Blauband, 9 cm, aschelos, Schleicher und Schuell GmbH) abgesaugt. Die fixierten, gewaschenen und adhäsieren Chloroplasten wurden sofort 2 min lang mit einer 2 %igen (w/v) Uranylacetatlösung (in Aqua bidest.; Fa. W. Plannet GmbH) kontrastiert. Im Anschluss daran wurde wiederum 3 mal je 5 min lang mit Aqua bidest. gewaschen, das überschüssige Wasser abgesaugt und die Netzchen zum Trocknen bei RT staubfrei in Petrischalen

(Petrischale 9 cm, Fa. Sarstedt AG und Co.) gelagert. Bis zur Untersuchung im Transmissionselektronenmikroskop (TEM, Typ EM 109 oder EM 902, Fa. Zeiss) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV wurden die Proben staubfrei im Dunklen bei RT aufbewahrt.

2.5.1.2. Standardpräparationsverfahren biologischer Proben zur Transmissionselektronenmikroskopie (Ultramikrotomie und Gefrierbruch)

Mit Hilfe der Dünnschneidetechnik ist es möglich, interne Details biologischer Proben hochaufgelöst auf einem ultrastrukturellen Niveau darzustellen. Werden hingegen Informationen zur Topographie und zur Topologie biologischer Systeme in genügend hoher räumlicher Auflösung benötigt, dann ist die konventionelle Gefrierbruchtechnik die geeignete Methode. Bei beiden Methoden ist hierzu aber eine zahlreiche Arbeitsschritte umfassende Probenpräparation notwendig, die den speziellen Anforderungen der Transmissionselektronenmikroskopie Rechnung tragen muss. Die zu untersuchende biologische Probe muss wasserfrei, vakuumstabil, hinreichend dünn und kontrastreich sein.

2.5.1.2.1. Konventionelle Einbettung in Epoxidharz (nach SPURR; 1969) zur Ultramikrotomie

Im Folgenden werden die notwendigen Schritte zur konventionellen Einbettung in Epoxidharz (zur Ultramikrotomie) beschrieben, wobei beim ersten Schritt - der Probennahme und primären Fixierung - zwischen Blattgewebe und Suspensionen unterschieden wird. Alle nachfolgenden Schritte sind identisch.

Probennahme und primäre chemische Fixierung von Blattgewebe (Aldehydfixierung)

Ausgewählte Gerstenprimärblätter wurden mittels einer neuen, mit Ethanol entfetteten Rasierklinge (Fa. Gillette) in einem Tropfen Fixierlösung (2 % (v/v) Glutaraldehyd in 0,05 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,2) in kleine Stücke (1,5 mm x 1 mm) geschnitten und sofort in ein mit Fixierlösung gefülltes Schraubdeckelglas (5 ml; Fa. W. Plannet GmbH) überführt. Während der Fixierung (bei RT)

wurden die Blattgewebestücke durch periodisches Anlegen eines Vakuums (200 hPa - 300 hPa) entlüftet. Nach 5 h bis 7 h wurden die entlüfteten Blattgewebestücke in frische Fixierlösung überführt und 12 h lang bei 4 °C ohne Vakuum fixiert.

Probennahme und primäre chemische Fixierung von Suspensionen (Aldehydfixierung)

Proben, die in Suspension vorlagen (z.B. isolierte Chloroplasten), wurden zuerst (durch geeignete Zentrifugation) sedimentiert. Anschließend wurde das Sediment in 2 %igem (w/v) Agar-Agar (in Aqua bidest.) eingeschlossen und nach dem Gelieren mittels einer neuen, entfetteten Rasierklinge in kleine Blöcke (mit etwa 1,5 mm Kantenlänge) geschnitten und sofort in ein mit Fixierlösung gefülltes Schraubdeckelglas überführt. Die Proben wurden mindestens 4 h lang bei RT fixiert. Ihre Aufbewahrung über Nacht erfolgte in frischer Fixierlösung bei 4 °C.

Sekundäre chemische Fixierung (komplementäre Schwermetallfixierung) und Kontrastverstärkung

Die primär chemisch fixierten Proben (siehe oben) wurden anschließend 3 mal je 15 min lang gewaschen (0,05 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,2; RT) und sofort in 2 %iger (w/v) Osmiumtetroxid-Lösung (in 0,025 M Natriumphosphatpuffer) bei RT 12 h lang fixiert. Anschließend wurde 3 mal je 15 min lang gewaschen (0,1 M Na-Cacodylatpuffer, pH 7,2). Zur Verstärkung des Kontrasts der vorwiegend lipidhaltigen Ultrastrukturen (z.B. Membranen, Plastoglobuli der Chloroplasten) der biologischen Proben folgte eine Inkubation in 2 %iger (w/v) Tanninlösung (in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer 1h lang, RT).

Entwässerung der Proben (Dehydratation):

Nach der komplementären Schwermetallfixierung und Kontrastverstärkung durch Tannin (siehe oben) wurden die Proben 3 mal je 20 min lang mit Aqua bidest. gewaschen. Die Entwässerung der Proben erfolgte in einer aufsteigenden Acetonkonzentrationsreihe (RT). Zu Beginn war eine möglichst schonende Entwässerung zu gewährleisten; daher erfolgte die Anfangskonzentrierung von 0 % bis 25 % (v/v) Aceton kontinuierlich über einen Zeitraum von 30 min. Um vor allem auch proteinhaltige Ultrastrukturen genügend kontrastreich für die transmissionselektronischen Untersuchungen zu erhalten, wurde den Proben bei der

anschließenden Entwässerungsstufe auf 50 % Aceton noch zusätzlich 1 % (w/v) Uranylacetat zugesetzt und diese dann 2 h lang inkubiert. Anschließend wurde die Entwässerungsreihe mit 75 % Aceton (15 min lang) und 96 % Aceton (15 min lang) fortgesetzt. Um eine vollständige Dehydratation zu erreichen, wurde abschließend 3 mal je 20 min lang mit 100 %igem, über ein Molekularsieb (0,3 nm) getrockneten Aceton gewaschen.

Infiltration mit niederviskosem Epoxidharz nach SPURR (1969).

Die fixierten, kontrastierten und dehydrierten Proben wurden anschließend mit niederviskosem Epoxidharz nach SPURR (1969) ebenfalls in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe nach Tabelle 2 bei RT infiltriert:

Tab. 2: Mischungsverhältnisse von Epoxidharz und Aceton sowie die jeweiligen Infiltrationszeiten

Harz / Aceton (v/v)	Dauer der Infiltration (h)
1 / 3	4
1 / 1	12
3 / 1	4
1 / 0	4
1 / 0	12
1 / 0	4

Die Komponenten des Harzes wurden frisch in folgender Zusammensetzung gemischt: 5,2 : 2,0 : 1,2 : 0,008 (v/v/v/v) = NSA : ERL : DER : S-1 (Spurr-Harz *Kit* der Fa. W. Plannet GmbH)

Polymerisation der Proben (Härtung):

Zur Polymerisation der Proben wurden diese zuerst in flache Einbettungsgießformen (Blockgröße 12,2 mm x 4,5 mm x 3 mm; Fa. W. Plannet GmbH) überführt und zunächst 4 h lang bei 50 °C und dann 3 Tage lang bei 55 °C gehärtet (Polymerisationsofen KT 100; Fa. Reichert, Wien).

Ultramikrotomie der polymerisierten Proben:

Um eine genügend kleine und ebene Schnittfläche zu erhalten, wurden die gehärteten Probenblöckchen an geeigneter Stelle mit einer Diamantfräse (Leica EM Trimm; Fa. Leica Microsystems GmbH) zu einem Pyramidenstumpf geformt (Trimmen der Probe). Von den so vorbereiteten Probenblöckchen wurden Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 50 nm bis 70 nm (silber- bis goldfarbige Interferenz der einzelnen Schnitte auf der Wasseroberfläche unter Auflicht) mit Hilfe eines Ultramikrotoms (Leica Ultracut UCT, Fa. Leica Microsystems GmbH) und eines Diamantmessers (45° Messerschneidewinkel; Fa. Diatome) angefertigt. Nach dem Glätten der Schnitte mit einem mit Chloroform getränkten Filterpapierstreifen, der für kurze Zeit (5 sec lang) etwa 5 mm über die schwimmenden Ultradünnschnitte gehalten wurde, wurden diese auf mit Pioloform beschichtete Kupfernetzchen aufgenommen und getrocknet.

Nachkontrastierung und Mikroskopie der polymerisierten Proben:

Die auf den Kupfernetzchen aufgebrachten Ultradünnschnitte wurden, zur nochmaligen Kontrastverbesserung, 7 min lang in wässriger 2 %iger (w/v) Uranylacetatlösung inkubiert, dann 3 mal je 5 min lang gewaschen (Aqua bidest.) und anschließend 5 min lang mit einer alkalischen, wässrigen Bleicitratlösung (nach REYNOLD'S 1963) nachkontrastiert. Nach einem abschließenden Waschschrift (3 mal je 5 min lang mit Aqua bidest.) wurden die Ultradünnschnitte getrocknet (RT, staubfrei) und waren zur Untersuchung im Transmissionselektronenmikroskop (TEM, Typ Zeiss EM 109 oder CEM 902A, Fa. Zeiss, Oberkochen) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV vorbereitet.

2.5.1.2.2. Konventionelle Gefrierbruchtechnik (Gefrierbruch und -ätzen)

Mit Hilfe der Gefrierbruchtechnik können innere Zelldetails (z. B. Membransysteme und deren Kontaktstellen, Vesikel) untersucht werden. Da der Bruch bei gefrorenen biologischen Proben oft der hydrophoben Mitte der Doppelschicht von Membranen folgt, können Informationen zur Topographie und Topologie der strukturellen Bestandteile in diesen Membranen dreidimensional in genügend hoher räumlicher Auflösung erhalten werden.

Probenvorbehandlung Isolierter Chloroplasten (chemische Fixierung und Gefrierschutz)

Die Chloroplasten in der erhaltenen Suspension (siehe 2.2.1.2.) wurden in 2 % (v/v) Glutaraldehydlösung (in Puffer 4, 4 °C) 1 h lang fixiert, anschließend sedimentiert (200 x g, 3 min, 4°C) und einmal gewaschen (mit Puffer 4, 4 °C) . Der Niederschlag wurde in einem definierten Volumen Puffer 4 resuspendiert, anschließend mit dem gleichen Volumen an Glycerin (70 %, in Puffer 4) versetzt (Endkonzentration Glycerin: 35 %) und 1 h lang inkubiert. Anschließend wurden die chemisch fixierten und gefriereschützten Chloroplasten sedimentiert (400 x g, 3 min, 4 °C).

Physikalische Fixierung (Gefrierfixieren)

Zum Gefrierfixieren wurden 2 µl des weichen Niederschlags entnommen und zwischen zwei vorbereitete Messingnieten (Fa. Leybold-Haeraeus, geschliffen mit 800er Sandpapier, mit leichtem Hammerschlag eingedellt und mit Aceton gereinigt) gebracht. Nach dem Zusammendrücken der Nieten wurde überschüssiges Material mit Hilfe eines Filterpapiers entfernt und die Probe sofort in schmelzenden Stickstoff (-210 °C, 10 sec lang) ultraschnell eingefroren, um Eiskristallbildung innerhalb der Probe zu verhindern bzw. zu erreichen, dass die Eiskristalle kleiner als die Auflösungsgrenze der kontrasterzeugenden Metallschicht sind. Eine Lagerung der Proben bis zur weiteren Verwendung erfolgte unter flüssigem Stickstoff (-196 °C).

Gefrierbruch, Gefrierätzen und Herstellen eines Abdrucks

Die gefrierfixierten Proben wurden in den vorbereiteten und mit flüssigem Stickstoff gekühlten (-196 °C) Probenhalter eingesetzt (unter flüssigem Stickstoff) und anschließend sofort in die Gefrierbruchapparatur (BioEtch 2005, Fa. Leybold-Haeraeus) überführt, wobei eine Erwärmung des Probenhalters über -150 °C unbedingt vermieden wurde. Der eigentliche Gefrierbruchvorgang, das „Gefrierätzen“ sowie die Bedampfung mit Pt/C erfolgten unter Vakuum in der Gefrierbruchapparatur (elektronisch gesteuert). Nach langsamer Erwärmung über einen Zeitraum von 45 min auf eine Temperatur von -97 °C erfolgte automatisch (elektromagnetisch) der Bruch der Proben durch plötzliches Auseinanderziehen der Nieten im Probenhalter ($p < 4 \times 10^{-3}$ Pa). Anschließend wurden die gefriergebrochenen Proben 10 sec lang bis 2 min lang „geätzt“ (= Sublimation des amorph gefrorenen Wassers aus der Probenbruchoberfläche). Zur Herstellung eines Abdrucks (Replik) der

gefriergebrochenen und -geätzten Oberflächen wurde sofort mit Pt/C (7,5 sec, Bedampfungswinkel 45°) und darauf folgend nur mit C (6,0 sec, Bedampfungswinkel 90°) bedampft (elektronisch gesteuert).

Ablösen und Reinigen der Replika

Nach der Bedampfung wurden die Proben aus der Gefrierbruchapparatur entnommen; die einzelnen Nieten wurden aus dem Probenhalter entnommen und die Replik durch Flotieren auf Aqua bidest. (RT) abgelöst. Zur Reinigung der Replika von noch anhaftendem biologischem Material wurden diese auf 35 % (w/v) Chromsäure übertragen und 12 h lang inkubiert (RT). Nach 5-maligem Waschen mit Aqua bidest. (je 1 min lang) waren die Replika zur Untersuchung im TEM (Typ Zeiss EM 109; CEM 902A, Fa. Zeiss; EM 922 Fa. Leo/Zeiss) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV (oder einer anderen geeigneten Beschleunigungsspannung) vorbereitet.

2.5.2. Immunocytochemische Untersuchungsmethoden (TEM)

Immunologische Verfahren können in der Probenpräparation für das TEM sowohl an Ultradünnschnitten, an kleinen, ganzen 3D-Strukturen (z. B. Organellen), als auch bei Oberflächenabdrücken angewandt werden. Unter Verwendung von entsprechenden Kontrollen erlauben diese Verfahren die zytologische Lokalisierung und die Quantifizierung spezieller Verbindungen bzw. von Zielproteinen. Außerdem können diese immunologischen Verfahren so sensitiv sein, dass sogar eine Einzelmoleküldetektion möglich ist. Die dazu eingesetzten Verfahren sind äußerst aufgabenspezifisch und können Modifikationen eines oder aller Präparationsschritte erfordern (nach FLEGLER, HECKMANN, KLOMPARENS, 1995; S.184)

2.5.2.1. Immungoldmarkierung isolierter Chloroplasten (Suspension)

15 µl der Chloroplasten enthaltenden Suspension (siehe 2.2.1.2.) wurden auf (mit 1,5 % Pioloform) befilmte Gitternetzchen (Kupfer; 300 Maschen, Fa. W. Plannet GmbH) aufgetragen und 15 min lang bei RT und 1 x g sedimentiert (in einer feuchten Kammer). Anschließend wurde 3-mal je 5 min lang in Puffer 4 gewaschen. Der überschüssige Puffer 4 des letzten Waschschriffs wurde mit Hilfe eines Papierfilterstücks (Rundfilter 589 Blauband, 9 cm, aschelos, Schleicher und Schuell GmbH) abgesaugt. Die gewaschenen und adhäsieren Chloroplasten wurden sofort mit einer in Puffer 4 geeignet verdünnten Lösung an primären Antikörper inkubiert (1h lang, RT, staubfrei). Im Anschluss daran wurde 5 mal je 5 min lang mit Puffer 4 gewaschen, der überschüssige Puffer abgesaugt und die Netzchen sofort mit einem gegen den primären Antikörper gerichteten, sekundären goldkonjugierten Antikörper (Verdünnung 1:50, in Puffer 4; 1h lang, RT, staubfrei) inkubiert. Anschließend wurden die Proben 5 mal je 5 min lang mit Puffer 4 gewaschen, der überschüssige Puffer abgesaugt und sofort 10 min lang mit 4 % (v/v) Glutaraldehydlösung fixiert. Nach dreimaligem Waschen (je 3 min lang, mit Aqua bidest.) wurden die Proben zum Trocknen bei RT staubfrei in Petrischalen gelagert. Bis zur Untersuchung im TEM (Typ Zeiss EM 109 oder CEM 902A, Fa. Zeiss) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV wurden die Proben staubfrei und im Dunklen bei RT aufbewahrt (nach ACKER, 1990, verändert).

2.5.2.2. Immungoldmarkierung an Ultradünnschnitten

Die Immungoldmarkierung an Ultradünnschnitten ist ein Standardverfahren der immuncytologischen Untersuchungsmethoden für das TEM. Um die Antikörperbindungsfähigkeit der Zielmoleküle (Antigene) der Probe möglichst gut zu erhalten, muss eine speziell den Ansprüchen der Immuncytochemie genügende Probenbehandlung gewährleistet sein.

2.5.2.2.1. Standard-Einbettungsverfahren in Acrylatharz (Lowycryl-K4M) zur Ultramikrotomie

Die Standard-Einbettung in Acrylat/Methacrylat, wie das hier verwendete niederviskose Lowycryl-K4M-Harz-System, genügt den Ansprüchen der Immunocytochemie. Neben der allgemein guten Konservierung der Antikörperbindungsfähigkeit der Zielmoleküle (Antigene) zeichnet sich das Lowycryl-K4M-Harz-System vor allem durch seine niedrige Viskosität aus, die bei problematischen Pflanzengeweben eine genügend gute Penetration der Probe und somit zufrieden stellende Schneideeigenschaften gewährleistet.

Im Folgenden werden die notwendigen Schritte zur Standard-Einbettung in Acrylatharz (Lowycryl-K4M) beschrieben, wobei beim ersten Schritt - der Probennahme und der chemischen Fixierung - zwischen Blattgewebe und Suspensionen unterschieden wird. Alle nachfolgenden Schritte sind gleich.

Probennahme und chemische Fixierung von Blattgewebe (Aldehydfixierung)

Ausgewählte Gerstenprimärblätter wurden mittels einer neuen, mit Ethanol entfetteten Rasierklinge in einem Tropfen Fixierlösung (2 % (v/v) Glutaraldehyd in 0,05 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,2) in kleine Stücke (1,5 mm x 1 mm) geschnitten und sofort in ein mit Fixierlösung gefülltes Schraubdeckelglas (5 ml) überführt. Während dieses Fixierungsschritts (RT) wurden die Blattgewebestücke durch periodisches Anlegen eines Vakuums (200 - 300 hPa) entlüftet. Nach 5 bis 7 h wurden die entlüfteten Blattgewebestücke in frische Fixierlösung überführt und 12 h lang bei 4 °C ohne Vakuum fixiert.

Probennahme und chemische Fixierung von Suspensionen (Aldehydfixierung)

Proben, die in Suspension vorlagen (z. B. Chloroplasten), wurden zuerst (durch geeignete Zentrifugation) sedimentiert. Anschließend wurde das Sediment in 35 °C warmem, 2 %igem, (w/v) Agar-Agar (in Aqua bidest.) eingeschlossen und nach dem Gelieren mittels einer neuen, entfetteten Rasierklinge in kleine Blöcke (mit etwa 1,5 mm Kantenlänge) geschnitten und sofort in ein mit Fixierlösung gefülltes Schraubdeckelglas überführt. Die Proben wurden mindestens 4 h lang bei RT fixiert. Die Aufbewahrung über Nacht erfolgte in frischer Fixierlösung bei 4 °C.

Entwässerung der Proben (Dehydratation)

Nach der chemischen Aldehydfixierung (siehe oben) wurden die Proben 3-mal je 20 min lang mit Aqua bidest. gewaschen. Die Entwässerung der Proben erfolgte in einer aufsteigenden Ethanolkonzentrationsreihe bei RT. Um eine möglichst schonende Entwässerung zu gewährleisten, erfolgte der erste Schritt von 0 auf 25 % (v/v) Ethanol kontinuierlich in einem Zeitraum von 30 min durch tröpfchenweise Zugabe von Ethanol. Anschließend wurde die Entwässerungsreihe schrittweise mit 50 %, 75 %, und 96 % Ethanol (je 15 min lang) fortgesetzt. Um eine vollständige Dehydratation zu erreichen, wurde abschließend 3 mal je 20 min lang mit 100 % Ethanol (über Molekularsieb 0,3 nm getrocknet) inkubiert.

Infiltration mit Acrylatharz (Lowycryl-K4M)

Die fixierten und dehydrierten Proben wurden anschließend mit Lowycryl K4M Harz ebenfalls in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe, wie in Tabelle 3 gezeigt bei RT infiltriert:

Tab. 3: Mischungsverhältnisse von Acrylatharz und Ethanol sowie die jeweiligen Infiltrationszeiten

Harz / Ethanol (v/v)	Dauer der Infiltration (h)
1 / 3	4
1 / 1	12
3 / 1	4
1 / 0	4
1 / 0	12
1 / 0	4

Die Komponenten (Lowycryl-K4M Kit der Fa. W. Plannet GmbH) des Harzes wurden jeweils frisch in folgender Zusammensetzung gemischt: 16,6 ml Monomermischung B (48,8 % 2-Hydroxypropyl-methacrylat, 23,7 % 2-Hydroxyethyl-acrylat, 9,0 % n-Hexyl-methacrylat) 3,4 ml Crosslinker A (Triethylenglycol-dimethacrylat), 0,1 g Initiator C (Benzoin-ethylether)

Polymerisation der Proben (Härtung)

Zur Polymerisation der mit Acrylharz infiltrierten Proben wurden diese zuerst in flache Einbettungsgießformen (BEEM^R, Blockgröße 12 mm x 5 mm x 3 mm; Fa. W. Plannet GmbH) gegeben und mit UV durchlässiger ALCLAR Folie (Fa. W. Plannet GmbH) luftdicht abgeschlossen. Die eigentliche Polymerisation erfolgte unter UV Licht (Wellenlänge $\lambda=360$ nm; indirekte Bestrahlung) bei RT über 4 Tage.

Ultramikrotomie der polymerisierten Proben

Um eine genügend kleine und ebene Schnittfläche zu erhalten, wurden die gehärteten Probenblöckchen an geeigneter Stelle mit einer Diamantfräse (Leica EM Trimm; Fa. Leica Microsystems GmbH) zu einem Pyramidenstumpf geformt (Trimmen der Probe). Von den so vorbereiteten Probenblöckchen wurden Ultradünnschnitte mit einer Dicke von ca. 50 nm mit Hilfe eines Ultramikrotoms (Leica Ultracut UCT, Fa. Leica Microsystems GmbH) und eines Diamantmessers (45° Messerschneidewinkel; Fa. Diatome) angefertigt. Die Schnitte wurden mit einem Chloroform getränkten Filterpapierstreifen, der 5 sec lang ca. 5 mm über die schwimmenden Ultradünnschnitte gehalten wurde, geglättet. Anschließend wurden diese auf Pioloform beschichtete Kupfernetzchen aufgenommen und damit sofort eine Immungoldmarkierung durchgeführt.

2.5.2.2.2. Immungoldmarkierung von Proteinen an Ultradünnschnitten

Der immuncytochemische Nachweis von Proteinen der in Acrylharz eingebetteten Proben erfolgte im Wesentlichen nach ACKER (1988). Zur Absättigung freier Aldehydgruppen wurden die frisch geschnittenen Proben (siehe oben) 30 min lang in 0,1 M Lysin in PBS (0,15 M NaCl, 0,01 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,4) bei RT inkubiert. Weitere mögliche unspezifische Bindungsstellen für Antikörper wurden durch eine folgende Inkubation der Schnitte mit 1% (w/v) Milchpulver (in PBS, 10 min lang, RT) blockiert. Nachdem die Proben kurz (10 sec lang) mit PBS gewaschen und der restliche noch vorhandene Puffer abgesaugt worden war, wurden die Proben 2 h lang mit einem primären Antikörper geeigneter Verdünnung [in PBS mit 2 % (w/v) BSA] möglichst staubfrei in geschlossenen Petrischalen inkubiert. Anschließend

wurde 3 mal je 5 min lang gewaschen (PBS) und 1 h lang mit einem (gegen den primären Antikörper gerichteten) sekundären Gold-konjugierten Antikörper inkubiert [AuroProbe™ EM GAR G 10; oder GAR G 5; oder GAM G 5, Fa. Amersham Life Science; Verdünnung 1 : 50, in PBS mit 1 % (w/v) BSA]. Nach Waschen mit PBS (6 mal je 5 min lang, bei RT) wurden - zum Entfernen möglicher störender Salzkristalle - die Proben noch mit Aqua bidest. gewaschen (3 mal je 5 min lang, bei RT); restliches verbleibendes Wasser wurde abgesaugt.

2.5.2.2.3. Kontrastierung und Mikroskopie der immunmarkierten Proben

Die immunmarkierten Ultradünnschnitte wurden, zur Visualisierung der Ultrastruktur, 5 min lang in wässriger 2 %iger (w/v) Uranylacetatlösung inkubiert, dann 3-mal je 5 min lang gewaschen (Aqua bidest.) und anschließend 30 sec lang mit einer alkalischen, wässrigen Bleicitratlösung (REYNOLDS 1963) nachkontrastiert. Nach einem abschließenden Waschschrift (3 mal je 5 min lang mit Aqua bidest.) wurden die Ultradünnschnitte bei RT getrocknet und konnten so im Transmissions-elektronenmikroskop (TEM, Typ Zeiss EM 109 oder CEM 902A, Fa. Zeiss) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV untersucht werden.

2.5.2.3. Immungoldmarkierung an Gefrierbruch-Abdrücken (SDS-FRL = *SDS-digested Freeze-fracture Replica Labeling*; FUJIMOTO, 1995)

Die SDS-FRL ermöglicht es, die konventionelle Gefrierbruchtechnik mit immun-cytologischen Verfahren zu kombinieren. Durch diese neue Technik werden nicht nur Informationen zur Topographie und Topologie biologischer Oberflächen (z.B. Membranen) geliefert; es ist darüber hinaus auch eine zytologische Lokalisierung und Quantifizierung spezieller Verbindungen bzw. Zielproteine möglich. Diese immunologische Methode kann so sensitiv sein, dass sogar eine Einzelmoleküldetektion möglich ist. Durch Anpassung und Optimierung der SDS-FRL speziell an die Fragestellung dieser Arbeit konnte diese Methode zur Untersuchung der Chloroplastenhüllmembran herangezogen werden.

2.5.2.3.1. Chemische Fixierung und Gefrierschutz bei Chloroplasten

Um die Antikörperbindungsfähigkeit der Zielproteine möglichst gut zu erhalten, wurde die Chloroplasten enthaltende Suspension (siehe 2.2.1.2.) in einem Gemisch aus 0,2 % (v/v) Glutaraldehyd- und 3 % (v/v) Formaldehydlösung (jeweils Endkonzentrationen; in Puffer 4, 4 °C) 30 min lang fixiert, anschließend sedimentiert (200 x g, 3 min, 4°C) und einmal mit eisgekühlten Puffer 4 gewaschen. Das Sediment wurde in 250 µl Puffer 4 resuspendiert und die Chloroplastensuspension anschließend durch Zugabe des gleichen Volumens Glycerinlösung (20 %, in Puffer 4) auf eine Endkonzentration von 10 % Glycerin eingestellt und 30 min inkubiert. Anschließend wurden die chemisch fixierten und gefriereschützten Chloroplasten sedimentiert (500 x g, 3 min lang, 4 °C).

Physikalische Fixierung (Gefrierfixieren)

Die physikalische Fixierung durch ultraschnelles Einfrieren erfolgte wie unter 2.5.1.2.2. (Konventionelle Gefrierbruchtechnik) beschrieben.

Gefrierbruch, Gefrierätzen und Herstellen eines Abdrucks (Replika)

Gefrierbruch, Gefrierätzen und Herstellen eines Abdrucks erfolgten wie unter 2.5.1.2.2. (Konventionelle Gefrierbruchtechnik) beschrieben. Die gefriergebrochenen Proben wurden jedoch nur 15 sec lang „geätzt“ (= Sublimation des amorph gefrorenen Wassers aus der Probenbruchoberfläche)

Ablösen und Reinigen der Replika

Nach der Bedampfung wurden die Proben aus der Gefrierbruchapparatur entnommen; die einzelnen Proben wurden aus dem Probenhalter entfernt und die Replika auf Aqua bidest. (RT) abflotiert. Diese Replika enthalten - neben den durch die Pt/C-Schicht stabilisierten Membranhälften und die darin enthaltenen integralen Proteine, die als potentielle Antigene fungieren können - noch überschüssiges biologische Material, das entfernt werden muss. Dazu wurden die Replika auf SDS-Puffer (2,5 % (w/v) SDS, 10 mM Tris-HCl, 30 mM Saccharose, pH 8,3) übertragen und 12 h lang bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Replika 5 mal mit PBS gewaschen (je 15 min lang).

2.5.2.3.2. Immundekoration von Proteinen an Gefrierbruch-Abdrücken (*Freeze-fracture Replica Labeling*)

Mögliche unspezifische Antikörperbindungsstellen der gewaschenen Replika wurden 30 min lang in 0,1 M Lysin (in PBS, RT), darauf folgend 10 min lang in 1% (w/v) Milchpulver (in PBS, RT) und schließlich 10 min lang mit 1% (w/v) BSA (in PBS, RT) „blockiert“. Anschließend wurden die Proben 2 h lang mit einem primären Antikörper (gegen das zu detektierende Zielantigen gerichtet) in geeigneter Verdünnung (in PBS mit 1 % (w/v) BSA) inkubiert. Nachfolgend wurde 5 mal je 5 min lang gewaschen (PBS) und 1 h lang mit einem (gegen den primären Antikörper gerichteten) sekundären Gold-konjugierten Antikörper immundekoriert [AuroProbe™ EM GAR G 10; oder GAR G 5; oder GAM G 5, Fa. Amersham Life Science; Verdünnung 1 : 50, in PBS mit 1 % (w/v) BSA]. Abschließend wurden die Replika mit PBS (5 x je 15 min lang) gewaschen.

2.5.2.3.3. Fixieren und Mikroskopie der immunmarkierten Replika

Die immunmarkierten Replika wurden mit 2 % (v/v) Glutaraldehyd (in 0,05 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,2) 5 min lang fixiert und mit Aqua bidest. gewaschen (2 mal je 5 min lang). Zur Untersuchung im TEM (Typ Zeiss EM 109; CEM 902A, Fa. Zeiss; EM 922 Fa. Leo/Zeiss) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV (oder einer anderen geeigneten Beschleunigungsspannung) wurden die Replika auf unbefilmte Kupfernetzchen (300 oder 700 Maschen) aufgenommen.

2.5.3. Methoden zur Untersuchung der Ultrastruktur durch die Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Anders als bei der Transmissionselektronenmikroskopie, bei der ein Untersuchungsobjekt durchstrahlt wird, wird bei der REM das Untersuchungsobjekt mit einem Elektronenstrahl abgetastet. Dadurch ist es möglich, ultrastrukturelle Details von Oberflächen nicht durchstrahlbarer Objekte hochaufgelöst visuell

darzustellen. Neben den Informationen zu Topographie und Topologie können auch Hinweise zur elementaren Zusammensetzung (Materialkontrast) erhalten werden.

2.5.3.1. Konventionelle REM

Bei der konventionellen REM ist eine umfangreiche Probenpräparation notwendig, die die speziellen Bedingungen im Rasterelektronenmikroskop berücksichtigt. Die Probe muss von daher wasserfrei, vakuumstabil, kontrastreich und elektrisch leitend sein.

2.5.3.1.1. Vorbehandlung von isolierten Chloroplasten für die konventionelle REM

Primäre chemische Fixierung (Aldehydfixierung) und Immobilisierung

Die Chloroplasten enthaltende Suspension (siehe 2.2.1.2.) wurde zuerst in 2 % (v/v) Glutaraldehyd (in Puffer 4, 4 °C) 10 min lang fixiert. Zur Immobilisierung der Chloroplasten wurden 50 µl der Suspension auf die adhäsionsfähige Seite eines in einem Spezialhalter (aus Teflon; Eigenbau) montierten Thermanox Plastic Coverslips (*Cell Culture treated on one side, Sterile*; Fa. NUNC™, Brand Products) aufgetragen und 30 min lang erschütterungsfrei sedimentiert (1 x g, RT).

Sekundäre chemische Fixierung (komplementäre Schwermetallfixierung) und Kontrastverstärkung

Die primär chemisch fixierten Proben (siehe oben) wurden anschließend 3-mal je 5 min lang gewaschen (0,05 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,2; RT) und sofort in 2 % (w/v) Osmiumtetroxid (in 0,05 M Natriumphosphatpuffer) bei RT 1 h lang fixiert (Kontrastverstärkung durch Erhöhung der Sekundärelektronenausbeute). Danach wurde 3 mal je 10 min lang gewaschen (0,1 M Cacodylatpuffer, pH 7,2). Zur Verbesserung der mechanischen Festigkeit der vorwiegend lipidhaltigen Ultrastrukturen (z.B. Membranen, Plastoglobuli der Chloroplasten) der biologischen Proben folgte eine einstündige Inkubation bei RT in 3 %iger (w/v) Tanninlösung (in 0,1 M Cacodylatpuffer).

Entwässerung der Proben (Dehydratation)

Nach der komplementären Schwermetallfixierung und Kontrastverstärkung durch Tannin (siehe oben) wurden die Proben 3 mal je 5 min lang mit Aqua bidest. gewaschen. Die anschließende Entwässerung der Proben wurde durch eine aufsteigende Acetonkonzentrationsreihe (RT) erwirkt. Um eine möglichst schonende Entwässerung zu gewährleisten, erfolgte der erste Schritt von 0 % auf 25 % (v/v) Aceton kontinuierlich über einen Zeitraum von 15 min. Damit vor allem auch proteinhaltige Ultrastrukturen mit ausreichendem Kontrast für die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen erhalten wurden, wurde den Proben bei der anschließenden Entwässerungsstufe mit 50 % Aceton noch zusätzlich 1 % (w/v) Uranylacetat zugesetzt und 20 min lang inkubiert. Anschließend wurde die Entwässerungsreihe mit 75 % Aceton (15 min lang) und 96 % Aceton (15 min lang) fortgesetzt. Um eine möglichst vollständige Dehydratation zu erreichen, wurde abschließend 3 mal je 20 min lang mit 100 % Aceton (über Molekularsieb 0,3 nm getrocknet) gewaschen.

2.5.3.1.2. Trocknung der Proben am Kritischen Punkt (KPT; ANDERSON, 1951 und 1953, COHEN 1974)

Beim Trocknen an der Luft würde die Oberflächenspannung des Lösungsmittels (hier: Aceton) beim Verdampfen aus der Probe ausgedehnte Schädigungen an dieser hervorrufen. Deshalb muss eine Trocknung am kritischen Punkt erfolgen (der kritische Punkt eines Gases ist die Kombination aus den Größen Druck und Temperatur bei konstantem Volumen, ab dem die Dichte von flüssiger und gasförmiger Phase gleich groß ist, d.h. es gibt keine Phasengrenze und damit keine Oberflächenspannung. Dazu wird das Lösungsmittel durch flüssiges CO₂ ersetzt (bei 5°C bis 10°C, 51 MPa), und anschließend durch Erhöhung der Temperatur bis über den kritischen Punkt von CO₂ (31°C, 7,38 MPa) gebracht. Durch langsames Ablassen des gasförmigen CO₂ (ca. 25 min lang; bis auf Umgebungsbedingungen) wird die Probe nahezu ohne Schädigungen durch die Oberflächenspannung des Acetons getrocknet. Dies erfolgte unter ständiger Kontrolle der maßgeblichen Parameter in einer KPT-Apparatur Typ 11 120 der Fa. Balzers (Lichtenstein).

2.5.3.1.3. Aufbringen elektrisch leitender Schichten (Gold, Kohlenstoff)

Nicht leitende Proben müssen mit einer sehr dünnen Metallschicht (hier: Gold) oder einer anderen Schicht eines elektrisch leitenden Materials (z. B. Kohlenstoff) versehen werden, um eine negative Aufladung der Probe im REM zu verhindern.

Beschichten der Proben mit Gold

Die Beschichtung mit Gold erfolgte nach dem Prinzip der Kathodenzerstäubung in einem „*Sputter Coater*“ der Fa. Edwards (Typ S 150 A). Dabei werden in einer niedrig evakuierten Kammer (ca. $5 \cdot 10^{-5}$ Pa) bei Anlegen einer Spannung (10000 V) und einem Stromfluß von 25 mA aus einer Goldkathode durch positive Argonionen (erzeugt durch Ionisation mit Hilfe der angelegten Spannung) Goldatome herausgeschlagen. Durch mehrfache Kollision der Goldatome mit den in der Kammer befindlichen Argonionen wird ein unidirektionaler Goldüberzug der Probe gewährleistet. Um eine mögliche Schädigung der Probe durch Überhitzung zu vermeiden, wurde 2 mal je 1 min lang (mit einer 2 minütigen Pause dazwischen) beschichtet.

Beschichten der Proben mit Kohlenstoff

Unter bestimmten experimentellen Voraussetzungen erweist sich eine Beschichtung der Probe mit Gold als ungünstig. Werden beispielsweise Informationen benötigt, um Rückschlüsse auf die Materialzusammensetzung („Materialkontrast“) der Probe ziehen zu können (Rückstreuelektronenbild), muss die Probe zwar elektrisch leitend sein, darf aber die Unterschiede in den Ordnungszahlen für die rückgestreuten Elektronen nicht überdecken oder absorbieren (wie es bei einem Goldüberzug der Fall wäre). Dazu wurden die Proben in einem Vakuumbeschichtungsanlage (Fa. Edwards) mit Kohlenstoff beschichtet.

Mikroskopie der Proben ohne Beschichtung

Zur hochauflösenden Darstellung der Topographie und Topologie der Oberflächen von Chloroplasten muss auf eine Beschichtung, die ja feinste ultrastrukturelle Details überdecken würde, gänzlich verzichtet werden. Durch die Probenpräparation, wie unter 2.5.3.1.1. und 2.5.3.1.2. beschrieben, ist jedoch durch die Imprägnierung der Probe mit OsO_4 und Uranylacetat eine schwache Leitfähigkeit gewährleistet.

Allerdings müssen die Mikroskopiebedingungen den sehr empfindlichen Proben speziell angepasst werden: Um eventuell auftretende Schäden am Präparat v. a. durch elektrische Aufladungen und thermische Einflüsse zu vermeiden, muss die durch den Elektronenstrahl übertragene Energie minimiert werden. Dies geschieht durch das Herabsetzen der Beschleunigungsspannung auf einige wenige Hundert Volt (Niederspannungselektronenmikroskopie). Für ein dennoch ausreichendes Sekundärelektronensignal muss ein sehr geringer Arbeitsabstand der Probe zum Bestrahlungs-/Detektorsystem gewählt werden (≈ 3 mm). Untersuchungen im Niederspannungsbereich wurden an einem REM der Fa. LEO (Typ 1540 FEG) am Lehrstuhl Physik IV (Universität Bayreuth) durchgeführt.

2.5.3.3. REM unter Umgebungsbedingungen (ESEM = *Environmental Scanning Electron Microscope*)

In einem ESEM können (biologische) Proben ohne vorherige Präparation, also im voll hydratisierten Zustand untersucht werden. Somit wird v. a. bei empfindlichen Proben die Ausbildung von Artefakten, die durch diese Probenpräparation entstehen könnten (Schrumpfungen, Geweberisse und -brüche, etc.), weitgehend verhindert. Allerdings muss bei dieser Untersuchungsmethode mit einer limitierten Auflösung (verglichen mit einem konventionellen SEM) gerechnet werden. Diese liegt je nach Probe in einem Größenbereich von ca. 10 nm. Außerdem ist nach wie vor mit Schädigungen des Präparats durch Wechselwirkungen zwischen Elektrodenstrahl und Probenoberfläche zu rechnen, die bei der Interpretation und Auswertung der Aufnahmen zu berücksichtigen sind.

2.5.4. Immunocytoologische Untersuchungsmethoden (REM)

Eine Identifizierung und Visualisierung einzelner Proteine ist auch in der Rasterelektronenmikroskopie möglich. Sollen periphere Membranproteine auf der Organellenoberfläche, wie z.B. im Rahmen dieser Arbeit Proteine auf der äußeren Chloroplastenhüllmembran, nachgewiesen werden, ist die Immuno-REM die einzige Möglichkeit, da weder die Immuno-TEM (Nachweis am Dünnschnitt nur bei

entsprechender, für den Antikörper zugänglicher Menge an Zielantigenen möglich) noch die SDS-FRL (Nachweis nur von integralen Membranproteinen, die erst durch Spaltung der *Lipidbilayer* zugänglich gemacht werden) eingesetzt werden können.

2.5.4.1. Immuncytologische Untersuchungsmethoden im REM

Diese Methode ist eine Verbindung der konventionellen Immuncytochemie (siehe 2.5.2.2.2.) mit der konventionellen REM unter besonderer Berücksichtigung der Besonderheiten der für die REM notwendigen Probenpräparation.

2.5.4.1.1. Vorbereitung von isolierten Chloroplasten für die konventionelle immuncytologische REM (chemische Fixierung und Immobilisierung)

Die sich in Suspension befindlichen Chloroplasten (siehe 2.2.1.2.) wurden zuerst in einer Mischung aus 2 % (v/v) Glutaraldehyd und 3 % (v/v) Formaldehyd (jeweils Endkonzentration, in Puffer 4, 4 °C) 10 min lang fixiert. Zur Immobilisierung der Chloroplasten wurden 50 µl der Suspension auf die adhäsionsfähige Seite eines in einem Spezialhalter (aus Teflon; Eigenbau) montierten *Thermanox Plastic Coverslips (Cell Culture treated on one side, Sterile; Fa. NUNC™, Brand Products)* aufgetragen und 30 min lang erschütterungsfrei sedimentiert (1 x g, RT). Anschließend wurden die Proben 2 mal je 5 min lang mit Puffer 4 gewaschen.

2.5.4.1.2. Immundekoration peripherer Membranproteine an isolierten, intakten Chloroplasten

Mögliche unspezifische Antikörperbindungsstellen auf den vorbereiteten Proben (siehe oben; 2.5.4.1.1.) wurden zuerst 30 min lang in 0,1 M Lysin (in Puffer 4, RT), dann 10 min lang in 1% (w/v) Milchpulver (in Puffer 4, RT) und schließlich 10 min lang mit 1% (w/v) BSA (in Puffer 4, RT) gesättigt. Anschließend wurden die Proben 2 h lang mit einem primären, gegen das zu detektierende Antigen gerichteten Antikörper in geeigneter Verdünnung (in Puffer 4 mit 1 % (w/v) BSA) inkubiert.

Nachfolgend wurde 5 mal je 5 min lang gewaschen (Puffer 4, RT) und danach 1 h lang mit einem (gegen den primären Antikörper gerichteten) sekundären Gold-konjugierten Antikörper immundekoriert [AuroProbe™ EM GAR G 10; oder GAR G 5; oder GAM G 5, Fa. Amersham Life Science; Verdünnung 1 : 50, in Puffer 4 mit 1 % (w/v) BSA]. Abschließend wurden die immundekorierten Proben mit Puffer 4 (5 mal je 15 min lang) gewaschen.

2.5.4.1.3. Abschlussfixierung, Entwässerung, KPT, Beschichtung und Mikroskopie der immundekorierten Proben

Abschlußfixierung, Entwässerung, KPT und Beschichtung (mit C)

Die immundekorierten Proben (siehe oben; 2.5.4.1.2.) wurden nach dem letzten Waschschrift sofort in 4 % (v/v) Glutaraldehydlösung (in Puffer 4) 10 min lang fixiert. Nach Waschen mit Aqua bidest (3 mal je 5 min lang) wurden die Proben, wie unter 2.5.3.1.1., 2.5.3.1.2. und 2.5.3.1.3. beschrieben, entwässert, getrocknet am kritischen Punkt (KPT) und mit Kohlenstoff beschichtet.

Mikroskopie

Die immundekorierten Chloroplasten wurden unter verschiedenen Modi (Hoch- und Niederspannung; Primär- und Sekundärelektronenbild oder eine Mischung beider) an einem REM der Fa. LEO (Typ 1540 FEG) am Lehrstuhl Physik IV (Universität Bayreuth) mikroskopiert (siehe auch 2.5.3.1.3.).

2.5.4.2. Immuncytologische Untersuchungsmethoden im ESEM

Sollen Proben der REM, die durch sekundäre Antikörper, konjugiert mit 10 nm Goldpartikeln immundekoriert wurden, ohne jegliche Beschichtung mit der hinreichenden Auflösung bei den notwendigen höheren Beschleunigungsspannungen mikroskopiert werden, ist das nur im ESEM-Modus eines geeigneten Mikroskops möglich. Die Proben wurden, wie unter 2.5.4.1. beschrieben, vorbereitet und immundekoriert, wobei auf eine abschließende Beschichtung der Proben verzichtet wurde.

Mikroskopie

Die immundekorierten Proben wurden unter verschiedenen Modi (unterschiedliche Beschleunigungsspannungen, Drücke, Arbeitsabstände und Temperaturen; Primär- und Sekundärelektronendetektoren oder eine Mischung beider) an einem ESEM (Fa. FEI, ESEM XL 30 FEG) der Universität des Saarlands, Service Einheit EM, Anatomie und Zellbiologie, mikroskopiert.

2.5.5. Bilderfassung, Bildbearbeitung und Bildauswertung

2.5.5.1. Bilderfassung

Die Bilderfassung in der Elektronenmikroskopie erfolgte entweder herkömmlich durch die Elektronenmikrografie (alle TEM Aufnahmen an der Abteilung EM der Universität Bayreuth) oder auf digitalem Wege (alle REM Aufnahmen; TEM Aufnahmen am Lehrstuhl Physik IV, Universität Bayreuth).

2.5.5.1.1. Elektronenmikrografie

Nach 2 s Belichtungszeit (für TEM Zeiss EM 109 und CEM 902A) der Negative (8 cm x 10 cm Planfilm, Kodak SO 163, für Elektronenmikroskopie) wurden diese in der Dunkelkammer 4 min lang entwickelt (Kodak Professional D-19), anschließend 1 min lang in fließendem Wasser gewaschen und abschließend 5 min lang fixiert (Kodak Superfix; Mischungsverhältnis 1 + 7) Die nach der Fixierung noch 10 min lang gewässerten Negative wurden dann im Negativ-Trockenschrank bei 50 °C 1 h lang getrocknet. Fotografische Abzüge und Vergrößerungen von den Negativen wurden je nach Bedarf in der Dunkelkammer angefertigt (auf Agfa Multicontrast Classic MCC 1 FB, B/W Fiber Base Paper Glossy).

2.5.5.1.2. Digitale Bildaufzeichnung

Digitale Bildaufzeichnungen erfolgten unter Verwendung der jeweiligen an den Mikroskopen angeschlossenen verfügbaren Geräte und Programme. Zur Bildbearbeitung und -auswertung wurden die aufgezeichneten Bilder entweder als TIF-, JPEG-Format gespeichert. Nicht digitalisierte Bilder oder Negative (siehe oben; 2.5.5.1.1.) wurden mit Hilfe eines Scanners (Fa. Hewlett Packard, mit Durchlichteinheit) am LS Pflanzenphysiologie, Universität Bayreuth digitalisiert.

2.5.5.2. Bildbearbeitung und Bildauswertung

Flächenmessungen bzw. Quantifizierungen immunologisch nachgewiesener Proteine erfolgten mit Hilfe der Bildauswertungssoftware Image Pro Plus (CAMBASE SOFTWARE) gemäß Anwendungsvorschrift;

Um eine optimale Bildauswertung zu ermöglichen, wurden die digitalisierten Bilder mit der Bildbearbeitungssoftware (Adobe Photoshop 6.0) bearbeitet.

2.6. Molekularbiologische Methoden

Da es sich bei den hier angewendeten molekularbiologischen Methoden um bekannte und gebräuchliche Standardmethoden handelte und oftmals käufliche Isolations-, Reinigungs-, und Analyse-*Kit`s* verwendet wurden, soll hier auf eine detaillierte Beschreibung weitgehend verzichtet und statt dessen auf entsprechende Literatur verwiesen werden (siehe auch die Diplomarbeiten von Bartsch, Sandra und Bauerschmitt, Heike; Lehrstuhl Pflanzenphysiologie, Bayreuth, sowie die Literaturangaben von Reinbothe, Christiane und Reinbothe, Steffen).

2.6.1. Extraktion der RNA aus Gerstenprimärblättern

Für die Extraktion der Gesamt-RNA wurde der RNeasy Mini Kit (Fa. Qiagen) verwendet und entsprechend dem RNeasy Mini Protokoll zur Isolierung von Gesamt-

RNA aus pflanzlichen Geweben gearbeitet. Die genaue Zusammensetzung der hierbei verwendeten Puffer ist ebenfalls dort zu finden.

Die Probennahme und das Aufbrechen des Zellmaterials erfolgten auf die bereits unter 2.4.1. beschriebene Weise. Nachdem zu dem aufgebrochenen, gefrorenen Zellmaterial 450 µl RLT-Puffer gegeben worden war, wurde dieses darin suspendiert. Die sich ergebenden Lysate wurden auf vorbereitete Säulen (*QIAshredder spin column*) pipettiert und 2 min bei RT und 12000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss daran überführte man den sich im Auffangbehälter befindenden Durchfluss in ein neues RNase-freies ERG. Nachdem zu jedem Lysat 225 µl Ethanol (p. a.) gegeben worden war, wurde schnell gemischt und die Proben auf vorbereitete Säulen (*RNeasy mini column*) aufgetragen. Nach einer 15 sec dauernden Zentrifugation bei RT und 10000 rpm wurden die Säulen mit jeweils 700 µl RW1-Puffer gewaschen, in frische Auffangbehälter gesetzt und zweimal mit je 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Um die RNA, die sich nun auf der RNeasy Silica-Gel-Membran in der jeweiligen Säule befand, zu trocknen, wurde im Anschluss an den letzten Waschschrift bei RT und 10000 rpm für eine Dauer von 2 min zentrifugiert. Nachdem die Säulen in ein frisches ERG gesetzt worden waren, eluierte man die RNA mit 50µl RNase-freiem Wasser (1 minütiges Zentrifugieren bei RT und 10000 rpm). Dieser Vorgang wurde ein zweites Mal wiederholt. Bevor die Reinheit und die Konzentration der isolierten Gesamt-RNA bestimmt wurde, bewahrte man die Proben auf Eis auf bzw. lagerte die RNA bei -80°C.

2.6.2. Bestimmung von Konzentration und Reinheit der isolierten RNA

Mittels der gemessenen Absorptionswerte bei Wellenlängen von 260 und 280 nm (UV/Vis Spectrophotometer DU 650) war es möglich, die jeweilige RNA-Konzentration in der Probe nach folgender Formel zu berechnen:

$$1 A_{260} = 40 \mu\text{g/ml RNA (s. MANIATIS)} \quad (5)$$

Vor der Absorptionsmessung wurde das Photometer mit Aqua bidest. auf den Nullwert geeicht und alle Proben mit RNase-freiem Wasser im Verhältnis 1:100 verdünnt.

Die Reinheit der RNA ergab sich aus dem Verhältnis von A_{260}/A_{280} , welches bei reiner RNA ~ 1,6 – 1,8 beträgt.

2.6.3. Ethanol-Präzipitation

Bevor die isolierte Gesamt-RNA in einem 1,2 %igen Formaldehyd-Agarose-Gel getrennt werden konnte, wurde sie mittels Ethanol präzipitiert. Die Proben-Volumina wurden zu diesem Zweck mit 1/10 des Volumens an 3 M Kaliumacetat und dem 2,5-fachen Volumen an EtOH versetzt und über Nacht bei -20°C gefä llt. Es folgte eine 20 minütige Zentrifugation bei 4°C und 14000 rpm, nach der der Überstand verworfen wurde. Das Trocknen der RNA-Pellets erfolgte im Anschluss daran bei RT und das Pellet wurde anschließend in einem zur Weiterverarbeitung entsprechenden Volumen an RNase-freiem H_2O aufgenommen.

2.6.4. Trennung und Nachweis der RNA

2.6.4.1. Agarose-Gelelektrophorese

Um die isolierte Gesamt-RNA aufzutrennen, wurde ein 1,2 %-iges Formaldehyd (FA)-Agarose-Gel der Größe 14 cm \times 12 cm benutzt. Tabelle 4 a zeigt die Zusammensetzung des verwendeten Puffers, Tabelle 4 b die Zusammensetzung des 1,2 %igen FA-Agarose-Gels.

Tab. 4a: Zusammensetzung des MOPS-Puffers (10x)

	MOPS-Puffer (10x)
MOPS	0,038 M
NaAcetat	0,625 M
0,5 M EDTA (pH 8,0)	0,01 M
DEPC-Wasser	ad 1 l

Tab. 4b: Zusammensetzung des 1,2 %igen FA-Agarose-Gels

	1,2 %iges FA-Agarose-Gel
Agarose	1,2 % (w/v)
37 % (v/v) Formaldehyd	1,1 % (v/v)
10 x MOPS-Puffer	1 x
DEPC-Wasser	ad 100 ml
EtBr 1 % (w/v)	3 µl

Die getrockneten RNA-Pellets (vgl. 2.6.3.) wurden jeweils in 5,6 µl DEPC-Wasser, 2,5 µl 10 × MOPS-Puffer, 4,4 µl 37 %-igem Formaldehyd und 12,5 µl Formamid gelöst. Nach Mischen der Proben wurde die gelöste RNA 15 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert und 5 min im Eiswasser abgekühlt. Nach Zugabe von jeweils 3 µl Agarose-Gel-Auftragspuffer (vgl. Tab.10) wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde über einen Zeitraum von 3 h bei einer Spannung von 5 V/cm (Elektrophoresesystem der Fa. BioRad Laboratories GmbH) durchgeführt, wobei ein Marker (*High-range-RNA-ladder*) der Fa. Fermentas als Längenstandard diente.

Tab. 5: Zusammensetzung des verwendeten Auftragspuffers

	Auftragspuffer: Agarose-Gele (10 x)
Na₂EDTA	0,1 M
SDS	1,0 % (w/v)
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Xylencyanol	0,25 % (w/v)

2.6.4.2. Alkalischer *Northern Blot*

Bei dieser Methode des Kapillar-*Blottings* wird die mittels FA-Agarose-Gel getrennte Gesamt-RNA auf eine Nylonmembran übertragen. Zu diesem Zweck wurden auf einen ca. 2-3 cm hohen Stapel aus Zellstoff vier Schichten trockenes Whattman 3MM Filterpapier und eine Schicht in Transferpuffer (TrP: 3 M NaCl, 8 mM NaOH) getränktes 3MM Filterpapier gelegt, bevor die in Aqua bidest. äquilibrierte Nylonmembran darauf zum Liegen kam. Diese wurde dann vom FA-Agarose-Gel und von weiteren drei Lagen mit TrP getränktem 3MM Filterpapier bedeckt. Die sog. „Brücke“, deren Aufgabe es ist, den Puffer aus dem Sammelbehälter auf den *Blot* zu leiten, bestand ebenfalls aus zwei Lagen mit TrP getränktem 3MM Filterpapier. Nach Abschluss des alkalischen *Blot*-Vorgangs (24 h; RT) wurde die Nylonmembran für 15 min in Neutralisierungspuffer (0,2 M Natriumphosphat pH 6,8) geschwenkt. Die Fixierung der RNA erfolgte bei einer Temperatur von 80°C für 20 min.

2.6.4.3. RNA-Nachweis durch Sonden-Hybridisierung

Im Folgenden wird der RNA-Nachweis durch Sonden-Hybridisierung nur für den cDNA-Klon von *lls1* (Pao, *Zea mais*, accession number: U77346) beschreiben. Weitere Sonden-Hybridisierungen zum RNA-Nachweis von LHC II (*Type I*, *Hordeum vulgare*: accession number: X89023), PsaN (*Photosystem I subunit N*, *Hordeum vulgare*: accession number: X66428), PsaL (*Photosystem I subunit L*, *Hordeum vulgare*: accession number: M61146 J05758), PsaF (*Photosystem I subunit F*, *Hordeum vulgare*: accession number: U08135) und Rbcs (kleine Untereinheit der Rubisco – SSU- siehe Dissertation von Herrn Valdes, Oscar; LS Pflanzenphysiologie, Universität Bayreuth) erfolgten analog. Die vollständigen Sequenzinformationen finden sich in der Datenbank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entry>).

2.6.4.3.1. Markierung der verwendeten Sonde

Zur Markierung der verwendeten *l1s1*-Sonde benutzte man das *RadPrime DNA Labeling System* (Fa. Invitrogen GmbH). Die dazu benötigten radioaktiv markierten Nukleotide [α^{32} -P] dATP und [α^{32} -P]dCTP wurden von der Fa. Perkin Elmer Life Sciences Inc. bezogen und besaßen eine spezifische Aktivität von 3000 Ci/mmol. Um den partiellen cDNA-Klon von *l1s1* aus Mais als Sonde benutzen zu können, wurde dieser zunächst aus dem Plasmid-Vektor geschnitten, gereinigt, 5 min bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt.

Nachdem die für die Synthese des Stranges benötigten Komponenten:

- jeweils 1 μ l nicht markierte Nukleotide (10 μ M]
- jeweils 5 μ l radioaktiv markierte Nukleotide (50 μ Ci)
- 20 μ l 2,5 x Random Primer Solution
- 17 μ l Aqua bidest.

hinzugefügt worden waren, wurde gemischt und die Reaktion durch Zugabe von 1 μ l des Klenow-Fragments gestartet. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei 37°C beendete die Zugabe von 5 μ l Stop Puffer die Reaktion. Im Anschluss daran wurde die radioaktiv-markierte Sonde von der noch freien Reaktivität getrennt (Microspin™ S-200 HR *Columns*; Amersham).

2.6.4.3.2. Hybridisierung der verwendeten Sonde

Nach zweistündiger Inkubation (Prähybridisierung) bei 62°C in HYB-9 Hybridisierungslösung (Fa. Genra Systems) erfolgte die Hybridisierung mit insgesamt 55 μ l radioaktiv markierter *l1s1*-Sonde in 10 ml Hybridisierungslösung bei 62°C über Nacht. Insgesamt folgten darauf vier Waschschr ite [2 \times 30 min mit Puffer W1 (2 \times SSC/0,5 % SDS); 2 \times 30 min mit Puffer W2 (0,5 \times SSC/0,1 % SDS); jeweils bei 50°C) nach denen der *Blot* bei -70°C über einen Zeitraum von 22 h auf einem Röntgenfilm exponiert wurde. Die an dieser Stelle verwendete Photokassetten, *Screens* (Kodak BioMax TranScreen – HE) und Filme (Kodak BioMax MS) wurden von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech AB und Eastman Kodak Company

bezogen. (Die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen können den Angaben des Herstellers entnommen werden.)

2.6.5. Proteinimportstudien und Identifizierung möglicher Interaktionspartner durch Vernetzungs-Experimente (*Crosslinking*)

2.6.5.1. Herstellung von cDNA-Konstrukten, die für transA-DHFR-Fusionsproteine kodieren und Amber-Stop-Kodonen im TransA-Teil enthalten

Die Herstellung des transA-DHFR cDNA-Klons, der für ein Fusionsprotein aus dem Transitpeptid von pPORA und der cytosolischen Dihydrofolatreduktase kodiert, wurde zuvor beschrieben (REINBOTHE *et al.*, 1997). Diese DNA wurde als Template in den nachfolgenden PCR-Reaktionen eingesetzt.

Drei verschiedene Konstrukte wurden hergestellt, die sich durch die Position des Amber-Stop-Kodons im Transitpeptid von PORA unterscheiden: am 5'-Ende (PCR1, zur Klonierung der cDNA des Fusionsproteins TransA2-DHFR), am 3'-Ende (PCR2 zur Klonierung der cDNA des Fusionsproteins TransA3-DHFR) bzw. am 5'-und am 3'-Ende (PCR3, zur Klonierung der cDNA des Fusionsproteins TransA1-DHFR)). Für die PCR 1 wurden die Primer Sup4 (5'-AAAGGATCCATGGCTTAGCAGCTTCTCCCCTCCACC-3') und tr2 (5'-TATGCCGGATCCGCTCGGCGACGCGGTCTCGA-3'), für die PCR 2 die Primer NT (5'-GAGAGAGGATCCCAAGCTCACCGTCATCCATGGCT-3') und Sup5 (5'-AAAGGATCCCTACGGCGACGACGCGGTCTCGA-3') für die PCR 3 die Primer Sup4 und Sup5 verwendet. Die PCR wurde mit dem „Expand High Fidelity PCR System“ der Firma Roche entsprechend den Instruktionen des Herstellers unter Verwendung folgender Zyklen durchgeführt: 95°C 2min, 39 Zyklen bestehend aus 95°C 1min, 50°C 2min und 72°C 3min sowie 1 Zyklus 72°C 5min. Die PCR-Produkte wurden auf einem Ethidiumbromid-haltigen, 1%igen Agarose-TAE-Gel (s. SAMBROOK *et al.*, 1989) getrennt und die im UV-Licht sichtbar gemacht. Die PCR-Produkte, die der erwarteten Größe entsprachen, wurden ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des QIAEX^RII-Gel Extraction Kits isoliert. Die DNA wurde dann einem Restriktionsverdau mit BamHI (Roche) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers unterzogen und nach einer erneuten Aufreinigung durch Phenol-Chloroform-Extraktion

(SAMBROOK *et al.*, 1989) in den bereits früher verwendeten BamHI-geschnittenen Vektor pSP64-DHFR (REINBOTHE *et al.*, 1997) ligiert. Die richtige Orientierung bzw. die Korrektheit der durch PCR amplifizierten Sequenz wurden durch Sequenzierung (mit Hilfe eines T7-DNA-Sequencing-Kits von Promega und dem von SANGER *et al.* (1977) beschriebenen Gel-Systems) überprüft.

2.6.5.2. Synthese von (Tmd)Phe-haltigen, radioaktiv markierten transA-DHFR-Polypeptiden sowie der radioaktiv markierten pPORA, pPORB, transA-DHFR und transB-DHFR Präkursoren durch gekoppelte *In-vitro*-Transkription/Translation

TransA-DHFR-Fusionsproteine, die den (Tmd)Phe-Rest (L-[3-(Trifluoromethyl)-3-diazirin-3H-yl]phenylalanin) an den Positionen 2 plus 65 (TransA1-DHFR), nur an Position 2 (TransA2-DHFR) bzw. nur an Position 65 (TransA3-DHFR) des Transitpeptides enthielten, wurden in Gegenwart von ^{35}S -Methionin und der (Tmd)Phe-Suppressor-tRNA, die uns freundlicherweise von J. Brunner, ETH Zürich, Schweiz, zur Verfügung gestellt wurde, translatiert. Die Methode beruht darauf, dass die zuvor auf DNA-Ebene künstlich eingeführten Amber-Kodonen dann durch eine Amber-Suppressor-tRNA, die den (Tmd)Phe-Träger trägt, "dechiffriert" werden können. Die anderen Polypeptide (pPORA, pPORB, transA-DHFR und transB-DHFR; s. REINBOTHE *et al.*, 1997), die nicht zum Photocrosslinking eingesetzt wurden, wurden nur in Gegenwart von ^{35}S -Methionin translatiert. Die *In-vitro*-Transkription/Translation wurde in einem TNT-T7/SP6 gekoppelten *In-vitro*-Transkriptions/Translations-Weizenkeimsystem der Firma Promega entsprechend den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Für die *In-vitro*-Transkription wurden die folgenden RNA-Polymerasen (Promega) eingesetzt: SP6-RNA-Polymerase für transA- und transB-DHFR-Konstrukte (unabhängig von der Einführung der (Tmd)Phe-Reste), T7-RNA-Polymerase für pPORA und T3-RNA-Polymerase für pPORB.

2.6.5.3. *In-vitro*-Import von Vorstufenproteinen in isolierte Chloroplasten und Photocrosslinking

Chloroplasten wurden aus Gerstenprimärblättern (5 cm lange Segmente, 1 cm von der Blattspitze wurde entfernt) isoliert, die entweder frisch geerntet wurden, 24 h auf Wasser oder auf einer 45 μ M Methyljasmonat-haltigen wässrigen Lösung flotiert worden waren. Die Chloroplasten wurden durch Zentrifugation über einen Percoll (Pharmacia-LKB Schweden)-Gradienten angereichert und weiter durch Flotation auf einem Percoll-Kissen aufgereinigt (REINBOTHE *et al.*, 1990, 1993).

Für die Importstudien wurden die *in vitro* synthetisierten, radioaktiv markierten und (Tmd)Phe-haltigen Vorstufenproteine (s. vorheriger Abschnitt), 5×10^7 Plastiden pro 50 μ l Importreaktion (ausgezählt mit einem Hämocytometer) und der Importpuffer von DELLA-CIOPPA *et al.* (1986) eingesetzt. Die eingesetzten ATP- und GTP-Konzentrationen sind an der entsprechenden Stelle im Ergebnisteil angegeben. Sollte der Import in Protochlorophyllid (Pchlid)-haltige Plastiden getestet werden, so wurden die Chloroplasten vor dem eigentlichen Importversuch mit σ -Aminolävulinsäure (σ -ALA) (0,5 mM Endkonzentration in einem Phosphatpuffer, REINBOTHE *et al.*, 1995) bei 25°C in der Dunkelheit für 15 min inkubiert, um die intraplastidäre Pchlid-Produktion zu induzieren. Kontrollchloroplasten wurden nur in Phosphatpuffer ohne σ -ALA unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Die eigentliche Importreaktion wurde bei 23°C im Dunkeln für 15 min durchgeführt. Das *Photocrosslinking* wurde durch 1 min Bestrahlung mit einer UV-Lampe, wie bei HIGH *et al.* (1991) beschrieben, ausgelöst.

2.6.5.4. Proteinextraktion und Analyse der *Crosslink*-Produkte durch Autoradiographie und nach Immunpräzipitation

Nach der Durchführung des *Photocrosslinking* wurden die Plastiden auf einem Percoll-Kissen (s. oben) aufgereinigt und die Proteine wurden dann nach Aufschluss der Chloroplasten durch Ultraschall mit Trichloressigsäure (5% [w/v]) präzipitiert und zur anschließenden Auftrennung durch Polyacrylamidgelelektrophorese weiter verarbeitet (REINBOTHE *et al.*, 1990). Die Proteine wurden auf eindimensionalen SDS-Polyacrylamidgelen (Gradient von 12,5 bis 20% Polyacrylamid) (LAEMMLI,

1970) aufgetrennt und durch Autoradiographie (Kodak BioMax MR Film, Firma Sigma-Aldrich) sichtbar gemacht.

Die Immunpräzipitation wurde, wie bei WIEDMANN *et al.* (1987) beschrieben, mit den bei REINBOTHE *et al.* (2004) beschriebenen Antiseren durchgeführt.

2.7. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Statistica 6.1 (STAT SOFT INC., TULSA, USA, 2004). Alle zu vergleichenden Stichproben wurden zunächst auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) und Homogenität der Varianzen (Levene-Test) geprüft. Im Falle der Normalverteilung und Homogenität der Varianzen wurde zum Vergleich zweier Stichproben der t-Test (nach Student) verwendet. Für Vergleiche von Stichproben mit der Kontrolle kam der Dunnett-Test zur Verwendung. Multiple, orthogonale (*a priori*) Vergleiche von Stichproben mit der Kontrolle wurden durch eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA = Analysis Of Variance) getestet. Waren Normalverteilung und Homogenität der Varianzen nicht gegeben, wurde zum Vergleich zweier Stichproben ein Mann-Whitney-U-Test und zum Vergleich mehrerer Stichproben eine Kruskal-Wallis-ANOVA angewandt.

Die Grafiken sind mit dem Programm Microcal Origin (Version 3.54) erstellt. Bei den numerischen Werten sind jeweils die Mittelwerte \pm Stichproben-Standardabweichung dargestellt.

Die Kennzeichnung von Signifikanzniveaus erfolgt durch die Sternsymbolik: $p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***.

3. Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollten seneszenzbedingte Veränderungen an Plastiden untersucht werden. Dabei sollte die Frage beantwortet werden, ob die Plastidenhüllmembran bis in relativ späte Phasen der Seneszenz unverändert bleibt, oder ob es schon in frühen Abschnitten der Plastidenentwicklung zu (seneszenz-)spezifischen Veränderungen kommt. Ein besonderer Schwerpunkt des Interesses galt dem Proteinimportapparat der Plastiden, der so genannten TIC/TOC-Maschinerie (TIC = *Translocon of the Inner Chloroplast Envelope*; TOC = *Translocon of the Outer Chloroplast Envelope*). Dabei handelt es sich um Multiproteinkomplexe, die in die innere bzw. äußere Plastidenhüllmembran eingebettet sind. Dazu musste zunächst ein experimentelles System ausgewählt und etabliert werden, mit dem es möglich wäre, Seneszenz in Primärblättern der Gerste gezielt zu induzieren und deren Ablauf, im Vergleich zur natürlichen Seneszenz, zu beschleunigen. Dieses induzierbare System wurde mit der natürlichen Seneszenz auf biochemischer-, molekularbiologischer-, makroskopischer- und elektronenmikroskopischer Ebene verglichen. Es wurden dazu verschiedene Parameter auf ihre Eignung als verlässliche, seneszenzspezifische Marker hin untersucht.

3.1. Auswahl eines experimentellen Systems zur Seneszenzinduktion mit Hilfe seneszenzspezifischer Marker

Die Merkmale, die als Marker von seneszenzbedingten Veränderungen an Plastiden herangezogen werden sollen, müssen - alleine für sich, oder auch in Kombination miteinander - einen gut erkennbaren, kausalen Zusammenhang zum Phänomen Seneszenz aufweisen. Daneben sollen diese seneszenzspezifischen Marker verlässlich (reproduzierbar) und experimentell gut zu erfassen sein. Diese Kriterien erfüllen Veränderungen des Chlorophyllgehalts und der Ultrastruktur.

Verfahren und Behandlungen, die potentiell dazu geeignet erscheinen, das Phänomen Seneszenz vorzeitig auszulösen und dessen Ablauf zu beschleunigen, müssen zuerst, um der physiologischen Gesamtsituation wie z. B. *Source – Sink*-Beziehungen, der Kommunikation zwischen entfernten Pflanzenorganen und/oder der Wettbewerbssituation um Nährstoffe, Licht und Raum (THOMAS und STODDART, 1980) gerecht zu werden, an ganzen Pflanzen getestet werden. Gerade bei einem experimentellen System mit monokarpen Pflanzen (in dieser Arbeit: *Hordeum vulgare* L., *Poaceae*), bei denen die Seneszenz nahezu während der gesamten Lebensspanne sukzessive abläuft und ja letztendlich zum Absterben der ganzen Pflanze führt (NOODÉN *et al.* 1997), ist es von entscheidender Bedeutung, einen kausalen Zusammenhang zwischen der Behandlung und dem Erscheinen von seneszenzspezifischen Markern herstellen zu können.

3.1.1. Veränderungen des Chlorophyllgehalts in Abhängigkeit von der Behandlung der Primärblätter

Ein wesentliches, makroskopisch sehr auffälliges Merkmal der natürlichen Seneszenz ist das „Ausbleichen“ der Blätter durch Chlorophyllverlust (GRUMBACH und LICHTENTHALER, 1973; HIDEMA *et al.*, 1992; WILSON *et al.*, 2002; HÖRTENSTEINER, 2006). Auf die Fähigkeit, vorzeitig einen Chlorophyllabbau in Gerstenprimärblättern hervorzurufen, wurden vier unterschiedliche Behandlungen an ganzen, acht Tage alten Gerstenpflanzen getestet. Dabei wurden zwei unterschiedliche physikalische Behandlungen (Verdunkelung der Pflanzen oder Bestrahlung mit UV-Licht) und zwei unterschiedliche Phytohormonbehandlungen (Inkubation mit Ethylen oder Methyljasmonat) angewendet (7 Tage lang). Zur Kontrolle wurden Gerstenpflanzen ohne jegliche Behandlung verwendet (siehe 2. Material und Methoden).

Als Bezugsgröße für den Chlorophyllgehalt wurde entweder eine Blattflächeneinheit oder das Blattfrischgewicht eingesetzt. In Abb. 3C sind die Chlorophyllgehalte pro Frischgewicht in Abhängigkeit von der jeweiligen Behandlung dargestellt. Während bei Blättern der Kontrollpflanzen und der Pflanzen unter Ethyleneinfluss keine Änderung des Chlorophyllgehalts über die gesamte Versuchsdauer festzustellen war, zeigten die Blätter der Pflanzen nach Dunkelinkubation und unter

Methyljasmonateinfluss nach dem ersten Tag einen stetigen Verlust an Chlorophyll (pro Frischgewicht) von $1,25 \text{ mg g}^{-1}$ auf $0,7 \text{ mg g}^{-1}$. Unter UV-Einfluss stieg der Chlorophyllgehalt unmittelbar nach Applikationsbeginn bis zu einem Höchstwert von etwa $3,5 \text{ mg g}^{-1}$ (nach 5 Tagen). Wurde allerdings die Entwicklung des Frischgewichts pro Blattfläche in Abhängigkeit zur jeweiligen Behandlung betrachtet (Abb. 3D), so ging der Chlorophyllanstieg (pro Frischgewicht) unter UV- Einfluss mit einem starken Abfall des Frischgewichts pro Blattfläche einher (von ca. 275 g m^{-2} auf 50 g m^{-2}). Deshalb handelt es sich hierbei nur um einen scheinbaren Chlorophyllanstieg, der einzig durch das dramatische Absinken des Blattfrischgewichts hervorgerufen wird. Dies wird durch eine makroskopisch sofort erkennbare Erscheinungsform der UV-bestrahlten Blätter (grün-gelbe, fast heuartig trockene Blätter) belegt (Daten nicht gezeigt). Bei allen anderen Behandlungen wurden keine Veränderungen des Frischgewichts pro Blattfläche beobachtet (das Anfangsniveau blieb nahezu konstant; siehe Abb. 3D). Somit eignet sich die Angabe des Chlorophyllgehalts pro Frischgewicht – vor allem zum Vergleich der unterschiedlichen Behandlungen - nicht für alle Untersuchungen gleichermaßen.

Als geeignet hingegen erwies sich der Bezug des Chlorophyllgehalts auf eine Blattflächeneinheit, wie in Abb. 3A dargestellt: Bei Blättern der Kontrollpflanzen und der Pflanzen unter Ethyleneinfluss war keine Änderung des Chlorophyllgehalts über die gesamte Versuchsdauer festzustellen; es wurde ein gleich bleibender Gehalt von ca. $350 \text{ mg Chlorophyll pro m}^2$ Blattfläche festgestellt. Obwohl ein Ansteigen der (endogenen) Ethylenproduktion als eine Begleiterscheinung der Seneszenz bekannt ist, scheint exogen appliziertes Ethylen kein Initiator von Blattseneszenz zu sein (ORZÁEZ *et al.* 1999). Da eine Ethylen-Behandlung der Gerstenpflanzen in unseren Versuchen (mit reifen Äpfeln, siehe Material und Methoden) offensichtlich keinen Chlorophyllverlust in den Blättern hervorruft – der ja ein wesentliches Merkmal der Seneszenz darstellt (s. o.) – ist diese Behandlungs-Variante zur Auslösung der künstlichen Seneszenz nicht geeignet.

In den ersten 3 Tagen der UV-Bestrahlung war kein Chlorophyllverlust festzustellen, dann folgte jedoch ein starker Chlorophyllverlust innerhalb der beiden folgenden Tage von ca. 375 mg m^{-2} an Tag 3 auf ca. 200 mg m^{-2} an Tag 5. Danach wurde bis zum Versuchende kein weiterer Chlorophyllverlust beobachtet.

Bei Dunkelinkubation war in den ersten 3 Tagen lediglich ein leichtes Absinken des Chlorophyllgehalts zu verzeichnen, von ca. 350 mg m^{-2} beginnend an Tag 1 auf ca.

300 mg m⁻². Dieser Wert blieb dann bis Tag 3 unverändert. Anschließend war ein deutlicher, stetiger Chlorophyllverlust bis zum Versuchende zu verzeichnen (von ca. 300 mg m⁻² bis ca. 175 mg m⁻² an Tag 7).

Unter Methyljasmonateinfluss wurde vom ersten Tag der Inkubation an ein stetiger Chlorophyllverlust der Blätter registriert (von ca. 350 mg m⁻² bei Versuchsbeginn bis ca. 170 mg m⁻² an Tag 5). Von Tag 5 bis zum Versuchende blieb dieser niedrige Chlorophyllgehalt erhalten.

Sowohl eine UV-Bestrahlung, als auch eine Dunkelinkubation oder Methyljasmonatbehandlung hatten das Potential, zu einem Chlorophyllverlust, wenn auch in zeitlich und quantitativ unterschiedlicher Ausprägung, in den Gerstenprimärblättern zu führen und erfüllten somit ein Kriterium in Bezug auf die Seneszenz. Ob allerdings die Mechanismen, die zu einem Chlorophyllverlust führten, auch bei allen Behandlungen ursächlich mit dem Phänomen der Seneszenz verbunden sind, soll durch die nachfolgenden Untersuchungen festgestellt werden.

Dazu wurde, neben dem Gehalt an Gesamtchlorophyll, das Verhältnis von Chlorophyll *a* zu Chlorophyll *b* (Chlorophyll *a/b*) untersucht. Mit Hilfe von Änderungen im Chlorophyll *a/b* Verhältnis können einerseits Rückschlüsse über den Chlorophyllabbau (ITO, 1993; ITO 1996; MATILE, 1996; MATILE, 1999; HÖRTENSTEINER, 2006) und andererseits über die Zusammensetzung der Photosysteme gewonnen werden (GREENBAUM und MAUZERAALL, 1991).

In Abb. 3B sind die Chlorophyll *a/b* Verhältnisse in Abhängigkeit der Behandlung dargestellt: Bei Kontrollpflanzen und Pflanzen unter Ethyleneinfluss blieb das Chlorophyll *a/b* Verhältnis der Primärblätter über die gesamte Versuchsdauer bei einem Wert von ca. 2,8 (relative Einheiten). Wie schon beim Chlorophyllgehalt festgestellt wurde, zeigte eine Ethylen-Behandlung auch in Bezug auf das Chlorophyll *a/b* Verhältnis keinerlei Einfluss. Es kann davon ausgegangen werden, dass somit weder ein seneszenzbedingter Chlorophyllabbau noch Änderungen in der Zusammensetzung der Photosysteme erfolgten.

Bei Primärblättern von im Dunkeln inkubierten Pflanzen ist am dritten Tag nach Beginn der Behandlung ein leichter Anstieg des Chlorophyll *a/b* Verhältnisses von 2,8 (Ausgangswert) auf ca. 3,3 zu beobachten, der mit leichten Schwankungen bis zum Ende des Versuches gehalten wird. Zum gleichen Befund, nämlich einem Ansteigen des Chlorophyll *a/b* Verhältnisses nach dem dritten Tag (von ca. 2,3 auf letztendlich 3,2), kommen PRUŽINSKÁ *et al.* (2005) bei Verdunklung von

abgeschnittenen *Arabidopsis thaliana* Blättern. Dieses Ansteigen des Chlorophyll *a/b* Verhältnisses - in Kombination mit dem ebenfalls am dritten Tag einsetzenden Verlust an Gesamtchlorophyll (s. o.) - wird hier allerdings nur in Zusammenhang mit generellen Chlorophyllabbau-Mechanismen gesehen. Auch SCHEUMANN *et al.* (1999) stellten nach Dunkel-Inkubation von Gerstenblättern ein ansteigendes Chlorophyll *a/b* Verhältnis fest und folgerten daraus, dass Chlorophyll *b* relativ zu Chlorophyll *a* stärker abnimmt, was darauf schließen lässt, dass hauptsächlich die Antennenkomplexe der Photosysteme bevorzugt von einer Degradation betroffen sind. Dass es sich lediglich um eine Anpassung (Schattentoleranz) der Pflanzen handeln könnte, ist auszuschließen, da sich dann das Chlorophyll *a/b* Verhältnis in Folge des steigenden Chlorophyll *b* Anteils (zur besseren Ausnutzung der „Grünlücke“ zwischen 480 nm und 550 nm bei schwachen Strahlungsintensitäten vergrößern sich die Antennenkomplexe) verringern müsste, (KITAJIMA und HOGAN, 2003; HANSEN *et al.*, 2002).

Unter UV Einfluss findet von Beginn der Behandlung ein stetiger Abfall des Chlorophyll *a/b* Verhältnisses statt (von ca. 2,8 zu Beginn der Behandlung auf 1,5 an Tag 5). In den folgenden zwei Tagen bleibt das Chlorophyll *a/b* Verhältnis auf diesem unteren Niveau. UV-Strahlen, v. a. die UVB-Anteile (Wellenlänge: $\lambda = 280 - 320$ nm) verursachen multiple physiologische und biochemische Veränderungen in Pflanzen, einschließlich der Inhibition der Photosynthese (TERAMURA, 1983; STRID *et al.*, 1990; BORNMANN und TERAMURA, 1993). Diese Inhibition ist gemäß HIDEMA (2006) auch zurück zu führen auf reduzierte Gehalte an Chlorophyll und LHCII (*light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein of photosystem II*). Dabei spielen potentiell zwei primäre Schädigungsmechanismen eine Rolle: Einerseits führen hohe UVB-Dosen zu DNA-Läsionen, die mit der DNA-Replikation und DNA-Transkription interferieren (BRITT, 1996). Andererseits unterliegen Proteine (v. a. der Photosysteme) in Folge von Photooxidation, durch freie Radikale oder ROS (*reactive oxygen species*) Modifikationen, die zu einer Denaturierung und zum verstärkten Abbau führen (CALDWELL, 1993; WILSON *et al.*, 1995; BORKMANN und MCLOUGHLIN, 1995; GREENBERG *et al.*, 1996). Aber auch schon geringe UVB Strahlungsintensitäten sind in der Lage, eine Degradation des zentralen D2 Proteins des Photosystem II (PS II) zu bewirken (JANSEN *et al.*, 1996), das dann zur Degradation des ganzen PS II Komplexes führen kann. Das zuletzt sehr niedrige Chlorophyll *a/b* Verhältnis zeigt, dass offensichtlich nicht nur geregelter

Chlorophyllabbau sondern weitergehende Schädigungen vorhanden sein müssen. Ein sehr wichtiger Schritt beim Chlorophyllabbau ist das Entfernen des zentral gebundenen Magnesiums aus dem Chlorophyllmolekül, der zum Phaeophytin führt (HÖRTENSTEINER, 2006). Dies geschieht normalerweise auf enzymatischem Wege (*metal chelating substance* = MCS), wird aber auch durch Inkubation von Chlorophyll im sauren Milieu, wie es beispielsweise in der Vakuole der Pflanzenzelle herrscht, erreicht. Dies könnte durch eine nachhaltige Schädigung sowohl der Zellabgrenzung, als auch der Chloroplastenmembranen in Folge hoher UV-Strahlungsintensitäten geschehen und müsste dann allerdings als dramatische ultrastrukturelle Veränderungen erkennbar sein.

Der bei Methyljasmonatinkubation beobachtete stetige Chlorophyllverlust der Blätter wird von Beginn der Behandlung an von einem Rückgang des Chlorophyll *a/b* Verhältnisses (von ca. 2,8 zu Beginn der Behandlung auf ca. 2,15 an Tag 3) begleitet, allerdings erreicht das Chlorophyll *a/b* Verhältnis bis zum Ende des Versuches wieder den Ausgangswert (2,8).

Einen vergleichsweise schnellen Chlorophyllabbau bei Gerstenblättern unter Methyljasmonateinfluss konnten auch RODINI *et al.* (1998) feststellen, wobei eine gesteigerte Aktivität der Pheophorbid *a* Oxygenase (PAO) – ein Schlüsselenzym des Chlorophyllabbaus – registriert wurde. Die von HÖRTENSTEINER (2006) proklamierte exklusive Spezifität der PAO für sein Substrat Pheophorbid *a* – einem Zwischenprodukt des Chlorophyll *a* Abbaus - und die gesteigerte PAO Aktivität unter Methyljasmonateinfluss würden bedeuten, dass zuerst bevorzugt Chlorophyll *a* einer Degradation unterzogen wird, was zur Folge hätte, dass sich das Chlorophyll *a/b* Verhältnis vermindert. Eine Grundvoraussetzung für den Abbau von Chlorophyll *b* via PAO ist dessen Umwandlung zu Chlorophyll *a* (ITO, 1993; ITO und TANAKA, 1996; MATILE, 1996; MATILE und THOMAS, 1999) durch eine Chlorophyll *b* Reduktase. Das so entstandene Chlorophyll *a* wird nun durch eine Chlorophyllase in Chlorophyllid *a* (Chlid *a*) und den Phytolrest gespalten (BENEDETTI und ARRUDA, 2002; HÖRTENSTEINER, 1999). Anschließend wird das zentrale Mg^{2+} Ion durch eine MCS freigesetzt (SUZUKI *et al.* 2005). Es ist durchaus vorstellbar, dass das Enzym Chlorophyll *b* Reduktase, (und evtl. auch Chlorophyllase und MCS) mit einiger Verzögerung an die durch Methyljasmonat gesteigerte Aktivität der PAO reagiert und somit sich die temporär unterschiedlichen Abbauraten von Chlorophyll *a* und Chlorophyll *b* ergeben, was sich dann in einer Veränderung des Chlorophyll *a/b*

Verhältnisses - ein anfängliches Absinken gefolgt von einem Anstieg, wie in unserem Versuch - zeigen sollte (siehe Abb. 3B). Da gemäß HÖRTENSTEINER (1998) PAO ausschließlich während der Blattseneszenz nachweisbar ist, ist anzunehmen, dass es sich bei dem hier beobachteten Chlorophyllabbau in Gerstenprimärblättern unter Methyljasmonateinfluss tatsächlich um einen seneszenzspezifischen Vorgang handelt.

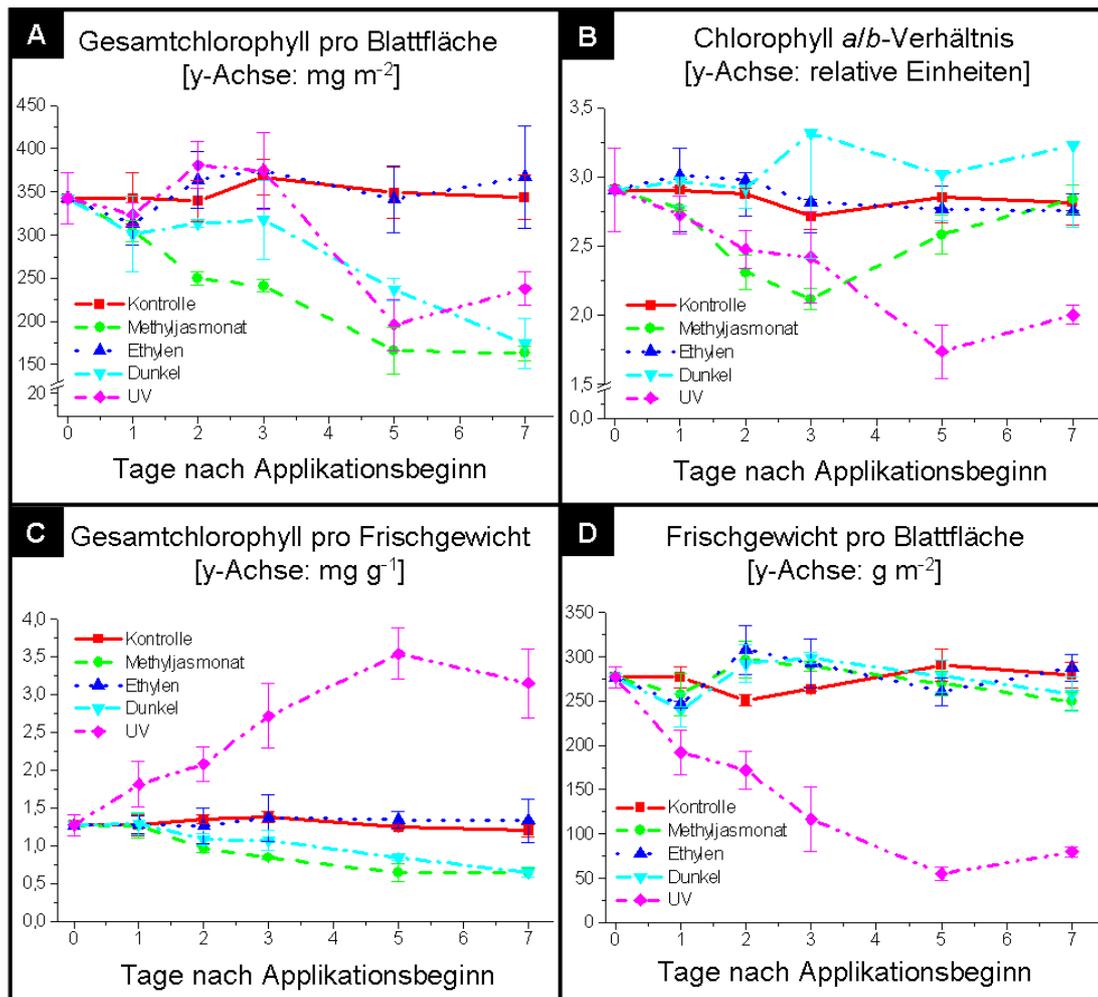


Abb. 3: Änderungen des Chlorophyllgehaltes, Chlorophyll a/b - Verhältnisses sowie des Frischgewichtes in Abhängigkeit von der Behandlung.

A: Behandlungsbedingte Änderungen im Gesamtchlorophyllgehalt bezogen auf die Blattfläche (in mg m^{-2}). Eine Behandlung mit Ethylen zeigte gegenüber der Kontrolle keinerlei Einfluss; die anderen Behandlungen (mit Methyljasmonat, bei Verdunkelung oder zusätzlicher UV-Bestrahlung) bewirkten jeweils ein Absinken des Gesamtchlorophyllgehalts.

B: Chlorophyll a/b Verhältnisse in Abhängigkeit von der Behandlung (relative Einheiten). Nur unter zusätzlicher UV-Bestrahlung zeigte sich ein deutliches Absinken des Chlorophyll a/b Verhältnisses; bei Methyljasmonatbehandlung war ein anfängliches Absinken des Chlorophyll a/b Verhältnisses zu beobachten, dass jedoch bis Versuchsende wieder den Ausgangswert erreichte.

C: Behandlungsbedingte Änderungen im Gesamtchlorophyllgehalt bezogen auf das Blattfrischgewicht (in mg g^{-1}). Während die Behandlung mit Ethylen gegenüber der Kontrolle keinerlei Einfluss zeigte, war unter Methyljasmonatbehandlung und bei Verdunkelung ein vergleichbarer Rückgang des Gesamtchlorophyllgehalts zu verzeichnen; unter zusätzlicher UV-Bestrahlung zeigte sich ein sprunghafter Anstieg.

D: Einfluss der unterschiedlichen Behandlungen auf das Blattfrischgewicht bezogen auf die Blattfläche (in g m⁻²). Unter zusätzlicher UV-Bestrahlung erfolgte fast augenblicklich ein rapider Verlust an Blattfrischgewicht, wohingegen alle übrigen Behandlungen sich nicht von der Kontrolle unterschieden. Probenahme: Pro Experiment (insgesamt drei) wurden jeweils drei zufällig ausgewählte, ganze Primärblätter für die Analysen verwendet (n = 3).

Resümee:

Während die Ethylenbehandlung keinerlei Einfluss auf den Chlorophyllgehalt und das Chlorophyll *a/b* Verhältnis in den Primärblättern der Gerste hatte, führten die anderen Behandlungen (UV-Bestrahlung, Dunkel- und Methyljasmonatinkubation) zu einem vorzeitigen Chlorophyllverlust. Die unterschiedlichen Änderungen im Chlorophyll *a/b* Verhältnis unter UV-Einfluss und während der Dunkelinkubation geben Anlass zu der Vermutung, dass hier in erster Linie Reaktionen der Photosysteme auf die veränderten Licht- bzw. Strahlungsbedingungen bzw. multiple physiologische und biochemische Schädigungen für den Chlorophyllabbau verantwortlich waren und keine seneszenzspezifischen Prozesse. Einzig die Behandlung von Gerstenprimärblättern mit Methyljasmonat lässt auf Grund der oben gezeigten Daten tatsächlich auf einen seneszenzspezifischen Abbau des Chlorophylls schließen.

Da eine Ethylenbehandlung von Gerstenpflanzen keinen messbaren Einfluss auf den Chlorophyllgehalt von Primärblättern hatte, war somit ein wesentliches Merkmal der Seneszenz - der Chlorophyllverlust - nicht gegeben; daher wurde diese Versuchsvariante nicht weiter verfolgt.

3.1.2. Behandlungsbedingte Veränderungen der Ultrastruktur der Chloroplasten

Neben dem Chlorophyllverlust zeigen die Plastiden spezielle, seneszenzbedingte Veränderungen in ihrer Ultrastruktur. Vor allem das Auftreten und die Veränderungen in der Größe so genannter Plastoglobuli, die sich im Elektronenmikroskop als osmiophile globuläre Strukturen innerhalb der Plastiden darstellen, ist ein augenfälliges seneszenzabhängiges Merkmal (LICHTENTHALER und SPREY, 1966; LICHTENTHALER und PEVELING 1967; LICHTENTHALER, 1969; THOMAS und STODDART, 1980; PARTHIER, 1988; GOSH *et al.* 2001). Gleichzeitig kommt

es zu einem Abbau der Thylakoide (NOODEN, 1988; KOŁODZIEJEK *et al.*, 2003; KESKITALO *et al.*, 2005). Daher sollten die verbleibenden Behandlungsmethoden auf ihr Vermögen, solche seneszenzbedingten Veränderungen der Ultrastruktur der Plastiden zu erzeugen, hin überprüft werden. Verwendet wurden dazu Ultradünnschnitte von in Epoxydharz (gemäß SPURR, siehe Material und Methoden) eingebetteten Gerstenprimärblättern.

Abb. 4A zeigt die Ultrastruktur eines Chloroplasten aus einem insgesamt 16 Tage alten Gerstenprimärblatt ohne jegliche Behandlung (Kontrolle). Gut zu erkennen ist das interne Membransystem der Thylakoide, die in gestapelter (Granathylakoide) und ungestapelter Form (Stromathylakoide) vorliegen. Darüber hinaus zu erkennen sind Plastoglobuli als gut sichtbare, kontrastreiche osmiophile globuläre Strukturen. Abb. 4a zeigt einen stark vergrößerten Bereich mit geordneten Grana- und Stromathylakoiden und einigen Plastoglobuli.

In Abb. 4B ist die Ultrastruktur eines Chloroplasten aus einem insgesamt 16 Tage alten Gerstenprimärblatt (nach 7-tägigem Methyljasmonateinfluss) zu sehen. Das Thylakoidsystem des Chloroplasten ist zwar noch deutlich in Grana- und Stromathylakoide gegliedert, aber es zeigen sich bereits Bereiche der Desintegration der Thylakoidstrukturen. Sehr auffällig sind v. a. kontrastreiche osmiophile globuläre Strukturen (Plastoglobuli), die im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4A) wesentlich größer sind. Noch deutlicher ist dies in stärkerer Vergrößerung (Abb. 4b) zu erkennen.

Offensichtlich ist eine Inkubation von Gerstenprimärblättern mit Methyljasmonat in der Lage, den wichtigsten ultrastrukturellen Marker für Seneszenz, nämlich eine Vergrößerung der Plastoglobuli (BACHMANN *et al.*, 2002) in den Chloroplasten im Vergleich zu gleich alten unbehandelten Blättern zu verursachen. Solche Veränderungen sind eigentlich typisch für Chloroplasten aus wesentlich älteren, bereits seneszenten Blättern (THOMAS und STODDART, 1980; PARTHIER, 1988; GOSH *et al.* 2001).

Nach Dunkelinkubation (Abb. 4C) ist in den Chloroplasten eine beginnende Desintegration des Thylakoidsystems zu erkennen, wobei hauptsächlich die Granathylakoide betroffen sind (Abb. 4c). Auch ŠPUNDOVÁ *et al.* (2003) beobachtete eine solche Desintegration des Thylakoidsystems bei Chloroplasten aus Gerstenblättern (*Hordeum vulgare* L. cv. Akcent) ab dem vierten Tag der Dunkelinkubation. Daneben wird von einem gleichzeitigen Auftreten von unterschiedlich elektronentransparenten Plastoglobuli, so genannten „*translucent*

plastoglobuli“, berichtet und daraus gefolgert, dass eine Veränderung der Lipidzusammensetzung während der Seneszenz der Verursacher dieses Phänomens ist. Es könnte sich allerdings auch um eine ungenügende Kontrastierung der Proben mit OsO_4 handeln, zumal das Blattgewebe nur 2 Stunden lang mit 2 % iger OsO_4 -Lösung inkubiert wurde (zum Vergleich: die hier verwendeten Proben wurden mit 2 % iger OsO_4 -Lösung mindestens 12 Stunden lang inkubiert). Die wenigen sichtbaren Plastoglobuli in den hier analysierten Proben unterscheiden sich weder hinsichtlich ihrer Größe noch hinsichtlich ihrer Elektronendurchlässigkeit von denen aus der Kontrolle (Abb. 4A).

UV-Bestrahlung (Abb. 4D) bewirkt offensichtlich eine umfassende Schädigung des ganzen Chloroplasten und dessen interner Membranstrukturen. Zu erkennen sind auch zahlreiche große Stärkekörner, die in dieser Form bei den anderen Behandlungen nicht auftreten. Plastoglobuli oder ähnliche Strukturen scheinen ganz zu fehlen. Bei stärkerer Vergrößerung (Abb. 4d) ergibt sich der gleiche Befund.

Was schon bei der Untersuchung der Chlorophyll-Daten (Chlorophyll *a/b* Verhältnis und Gesamtchlorophyllgehalt) zu vermuten war, nämlich das Auftreten von dramatischen ultrastrukturellen Veränderungen des Chloroplasten in Folge hoher UV-Strahlungsintensitäten, wird durch die in Abb. 4D zweifelsfrei erkennbaren nachhaltigen Schädigungen sowohl der internen Membranstrukturen, als auch der Chloroplastenmembranen bestätigt. Dafür verantwortlich ist sicherlich auch die hohe Dosis an Gesamt-UV-Strahlung. Die auffällige Anhäufung und starke Vergrößerung der Stärkekörner im Chloroplasten ist dagegen in erster Linie dem UV-A-Anteil des Spektrums zuzuschreiben (KIVIMÄENPÄÄ *et al.*, 2001; VALKAMA *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2004).

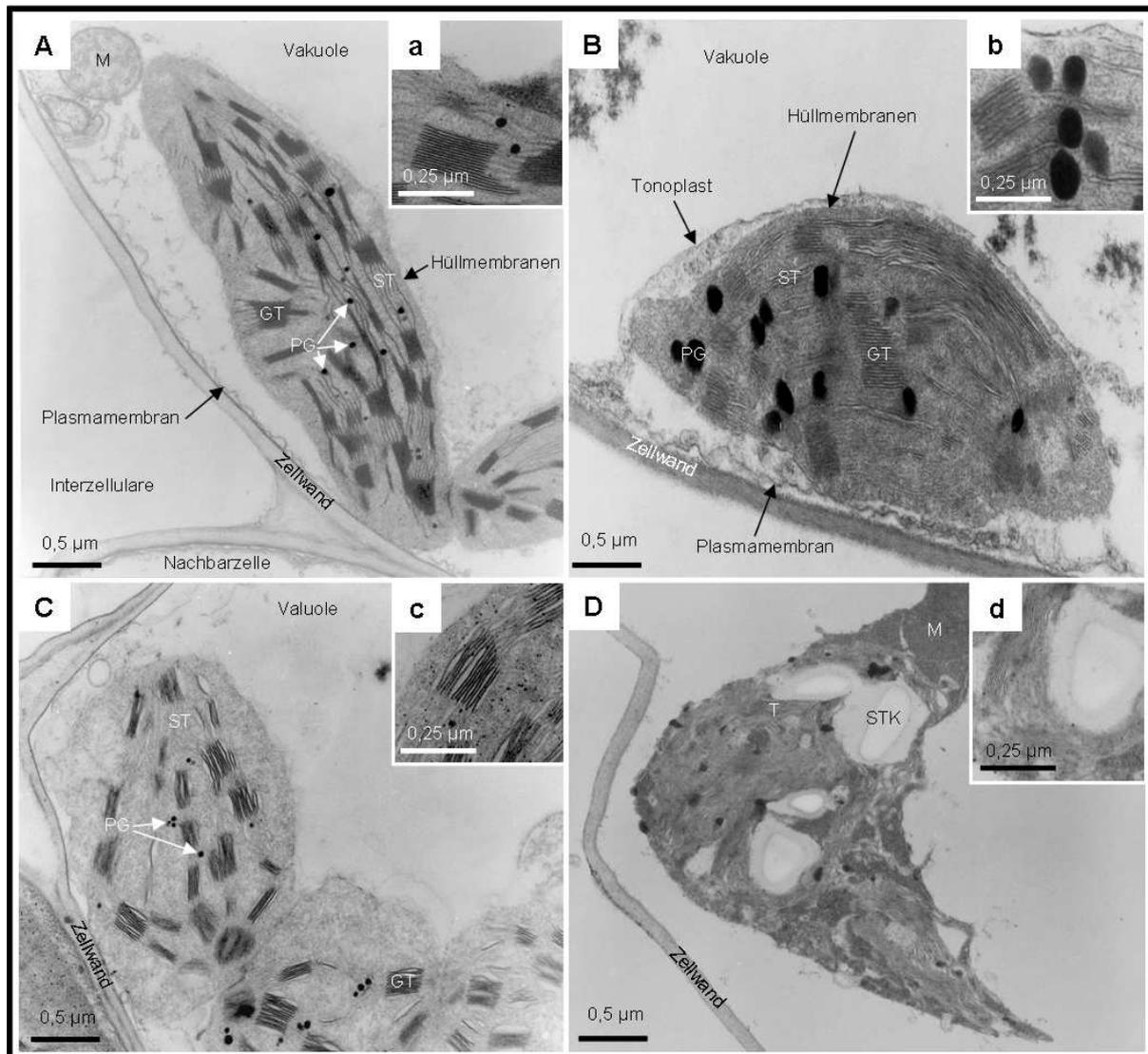


Abb. 4: Behandlungsbedingte Veränderungen der Ultrastruktur der Chloroplasten:

A: Chloroplast aus einem 16 Tage alten Gerstenprimärblatt (Kontrolle), mit gut entwickelten internen Membranstrukturen und einigen kleinen Plastoglobuli (PG).

a: Stark Vergrößerter Ausschnitt eines Chloroplasten mit gut entwickelten Grana- und Stromathylakoiden (GT bzw. ST) und kleinen PG

B: Ein Chloroplast aus einem insgesamt 16 Tage alten Gerstenprimärblatt nach 7-tägiger Methyljasmonat Behandlung mit beginnender Desintegration der internen Membranstrukturen und großen Plastoglobuli.

b: Stark vergrößerter Ausschnitt eines Chloroplasten mit immer noch gut entwickelten Grana- und Stromathylakoiden und einigen großen PG

C: Ultrastruktur von Chloroplasten (aus einem insgesamt 16 Tage alten Gerstenprimärblatt) nach 7 Tagen Verdunkelung: Beginnende Desintegration hauptsächlich der Granathylakoide; keine auffällige Veränderung der Plastoglobuli.

c: Stark vergrößerter Ausschnitt eines Chloroplasten mit gut entwickelten, aber bereits desintegrierenden Grana – und Stromathylakoiden. Nur vereinzelt kleine PG zu erkennen.

D: Chloroplast aus einem 16 Tage alten Gerstenprimärblatt nach 5-tägiger UV-Bestrahlung: Starke Schädigung der internen Membransysteme des Chloroplasten; Bildung größer Stärkekörner (STK), jedoch keine Plastoglobuli.

d: Stark vergrößerter Ausschnitt eines Chloroplasten mit kaum mehr zu erkennenden internen Membranstrukturen, keine PG, jedoch großem Stärkekorn.

Abkürzungen: GT: Granathylakoide, M: Mitochondrium, PG: Plastoglobuli, ST: Stromathylakoide, STK: Stärkekorn, T: Thylakoide

Resümee:

Sowohl unter Verdunkelung als auch unter UV Bestrahlung zeigten die jeweiligen Chloroplasten z. T. erhebliche Veränderungen ihrer Ultrastruktur; dabei waren v. a. die internen Membransysteme - die Thylakoide - betroffen. Jedoch war eine zahlenmäßige Anhäufung oder Vergrößerung von Plastoglobuli nicht zu beobachten. Lediglich unter Einfluss von Methyljasmonat war vor allem eine sehr deutliche Vergrößerung der Plastoglobuli zu erkennen. Somit zeigte nur die Behandlung mit Methyljasmonat beide der geforderten seneszenzspezifischen Veränderungen - einen Chlorophyllverlust und gleichzeitige, starke Vergrößerung der Plastoglobuli.

3.2. Vergleich von natürlich ablaufender mit methyljasmonatinduzierter Seneszenz

Das experimentelle System, Seneszenz in Gerstenprimärblättern durch Methyljasmonat künstlich zu induzieren und zu beschleunigen, wurde nun mit der natürlichen Seneszenz mit Hilfe von photometrischen-, biochemischen-, molekularbiologischen- und elektronenmikroskopischen Analysen bzw. Methoden verglichen und näher charakterisiert. Dieses künstlich induzierbare System wurde dann als experimentelles Modell für die nachfolgenden, speziellen elektronenmikroskopischen Untersuchungen zu Veränderungen von Komponenten des Standardproteinimportapparates der äußeren Plastidenhülle verwendet. Um ein möglichst genau determiniertes, von äußeren Einflüssen, wie sie bei der Anzucht im Gewächshaus auftreten (Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsschwankungen, unterschiedliche Lichtverhältnisse der einzelnen Gerstenprimärblätter durch ganzes oder teilweises gegenseitiges Beschatten im Bestand, *Source – Sink* Beziehungen), weitgehend unabhängiges experimentelles System mit Blattzellen im nahezu synchronen, physiologischen Zustand zu gewährleisten (siehe Einleitung 1.2.2.), wurden dazu 7 Tage alte, abgeschnittene Gerstenprimärblätter auf Wasser mit 45 μM Methyljasmonat (bzw. nur auf Wasser zur Kontrolle) inkubiert. Als Vergleich dienten Gerstenprimärblätter von im Gewächshaus konventionell (d. h. im Gewächshaus in Erdkultur) angezogenen Gerstenpflanzen unterschiedlichen Alters (siehe Material und Methoden).

3.2.1. Gesamtchlorophyllgehalte von Gerstenprimärblättern bei natürlich ablaufender und Methyljasmonat-induzierter Seneszenz

Wie unter 3.1.1. beschreiben, ist das Ausbleichen der Blätter durch den Verlust von Chlorophyll das makroskopisch auffälligste Merkmal der Seneszenz. Auch bei Inkubation von Gerstenprimärblättern mit Methyljasmonat tritt ein sukzessives Ausbleichen der Blätter durch Verlust von Chlorophyll auf. Im Gegensatz zur natürlich auftretenden Seneszenz lässt sich dieser Prozess in noch jungen Gerstenprimärblättern (7 Tage alt) auslösen; dabei läuft der künstlich induzierte, seneszenzbedingte Chlorophyllabbau in einer wesentlich kürzeren Zeitspanne ab (Abb.5).

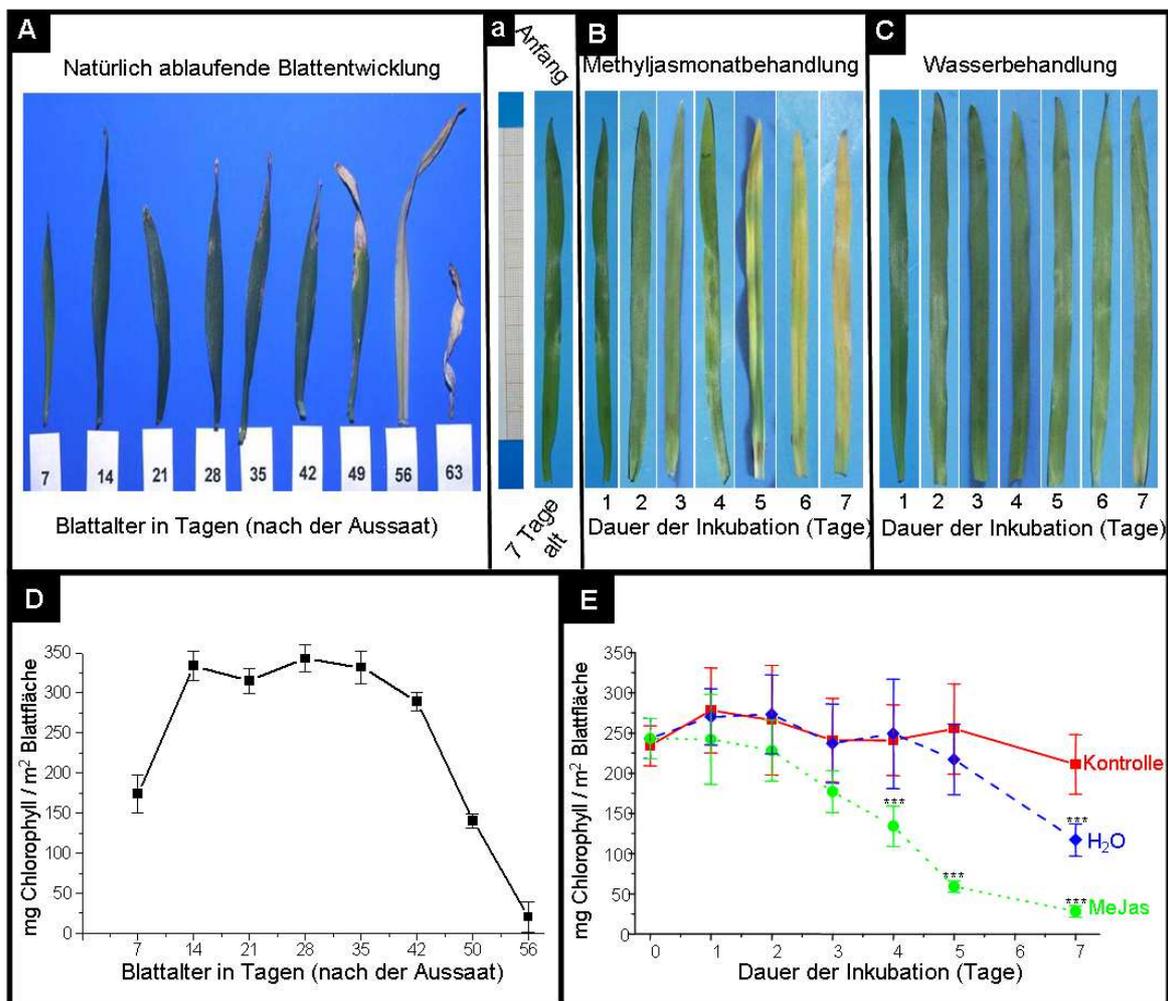


Abb. 5: Zeitliche Veränderungen des Gesamtchlorophyllgehaltes bei natürlicher und künstlich induzierter Seneszenz:

A: Primärblätter konventionell (im Gewächshaus in Erdkultur, siehe Material und Methoden) angezogener Gerstenpflanzen photographiert im Abstand von einer Woche über die gesamte Lebensdauer. Deutlich ist der ab Tag 42 an der Blattspitze beginnende, graduelle Chlorophyllverlust zu erkennen, der sich dann im Laufe der Zeit auf das gesamte Blatt ausdehnt.

a: Größenmaßstab (Millimeterpapier) und Anfangswert (konventionell angezogenes, 7 Tage altes Gerstenprimärblatt).

B: Abgeschnittene, 7 Tage alte Gerstenprimärblätter nach unterschiedlichen Inkubationszeiten auf Methyljasmonat. Ein beginnendes Ausbleichen des Blattes war schon ab Tag 4 nach Inkubationsbeginn festzustellen, wobei es bis auch bis zum völligen Ausbleichen des ganzen Blattes zu keinem „Chlorophyllverlustgradienten“ von der Blattspitze bis zur Blattbasis kam.

C: Abgeschnittene, 7 Tage alte Gerstenprimärblätter nach unterschiedlichen Inkubationszeiten auf Wasser (= Kontrolle). Mit Ausnahme des Endpunktes des Versuches war keinerlei Ausbleichen der Blätter zu erkennen.

D: Gesamtchlorophyllgehalte von Primärblättern konventionell angezogener Gerstenpflanzen gemessen im wöchentlichen Abstand über die gesamte Lebensdauer (natürliche Seneszenz). Nach einem steilen Anstieg des Chlorophyllgehalts innerhalb von 7 Tagen und einem mehrwöchigen Verweilen des Chlorophyllgehalts auf diesem Niveau, folgte ein rapider ca. 2 Wochen andauernder Chlorophyllverlust.

E: Gesamtchlorophyllgehalte von abgeschnittenen, 7 Tage alten Gerstenprimärblättern nach unterschiedlichen Inkubationszeiten auf Methyljasmonat (künstlich induzierte Seneszenz). Ab Tag 4 der Methyljasmonatinkubation war ein signifikanter Rückgang (gegenüber der Kontrolle) des Chlorophyllgehalts zu verzeichnen, der bis zum Ende des Versuches anhielt. Bei Inkubation auf Wasser unterschied sich lediglich der Endpunkt signifikant von der Kontrolle.

Pro Datenpunkt wurden von jeweils 3 zufällig ausgewählten Primärblättern zur Gesamtchlorophyllbestimmung über die ganze Blattspreite Proben genommen, vereinigt und nach Extraktion mit DMF photometrisch analysiert ($n = 3$). Die Kennzeichnung von Signifikanzniveaus erfolgt durch die Sternsymbolik: $p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***.

Die in Abb. 5A dargestellten Primärblätter konventionell (im Gewächshaus in Erdkultur, siehe Material und Methoden) angezogener Gerstenpflanzen zeigten ab Tag 42 einen beginnenden Verlust an Chlorophyll von der Blattspitze ausgehend. Bereits 7 Tage später war ca. 1/3 des Blattes (von der Blattspitze ausgehend) hellgelb. Am Tag 56 dann war das gesamte Blatt vollständig hellgelb gefärbt. Nach weiteren 7 Tagen war das Blatt vollständig entfärbt, trocken und abgestorben. Auffällig war der örtlich unterschiedliche Chlorophyllverlust (Tag 42 und Tag 49), der zu einem „Chlorophyllverlustgradienten“ innerhalb des einzelnen Blattes führte. Dieser von der Blattspitze zur –basis laufende Chlorophyllverlustgradient lässt darauf schließen, dass die Zellen und somit auch die Plastiden innerhalb des Blattes, unterschiedliche physiologische Zustände repräsentieren. Dabei reicht die Spannweite dieser Zustände von jungen, wenig differenzierten Zellen und deren Organellen an der Blattbasis, über vollständig differenzierte, „reife“ Zellen entlang der Blattspreite bis hin zu seneszenten, und/oder im Absterben befindlichen Zellen in der Blattspitze. Diese unterschiedlichen physiologischen Zustände der Zellen innerhalb eines einzelnen Blattes finden sich auch in der differenzierten Ausprägung der Ultrastruktur von Chloroplasten der betreffenden Zellen wieder und konnten mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen von uns gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Bezüglich einer experimentellen Bearbeitung des Phänomens der Seneszenz ist es aber unumgänglich, dass ein überwiegend großer Teil der Zellen

sich in einem annähernd synchronen, physiologischen Zustand befinden. Ob dies durch die Verwendung von abgeschnittenen, mit Methyljasmonat inkubierten Gerstenprimärblättern (siehe Material und Methoden) gewährleistet ist und in wie weit die Ausprägung der beobachteten seneszenzspezifischen Marker denen der natürlich vorkommenden Seneszenz entsprechen, sollen die nachfolgenden Untersuchungen und Vergleiche klären.

Bei Inkubation von abgeschnittenen, 7 Tage alten Gerstenprimärblättern mit Methyljasmonat (Abb. 5B) war ein beginnendes Ausbleichen des Blattes schon mit dem unbewaffneten Auge ab Tag 4 nach Inkubationsbeginn festzustellen; dieses Ausbleichen setzte sich fort und ab Tag 5 war dieser Effekt sehr deutlich sichtbar. Zu einem „Chlorophyllverlustgradienten“ innerhalb eines einzelnen Blattes wie bei der natürlich ablaufenden Seneszenz (siehe Abb. 5A) kam es offensichtlich nicht.

Im Gegensatz dazu zeigten die nur auf Wasser inkubierten, ebenfalls 7 Tage alten Blätter (Abb. 5C) keinen gravierenden Chlorophyllverlust über fast die gesamte Inkubationsdauer; lediglich nach 7 Tagen war auch hier ein beginnender Chlorophyllverlust visuell festzustellen.

Abb. 5D zeigt die Entwicklung des Gesamtchlorophyllgehalts von Primärblättern konventionell angezogener Gerstenpflanzen im wöchentlichen Abstand über die gesamte Lebensdauer. Nach einem Ansteigen des Gesamtchlorophyllgehalts der Blätter von ca. 175 mg m^{-2} an Tag 7 bis 330 mg m^{-2} an Tag 14 folgte eine ca. 21-tägige Phase (bis Tag 35), in der der Gesamtchlorophyllgehalt - mit geringen Schwankungen - das erreichte Niveau (350 mg m^{-2}) in etwa beibehielt. Von Tag 35 bis Tag 42 war ein leichter Rückgang des Gesamtchlorophyllgehalts der Blätter von ca. 330 mg m^{-2} bis auf ca. 285 mg m^{-2} zu beobachten. Anschließend wurde von Tag 42 bis Tag 56 ein rapider Verlust des Gesamtchlorophyllgehalts der Blätter von ca. 285 mg m^{-2} bis nur noch ca. 25 mg m^{-2} gemessen.

Der Gesamtchlorophyllgehalt von abgeschnittenen Gerstenprimärblättern bei Inkubation mit Methyljasmonat (Abb. 5E) war in den ersten 3 Tagen etwa gleich der Gesamtchlorophyllgehalte von Kontrollen auf Wasser bzw. von nicht abgeschnittenen Gerstenprimärblättern (um 260 mg m^{-2}), wenngleich auch auf einem etwas niedrigeren Niveau. Auch war schon ab Tag 2 der Inkubation mit Methyljasmonat ein beginnendes Absinken des Gesamtchlorophyllgehalts zu erkennen. Ab Tag 4 der Inkubation mit Methyljasmonat war ein deutlicher Unterschied zu den Kontrollen bzw. zu den nicht abgeschnittenen

Gerstenprimärblättern messbar (250 mg m^{-2} bei den Kontrollen bzw. den nicht abgeschnittenen Gerstenprimärblättern; 130 mg m^{-2} bei Inkubation mit Methyljasmonat). Von Tag 4 bis Tag 7 fiel der Gesamtchlorophyllgehalt unter Einfluss von Methyljasmonat weiter auf ca. 25 mg m^{-2} . Der Gesamtchlorophyllgehalt der Kontrollblätter auf Wasser sank ab Tag 5 von 220 mg m^{-2} auf ca. 120 mg m^{-2} an Tag 7, wohingegen die nicht abgeschnittenen Gerstenprimärblätter keinen signifikanten Rückgang des Gesamtchlorophyllgehalts bis Tag 7 zeigten. Dass eine Inkubation mit Methyljasmonat einen seneszenspezifischen Chlorophyllverlust an Primärblättern ganzer Gerstenpflanzen herbeiführen kann, konnte unter 3.1.1. bereits gezeigt werden. Auch eine Inkubation von abgeschnitten, 7 Tage alten Gerstenprimärblättern mit Methyljasmonat (Flotation der Blätter auf $45 \mu\text{m}$ Methyljasmonat in Wasser unter definierten Bedingungen, siehe Material und Methoden) löste einen Chlorophyllverlust, mit Gerstenprimärblättern bei natürlichem Entwicklungsverlauf von Tag 42 bis Tag 56 vergleichbar, aus, ohne jedoch zu einen Chlorophyllverlustgradienten im einzelnen Blatt zu führen. Der in der späten Phase der natürlich vorkommenden Seneszenz (von Tag 42 bis Tag 56) festgestellte Chlorophyllverlust bewegte sich in der gleichen Größenordnung wie bei der durch Methyljasmonat induzierten Seneszenz innerhalb von 7 Tagen. Da sich der Chlorophyllgehalt der nicht abgeschnittenen Kontrollblätter und der abgeschnittenen, nur auf Wasser inkubierten Blätter - bis zum Tag 6 zumindest - nicht unterschieden, ist die Inkubation der Blätter mit Methyljasmonat offensichtlich dazu geeignet, einen seneszenzbedingten Chlorophyllabbau nahezu synchron in den Plastiden der Zellen über einen sehr großen Bereich der Blattspreite (ohne Chlorophyllverlustgradienten) zu generieren.

3.2.2. Vergleich der zellulären und subzellulären Struktur von Gerstenprimärblattparenchym bei natürlicher und durch Methyljasmonat induzierter Seneszenz.

Im Folgenden wird die durch Methyljasmonat induzierbare mit der natürlichen Seneszenz auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede auf zellulärer Ebene und ultrastrukturellem Niveau hin untersucht. Dabei wurden v. a. Änderungen in der Anzahl und Größe der Plastiden, aber auch bezüglich deren Ultrastruktur betrachtet.

Dazu verwendet wurden Ultradünnschnitte von in Epoxydharz (gemäß SPURR, siehe Material und Methoden) eingebetteten Gerstenprimärblättern unterschiedlichen Alters bzw. nach Inkubation mit Methyljasmonat (Kontrolle: Inkubation nur mit Wasser).

3.2.2.1. Änderungen der Zellgröße

Die Parenchymzellen eines 7 Tage alten, bereits voll entwickelten Gerstenprimärblattes wiesen eine mittlere Größe (als Fläche im Ultradünnschnitt) von $794 \mu\text{m}^2 \pm 367 \mu\text{m}^2$ auf. Diese mittlere Zellgröße blieb bei der natürlich ablaufenden Seneszenz unverändert bis zu einem Blattalter von ca. 55 Tagen erhalten. Allerdings war die Größenvariabilität der Zellen von Anfang an sehr unterschiedlich; dabei bewegten sich die Zellgrößen in einem Bereich von ca. $400 \mu\text{m}^2$ bis $1200 \mu\text{m}^2$ (siehe Abb. 6A, C). Erst in einem sehr späten, finalen Stadium (58 Tage) kollabierten die Zellen des Parenchyms nahezu vollständig und waren somit auch nicht mehr als einzelne Zellen zu erkennen und messbar (siehe Abb. 6B).

Während der insgesamt 7-tägigen Inkubation von 7 Tage alten abgeschnittenen Gerstenprimärblättern auf Methyljasmonat wurde ebenfalls keine signifikante Veränderung der mittleren Zellgröße beobachtet (Abb. 6D, F); zu einem Kollabieren der Parenchymzellen nach 7 Tagen Inkubation kam es nicht. Bei der nur auf Wasser inkubierten Kontrolle veränderte sich die mittlere Zellgröße über die gesamte Inkubationsdauer nicht und blieb im Bereich des Anfangswertes der Parenchymzellen der 7 Tage alten Gerstenprimärblätter (Abb. 6E, F).

Während der natürlich ablaufenden Entwicklung ändert sich die Größe der Parenchymzellen altersbedingt nicht. Die Zellen bleiben auch bis in die späte Phase der Seneszenz intakt und turgoreszent. Offensichtlich werden die Integrität der Zellbegrenzungen und die Funktionen, die für einen geregelten Wasserhaushalt und Nährstofftransport notwendig sind, bis kurz vor dem Kollabieren des ganzen Organs (des Blattes) aufrechterhalten. Gemäß KESKITALO *et al.* (2005) ist das ein Hinweis darauf, dass somit ein hoher Grad an Rückgewinnung wichtiger Nährstoffe und Elemente sichergestellt wird. Dafür spricht auch (siehe Abb. 6B), dass die Zellen der Leitbündel offensichtlich noch intakt bleiben, auch wenn die Parenchymzellen des

Blattgewebes schon zu einem hohen Grad kollabiert sind. Obwohl das Blatt in diesem sehr späten Stadium keine Photosyntheseaktivität aufweist (BUCHANAN-WOLLASTON, 1997; ANDERSON *et al.*, 2004), ist eine gewisse (Phloem-) Transport-Kapazität notwendig, um den Export von Nährstoffen zu sichern. Aus der Perspektive des Transports agieren Blätter auch in diesem sehr späten Seneszenzstadium noch als *Source*-Blätter (KESKITALO *et al.* 2005).

Bei den Inkubationsversuchen, sowohl auf Wasser als auch auf Methyljasmonat-Lösung konnte während der Inkubationszeiten (7 Tage) kein Kollabieren der Zellen beobachtet werden; wahrscheinlich war die Inkubationszeit zur Auslösung des finalen Kollapses der Zellen nicht lange genug. Denkbar ist aber auch, dass das Abschneiden der Blätter den Abtransport von Nährstoffen auf Grund der fehlenden oder stark eingeschränkten Transportkapazität der Phloemzellen (da keine Verbindung zu den *Sink*-Organen der Pflanze) behindert und somit es auch zu keinem Kollabieren der Parenchymzellen innerhalb der abgeschnittenen Blättern kommen kann.

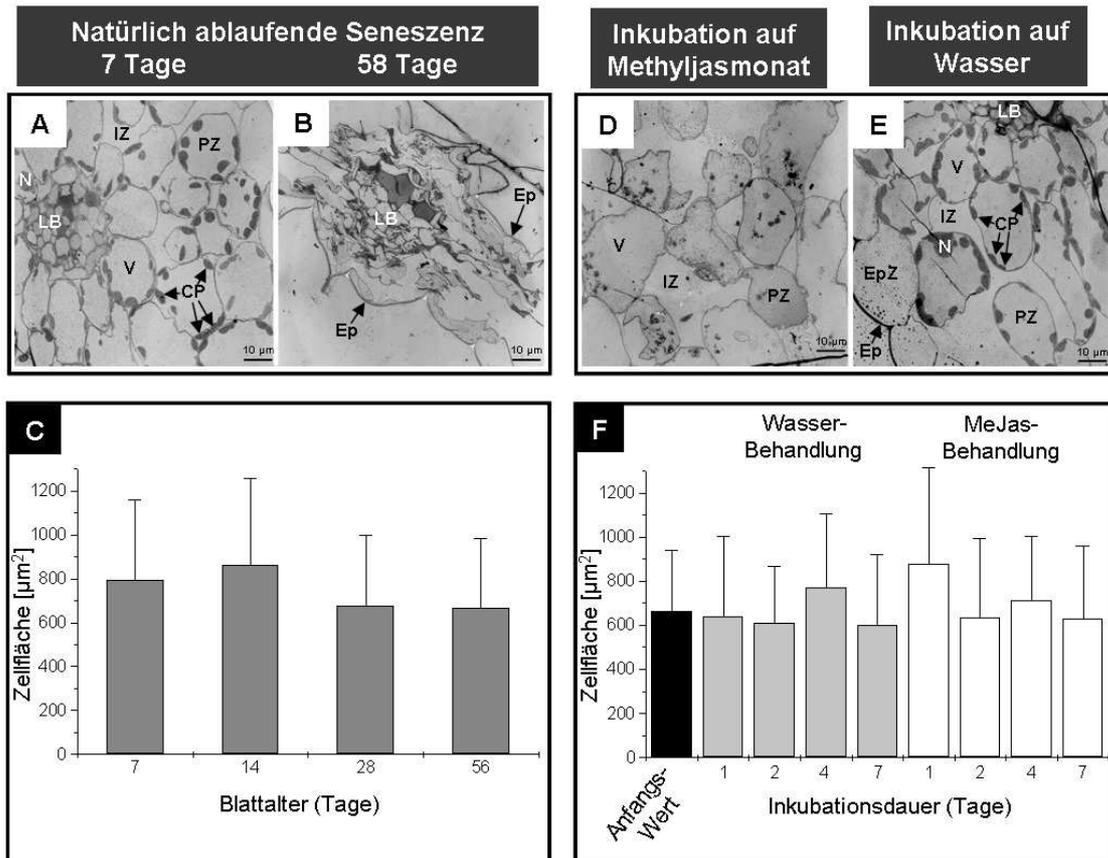


Abb. 6: Zellgrößen (mittlere Zellflächen) bei natürlich ablaufender und künstlich induzierter Senescenz:

A: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Parenchymzellen (PZ) eines Blattquerschnitts eines 7 Tage alten Gerstenprimärblatts (Ultradünnschnitt): Zu sehen sind voll entwickelte, turgoreszente Zellen mit Zellorganellen wie Chloroplasten (CP), Zellkern (N), Vakuole (V), intakten Zellwänden und Interzellularen (IZ) angrenzend an Epidermiszellen (EpZ); außerdem ist ein gut entwickeltes Leitbündel (LB) sichtbar.

B: Blattquerschnitt eines 58 Tage alten Gerstenprimärblatts (Ultradünnschnitt): Vollkommen kollabiertes Parenchym ohne erkennbare Zellgrenzen bzw. mit stark zerrissenen Zellwänden. Obere und untere Epidermiszellen zum Teil noch erkennbar und mit zum Teil stark gefalteter äußerer Zellwand. Zellen der Leitgefäße im Zentrum noch klar zu erkennen, randständige Zellen jedoch stark deformiert.

C: Zellgrößen zu 4 unterschiedlichen Zeitpunkten während der natürlich ablaufenden Senescenz. Die Mittelwerte unterschieden sich nicht. ($20 \leq n \leq 24$).

D: Aufnahme von Parenchymzellen eines Blattquerschnitts eines 7 Tage alten Gerstenprimärblatts nach 7-tägiger Inkubation auf Methyljasmonat: Alle Zellen noch mit intakter Abgrenzung, aber bereits beginnender Deformation der Zellwände. Zellorganellen nur spärlich oder schon nicht mehr vorhanden und schwer zu identifizieren.

E: Aufnahme von Parenchymzellen eines Blattquerschnitts eines 7 Tage alten Gerstenprimärblatts nach 7-tägiger Inkubation auf Wasser: Gut erkennbar sind voll entwickelte, turgoreszente Zellen mit Zellorganellen (Chloroplasten, Zellkern, Vakuole), intakten Zellwänden und Interzellularen angrenzend an Epidermiszellen. Teile eines gut entwickelten Leitbündels sind ebenfalls sichtbar.

F: Zellgrößen des Ausgangswertes und bei Inkubation mit Methyljasmonat bzw. Wasser (Kontrolle) zu 4 unterschiedlichen Zeitpunkten (Ausgangswert: $n = 38$; Methyljasmonatinkubation: $18 \leq n \leq 76$; Kontrolle: $31 \leq n \leq 56$). Bei keiner Behandlung waren Unterschiede der Mittelwerte (im Vergleich zum Ausgangswert) vorhanden.

Abkürzungen: C: Chloroplast, Ep: Epidermis, EpZ: Epidermiszelle, IZ: Interzellulare, LB: Leitbündel, N: Zellkern (Nukleus), PZ: Parenchymzelle, V: Vakuole

3.2.2.2. Änderungen der Anzahl und Größe der Plastiden pro Zelle

Dass sich während der natürlichen Entwicklung von Pflanzen ultrastrukturelle Veränderungen v. a. in den Parenchymzellen ergeben, die mit einer Veränderung der Anzahl und Größe von Plastiden einhergehen, ist zwar schon lange bekannt (z. B. BARTON, 1966; LICHTENTHALER, 1969; BUTLER und SIMON, 1970), diesbezügliche detaillierte Untersuchungen wurden aber erst in jüngster Zeit veröffentlicht (INADA *et al.*, 1998; KOŁODZIEJEK *et al.*, 2003; KESKITALO *et al.*, 2005). Dabei stehen aber hauptsächlich die qualitativen Veränderungen im Vordergrund; eine umfassende quantitativ-statistische Bearbeitung fehlt bisher weitgehend. Dies wäre aber notwendig, um ein experimentelles System zur artifiziellen Seneszenzinduktion und –propagation zu charakterisieren, und um es mit der natürlich ablaufenden Seneszenz vergleichen zu können. Dazu wurden in dieser Arbeit die sowohl im Verlauf der natürlich ablaufenden, als auch während der durch Methyljasmonat induzierten Seneszenz auftretenden Veränderungen in der Anzahl der Plastiden pro Parenchymzelle und in der Größe der Plastiden (gemessen als Fläche im Ultradünnschnitt) quantitativ-statistisch bearbeitet.

3.2.2.2.1. Änderungen der Anzahl der Plastiden pro Parenchymzelle

Während der natürlichen Seneszenz war in der späten Phase - ab Tag 50 - eine Tendenz zur Verminderung der Anzahl der Chloroplasten pro Parenchymzelle der Gerstenprimärblätter zu verzeichnen. Bei einem Alter der Primärblätter von 56 Tagen waren pro Parenchymzelle nur noch 4 ± 2 Plastiden, gegenüber 10 ± 4 Plastiden pro Parenchymzelle in 28 Tage alten Primärblättern enthalten (siehe Abb. 7A-D und Abb. 8A). Nach 56 Tagen waren in den meisten Parenchymzellen nur noch vereinzelt Plastiden bzw. deren verbliebene Rückstände zu sehen (Abb. 7D). Auch INADA *et al.* (1998) beobachteten bei der Seneszenz an Koleoptilen von Reis (*Oryza sativa* L.) eine Verringerung der Plastidenanzahl pro Zelle. Zum selben Befund kamen KESKITALO *et al.* (2005) bei der Seneszenz von Pappelblättern (*Populus tremula* L.) und beschrieben darüber hinaus das Verbleiben weniger, einzelner Plastiden bis in eine sehr späte, letzte Phase der Seneszenz.

Bei Inkubation von 7 Tage alten Gerstenprimärblättern mit Methyljasmonat war nach dem ersten Tag keine Änderung der Anzahl der Chloroplasten pro Parenchymzelle zu verzeichnen (Anfangswert: 9 ± 4 Plastiden; nach einem Tag Inkubation: 10 ± 2 Plastiden). Am zweiten Tag der Inkubation war eine leichte Tendenz zur Verminderung der Chloroplastenanzahl pro Parenchymzelle zu erkennen (7 ± 4 Plastiden). Nach 4-tägiger Methyljasmonatinkubation war dann ein abrupter Rückgang der Plastidenanzahl pro Parenchymzelle (2 ± 1 Plastiden) zu erkennen, der sich bis zum Ende der Inkubation nach 7 Tagen auf $0,4 \pm 0,3$ Plastiden pro Parenchymzelle fortsetzte. Die Anzahl der Plastiden pro Parenchymzelle nach 4-tägiger Methyljasmonatinkubation von 7 Tage alten Gerstenprimärblättern entsprach also ungefähr der Plastidenanzahl von Parenchymzellen von 56 Tage alten Gerstenprimärblättern (Abb. 7E - H und Abb. 8C).

Bei paralleler Inkubation von 7 Tage alten Gerstenprimärblättern auf Wasser (Kontrolle) war über die gesamte Zeit (7 Tage) keine Änderung der Anzahl der Plastiden pro Parenchymzelle zu erkennen (Abb. 7I - L und Abb. 8C).

Sowohl bei der natürlich ablaufenden Seneszenz als auch bei der Methyljasmonatinkubation von Gerstenprimärblättern war eine Reduktion der Plastidenanzahl pro Parenchymzelle einwandfrei nachweisbar, wohingegen bei der Kontrolle keinerlei Einfluss auf die Anzahl der Plastiden bis zum Ende des Versuchs erkennbar blieb. Die Inkubation der abgeschnittenen Gerstenprimärblätter mit Methyljasmonat führte offensichtlich nicht zu einer generellen Schädigung sämtlicher zellulärer- und subzellulärer Strukturen, sondern zeigte eine, der natürlichen Seneszenz entsprechende, spezifische Ausprägung, die in erster Linie die Plastiden betraf und auf einen regulierten, entwicklungspezifischen Prozess (Seneszenz) hinweist. Beiden Systemen gleich ist, dass sich der Abbau der Chloroplasten weder im Zellverband allgemein, noch in Bezug auf die einzelne Zelle synchron ereignet; so verbleiben bis in sehr späte Phasen der natürlichen Seneszenz und auch bei entsprechender Methyljasmonatinkubation einige wenige Plastiden. Es könnte spekuliert werden, dass diese wenigen Plastiden notwendig sind, um eine geringe, aber nichtsdestoweniger notwendige metabolische Funktion in Bezug auf die Rückgewinnung von Nährstoffen sicherzustellen; dafür spräche auch der Befund von KESKITALO *et al.* (2005), dass in Pappelblättern, die in der späten Phase der Seneszenz schon komplett gelb gefärbt sind und nur noch wenige Plastiden aufweisen, noch eine detektierbare Photosyntheseaktivität vorhanden ist.

Noch nicht geklärt ist die Frage, welche Mechanismen dazu führen, dass nicht alle Plastiden in einer Zelle im gleichen Maße einem Abbau unterliegen. Vielleicht ist bei der Selektion der zum kontrollierten Abbau bestimmten Plastiden ein „Plastidensignal“ an das genetische Zentrum der „Wirtszelle“ (den Zellkern) maßgeblich beteiligt. Diese Art der Kommunikation von Plastiden mit dem Zellkern (*Plastid-to-Nucleus Retrograde Signaling*) wird in jüngster Zeit von NOTT *et al.* (2006) sehr anschaulich diskutiert; Es werden darin im Wesentlichen drei retrograde Signaltransduktions-Wege beschrieben, wobei der erste Weg mit der Koordination der Biosynthese des Chlorophylls (der so genannte Mg-ProtoporphyrinIX-Signalweg), und der zweite Weg mit der frühen Samenentwicklung (Plastiden-Genexpressions-abhängiger-Signalweg) zu tun haben (KROPAT *et al.*, 2000; STRAND *et al.*, 2003; STRAND, 2004; GRAY *et al.*, 2003; RICHLY *et al.*, 2004) und somit sicherlich nicht mit seneszenzbedingten Veränderungen der Plastidenanzahl in Verbindung gebracht werden können. Anders verhält es sich mit dem dritten der Signaltransduktions-Wege, der auf unterschiedlichen Redox-Zuständen von Komponenten der photosynthetischen Elektronentransport-Kette (PFANNSCHMIDT *et al.*, 1999; FREY *et al.*, 2005), oder auf den im Chloroplasten entstehenden ROS selber (KARPINSKY *et al.*, 1999; WAGNER *et al.*, 2004) basiert: So kann angenommen werden, dass während des Verlaufs der Seneszenz sicher nicht alle Plastiden einer Zelle genau den selben Redox-Zustand und/oder den gleichen Gehalt an ROS aufweisen. Dadurch könnten einige wenige Plastiden einem verzögerten seneszenzbedingten Abbau unterliegen, was erklären würde, warum auch in der sehr späten Phase der Seneszenz noch vereinzelt, metabolisch aktive (KESKITALO *et al.*, 2005) Plastiden in den meisten Zellen zu finden sind.

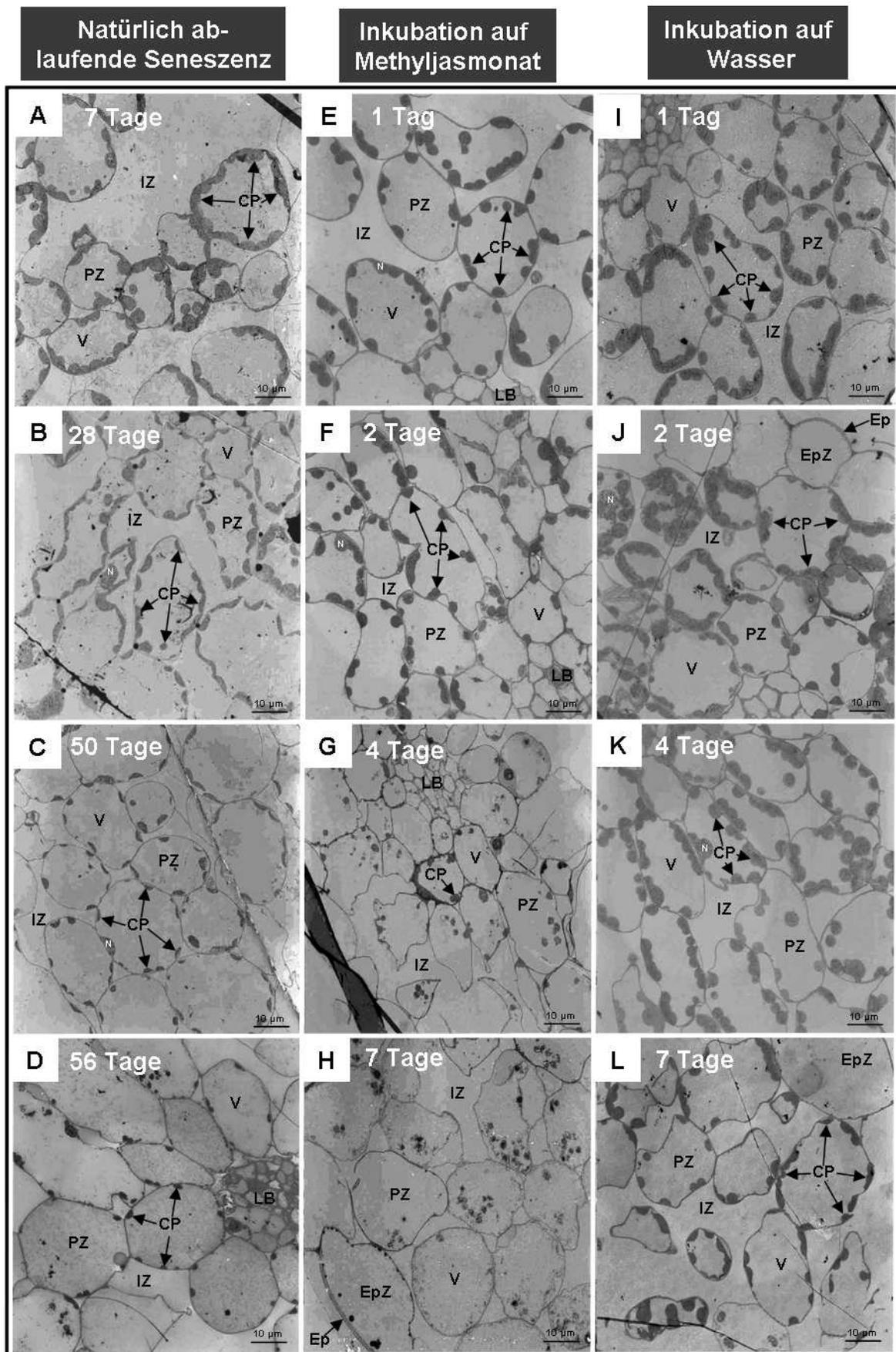


Abb. 7: Querschnitte (Ultradünnschnitte) durch Parenchymzellen von Gerstenprimärblättern bei natürlich ablaufender bzw. durch Methyljasmonat induzierter Seneszenz und bei Inkubation auf Wasser (Kontrolle).

A-D: zeigt Entwicklungsstadien von Parenchymzellen während der natürlich ablaufender Seneszenz zu unterschiedlichen Zeitpunkten: nach 7 Tagen (A), nach 28 Tagen (B), nach 50 Tagen (C) und nach 56 Tagen (D). Die Erscheinungsform der voll turgoreszenten Zellen veränderte sich über die gesamte Zeitspanne nicht. Jedoch war eine deutliche Abnahme der Anzahl der Plastiden pro Parenchymzelle zu den späten Zeitpunkten der Blattentwicklung zu verzeichnen.

E-H: Entwicklungsstadien von Parenchymzellen aus 7 Tage alten Gerstenprimärblättern bei Inkubation mit Methyljasmonat nach unterschiedlicher Inkubationsdauer von 1 Tag (E), 2 Tagen (F), 4 Tagen (G) und 7 Tagen (H). Auch hier veränderte sich die Erscheinungsform der voll turgoreszenten Zellen über die gesamte Inkubationszeit nicht. Ähnlich der natürlich ablaufenden Seneszenz war jedoch eine deutliche Abnahme der Anzahl der Plastiden pro Parenchymzelle zu den späten Zeitpunkten der Inkubation zu erkennen.

I-L: Entwicklungsstadien von Parenchymzellen aus 7 Tage alten Gerstenprimärblättern bei Inkubation mit Wasser (zur Kontrolle) nach unterschiedlicher Inkubationsdauer von 1 Tag (I), 2 Tagen (J), 4 Tagen (K) und 7 Tagen (L). Auch hier veränderte sich die Erscheinungsform der voll turgoreszenten Zellen über die gesamte Inkubationszeit nicht. Es wurde keine Verminderung der Anzahl der Plastiden pro Parenchymzelle über die ganze Inkubationszeit hinweg beobachtet; allenfalls nach 7 Tagen war evtl. eine Tendenz zur zahlenmäßigen Verringerung der Plastiden zu beobachten.

Abkürzungen: C: Chloroplast, Ep: Epidermis, EpZ: Epidermiszelle, IZ: Interzellulare, LB: Leitbündel, N: Zellkern (Nukleus), PZ: Parenchymzelle, V: Vakuole

3.2.2.2.2. Änderungen der Größe der Plastiden in Parenchymzellen

Die Plastiden der Parenchymzellen eines natürlich gewachsenen Gerstenprimärblattes verloren von Beginn der Messungen an kontinuierlich an Größe (gemessen als Fläche im Ultradünnschnitt). Betrug die mittlere Fläche eines Chloroplasten eines 7 Tage alten Primärblattes noch $12 \mu\text{m}^2 \pm 4 \mu\text{m}^2$, so waren es bei einem 56 Tage alten Primärblatt noch $4 \mu\text{m}^2 \pm 1 \mu\text{m}^2$ (Abb. 8B). Dieser Befund, eine Verringerung der Plastidengröße, konnte auch bei der Seneszenz an Koleoptilen von Reis (*Oryza sativa* L.) beobachtet werden (INADA *et al.*, 1998).

Während der Inkubation von 7 Tage alten Gerstenprimärblättern mit Methyljasmonat war ebenfalls eine Verkleinerung der Plastiden von Parenchymzellen zu verzeichnen. Zu Beginn der Inkubation betrug die mittlere Fläche eines Chloroplasten noch $12 \mu\text{m}^2 \pm 2 \mu\text{m}^2$, um dann nach insgesamt 7 Tagen Methyljasmonatinkubation auf $3 \mu\text{m}^2 \pm 1 \mu\text{m}^2$ zu sinken (Abb. 8D). Die Größe der Plastiden nach 4-tägiger Methyljasmonatinkubation von 7 Tage alten Gerstenprimärblättern entsprach also ungefähr der Plastidengröße von 56 Tage alten Gerstenprimärblättern (Abb. 8B und Abb. 8D) und sank bis zum Ende der Inkubation (nach 7 Tagen) noch weiter ab.

Bei paralleler Inkubation von 7 Tage alten Gerstenprimärblättern auf Wasser (Kontrolle) war bis 4 Tage nach Inkubationsbeginn keine Änderung der Plastidenfläche festzustellen; erst am Ende der Inkubationsdauer (nach 7 Tagen)

war ein leichtes Absinken der mittleren Plastidenfläche von anfangs $12 \mu\text{m}^2 \pm 2 \mu\text{m}^2$ auf letztlich $8 \mu\text{m}^2 \pm 1 \mu\text{m}^2$ zu verzeichnen (Abb. 8D). Es wurden jedoch letztendlich keine vergleichbaren Plastidengrößen wie unter natürlichen oder experimentell hervorgerufenen Seneszenzbedingungen erreicht.

Von einer seneszenzspezifischen Größenänderung - und deren quantitativer Erfassung - der Plastiden wird in der Literatur nur von INADA *et al.* (1998) berichtet. Allerdings wird dieses Phänomen nur zur Charakterisierung und Unterscheidung der unterschiedlichen Seneszenz-Phasen herangezogen und keineswegs das Phänomen als solches erklärt oder diskutiert. Eine seneszenzbedingte Verminderung der Plastidengröße könnte an Hand zweier verschiedener Vorgänge erklärt werden: Entweder werden die Plastiden durch die entwicklungsabhängige Expansion der Vakuole (OTEGUI *et al.*, 2005) einzig auf Grund des dadurch steigenden Drucks physikalisch zusammengepresst, oder die Plastiden verlieren durch (entwicklungs-) physiologische Veränderungen an Masse. Für den letzteren Vorschlag würde der von GUIAMÉT *et al.* (1999) beschriebene Exodus an Masse bei seneszierenden Sojabohnen- (*Glycine max* L.) Chloroplasten sprechen. Dabei kommt es zum massenhaften Austritt ganzer Plastoglobuli durch die Hüllmembranen der Plastiden in das Cytosol. Bei der monokotylen Pflanze Reis (*Oryza sativa* L.) konnten ultrastrukturell ähnliche Protuberanzen an Chloroplasten festgestellt werden (BOURETT *et al.*, 1999). Auch bei den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit war ein Durchtritt von Plastoglobuli oder einer plastoglobuliähnlichen Struktur durch die Hüllmembran von seneszenten Chloroplasten feststellbar, wenngleich dieses Ereignis auch nicht sehr häufig zu sein scheint und im fortgeschrittenen Stadium der Plastidenseneszenz (Gerontoplast) nicht mehr beobachtet werden konnte (Abb. 11A, B). Dass dieser Massenexodus tatsächlich eine Relevanz im Seneszenzgeschehen haben könnte, zeigen die in den Plastoglobuli unter anderem gefundenen Inhalte: Neben Lipiden, die offensichtlich von der Disassemblierung der Thylakoide stammen (TEVINI und STEINMÜLLER, 1985), wurden auch Chlorophyll und Chlorophyllabbauprodukte, Carotinoide und Proteine der Photosysteme (GUIAMÉT *et al.*, 1999) gefunden; in den ultrastrukturell ähnlichen Protuberanzen an Chloroplasten aus Reis konnte unter anderem auch die Große Untereinheit der Rubisco (*Large subunit of Rubisco* = LSU) durch immunologische Verfahren detektiert werden (BOURETT *et al.*, 1999).

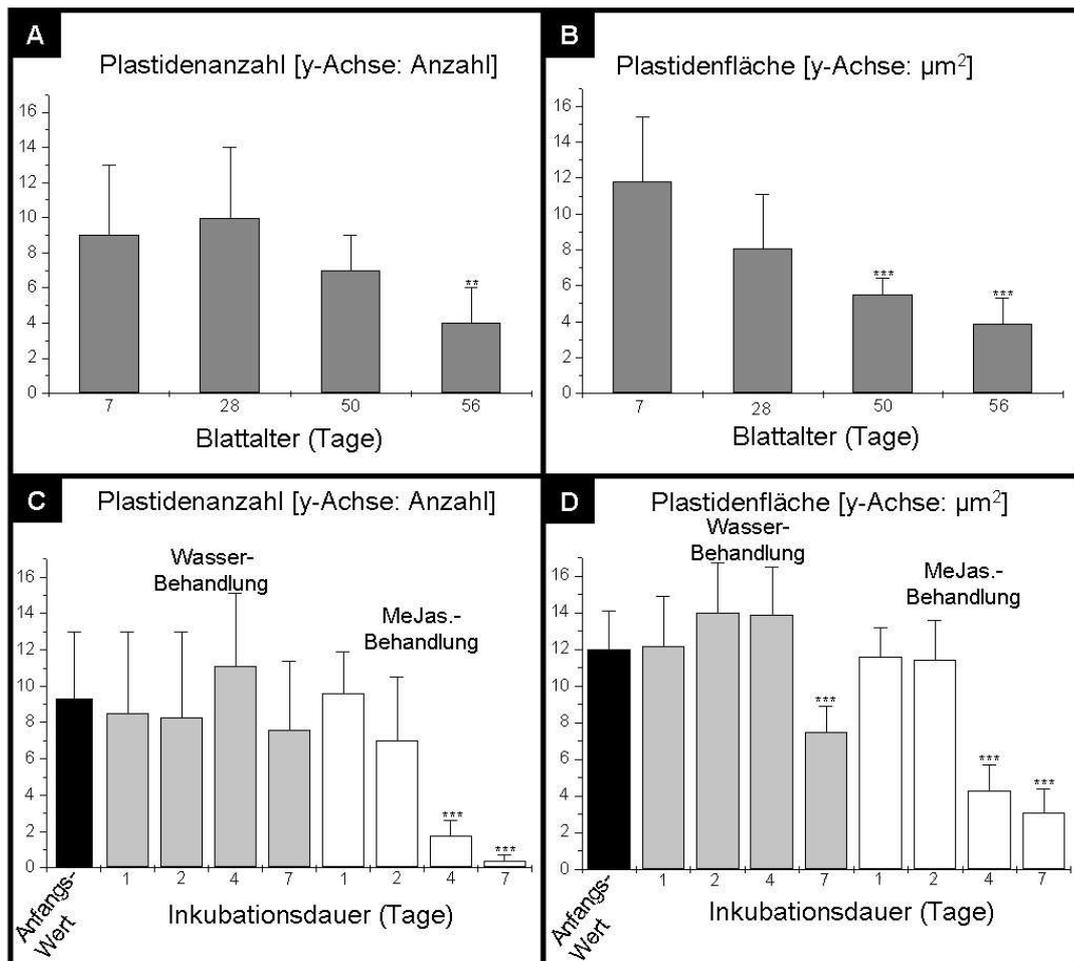


Abb. 8: Änderungen der Anzahl und Größe der Plastiden pro Parenchymzelle:

Abb. A zeigt die Entwicklung der Plastidenanzahl während der natürlich ablaufenden Seneszenz zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach 7, 28, 50 und 56 Tagen; $20 \leq n \leq 24$). Eine signifikante Abnahme der Anzahl der Plastiden pro Parenchymzelle war nur zum letzten Zeitpunkt (Tag 56) der Blattentwicklung messbar.

In **Abb. B** ist die Entwicklung der Plastidengröße (als Fläche im Ultradünnschnitt) während der natürlich ablaufenden Seneszenz zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach 7, 28, 50 und 56 Tagen) dargestellt ($13 \leq n \leq 15$). Von Beginn der Messungen an war eine kontinuierliche Abnahme der Plastidengröße festzustellen, welche sich ab Tag 50 signifikant vom Anfangswert unterschied.

In **Abb. C** ist die Entwicklung der Plastidenanzahl bei unterschiedlich langer Inkubation von 7 Tage alten Gerstenprimärblättern mit Methyljasmonat ($31 \leq n \leq 59$) bzw. Wasser (zur Kontrolle; $18 \leq n \leq 78$) zu sehen (nach 1 Tag, nach 2, 4 und 7 Tagen). Anfangswert: $n = 38$. Während bei der Inkubation auf Wasser keinerlei Veränderungen gegenüber dem Ausgangswert zu erkennen waren, war bei der Inkubation mit Methyljasmonat eine kontinuierliche Abnahme der Plastidenanzahl festzustellen, welche sich ab Tag 4 signifikant vom Anfangswert unterschied.

In **Abb. D** ist die Entwicklung der Plastidengröße (als Fläche im Ultradünnschnitt) während unterschiedlich langer Inkubation von 7 Tage alten Gerstenprimärblättern mit Methyljasmonat ($18 \leq n \leq 22$) bzw. Wasser (zur Kontrolle; $16 \leq n \leq 22$) zu sehen (nach 1 Tag, nach 2, 4 und 7 Tagen). Anfangswert: $n = 22$. Bei der Inkubation auf Wasser war erst nach 7 Tagen eine signifikante Veränderung gegenüber dem Ausgangswert zu erkennen; demgegenüber war bei der Inkubation mit Methyljasmonat eine Abnahme der Plastidengröße festzustellen, welche sich ab Tag 4 signifikant vom Anfangswert unterschied.

Die Kennzeichnung von Signifikanzniveaus erfolgt durch die Sternsymbolik: $p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***.

3.2.2.2.3. Änderungen der mittleren Größe des Plastoms pro Parenchymzelle

Wie unter 3.2.2.2.1. und 3.2.2.2.2. dargestellt, veränderten sich sowohl bei der natürlichen Seneszenz als auch unter Methyljasmonateinfluß Anzahl und Größe von Plastiden in den Zellen des Primärblattparenchyms. Im Folgenden sind die synergistischen Effekte dieser beiden Veränderungen auf das Plastom (Gesamtheit der Plastiden pro Parenchymzelle) aufgezeigt.

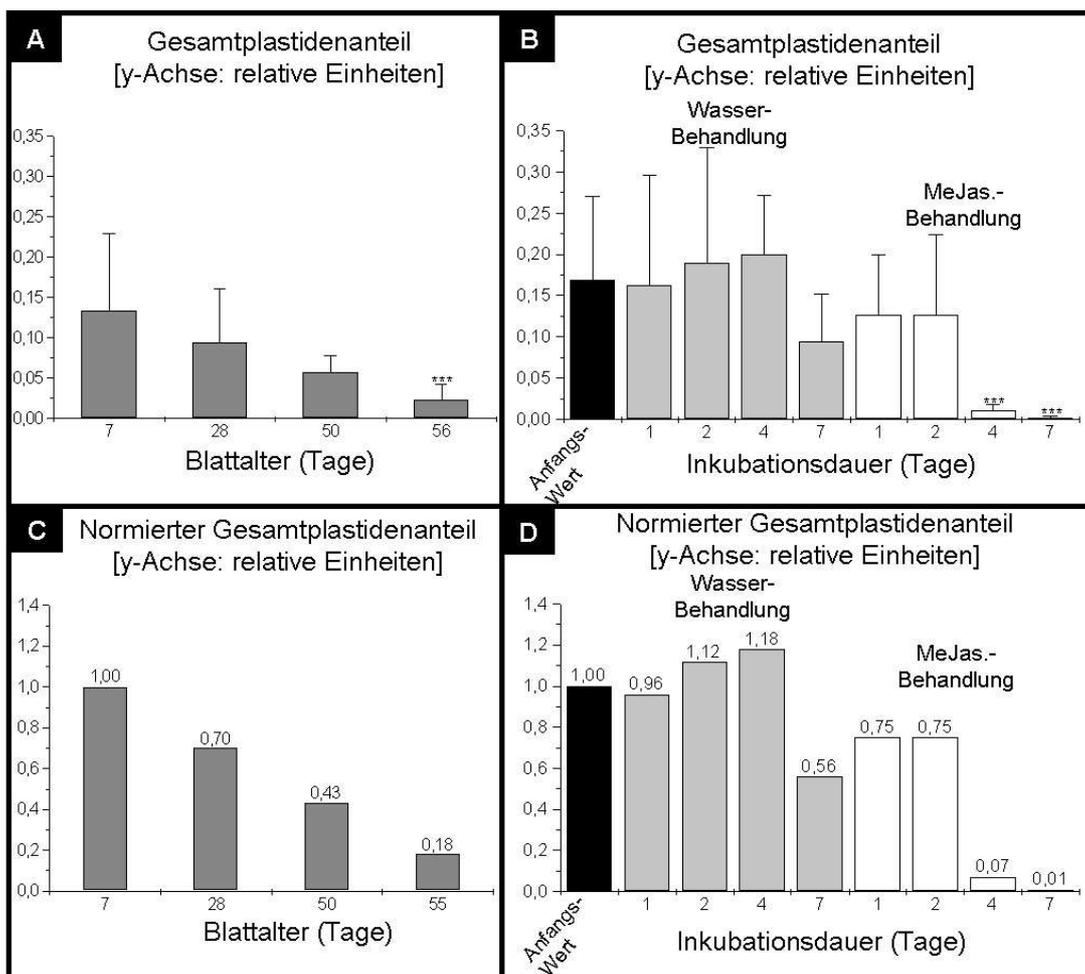


Abb. 9: Änderungen der mittleren Größe des Plastoms pro Parenchymzelle

Abb. A: Gesamtplastidenanteil pro Zellanteil (gemessen als Fläche in μm^2 und dargestellt als relative Einheiten) zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der natürlichen Seneszenz (nach 7, 28, 50 und 56 Tagen). Von Beginn der Messungen an war eine kontinuierliche Abnahme des Gesamtplastidenanteils festzustellen, welcher sich am Tag 56 signifikant vom Anfangswert unterschied.

Abb. B: Gesamtplastidenanteil pro Zellanteil (gemessen als Fläche in μm^2 und dargestellt als relative Einheiten) bei unterschiedlich langer Inkubation von 7 Tage alten Gerstenprimärblättern mit Methyljasmonat bzw. Wasser (zur Kontrolle; nach 1 Tag, nach 2, 4 und 7 Tagen). Während bei der Inkubation auf Wasser keinerlei signifikante Veränderungen gegenüber dem Ausgangswert zu erkennen waren, war bei der Inkubation mit Methyljasmonat ab Tag 4 eine starke, signifikante Abnahme des Gesamtplastidenanteils festzustellen.

Abb. C stellt den normierten Gesamtplastidenanteil pro Zellanteil in % (100 % = 1) vom Ausgangswert zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach 7, 28, 50 und 56 Tagen) dar. Dabei war zu erkennen, dass sich der Gesamtplastidenanteil im Laufe der Blattenwicklung kontinuierlich auf 18 % des Ausgangswertes vermindert.

Abb. D stellt den normierten Gesamtplastidenanteil pro Zellanteil in % vom Ausgangswert bei unterschiedlich langer Inkubation von 7 Tage alten Gerstenprimärblättern mit Methyljasmonat bzw. Wasser (zur Kontrolle) dar (nach 1 Tag, nach 2, 4 und 7 Tagen). Bei Inkubation mit Wasser wurde nach anfänglichem Anstieg (118 %) ein Endwert von 56 % Gesamtplastidenanteil (gegenüber dem Ausgangswert) erreicht; bei Inkubation mit Methyljasmonat waren an Tag 1 und 2 jeweils noch 75 % des anfänglichen Gesamtplastidenanteils vorhanden, der dann allerdings am Tag 4 schon drastisch auf 7 % sank und dann schließlich an Tag 7 nur noch 1 % des anfänglichen Gesamtplastidenanteils betrug.

Daten für Abb.9A und B wurden rechnerisch unter Beachtung des Fehlerfortpflanzungsgesetzes aus den Werten von Abb.8 gewonnen.

Die Kennzeichnung von Signifikanzniveaus erfolgt durch die Sternsymbolik: $p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***.

Das Plastom von Parenchymzellen eines natürlich gewachsenen Gerstenprimärblattes verlor - in Folge des synergistischen Effekts von Verminderung der Anzahl und Größe der Plastiden pro Parenchymzelle in Abhängigkeit vom Blattalter - von Beginn der Messungen an (Tag 7 nach Aussaat) kontinuierlich an Größe (gemessen als Fläche im Ultradünnschnitt). Betrag der relative Flächenanteil des Plastoms pro Parenchymzelle eines 7 Tage alten Primärblattes noch $0,134 \pm 0,095$, so sank der Anteil kontinuierlich auf $0,024 \pm 0,019$ bei einem 56 Tage alten Primärblatt (Abb. 9A).

Auch während der 7-tägigen Inkubation von Gerstenprimärblättern mit Methyljasmonat wurde ein vergleichbarer synergistischer Effekt auf das Plastom der Parenchymzellen beobachtet (Abb. 9B): An Tag 1 und 2 nach Beginn der Methyljasmonatinkubation war nur ein leichter Rückgang des relativen Flächenanteils des Plastoms pro Parenchymzelle ($0,127 \pm 0,072$ bzw. $0,126 \pm 0,098$) gegenüber dem Ausgangswert ($0,169 \pm 0,102$) zu verzeichnen. Nach 4-tägiger Methyljasmonatinkubation allerdings war ein dramatischer Rückgang des relativen Flächenanteils des Plastoms pro Parenchymzelle zu verzeichnen ($0,011 \pm 0,007$); dieser Rückgang setzte sich dann bis zum Ende der Inkubation nach 7 Tagen fort ($0,002 \pm 0,002$).

Bei paralleler Inkubation (zur Kontrolle) von 7 Tage alten Gerstenprimärblättern auf Wasser war bis 4 Tage nach Inkubationsbeginn kein Effekt auf den relativen Flächenanteil des Plastoms pro Parenchymzelle festzustellen; erst am Ende der Inkubationsdauer (nach 7 Tagen) war ein leichtes Absinken auf $0,095 \pm 0,057$ (von anfangs $0,169 \pm 0,102$) zu verzeichnen (Abb. 9B).

Die großen Schwankungen der einzelnen Messwerte resultierten v. a. aus der großen Flächenvariabilität der Parenchymzellen (siehe 3.2.2.1.). Um die temporäre,

progrediente Dynamik der Veränderungen des relativen Flächenanteils des Plastoms pro Parenchymzelle zu erfassen, sind die normierten Mittelwerte am besten geeignet:

Abb. 9C zeigt die Änderungen des relativen Flächenanteils des Plastoms pro Parenchymzelle von Gerstenprimärblättern unter natürlichen Bedingungen; dabei ist der Ausgangswert (Blattalter: 7 Tage) mit 100 % gesetzt. Der Flächenanteil des Plastoms vermindert sich kontinuierlich von 70 % (nach 28 Tagen), über 43 % (nach 50 Tagen) bis auf 18 % (nach 56 Tagen). Dieser drastische Rückgang des relativen Flächenanteils des Plastoms bedeutet ja letztendlich einen drastischen Rückgang der gesamten Chloroplastenmasse pro Zelle. Das hieße, vor dem Hintergrund der Tatsache, dass in den Chloroplasten ca. 70 % des Gesamtproteins des Blattes enthalten sind (LIN und WU, 2004), dass mehr als 80 % des im Plastom enthaltenen Proteins rückgewonnen werden könnte; das entspräche mehr als der Hälfte des Gesamtproteingehaltes des Blattes. Somit würde selbst das stark seneszenzente Primärblatt noch eine *Source*-Funktion (v. a. in Bezug auf Stickstoff) bekleiden.

Abb. 9D zeigt die Änderungen des relativen Flächenanteils des Plastoms pro Parenchymzelle während einer 7-tägigen Inkubation von 7 Tage alten Gerstenprimärblättern mit Methyljasmonat (bzw. Wasser zur Kontrolle): Auch hier ist der Ausgangswert (Blattalter: 7 Tage) mit 100 % gesetzt. Nach einem Tag Methyljasmonatinkubation beträgt der Flächenanteil des Plastoms noch 75 %; dieser Wert wird auch am Tag 2 der Inkubation gehalten. Anschließend sinkt der Flächenanteil des Plastoms rapide auf 7 % (Tag 4 der Inkubation) bzw. sogar auf 1 % am Ende (Tag 7) der Inkubation. Dass unter Methyljasmonateinfluss ein noch größerer Anteil der gesamten Chloroplastenmasse pro Zelle abgebaut wird und offensichtlich fast das gesamte Plastom und dessen darin enthaltene Proteine rückgewonnen werden können, könnte seine Ursache darin haben, dass zum einen die seneszenzbedingten Abbauprozesse schneller ablaufen und es bis zum Ende der Inkubation (nach 7 Tagen) noch zu keinem erkennbaren Kollabieren der Transportgefäße im Blattquerschnitt kommt. Gemäß KESKITALO *et al.* (2005) wird eine gewisse (Phloem-) Transport-Kapazität auch bis in sehr späte Phasen der Seneszenz aufrechterhalten, um den Export von Nährstoffen zu sichern.

Bei der Inkubation auf Wasser ist bis zum Tag 4 ein leichter Anstieg des relativen Flächenanteils des Plastoms auf 118 % zu verzeichnen; an Tag 7 jedoch beträgt der

Flächenanteil des Plastoms noch 56 %; dieser Wert spiegelt den letzten Mittelwert (Tag 7 der Inkubation) wieder, der, auf Grund der großen Abweichungen (Varianzen) nicht signifikant ist (Siehe Abb. 9B).

3.2.2.3. Entwicklungsbedingte Änderungen der Plastiden

Während der Entwicklung von Pflanzen treten die Plastiden in verschiedenen Formen auf, die sich durch Unterschiede in der Ultrastruktur auszeichnen und die in der Regel ineinander umwandelbar sind (NULTSCH, 1991). Alle Plastidenformen haben einen gemeinsamen Ursprung, so genannte Proplastiden, die typisch für junge, wenig differenzierte Gewebe sind. In Abhängigkeit vom Gewebetyp, dem Entwicklungszustand der Pflanzen und den Lichtbedingungen können sich Proplastiden zu Etioplasten, Chloro-, Chromo- oder Gerontoplasten entwickeln (NULTSCH, 1991).

3.2.2.3.1. Entwicklungsphasenspezifische Formen der Plastiden

Die entwicklungsphasenspezifischen Formen der Plastiden während der natürlichen Entwicklung eines Gerstenprimärblattes lassen sich auf Grund ihrer unterschiedlichen Ultrastruktur eindeutig identifizieren. Der am Anfang stehende, unbelichtete Proplastid zeichnet sich durch das Fehlen eines Thylakoidsystems und das Vorhandensein eines Prolamellarkörpers aus (Frühe Phase; Abb. 10A). Wenige Stunden nach Belichtung eines Proplastiden wird bereits ein Thylakoidsystem angelegt, wobei noch keine eindeutige Trennung in Stroma- und Granabereiche zu erkennen ist (Entwicklungsphase; Abb. 10B). Der anschließend voll entwickelte Chloroplast - mit deutlich in Grana- und Stromabereiche gegliedertem Thylakoidsystem - dominiert den größten Teil der gesamten Lebensphase (Abb. 10C). In der letzten Entwicklungsphase, der Seneszenz (Abb. 10D), kommt es zu einer schrittweisen Umwandlung der Chloroplasten zu Gerontoplasten, deren herausragende ultrastrukturelle Merkmale die Desintegration des Thylakoidsystems (v. a. der Granathylakoide) und die zahlreichen, stark vergrößerten Plastoglobuli sind.

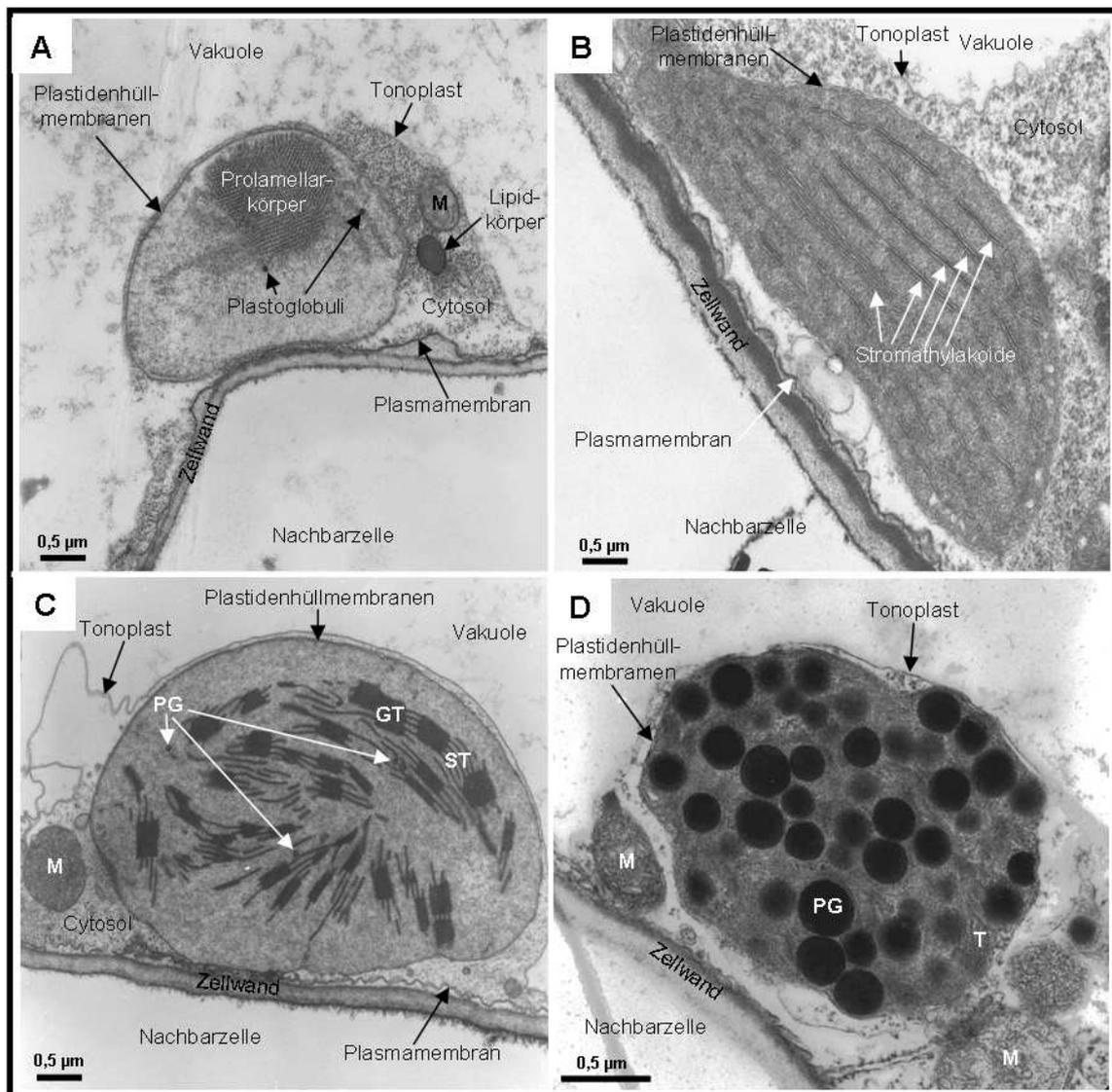


Abb. 10: Ultrastruktur von Plastiden unterschiedlicher Entwicklungsphasen

A: Proplastid; deutlich zu sehen der für diese Entwicklungsstufe charakteristische Prolamellarkörper (Frühe Phase). Auch Plastoglobuli sind bereits vorhanden. Die Plastidenhüllmembranen sind intakt.

B: Entwicklungsphase; Beginn der Ausbildung des Thylakoidsystems; vorerst jedoch nur Stromathylakoide; noch keine Granathylakoide.

C: Ausgereifter Plastid (Chloroplast); voll entwickeltes und in Grana- und Stromabereiche differenziertes Thylakoidsystem.

D: Gerontoplast; gekennzeichnet durch desintegriertes, teilweise oder völlig aufgelöstes Thylakoidsystem; zahlreiche, große Plastoglobuli (Seneszenzphase) und sich auflösende, z. T. durchlässig erscheinende Hüllmembranen.

Abkürzungen: GT: Granathylakoide, M: Mitochondrium, PG: Plastoglobuli, ST: Stromathylakoide, T: Thylakoide

3.2.2.3.2. Spezielle ultrastrukturelle Merkmale der Gerontoplasten

Die abschließende Entwicklung von Chloroplasten zu Gerontoplasten ist durch zwei spezielle ultrastrukturelle Merkmale charakterisiert: Zum einen desintegriert das Thylakoidsystem, wobei sukzessive zuerst die Grana- und anschließend die Stromathylakoide bis zum vollständigen Verschwinden aufgelöst werden. Zum anderen bilden sich zahlreiche, stark vergrößerte Plastoglobuli, die in der späten Seneszenzphase nahezu den gesamten Raum des Gerontoplasten einnehmen (siehe Abb. 10D und Abb. 12D). Weiterhin weist der Bereich der Chloroplastenhüllmembranen, der sich in der unmittelbaren Nähe zu den randständigen Plastoglobuli befindet, eine höhere Elektronentransparenz, und damit eine geringere Dichte auf, was auf eine beginnende Auflösung der Hüllmembranen an dieser Stelle hindeutet (Abb. 11A). Das könnte ein Hinweis dafür sein, dass, wie auch von GUIAMÉT *et al.*, (1999) berichtet, in manchen Fällen ein Durch- oder Austritt ganzer Plastoglobuli oder plastoglobuliähnlicher Strukturen durch die Plastidenhülle erfolgen könnte (Abb. 10B). Einige der Plastoglobuli sind aber auch offensichtlich mit der inneren Chloroplastenhülle verbunden (Abb. 11A, kleiner Pfeil links unten). KESSLER *et al.* (1999) sieht solche Verbindungen in Zusammenhang mit der Genese der Plastoglobuli. Darüber hinaus scheinen nahezu alle Plastoglobuli in Kontakt mit den Thylakoiden zu stehen (Abb. 11C). AUSTIN *et al.* (2006) stellt mit Hilfe modernster elektronenmikroskopischer Methoden und Verfahren (Hochdruckgefrieren/Gefriersubstitution kombiniert mit Elektronentomographie; Gefrierbruch- und -ätztechniken) sogar fest, dass mehr als 98 % Plastoglobuli entweder mit den Thylakoiden oder mit anderen Plastoglobuli in Verbindung stehen. Neben Lipiden werden im Kern der Plastoglobuli auch Karotinoide, Plastochinone und Tocopherol (Vitamin E) gefunden. Desweiteren konnten AUSTIN *et al.* (2006) zeigen, dass sich über die Oberfläche des *Lipidmonolayers* der Plastoglobuli ins innere das Enzym Tocopherolcyclase (VTE1) spannt. Daraus, und aus dem Umstand der permanenten strukturellen Kopplung der Plastoglobuli mit den Thylakoiden folgern AUSTIN *et al.* (2006) weiter, dass die Lipide im Plastoglobuli-Kern mit denen der Thylakoide im Gleichgewicht stehen. Somit kann eine freier Austausch der unterschiedlichen Lipidmoleküle zwischen den Plastoglobuli und den Thylakoiden, wo diese Verbindungen u. a. zum Schutz vor Schädigungen (v. a. der Photosysteme) durch freie Radikale dienen, stattfinden. Dass gerade während des Seneszenzstadiums die

Plastoglobuli so prominent auftreten, könnte auch ein Hinweis darauf sein, dass dadurch potentiell destabilisierende makromolekulare Kataboliten aus den Thylakoidmembranen entfernt und somit unschädlich gemacht werden könnten (GOSH *et al.*, 1994). Der während der Seneszenz auftretende radikale Chlorophyllverlust (s. o.) und der Umstand, dass in den Plastoglobuli u. a. Chlorophyll und Chlorophyllabbauprodukte, Proteine der PS, Untereinheiten der ATPase und Cytochrom f (GOSH *et al.*, 1994; GUIAMÉT *et al.*, 1999) sowie Tocopherol – ein Radikalfänger, der zur „Entgiftung“ von ROS befähigt ist - (AUSTIN *et al.*, 2006; VIDI *et al.*, 2006) gefunden wurden, erhärten die These von der „Schutzfunktion“ der Plastoglobuli im Laufe der Seneszenz. Eine weitere Unterstützung dieser These ergibt sich daraus, dass das in Plastoglobuli immunocytoologisch nachgewiesene Enzym VTE1 (AUSTIN *et al.*, 2006) den wichtigen vorletzten Schritt der Tocopherol- (Vitamin E) Synthese katalysiert (KANWISCHER *et al.*, 2005). Weiterhin konnten KANWISCHER *et al.*, (2005) und PORVIROVA *et al.* (2002) zeigen, dass die VTE1 Aktivität bei oxydativem Stress steigt und die Thylakoidmembranen und photosynthetischen Proteine vor oxydativen Schäden durch ROS zu schützen vermag.

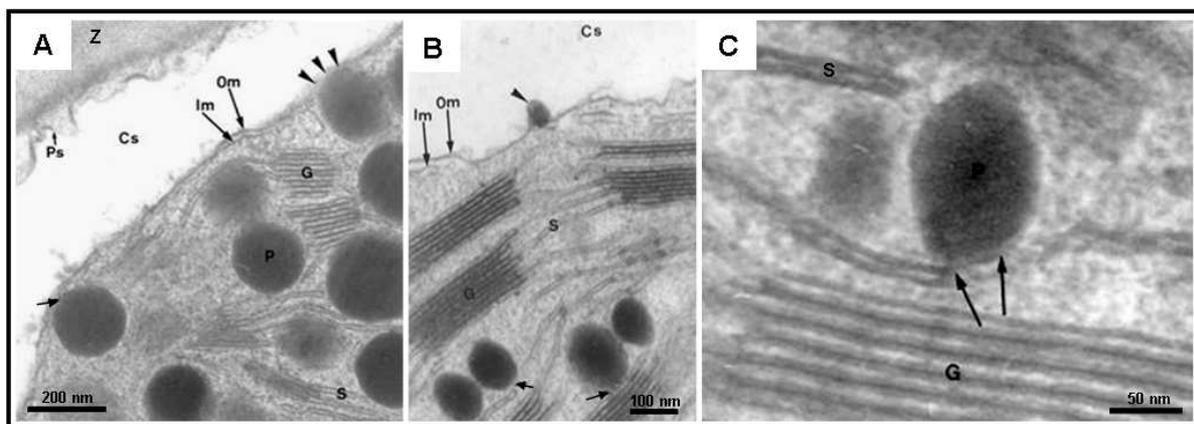


Abb. 11: Ultrastrukturelle Merkmale von Gerontoplasten

A: Ausschnitt aus einem 53 Tage alten Plastiden; zu sehen sind noch deutlich zu unterscheidende Grana- und Stromathylakoide (G bzw. S), sowie z. T. die Innere- und Äußere Hüllmembran (Im bzw. Om). Des Weiteren zu sehen: Verbindung eines Plastoglobulus (P) mit der inneren Hüllmembran (kleiner Pfeil, links unten) sowie eine elektronentransparentere Zone im Bereich eines randständigen Plastoglobulus (3 Pfeilspitzen, rechts oben) welche auf eine lokale Auflösung der Hüllmembranen hindeutet.

B: Durchtritt eines Plastoglobulus oder einer plastoglobuliähnlichen Struktur durch die Hüllmembran (Pfeilspitze); Verbindung von Plastoglobuli mit der Thylakoidmembran (kleine Pfeile, unten).

C: Stark vergrößerte Verbindungszone eines Plastoglobulus mit der Thylakoidmembran (Pfeile).

Abkürzungen: Cs: Cytosol, Im: innere Hüllmembran, Om: äußere Hüllmembran Ps: Plasmamembran, Z: Zellwand

3.2.2.4. Änderungen der Anzahl und Größe der Plastoglobuli pro Plastid

Es sollte festgestellt werden, inwieweit im Verlauf der natürlichen als auch während der durch Methyljasmonat induzierten Seneszenz die Veränderungen in der Anzahl der Plastoglobuli pro Plastid und in der Größe der Plastoglobuli (gemessen als Fläche im Ultradünnschnitt) in vergleichbarer Weise auftreten.

3.2.2.4.1. Änderungen der Anzahl der Plastoglobuli pro Plastid

Während der natürlichen Entwicklung konnte, in Übereinstimmung mit Befunden der Literatur (z. B. BARTON, 1966; LICHTENTHALER, 1968; GOSH *et al.*, 2001; KOŁODZIEJEK *et al.*, 2003; KESKITALO *et al.*, 2005), ein Anstieg in der Anzahl der Plastoglobuli pro Chloroplast festgestellt werden. Chloroplasten aus einer Parenchymzelle eines 7 Tage alten Gerstenprimärblattes hatten ca. $17,9 \pm 6,0$ Plastoglobuli; nach 28 Tagen bzw. 50 Tagen waren es $9,7 \pm 5,1$ bzw. $13,1 \pm 3,8$. Dass jedoch erst in der späten Seneszenzphase (Tag 56) ein sprunghafter, signifikanter Anstieg der Plastoglobulianzahl auf durchschnittlich $35,5 \pm 5,9$ zu verzeichnen war (siehe Abb. 12A bis D und Abb. 13A), ist ein starkes Indiz dafür, dass den Plastoglobuli – obwohl in allen anderen Entwicklungsstadien der Plastiden vorhanden – primär eine besondere (Schutz-)Funktion (siehe oben) während des Programms Seneszenz zukommt.

Bei Inkubation von 7 Tage alten Gerstenprimärblättern mit Methyljasmonat waren nach dem ersten Tag $6,0 \pm 2,7$ Plastoglobuli pro Plastid vorhanden; die Anzahl der Plastoglobuli pro Plastid stieg im weiteren Verlauf der Inkubation allmählich von $8,3 \pm 2,1$ (Tag 2) auf $14,9 \pm 7,3$ (Tag 4) an, um letztendlich am Ende der Inkubationsdauer (nach 7 Tagen) wieder leicht auf $10,5 \pm 2,7$ Plastoglobuli pro Plastid zu fallen (siehe Abb. 12E bis H und Abb. 13C). Auf Grund der Varianzen der Mittelwerte konnte allerdings keine signifikante Änderung der Plastoglobulianzahl in Abhängigkeit zur Methyljasmonat-Inkubation erkannt werden.

Bei paralleler Inkubation von 7 Tage alten Gerstenprimärblättern auf Wasser (Kontrolle) war über die gesamte Zeit (7 Tage) keine Änderung der Anzahl der Plastoglobuli pro Plastid gegenüber dem Ausgangswert zu erkennen (Abb. 12I - L und Abb. 13C).

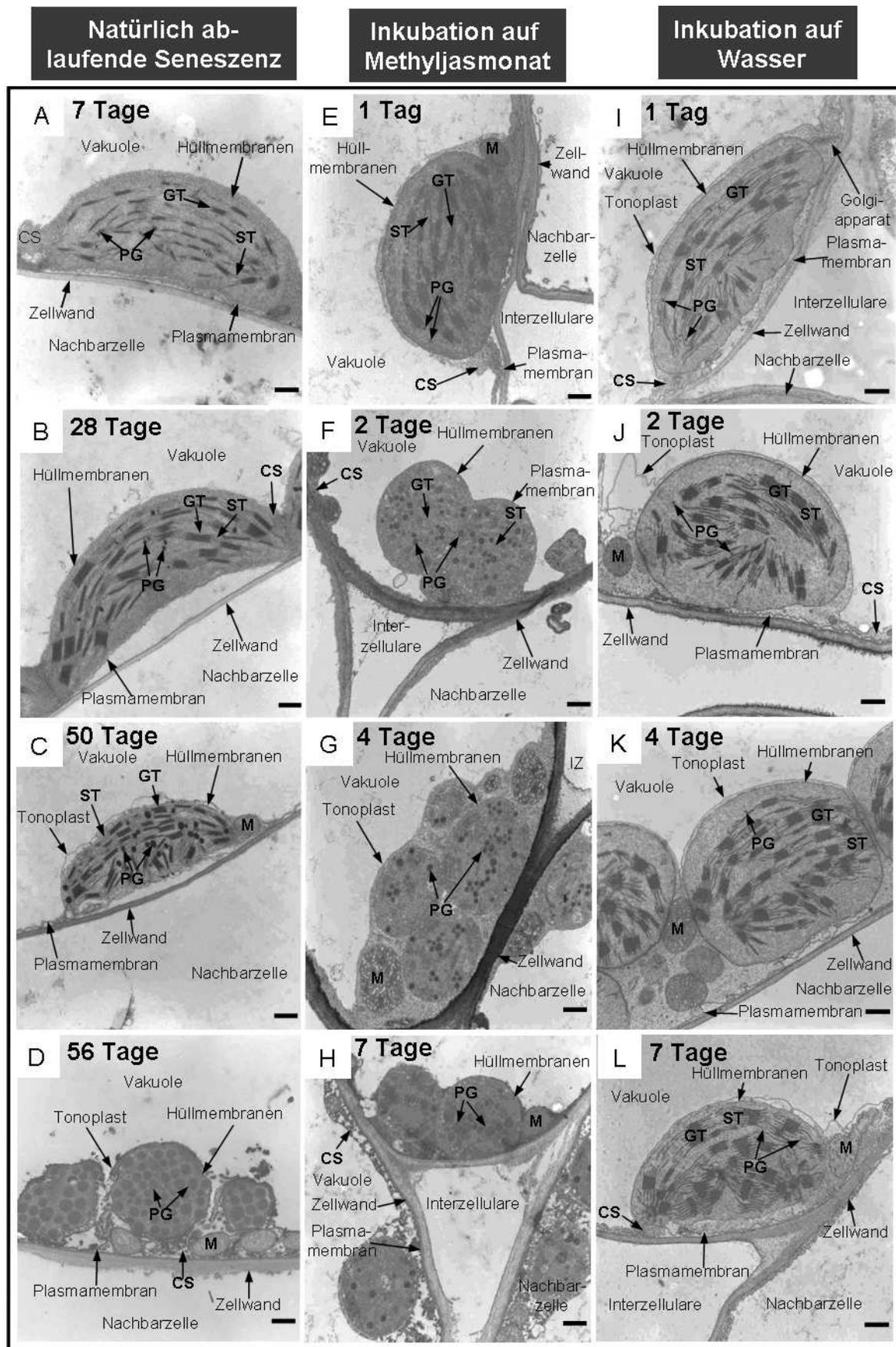


Abb. 12: Querschnitte (Ultradünnschnitte) durch Plastiden aus Parenchymzellen von Gerstenprimärblättern bei natürlich ablaufender bzw. durch Methyljasmonat induzierter Seneszenz und bei Inkubation auf Wasser (Kontrolle).

Abb. A-D: Entwicklungsstadien von Plastiden bei natürlich ablaufender Seneszenz zu unterschiedlichen Zeitpunkten von 7 Tagen (A), 28 Tagen (B), 50 Tagen (C) und 56 Tagen (D). Auffällig waren v. a. die im Laufe der Blattentwicklung sich verringernde Größe der Plastiden und die seneszenzbedingten, ultrastrukturellen Veränderungen (Desintegration der Thylakoidmembranen, Anhäufung und drastische Vergrößerung der Plastoglobuli), die die Transformation des Chloroplasten zum Gerontoplasten anzeigen.

In **Abb. E-H:** Entwicklungsstadien von Plastiden aus 7 Tage alten Gerstenprimärblättern bei Inkubation mit Methyljasmonat nach unterschiedlicher Inkubationsdauer von 1 Tag (E), 2 Tagen (F), 4 Tagen (G) und 7 Tagen (H). Ähnlich der natürlich ablaufenden Seneszenz waren auch hier im Laufe der Methyljasmonatinkubation eine Verringerung der Größe der Plastiden und vergleichbare ultrastrukturellen Veränderungen (Desintegration der Thylakoidmembranen, Anhäufung und drastische Vergrößerung der Plastoglobuli) festzustellen.

Abb. I-L: Entwicklungsstadien von Plastiden aus 7 Tage alten Gerstenprimärblättern bei Inkubation mit Wasser (zur Kontrolle) nach unterschiedlicher Inkubationsdauer von 1 Tag (I), 2 Tagen (J), 4 Tagen (K), 7 Tagen (L). Außer einer nach 7 Tagen feststellbaren leichten Verringerung der Plastidengröße ergab sich kein weiterer Befund. Ultrastrukturelle Veränderungen, wie die Desintegration der Thylakoidmembranen oder eine Anhäufung und drastische Vergrößerung der Plastoglobuli fehlten gänzlich.

Abkürzungen: CS: Cytosol, GT: Granathylakoide, M: Mitochondrium, PG: Plastoglobuli, ST: Stromathylakoide

Größenmaßstabsbalken in den Aufnahmen: entspricht 0,5 μm

3.2.2.4.2. Änderung der Größe der Plastoglobuli

Die Plastoglobuli in Plastiden der Parenchymzellen eines natürlich gewachsenen Gerstenprimärblattes nahmen von Beginn der Messungen an kontinuierlich an Größe (gemessen als Fläche im Ultradünnschnitt) zu: Betrug die mittlere Fläche von Plastoglobuli der Plastiden aus einem 7 Tage alten Gerstenprimärblatt erst noch $4,2 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2 \pm 2,0 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2$, so betrug die mittlere Fläche von Plastoglobuli aus Plastiden eines 56 Tage alten Primärblattes letztlich $55,8 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2 \pm 28,5 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2$ (Abb. 13B). Eine ähnliche Größenzunahme von Plastoglobuli wurde auch schon von LICHTENTHALER (1978) bei einer Reihe unterschiedlicher Pflanzen gefunden; dabei unterschieden sich die Größen der Plastoglobuli von einjährigen (annualen) Pflanzen (Durchmesser zwischen 80 nm und 120 nm) deutlich von denen der mehrjährigen (perennen) Pflanzen (Durchmesser zwischen 300 nm und 500 nm; einige sogar bis zu 2 μm). Aussagekräftiger in Bezug auf ultrastrukturelle Veränderungen als die eindimensionale Größe des Durchmessers ist die in dieser Arbeit herangezogene zweidimensionale Größe, die Fläche der Plastoglobuli (ähnlich den Größenvergleichen der Chloroplasten). Interessant im Zusammenhang mit der Größenzunahme der Plastoglobuli während der Seneszenz sind die Befunde aus Proteomanalysen isolierter Plastoglobuli (VIDI *et al.*, 2006; YTTBERG *et al.*, 2006): Neben bekannten Strukturproteinen wurden auch Enzyme der Lipidsynthese

und des Lipidmetabolismus gefunden, was auf eine aktive Beteiligung auch an einer seneszenzspezifischen Thylakoiddegeneration schließen lässt.

Während der Inkubation von 7 Tage alten Gerstenprimärblättern mit Methyljasmonat war ebenfalls eine Vergrößerung der Plastoglobuli in den Plastiden der Parenchymzellen zu verzeichnen: Von $4,0 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2 \pm 1,2 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2$ stieg dessen Größe auf $37,7 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2 \pm 12,3 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2$ nach 7-tägiger Methyljasmonatbehandlung (Abb. 13D). Das entspricht zwar nicht in den absoluten Werten denen, die bei der natürlich ablaufenden Seneszenz erreicht werden (s. o.), aber sie bewegen sich in der gleichen Größenordnung, sowohl was die Steigerungsraten und die Unterschiede zu den Werten zu Beginn der Behandlung betrifft. Dass gerade unter Methyljasmonateinfluss solch eine gravierende Ähnlichkeit im Größenzuwachs der Plastoglobuli auftaucht kann folgendermaßen erklärt werden: Von YTTBERG *et al.* (2006) wurden in den Plastoglobuli vier Enzyme identifiziert, die möglicherweise in unterschiedliche Aspekte des Lipid- und Hormonmetabolismus involviert sind, aber die genauen Funktionen sind unbekannt. Die Ausnahme macht das Enzym *Allene Oxide Synthase* (AOS; At5g42650), das erste und häufigste Enzym im Lipidoxygenase-Stoffwechselweg, das zur Bildung von Jasmonsäure führt (LAUDERT *et al.*, 1996; MALEK *et al.*, 2002). Die Biosynthese von Jasmonsäure beginnt mit der Oxidation von aus den Membranen (durch eine unbekannt Lipase) freigesetzter Linolsäure. Diese wird durch eine Lipoxygenase zu 13-Hydroperoxylinolsäure umgewandelt und dient anschließend als Substrat für die AOS, die daraus ein nicht stabiles Epoxid bildet. YTTBERG *et al.* (2006) spekuliert nun, dass die hohen Gehalte an Chinon und α -Tocopherol in den Plastoglobuli helfen, dieses reaktive Epoxid gegenüber einer Oxydation zu stabilisieren. Es ist anzunehmen, dass das exogen applizierte Methyljasmonat zu einem verstärkten und beschleunigten Abbau der Thylakoidmembranen, und damit zur verstärkten Freisetzung von Linolsäure, und somit zur Erhöhung von reaktivem Epoxid führt. Das wiederum zieht höhere Gehalte an Chinon und α -Tocopherol nach sich, was, in Verbindung mit der Akkumulation von Lipiden und Proteinen aus dem (seneszenzspezifischen) Abbau der Thylakoidmembranen, die Größenzunahme der Plastoglobuli erklären könnte.

Bei paralleler Inkubation von 7 Tage alten Gerstenprimärblättern auf Wasser (Kontrolle) war bis 4 Tage nach Inkubationsbeginn keine Änderung der Plastoglobuli-fläche festzustellen; erst am Ende der Inkubationsdauer (nach 7 Tagen) war ein

leichtes Ansteigen der mittleren Plastoglobulifläche (von $5,6 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2 \pm 2,5 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2$ auf letztlich $12,7 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2 \pm 7,5 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2$) zu verzeichnen (Abb. 13D).

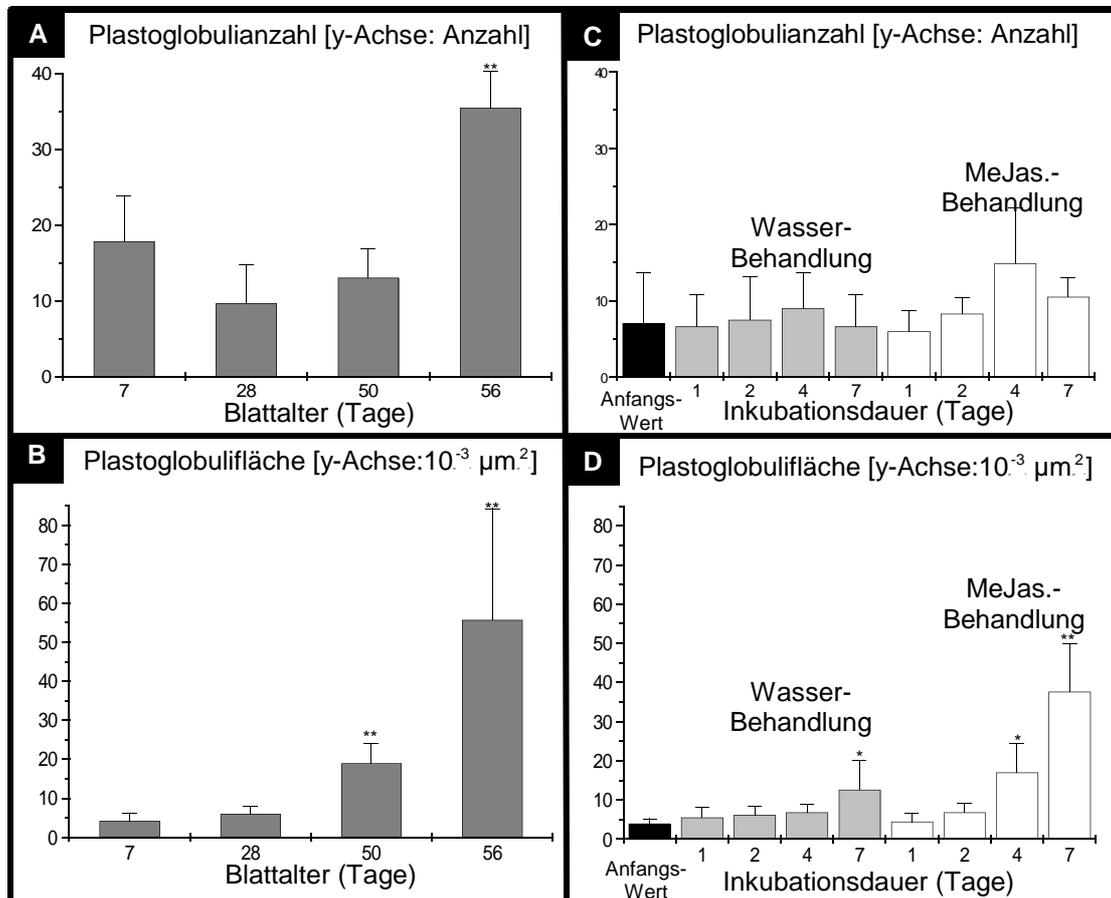


Abb. 13: Änderungen der Anzahl und Größe der Plastoglobuli pro Plastid:

Abb. A: Plastoglobulianzahl während der natürlich ablaufenden Seneszenz zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach 7, 28, 50 und 56 Tagen; $n: 13 \leq n \leq 15$). Eine signifikante Änderung (Erhöhung) der Plastoglobulianzahl war nur zum letzten Messzeitpunkt (nach 56 Tagen) messbar.

Abb. B: Plastoglobuligröße (als Fläche im Ultradünnschnitt) während der natürlich ablaufenden Seneszenz zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach 7, 28, 50 und 56 Tagen; $13 \leq n \leq 15$). Es erfolgte vom ersten Messzeitpunkt an ein Anstieg, der sich ab Tag 49 signifikant vom Anfangswert unterschied und zum letzten Messzeitpunkt hin noch mal stark anstieg.

Abb. C: Plastoglobulianzahl bei unterschiedlich langer Inkubation von 7 Tage alten Gerstenprimärblättern mit Methyljasmonat ($18 \leq n \leq 22$) bzw. Wasser (zur Kontrolle; $16 \leq n \leq 18$) nach 1 Tag, nach 2, 4 und 7 Tagen. Anfangswert: $n = 22$. Es ergab sich weder unter Methyljasmonateinfluss, noch bei Inkubation auf Wasser über den gesamten Versuchszeitraum ein Unterschied zum Ausgangswert.

Abb. D: Plastoglobuligröße (als Fläche im Ultradünnschnitt) während unterschiedlich langer Inkubation von 7 Tagen alten Gerstenprimärblättern mit Methyljasmonat ($18 \leq n \leq 22$) bzw. Wasser (zur Kontrolle; $16 \leq n \leq 18$) nach 1 Tag, nach 2, 4 und 7 Tagen. Anfangswert: $n = 22$. Während bei Inkubation auf Wasser nur der letzte Messzeitpunkt (nach 7 Tagen) einen leichten, signifikanten Anstieg der Plastoglobuligröße aufwies, konnte bei Methyljasmonatinkubation schon ab Tag 4 ein signifikanter Anstieg beobachtet werden, der bis zum letzten Messzeitpunkt nach 7 Tagen noch mal stark anstieg und in etwa die gleiche Größenordnung erreichte wie die Plastoglobuligröße der natürlich ablaufenden Seneszenz. Die Kennzeichnung von Signifikanzniveaus erfolgt durch die Sternsymbolik: $p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***.

Resümee:

Das artifizielle System, mit Hilfe einer Methyljasmonatinkubation Seneszenz an abgeschnittenen, 7 Tage alten Gerstenprimärblättern auszulösen und zu beschleunigen, zeigte in Bezug auf die zuvor ausgewählten und geprüften seneszenzspezifischen Marker, wie Chlorophyllabbau, ultrastrukturelle Veränderungen sowohl der Blattparenchymzellen und des Plastoms, als auch die ultrastrukturellen Veränderungen der Plastiden eine hohe Übereinstimmung mit der während der natürlichen Entwicklung auftretenden Seneszenz. Somit wurde dieses System als hinreichend geeignet betrachtet, um seneszenzspezifische Änderungen der Plastidenhülle zu untersuchen.

3.3. Der Proteinimport als Monitor für methyljasmonat-induzierte Veränderungen in der Plastidenhülle

Gemäß KEEGSTRA und CLINE (1999) besteht der Standardproteinimportapparat der Plastiden aus zwei Multiproteinkomplexen. Der in der äußeren Plastidenhülle lokalisierte Multiproteinkomplex (TOC = *T*ranslocon *O*f *T*he *O*uter *C*hloroplast *E*nvelope) besteht aus Komponenten, die die spezifische Erkennung der Transitsequenz (durch TOC 34, TOC 159), die Initiation der Translokation (TOC 159) und den Transfer des Vorstufenproteines (TOC 75) durch die Membran vermitteln. Der weitere Transport des Vorstufenproteins erfolgt durch den in der inneren Hüllmembran befindlichen TIC Multiproteinkomplex (TIC = *T*ranslocon *O*f *T*he *I*nnner *C*hloroplast *E*nvelope). Bis jetzt wurden insgesamt fünf Proteine, und zwar TIC 110, TIC 55, TIC 40, TIC 22 und TIC 20 isoliert und identifiziert (SCHNELL *et al.*, 1994; LUBECK *et al.*, 1996; CALIEBE *et al.*, 1997, STAHL, 1999; WU *et al.*, 1994; KOURANOV und SCHNELL, 1997; MA *et al.*, 1996). Über dessen genaue Lage, deren Rolle und Funktionen innerhalb des Proteintransports in den Plastiden ist noch relativ wenig bekannt und wird zudem in der Literatur kontrovers diskutiert (KESSLER *et al.*, 1996; CALIEBE *et al.*, 1997; HIDALGO *et al.*, 1997; GRAY *et al.*, 1997; PFANNSCHMIDT *et al.*, 1999; OSWALD *et al.*, 2001; BÉDARD und JARVIS, 2005). Seneszenzspezifische Änderungen der Plastidenhülle sollten demnach auch

gravierende Auswirkungen auf die Funktion und/oder Komposition des Standardproteinimportapparats und somit auch auf den Proteinimport selbst aufweisen.

3.3.1. Veränderungen im Proteinspektrum von Gerstenblättern nach Methyljasmonatinkubation

Gemäß BECKER und APEL (1993) und WASTERACK und PARTIER (1997) führt eine Inkubation von Gerstenpflanzen mit Jasmonat oder dessen Methylester zu einer Expression spezifischer Proteine, die als *jasmonate-induced proteins* (JIP) bezeichnet werden. Zeitgleich akkumulieren Proteine des Lipidstoffwechsels, die beim Abbau von freien Fettsäuren eine Rolle spielen. Dazu zählt unter anderem eine Lipoxygenase (THOMPSON *et al.*, 1998; WASTERACK und PARTIER 1997). Die meisten Untersuchungen, in denen solche Reaktionen gefunden wurden, wurden vor allem an abgeschnittenen Gerstenprimärblättern nach Inkubation mit Methyljasmonat beobachtet (BECKER und APEL, 1993; WASTERACK und PARTIER 1997).

Mögliche Änderungen im Proteinspektrum nach Inkubation **ganzer** Gerstenpflanzen mit Methyljasmonat sollten zu verschiedenen Zeitpunkten während der Behandlung nach SDS-PAGE und Immunnachweis (*Western Blotting*; siehe Material und Methoden) analysiert (Abb. 14) werden.

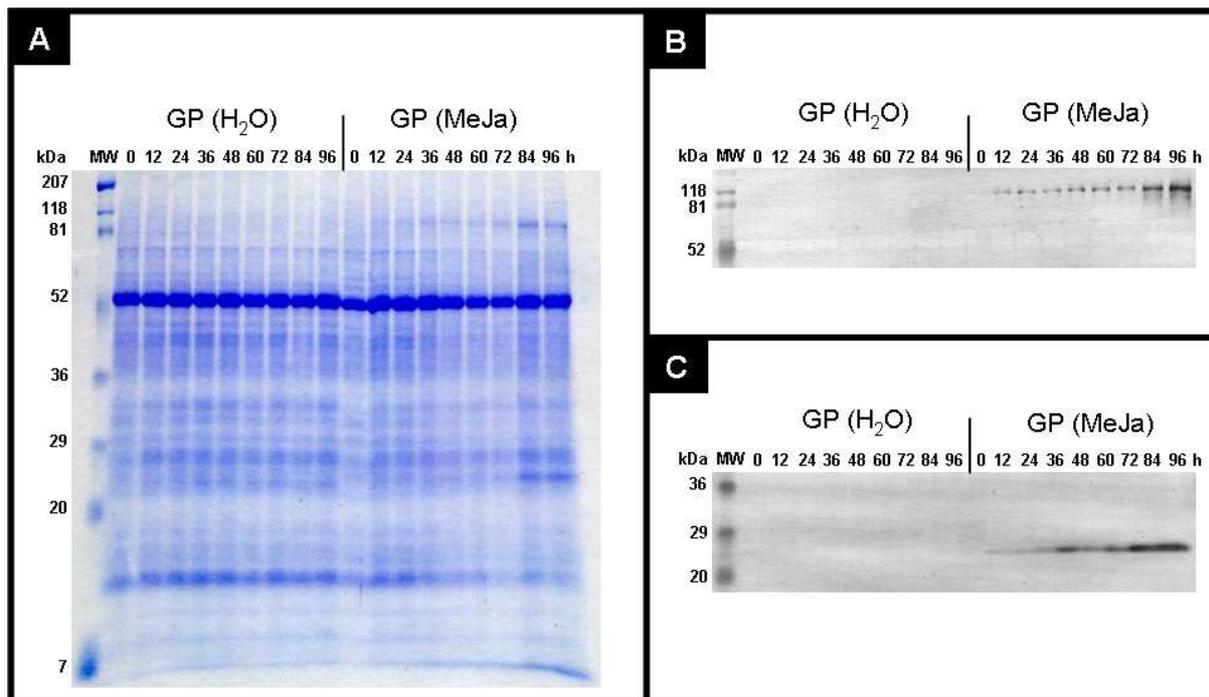


Abb. 14: Seneszenzinduktion durch Methyljasmonat: Nachweis von Änderungen im Proteinmuster (verändert; gemäß Diplomarbeit von Heike Bauerschmitt, LS Pflanzenphysiologie, Universität Bayreuth):

A: Auftrennung der Gesamtproteinextrakte aus methyljasmonatinkubierten und unbehandelten Gerstenprimärblättern mittels SDS-PAGE. Visualisierung der Proteine durch *Coomassie*-Blau-Färbung.

B: Immunnachweis (*Western Blot*) von LOX mit einem polyklonalen Antikörper.

C: Immunnachweis von JIP 23 mit einem polyklonalen Antikörper.

Abkürzungen: GP (H₂O): Extrahiertes Gesamtprotein aus unbehandelten Gerstenprimärblättern (= Kontrolle). GP (MeJa): Extrahiertes Gesamtprotein aus methyljasmonatinkubierten Gerstenprimärblättern. MW: Molekulargewichtsstandard. 0-96 h: Zeitpunkte der Probennahme nach Inkubationsbeginn

Bereits 12 Stunden nach Beginn der Seneszenzinduktion waren sowohl die Lipoxygenase als auch ein Vertreter der jasmonatinduzierten Proteine, das JIP 23, eindeutig immunologisch nachweisbar; mit zunehmender Dauer der Methyljasmonatinkubation (0-96 h) nahmen auch die Intensität der Immunsignale der LOX und des JIP 23 zu. Bei den unbehandelten Kontrollpflanzen ist zu keinem Zeitpunkt ein Immunsignal der LOX oder des JIP 23 nachweisbar (Abb. 14B, C).

Die Kontrollpflanzen zeigten keinerlei Änderungen im Gesamtproteinmuster nach SDS-PAGE und *Coomassie*-Blau-Färbung, wohingegen das Proteinmuster der Primärblätter der methyljasmonatinduzierten Pflanzen eine Abnahme von Proteinen im Größenbereich von ca. 15 kDa bis 20 kDa und von 30 kDa bis 35 kDa und z. B. eine Zunahme von Proteinen der Größe von ca. 118 kDa (LOX) und 23 kDa (JIP 23) in Abhängigkeit der Inkubationsdauer zeigten (Abb. 14A). Durch den Nachweis an sich und die zunehmende Akkumulation zweier Proteine, die zuvor als JIP's (JIP 23 und LOX) identifiziert wurden (BECKER und APEL, 1993; WASTERNAK und

PARTHIER 1997) konnte die Wirksamkeit von Methyljasmonat in ganzen Gerstenpflanzen auf der Ebene der Proteine gezeigt werden und deckten sich mit den Befunden an abgeschnittenen Gerstenblättern (BECKER und APEL; 1993; WASTERNACK und PARTHIER, 1997).

3.3.2. Quantitative Veränderungen des Rubisco Gehalts im Plastiden unter Methyljasmonateinfluss

Rubisco ist das mengenmäßig häufigste Enzym des Chloroplasten (ELLIS, 1979) und besteht aus einer großen- (LSU = *Large Subunit*) und einer kleinen Untereinheit (SSU = *Small Subunit*), wobei die SSU im Gegensatz zur LSU kernkodiert ist (BARRACLOUGH und ELLIS, 1980). Durch die Anwesenheit des SSU Proteins im Chloroplasten wird die Translation der *rbcl* RNA hochreguliert, was die Produktion der LSU bedingt. Das LSU Protein bedingt seinerseits eine rückwirkende Unterdrückung der eigenen Translation (*feedback repression*), d. h. wenn die LSU im Überschuss vorliegt, wird die LSU-Produktion im Plastiden wieder herunter reguliert (RODERMEL, 1999; IRVING und ROBINSON, 2006). Dadurch, dass die LSU-Produktion im Plastiden von der Menge der im Plastiden vorliegenden kernkodierten SSU abhängig ist, gibt es mehrere Möglichkeiten der Kontrolle des Gehalts an Rubisco: Eine Steuerung erfolgt dann entweder über die Transkription und/oder Translation der SSU oder auch über eine Veränderung der Transportraten in den Plastiden. In allen Fällen sollte das sich direkt auch auf den Gehalt an Rubisco im Plastiden auswirken. Da die Immunocytochemie einen Einzelmolekülnachweis darstellt, und somit die Immunsignale direkt proportional zur Menge des Antigens sind, müssen Veränderungen bezüglich des Rubisco Gehaltes nachweisbar und quantifizierbar sein. Dessenweiteren könnte eine unvollständige Assemblierung des Holoenzym (durch das Fehlen der SSU) einen verstärkten Abbau der LSU zur Folge haben (KATO *et al.*, 2004) und dadurch eine Verminderung des Rubisco-Gehalts immunocytochemisch detektierbar und quantifizierbar machen.

Abb. 15 zeigt die quantitativen Veränderungen des Rubisco-Gehalts in Plastiden von 7 Tage alten Gerstenprimärblättern bei insgesamt 24-stündiger Inkubation mit Methyljasmonat: Deutlich zu erkennen ist die stetige, sukzessive Abnahme des Immunsignals der Rubisco mit fortschreitender Dauer der Methyljasmonat-

Inkubation; gegenüber dem Ausgangswert (7 Tage alte Gerstenprimärblätter) von $85 \pm 15 \text{ G}/\mu\text{m}^2$ (Goldpartikel pro μm^2 Plastidenquerschnittsfläche) vermindert sich die Immunsignaldichte der Rubisco von $71 \pm 6 \text{ G}/\mu\text{m}^2$ nach 8 h Inkubationsdauer über $51 \pm 10 \text{ G}/\mu\text{m}^2$ nach 16 h Inkubationsdauer auf letztlich $37 \pm 7 \text{ G}/\mu\text{m}^2$ nach 24 h Inkubationsdauer (siehe Abb. 15D bis F, J). Eine parallel durchgeführte Inkubation der 7 Tage alten Gerstenprimärblätter auf Wasser weist keinen solchen Effekt auf (siehe Abb. 15A bis C, J). Der Endwert (8 Tage alte Gerstenprimärblätter, herkömmliche Anzucht) von $66 \pm 7 \text{ G}/\mu\text{m}^2$ ist zwar gegenüber dem Ausgangswert etwas niedriger, unterscheidet sich jedoch nicht signifikant von diesem (Abb. 15G und H, J). Eine Inkubation eines Ultradünnschnitts mit dem goldkonjugierten sekundären Antikörper ergibt kein unspezifisches Immunsignal (Abb. 15I). Geringe unspezifische Immunsignale des primären Antikörpers (Anti-Holo-Rubisco-Antikörper) mit anderen Zellstrukturen (Chromatin: $4 \pm 0 \text{ G}/\mu\text{m}^2$, Mitochondrien: $2 \pm 0 \text{ G}/\mu\text{m}^2$ und allgemeiner Hintergrund: $2 \pm 0 \text{ G}/\mu\text{m}^2$) sind sehr gering und bewegen sich weit unterhalb der Fehlergrenzen (siehe Abb. 15J).

Offensichtlich führt nur eine Inkubation mit Methyljasmonat schon innerhalb von 24 Stunden zu einer signifikanten Verringerung des Rubisco Gehalts in Plastiden. Es ist bekannt, dass exogen appliziertes Methyljasmonat nicht nur in Abwehrprozessen der Pflanze (VIJAYAN *et al.*, 1998; XIE *et al.*, 1998; RYAN *et al.*, 2000), sondern auch in Entwicklungsprozessen (XIE *et al.*, 1998; SANDERS *et al.*, 2000) eine Rolle spielt. Wie HE *et al.* (2002) an der Blattseneszenz (sowohl an abgeschnittenen als auch an nicht abgeschnittenen Blättern) bei *Arabidopsis*-Mutanten zeigen konnten, ist bei der Wirkung von exogen appliziertem Methyljasmonat ein funktional intakter Jasmonatsignaltransduktions-Weg notwendig. Dennoch ist noch nicht klar, welche Rolle von Methyljasmonat während der Seneszenz eingenommen wird. Es gibt Hinweise, dass exogen appliziertes Methyljasmonat zu einer reduzierten Expression von Genen, die für Komponenten des Photosyntheseapparates kodieren, führt: so wird beispielsweise von einer reduzierten Translation und gesteigerten Degradation der SSU berichtet (WEIDHASE *et al.*, 1987; PARTHIER, 1990). Neben der Beeinflussung des Rubisco Gehalts über die Syntheserate außerhalb des Plastiden gibt es noch mindestens zwei plastidäre Kontrollmechanismen: KHAN *et al.* (1999) beschreibt eine „proteolytische Regulation“ des Rubiscopehalts über generische Proteasen. MORENO und SPREITZER (1999) berichten über einen Abbau der Rubisco in Zusammenhang mit ROS, wobei die diese nicht selbst in der Lage sind,

Rubisco zu spalten (DESIONE *et al.*, 1996), aber über oxidative Schädigungen bestimmter Stellen des Proteins einen proteolytischen Abbau begünstigen (ISHIDA *et al.*, 1999). In Plastiden von seneszenten Blättern bildet sich ein mehr und mehr oxidierendes Milieu, da die Peroxidproduktion und andere Radikale nicht mehr effektiv durch enzymatische Radikalfänger entgiftet werden können (MCRAE und THOMPSON, 1983; MEHTA *et al.*, 1992). Dadurch ist ein verstärkter, seneszenzbezogener Abbau der Rubisco auch im Plastiden wahrscheinlich. Unterstützt wird diese These durch die spezifische Akkumulation der speziellen, nur für den Rubiscoabbau in Plastiden verantwortlichen Protease CND 41 (KATO *et al.*, 2005). Allerdings ist über die Regelmechanismen, die zu einer Akkumulation im Plastiden führen noch nichts bekannt; hier könnten seneszenzbedingte Veränderungen des Proteintransports in den Plastiden eine Rolle spielen.

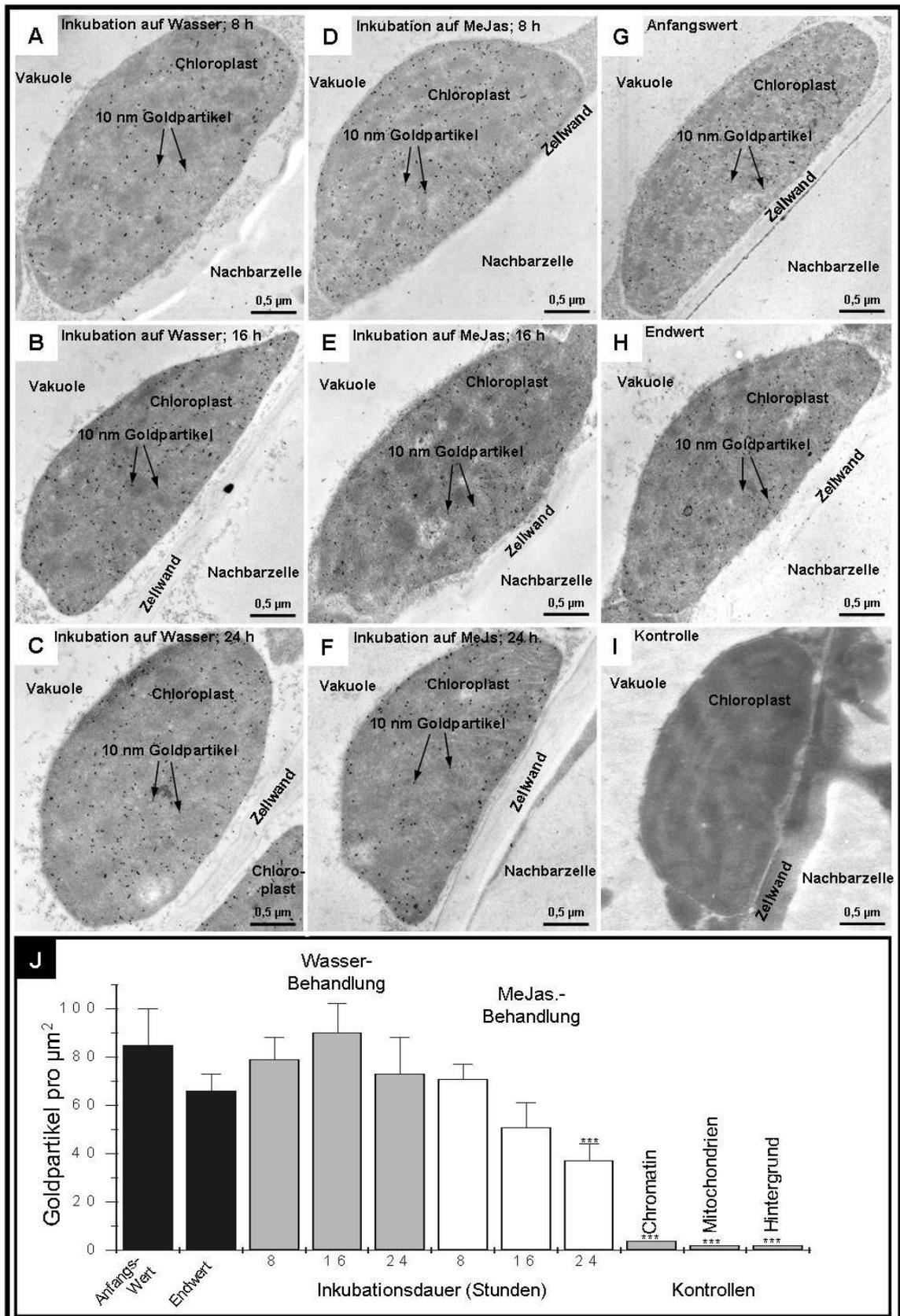


Abb. 15: Quantitative Veränderung des Rubisco Gehalts im Chloroplasten (als Dichte der Immunogoldpartikel pro μm^2 Plastidenquerschnittsfläche) während einer 24-stündigen Methyljasmonatinkubation:

Abb. A-C: Immunogoldmarkierung (Anti-Rubisco-Antikörper) von Ultradünnschnitten aus 7 Tage alten Gerstenprimärblättern nach unterschiedlich langer Inkubation auf Wasser (Inkubationsdauer: A: 8 h, B: 16 h, C: 24 h). Das Immunsignal (10 nm Goldpartikel) ist deutlich in der Plastidenquerschnitts-fläche

lokalisiert und gut zu erkennen. Eine Verminderung des Immunsignals im Laufe der Zeit war nicht gegeben.

Abb. D-F: Immunogoldmarkierung (Anti-Rubisco-Antikörper) von Ultradünnschnitten aus 7 Tage alten Gerstenprimärblättern nach unterschiedlich langer Inkubation auf Methyljasmonat (Inkubationsdauer: D: 8 h, E: 16 h, F: 24 h). Auch hier ist das Immunsignal (10 nm Goldpartikel) deutlich in der Plastidenquerschnittsfläche lokalisiert und gut zu erkennen. Beim letzten Zeitpunkt könnte eine Verminderung des Immunsignals gegeben sein.

Abb. G: Immunogoldmarkierung (Anti-Rubisco-Antikörper) von Ultradünnschnitten aus 7 Tage alten Gerstenprimärblättern (Anfangswert).

Abb. H: Immunogoldmarkierung (Anti-Rubisco-Antikörper) von Ultradünnschnitten aus 8 Tage alten Gerstenprimärblättern (Endwert).

Abb. I: Immunogoldmarkierung mit sekundärem goldkonjugiertem Antikörper (10 nm Goldpartikel) von Ultradünnschnitten aus 7 Tage alten Gerstenprimärblättern (Kontrolle goldkonjugierte Immunoglobulin-Fraktion). Es waren keinerlei Immunsignale vorhanden.

Abb. J: Grafische Darstellung der Anti-Rubisco-Immunsignal-Dichte (Goldpartikel pro μm^2 Plastidenquerschnittsfläche) in Abhängigkeit der Inkubationsdauer mit Methyljasmonat bzw. Wasser; Anfangs- und Endwert (Immunogoldmarkierung aus 7 bzw. 8 Tage alten Gerstenprimärblättern; konventionell im Gewächshaus in Erdkultur gewachsenen), unspezifische Immunsignale mit anderen Zellstrukturen (Kontrollen). Die Dichte der Immunsignale sowohl bei Anfangs- und Endwert, als auch bei Inkubation mit Wasser unterschieden sich nicht signifikant und ließen auch keinerlei Tendenz erkennen. Unter Methyljasmonateinfluss zeigte sich im Laufe der Inkubation jedoch eine Abnahme der Markierungsdichte, wobei sich lediglich die Markierungsdichte des letzten Messzeitpunkts signifikant vom Ausgangswert unterschied. Die Markierungsdichten der unspezifischen Immunsignale (Kontrollen) lagen weit unterhalb der Fehlertoleranzen.

Für alle Datensätze gilt: $10 \leq n \leq 12$.

Die Kennzeichnung von Signifikanzniveaus erfolgt durch die Sternsymbolik: $p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***.

3.3.3. Quantitative Veränderungen des LHC-II Gehalts im Plastiden unter Methyljasmonateinfluss

LHC II (*Light Harvesting Complex of Photosystem II*) und die *major light harvesting chlorophyll a/b binding proteins* sind weitere kernkodierte Protein-Pigment-Komplexe des in den Thylakoiden befindlichen Photosystems II, die durch den Standardproteinimportapparat der Plastidenhüllmembran (TOC - TIC Maschinerie) transportiert werden müssen, um in die Chloroplasten zu gelangen. Auch hier müssten sich - wie schon für die Rubisco gezeigt (s. o.) - seneszenzspezifische Veränderungen im LHC II Gehalt des Plastiden ergeben. Solche möglichen Veränderungen sind auch durch immunocytochemische Einzelmolekülnachweise zugänglich und somit nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ messbar.

In Abb. 16 zeigt die quantitativen Veränderungen des LHC II Gehalts in Plastiden von 7 Tage alten Gerstenprimärblättern bei insgesamt 24-stündiger Inkubation mit Methyljasmonat: Zu beobachten war eine Tendenz zur Abnahme des Immunsignals des LHC II Gehalts mit fortschreitender Dauer der Methyljasmonatinkubation; gegenüber dem Ausgangswert (7 Tage alte Gerstenprimärblätter) von

$101 \pm 26 \text{ G}/\mu\text{m}^2$ (Goldpartikel pro μm^2 Plastidenquerschnittsfläche) erfolgte jedoch erst ein scheinbarer (nicht signifikanter) Anstieg der Immunsignaldichte des LHC II auf $131 \pm 14 \text{ G}/\mu\text{m}^2$ nach 8 h Inkubationsdauer, um dann über $106 \pm 12 \text{ G}/\mu\text{m}^2$ nach 16 h auf letztlich $65 \pm 12 \text{ G}/\mu\text{m}^2$ nach 24 h signifikant abzusinken (siehe Abb. 16D bis F, J).

Eine parallel durchgeführte Inkubation der 7 Tage alten Gerstenprimärblätter auf Wasser wies keine einheitliche Tendenz des LHC II-Immunsignals mit fortschreitender Dauer der Inkubation auf; so schwankten die Mittelwerte der Immunsignaldichte von $141 \pm 22 \text{ G}/\mu\text{m}^2$ nach 8 h Inkubationsdauer über $93 \pm 14 \text{ G}/\mu\text{m}^2$ nach 16 h auf $152 \pm 23 \text{ G}/\mu\text{m}^2$ nach 24 h (siehe Abb. 16A bis C, J).

Der Endwert (8 Tage alte Gerstenprimärblätter von im Gewächshaus in Erdkultur gewachsenen Pflanzen) von $113 \pm 18 \text{ G}/\mu\text{m}^2$ war gegenüber dem Ausgangswert nicht verändert (Abb. 16G und H, J). Eine Inkubation eines Ultradünnschnitts mit dem goldkonjugierten sekundären Antikörper ergab kein unspezifisches Immunsignal (Abb. 16I).

Wie auch schon für die Rubisco gezeigt, führt eine Inkubation mit Methyljasmonat innerhalb von 24 Stunden zu einer signifikanten Verringerung des LHC II Gehalts in Plastiden. Auch hier ist noch keineswegs geklärt, welche Mechanismen dafür verantwortlich sind. Dass es durch exogen appliziertes Methyljasmonat zu einer reduzierten Expression von Genen, die für Komponenten des Photosynthesapparates kodieren, kommt, wird beispielsweise schon von WEIDHASE *et al.* (1987) und PARTHIER (1990) berichtet. Über die Regelung des seneszenzspezifischen Um- und Abbaus (*turnover*) von photosynthetischen Proteinen durch spezielle kernkodierte Plastidenproteasen existieren dahingegen nur sehr begrenzte Informationen (ŽELISKO *et al.*, 2005). Eine weitere Möglichkeit der Einflussnahme auf den Gehalt an kernkodierten Proteinen innerhalb des Plastiden, könnte auch über seneszenzbedingte Veränderungen des Proteintransports erfolgen.

Resümee:

Eine Methyljasmonatinkubation abgeschnittener Gerstenprimärblätter war offensichtlich in der Lage, innerhalb von nur 24 Stunden einen quantitativ messbaren (signifikanten) Rückgang zweier wichtiger Proteine (Rubisco und LHC II) des Plastiden zu bewirken. Für diese beobachtete Abnahme können sowohl verminderte Synthese-, als auch erhöhte Abbauraten (oder beides in Kombination) der

betroffenen Proteine verantwortlich sein. Daneben ist aber auch noch eine (zusätzliche) Regelung über die Importraten der jeweiligen Proteine in die Plastiden denkbar. Dafür werden in den nachfolgenden Kapiteln die Genexpressionsmuster von chloroplastidären Proteinen und die seneszenzspezifischen Veränderungen der Plastidenhülle – insbesondere des Proteinimports - analysiert.

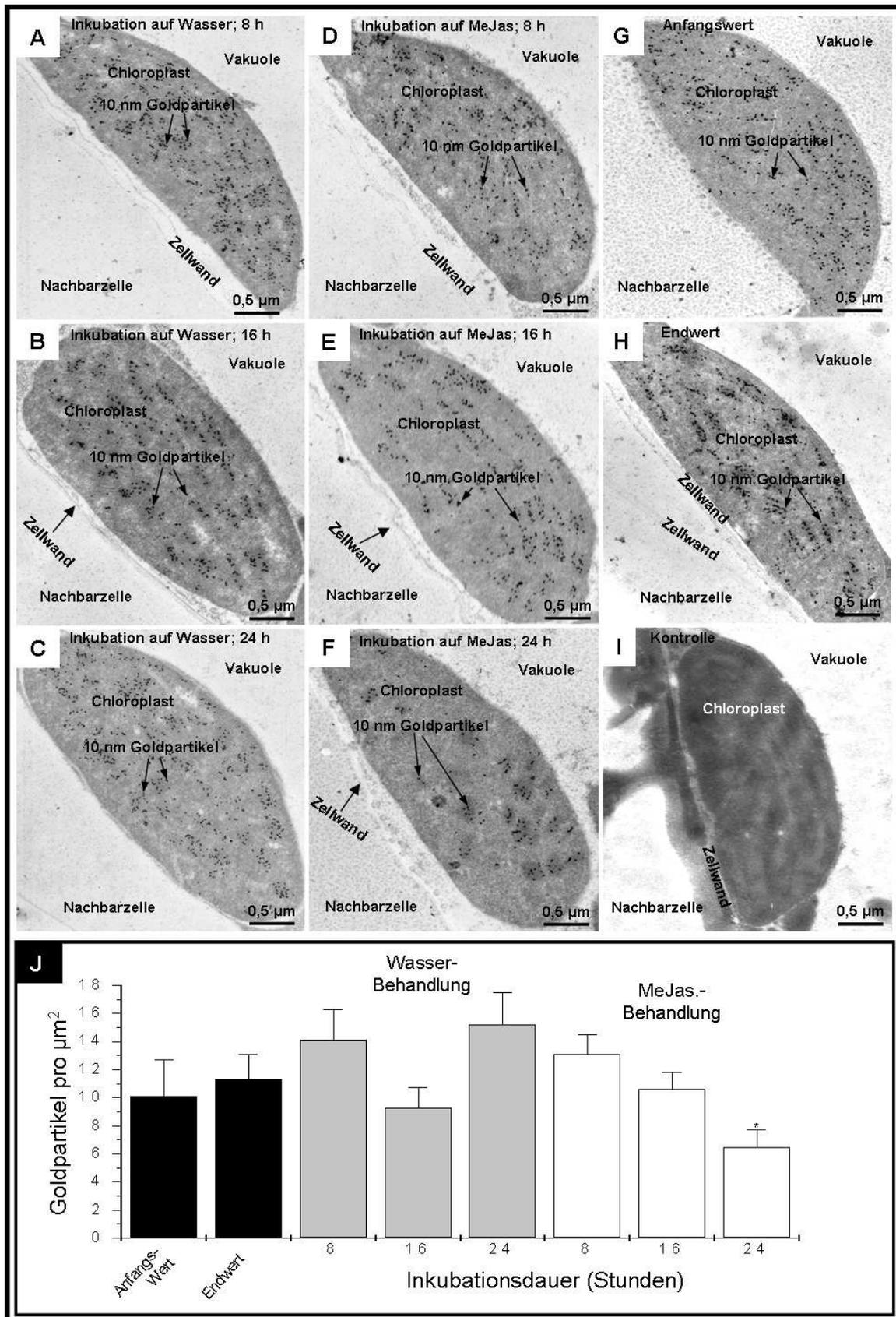


Abb. 16: Quantitative Veränderung des LHC II Gehalts im Chloroplasten (als Dichte der Immungoldpartikel pro μm^2 Plastidenquerschnittsfläche) während einer 24-stündigen Methyljasmonatinkubation:

Abb. A-C: Immunogoldmarkierung (Anti-LHC II-Antikörper) von Ultradünnschnitten aus 7 Tage alten Gerstenprimärblättern nach unterschiedlich langer Inkubation auf Wasser (Inkubationsdauer: A: 8 h,

B: 16 h, C: 24 h). Das Immunsignal (10 nm Goldpartikel) ist deutlich in der Plastidenquerschnittsfläche lokalisiert und gut zu erkennen und beschränkte sich augenscheinlich auf die Bereiche, die die Granathylakoide repräsentierten. Eine Verminderung des Immunsignals im Laufe der Zeit war nicht erkennbar.

Abb. D-F: Immunogoldmarkierung (Anti-LHC II-Antikörper) von Ultradünnschnitten aus 7 Tage alten Gerstenprimärblättern nach unterschiedlich langer Inkubation auf Methyljasmonat (Inkubationsdauer: D: 8 h, E: 16 h, F: 24 h). Auch hier ist das Immunsignal (10 nm Goldpartikel) deutlich in der Plastidenquerschnittsfläche – in den Bereichen, die die Granathylakoide repräsentieren - lokalisiert und gut zu erkennen. Beim letzten Zeitpunkt könnte eine Verminderung des Immunsignals gegeben sein.

Abb. G: Immunogoldmarkierung (Anti-LHC II-Antikörper) von Ultradünnschnitten aus 7 Tage alten Gerstenprimärblättern (Anfangswert).

Abb. H: Immunogoldmarkierung (Anti-LHC II-Antikörper) von Ultradünnschnitten aus 8 Tage alten Gerstenprimärblättern (Endwert).

Abb. I: Immunogoldmarkierung mit sekundärem goldkonjugiertem Antikörper (10 nm Goldpartikel) von Ultradünnschnitten aus 7 Tage alten Gerstenprimärblättern (Kontrolle goldkonjugierte Immunglobulin Fraktion). Es waren keinerlei Immunsignale vorhanden.

Abb. J: Grafische Darstellung der LHC II Dichte (Goldpartikel pro μm^2 Plastidenquerschnittsfläche) in Abhängigkeit der Inkubationsdauer mit Methyljasmonat bzw. Wasser; Anfangs- und Endwert (Immunogoldmarkierung aus 7 bzw. 8 Tage alten Gerstenprimärblättern; konventionell im Gewächshaus in Erdkultur gewachsenen). Die Dichte der Immunsignale sowohl bei Anfangs- und Endwert, als auch bei Inkubation mit Wasser unterschieden sich nicht signifikant und ließen auch keinerlei Tendenz erkennen. Unter Methyljasmonateinfluss zeigte sich im Laufe der Inkubation jedoch eine sinkende Tendenz der Markierungsdichte, wobei sich auch hier lediglich die Markierungsdichte des letzten Messzeitpunkts signifikant vom Ausgangswert unterschied.

Für alle Datensätze gilt: $10 \leq n \leq 12$.

Die Kennzeichnung von Signifikanzniveaus erfolgt durch die Sternsymbolik: $p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***.

3.3.4. Analyse der Genexpressionsmuster von chloroplastidären Proteinen

Wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt werden konnte, nahm die Menge der chloroplastenspezifischen Proteine Rbcs und LHCII mit zunehmender Dauer der Jasmonatbehandlung ab. Diese Abnahme kann, wie bereits erörtert, neben einer Verringerung der Importraten auch eine Abnahme der Synthese bzw. einen verstärkten Abbau als Ursache haben. Um Aussagen über die Synthese bzw. die Transkription der kernkodierten chloroplastenspezifischen Proteine Rbcs und LHCII treffen zu können, wurden abgeschnittene Gerstenprimärblätter auf Wasser oder Methyljasmonat für unterschiedliche Zeiten floriert. Nach Extraktion der Gesamt-RNAs wurde eine Abnahme der Menge der korrespondierenden mRNAs nach 24-stündiger Flotation beobachtet. Auch für die Transkripte von Komponenten des PS I (*psaL*, *psaF* und *psaN*, siehe Abb. 17) konnte eine solche Abnahme nachgewiesen werden. Bei der Abnahme schien es sich nicht um einen generellen RNA-Abbau zu handeln, da die Menge ribosomaler RNAs (s. UV-induzierte Fluoreszenz ribosomaler RNAs nach Ethidiumbromideinlagerung in Abb. 17) nahezu unverändert blieb.

Auch während der natürlichen Seneszenz konnte in Gerstenprimärblättern eine Abnahme der *rbcS*- und *cab*-Transkriptmengen beobachtet werden. Bereits in einem Alter von 2 Wochen wiesen die Blätter eine wesentlich geringere Menge an *rbcS*- und *cab*-Transkripten als 1-wöchige Blätter auf (Abb. 18). Wie auch nach Methyljasmonat-Behandlung schien es sich bei der Abnahme der Transkriptmengen um ein Phänomen zu handeln, von dem photosynthetisch wichtige Proteine betroffen waren. Im Unterschied zur Methyljasmonat-induzierten Seneszenz war jedoch während der natürlichen Seneszenz eine generelle Abnahme des RNA-Gehaltes pro Blattflächeneinheit zu beobachten. Dies geht aus der Menge der ribosomalen RNAs hervor, die bereits in 14 Tage alten Blättern um ein Vielfaches geringer war als 1-wöchigen (siehe UV-induzierte Fluoreszenz ribosomaler RNAs nach Ethidiumbromideinlagerung in Abb. 18)

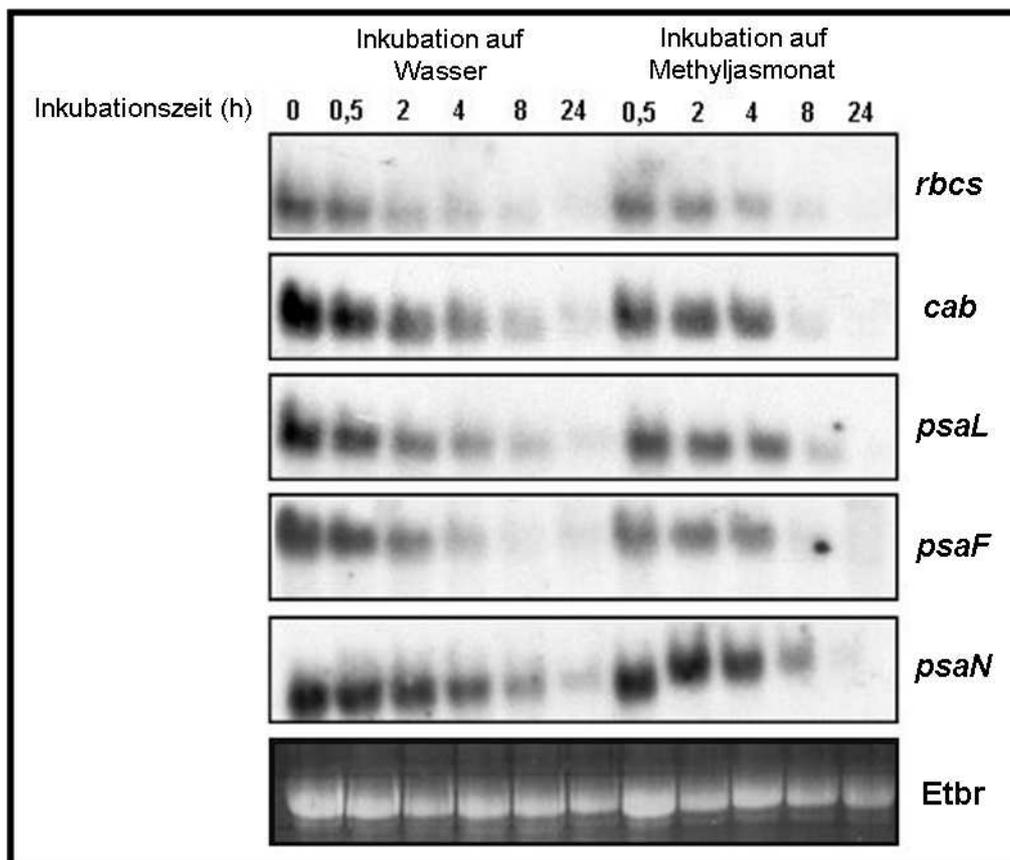


Abb. 17: Transkriptmengen der kleinen Untereinheit der Rubisco (*rbcS*), des *Light-Harvesting Chlorophyll a/b-binding proteins* von Photosystem II (*cab*) sowie der Untereinheit L, F und N von Photosystem I (*psaL*, *psaF* and *psaN*), während der Methyljasmonat-induzierten Seneszenz.

Sieben Tage alte Gerstenprimärblätter wurden auf entweder Leitungswasser oder Methyljasmonathaltiger Lösung für die angegebenen Zeiträume floriert. Blattscheibchen aus der Blattmitte von 5 verschiedenen Blättern, die zu einer Behandlung korrespondieren, wurden ausgestochen und die Gesamt-RNA wurde extrahiert. RNA-Volumina, die gleichen Blattflächen entsprachen, wurden auf ein

Formaldehyd-Agarosegel aufgetragen und *geblotted*. Die unterste Reihe zeigt die UV-induzierte Fluoreszenz Etidiumbromid-markierter ribosomaler RNA (Beladungskontrolle).

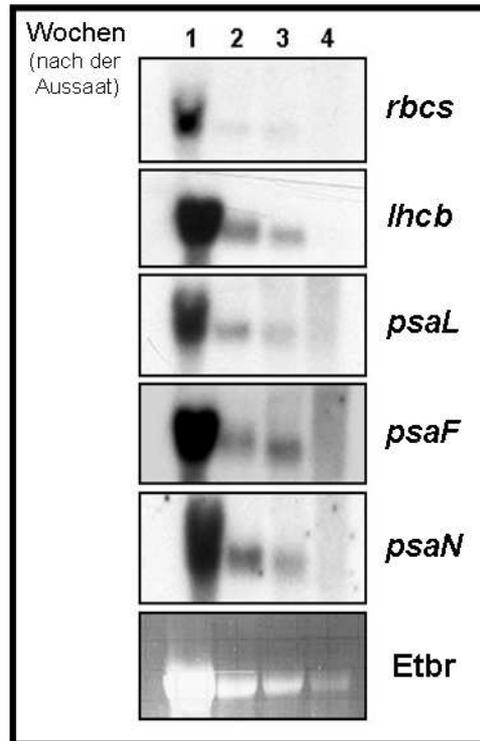


Abb. 18: Transkriptmengen der kleinen Untereinheit der Rubisco (*rbcS*), des *Light-Harvesting Chlorophyll a/b-binding proteins* von Photosystem II (*cab*) sowie der Untereinheit L, F und N von Photosystem I (*psaL*, *psaF* and *psaN*), während der natürlichen Seneszenz.

Gerstenprimärblätter wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Blattscheibchen wurden aus der Blattmitte von 5 verschiedenen Blättern, die zu einer Behandlung korrespondieren, ausgestochen und die Gesamt-RNA wurde extrahiert. RNA-Volumina, die gleichen Blattflächen entsprachen, wurden auf ein Formaldehyd-Agarosegel aufgetragen und *geblotted*.

Die unterste Reihe zeigt die UV-induzierte Fluoreszenz Etidiumbromid-markierter ribosomaler RNA (Beladungskontrolle).

Wie die Analyse der *rbcS*- und *cab*-Transkriptmengen zeigte, war die im Verlauf der Methyljasmonat-Behandlung registrierte Abnahme der intraplastidären Proteinkonzentration sicher zumindest partiell durch eine Abnahme der Synthese infolge geringer mRNA-Mengen bedingt. Diese Beobachtung legte die Frage nahe, ob es während der (natürlichen oder Methyljasmonat-induzierten) Seneszenz möglicherweise zu einer koordinierten Abschaltung der Transkription, Synthese und des Proteinimportes in die Plastiden kommen könnte. Vielleicht, so könnte man spekulieren, ist während der Seneszenz ein plastidärer Proteinimport ab einem bestimmten Stadium gar nicht mehr notwendig. Dieses träfe sicherlich für photosynthetisch wichtige Proteine zu. Andererseits sollte es jedoch Proteine geben (z.B. Proteasen, Nucleasen oder am Chlorophyllabbau beteiligte Enzyme), die während der natürlichen oder Methyljasmonat-induzierten Seneszenz in größerer Menge synthetisiert und dann importiert werden, da sie für den koordinierten Ablauf

des Entwicklungsprogrammes Seneszenz notwendig sind. Ein solches in Chloroplasten vorkommendes Enzym könnte z.B. die Pheophorbide *a* Oxygenase sein (synonym zu LLS1 in Mais oder ACD1 in *A. thaliana*), deren Expression zumindest in Mais seneszenzspezifisch erfolgt. Dieses Protein ist z. B. am Chlorophyllabbau beteiligt (GRAY, 2004).

Es sollte zunächst geprüft werden, ob die Expression des *lls1*-Gens aus Gerste nach Methyljasmonat-Behandlung bzw. während der natürlichen Seneszenz induziert wird. Dazu wurden 7 Tage alte Gerstenprimärblätter, wie oben beschrieben, auf Leitungswasser bzw. Methyljasmonat-haltiger Lösung floriert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Gesamt-RNA isoliert und nach *Northern-Blotting* mit der radioaktiv-markierten *lls1*-Sequenz aus Mais hybridisiert und autoradiographisch nachgewiesen (Abb. 19A, obere Zeile). Außerdem wurden Proteine aus den Blättern extrahiert und nach SDS-PAGE und *Western-Blot* mit einem monoklonalen Antikörper inkubiert, der gegen das Mais LLS1-Protein gerichtet ist (Abb. 19A, untere Zeile).

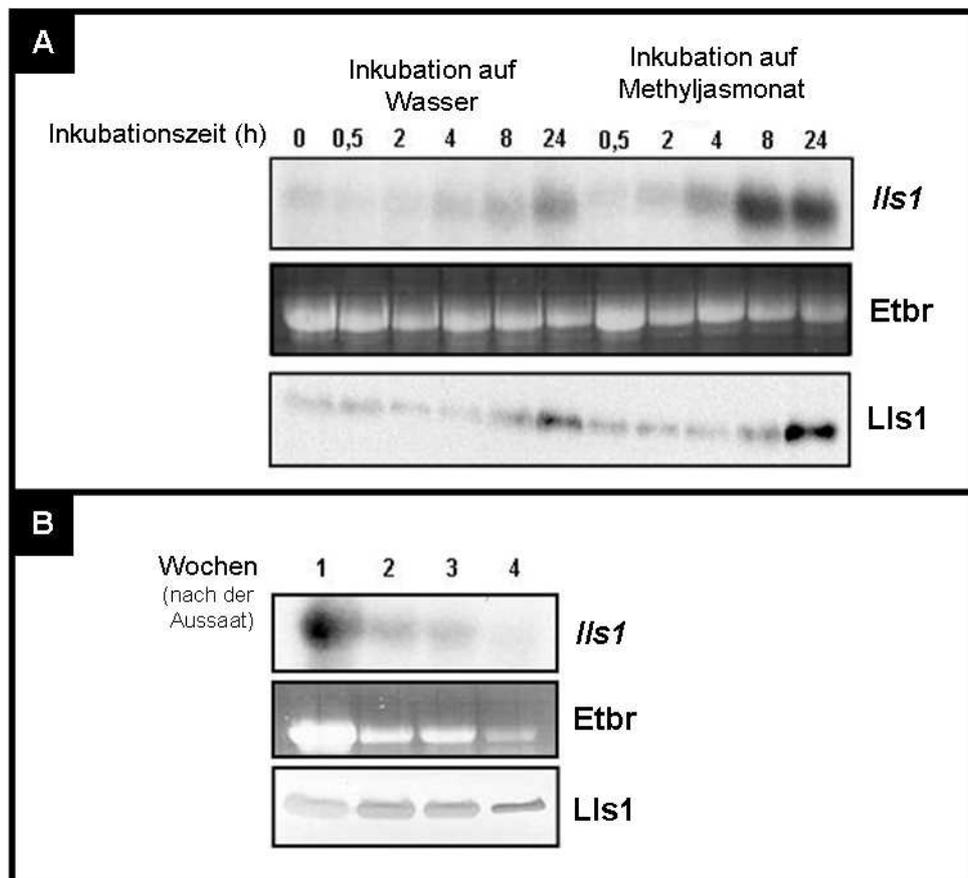


Abb. 19: Transkript- und Proteinmengen des *Lethal leaf spot* Proteins (LLS1).

Transkriptmengen (obere Zeile) und Proteinmengen (untere Zeile) des Lls1 während Methyljasmonat-induzierter (A) und natürlich auftretender Seneszenz (B). Blattscheibchen wurden aus dem mittleren

Teil von 5 verschiedenen Blättern entnommen, die entweder einen Zeitpunkt t(**B**) oder eine Behandlung mit entweder Leitungswasser oder Methyljasmonat repräsentierten (**A**) und Gesamt-RNAs oder Proteine wurden extrahiert. RNA- und Proteinmengen, die zu gleichen Blattflächen korrespondieren, wurden analysiert.

Die unterste Reihe zeigt die UV-induzierte Fluoreszenz Etidiumbromid-markierter ribosomaler RNA (Beladungskontrolle).

Darstellung eines Ergebnisses von drei unabhängigen Wiederholungen (n = 3).

Nach Inkubation der Blätter auf Leitungswasser oder Methyljasmonat-haltiger Lösung konnte eine Zunahme der *lls1*-Transkriptmenge beobachtet werden, zu der steigende Proteinmengen korrelierten. Auf Methyljasmonat erfolgte die Zunahme von Transkript- und Proteinmenge früher als nach Inkubation auf Leitungswasser.

Interessanterweise waren im Verlauf der natürlichen Seneszenz von Gerstenprimärblättern abnehmende *lls1*-Transkriptmengen zu beobachten, die jedoch zumindest von einer konstanten, wenn nicht sogar leicht ansteigenden Menge des korrespondierenden Proteins begleitet wurden (Abb. 19B).

Die deutlich zunehmende Proteinmenge an LLS1 (Pheophorbide *a* Oxygenase) in abgeschnittenen Gerstenprimärblättern nach Flotation auf Wasser und insbesondere auf Methyljasmonat-haltiger Lösung legte die Schlussfolgerung nahe, dass dieses Protein in die Chloroplasten importiert worden sein muss, da es nur in diesem Organell stabil und in prozessierter (reifer) Form akkumuliert. Demzufolge müssen Chloroplasten aus Blättern während der Methyljasmonat-induzierten Seneszenz einen funktionierenden Proteinimportapparat besitzen, bei dem es sich theoretisch um die noch vorhandene TIC-TOC-Maschinerie, deren Reste, mögliche Modifizierungen derselben oder sogar um einen Seneszenz-spezifischen Importapparat handeln könnte. Neben diesen spezifischen Änderungen der Importmaschinerie sind auch unspezifische Änderungen der Plastidenhüllmembran denkbar (Änderungen in der Lipidzusammensetzung), die den Proteinimport indirekt beeinflussen könnten. Da beispielsweise die TIC-TOC -Maschinerie aus zwei Multiproteinkomplexen besteht, bei deren Komponenten es sich zumindest zum Teil um periphere oder integrale Membranproteine handelt (KEEGSTRA und CLINE; 1999), sollte eine Änderung der Lipidzusammensetzung einen Einfluss auf die Lokalisierung solcher Proteine in der Plastidenhülle haben.

Resümee:

Die Analyse der Genexpressionsmuster der chloroplastidären Proteine RBCS und LHC II ergaben, dass unter Methyljasmonateinfluss die jeweiligen korrespondierenden mRNA-Mengen dieser Proteine abnahmen. Da gleichzeitig keinerlei Veränderung der rRNA-Mengen zu verzeichnen war, handelte es sich offensichtlich nicht um einen generellen RNA-Abbau. Die Abnahme der Konzentration der interplastidären, photosynthetischen Proteine RBCS und LHC II war zumindest zum Teil durch eine Abnahme ihrer Synthese bedingt. Bei einem nicht photosynthetisch relevanten Protein – LLS1 (Phaeophorbide *a* Oxygenase) – wurde demgegenüber bei Methyljasmonat-inkubation ein Ansteigen der Proteinmenge im Plastiden beobachtet, was zu der Annahme führt, dass es auch während der Methyljasmonat-induzierten Seneszenz wenigstens einen funktionierenden Proteinimportapparat geben muss, bei dem es sich theoretisch um Reste der noch vorhandenen TIC-TOC-Maschinerie, mögliche Modifizierungen desselben oder sogar um einen Seneszenz-spezifischen Importapparat handeln könnte. Neben diesen spezifischen Änderungen der Importmaschinerie sind auch unspezifische Änderungen der Plastiden-hüllmembran denkbar, die den Proteinimport beeinflussen könnten.

3.3.5. Seneszenzbedingte Veränderungen in der Proteinzusammensetzung der Plastidenhülle

Ausgehend von den zuvor dargestellten Überlegungen wurden zwei Arten von Experimenten angeschlossen, um seneszenzbedingte Veränderungen auf Plastidenhüllmembranebene zu erfassen.

Zum einen wurde die Proteinimportkapazität von Chloroplasten verglichen, die aus frischen Blättern oder Blättern nach Inkubation mit Leitungswasser bzw. Methyljasmonat isoliert worden waren. Zum anderen wurden *Crosslinking*-Partner, d. h. Proteine der Plastidenhülle, die während des Importes in unmittelbarer Nachbarschaft zu den *in transit* befindlichen Vorstufenproteinen sind, analysiert. Wie frühere Untersuchungen gezeigt hatten, übt Methyljasmonat einen stark seneszenzfördernden Effekt aus, während die entsprechenden Wasserkontrollen frisch geernteten Pflanzen gleichen (WEIDHASE *et al.*, 1987a, 1987b).

Dieses Experiment wurde mit zwei unterschiedlichen Vorstufenproteinen durchgeführt. Dabei handelte es sich um die Präkursoren der NADPH:Protochlorophyllid Oxidoreduktase A und B (pPORA und pPORB).

3.3.5.1. Import der Isoenzyme A und B der NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (pPORA und pPORB) in Plastiden

Dieses Enzym ist an der Chlorophyllbiosynthese beteiligt, in der es die lichtabhängige Reduktion von Protochlorophyllid (Pchlid) zu Chlorophyllid (Chlid) katalysiert (GRIFFITH, 1975; APEL *et al.*, 1980). Beide Reduktasen sind kernkodiert und werden als höhermolekulare Vorstufenproteine in die Plastiden importiert. Es konnte gezeigt werden, dass der Import von pPORB durch die TIC-TOC-Maschinerie erfolgt (REINBOTHE *et al.*, 2004a). Der pPORA-Import hingegen ist Substrat-abhängig. Etioplasten, die einen hohen Pchlid-Gehalt aufweisen, können pPORA importieren. Chloroplasten, deren Pchlid-Gehalt spektroskopisch nicht nachweisbar ist, importieren pPORA hingegen nicht (REINBOTHE *et al.*, 1995). Allerdings ist es möglich, durch Fütterung der Chloroplasten mit Aminolävulinsäure, einer Tetrapyrrolvorstufe, die intraplastidäre Pchlid-Konzentration zu erhöhen und damit den pPORA-Import gewissermaßen zu restaurieren (REINBOTHE *et al.*, 1995).

Kompetitionsexperimente und *Crosslinking*-Analysen haben gezeigt, dass es einen pPORA-spezifischen Importapparat gibt, der als *Pchlidge-dependent translocon complex* (PTC) bezeichnet wurde (REINBOTHE *et al.*, 2004b). Von einigen der Proteinkomponenten des PTC-Komplexes konnte eine partielle Sequenzinformation erhalten werden; von anderen ist lediglich das Molekulargewicht bekannt. Bei den Komponenten in der äußeren Hüllmembran handelt es sich um ein 130 kDa großes Protein (vermutlich der Rezeptor), ein 16 kDa großes Protein (der Transportkanal, Reinbothe *et al.*, 2004a und b) und ein Protein von 33 kDa (ein regulatives, GTP-bindendes Protein, REINBOTHE *et al.*, 2004b, REINBOTHE *et al.*, 2005.) Des Weiteren wurden ein 47 kDa-Protein, das Verwandtschaft zu Tyrosin-Aminotransferasen besitzt, und ein 52 kDa-Protein, das als Pchlid α -Oxygenase aktiv ist (REINBOTHE *et al.*, 2004b) als PTC-Komponenten identifiziert.

Der Pchlid-abhängige Import konnte *in vivo* sowohl für Kotyledonen aus *A. thaliana* als auch für Primärblätter der Gerste verifiziert werden: Im Dunkeln angezogene

Kotyledonen/Pimärblätter importierten das getestete pPORA-GFP-Fusionsprotein, im Licht gewachsene jedoch nicht (KIM und APEL, 2004; REINBOTHE *et al.*, 2004a). Der substratabhängige Import ist offensichtlich Teil eines komplexen Regulationsmechanismus, das den Gehalt von pPORA entwicklungsabhängig reguliert: Etioplasten aus dunkel gewachsenen Kotyledonen/Pimärblättern akkumulieren große Mengen PORA, Chloroplasten im Licht gewachsener Keimblätter jedoch nicht (oder kaum). PORB hingegen wird sowohl in licht- als auch in dunkel-gewachsenen Keimlingen in etwa gleicher Menge akkumuliert (REINBOTHE *et al.*, 1995). Jüngere, grüne Pflanzen reakkumulieren während der Nachtperiode Pchlid und die Plastiden können am Ende der Dunkelperiode pPORA importieren, ältere Pflanzen jedoch nicht. Dieses entwicklungsabhängige Importverhalten sollte den pPORA-Import zu einem geeigneten Monitor machen, um Änderungen in der Plastidenhülle zu erfassen. Wenn diese Hypothese korrekt ist, dann sollte sich der pPORA-Import sowohl während der natürlichen als auch der Methyljasmonat-induzierten Seneszenz ändern (verringern). Andererseits könnte auch im Fall des pPORB-Proteins eine Abnahme der Importkapazität zu beobachten sein. Da dieses Protein, wie auch RBCS und die LHC II-Proteine, durch die TIC-TOC-Maschinerie importiert werden (REINBOTHE *et al.*, 2004a), könnten sich Änderungen in der Plastidenhülle bzw. im Standardimportapparat (TIC-TOC) negativ auf die Importkapazität auswirken.

3.3.5.2. Untersuchungen des Importverhaltens von pPORA und pPORB in Chloroplasten in Abhängigkeit von der Vorbehandlung der Blätter (d. h. Seneszenzstadium)

Im Importexperiment wurden der authentische pPORA-Präkursor und ein Fusionsprotein, das aus dem Transitpeptid von pPORA und einem Reporterprotein (DHFR = Dihydrofolatreduktase) bestand, durch gekoppelte In-Vitro-Transkription/Translation in Gegenwart von ^{35}S -Methionin hergestellt und den Chloroplasten zugesetzt. Parallelinkubationen wurden in Anwesenheit oder Abwesenheit von 5-Aminolävulinsäure in Gegenwart von 2 mM ATP und 100 μM GTP durchgeführt. Als Kontrollen wurden das pPORB-Protein (HOLTDORF *et al.*, 1995) und das entsprechende TransB-DHFR-Protein verwendet. Der Import dieser

Fusionsproteine erfolgt in Abhängigkeit vom jeweiligen Transitpeptid wie der des entsprechenden authentischen Präkursors (REINBOTHE *et al.*, 1997).

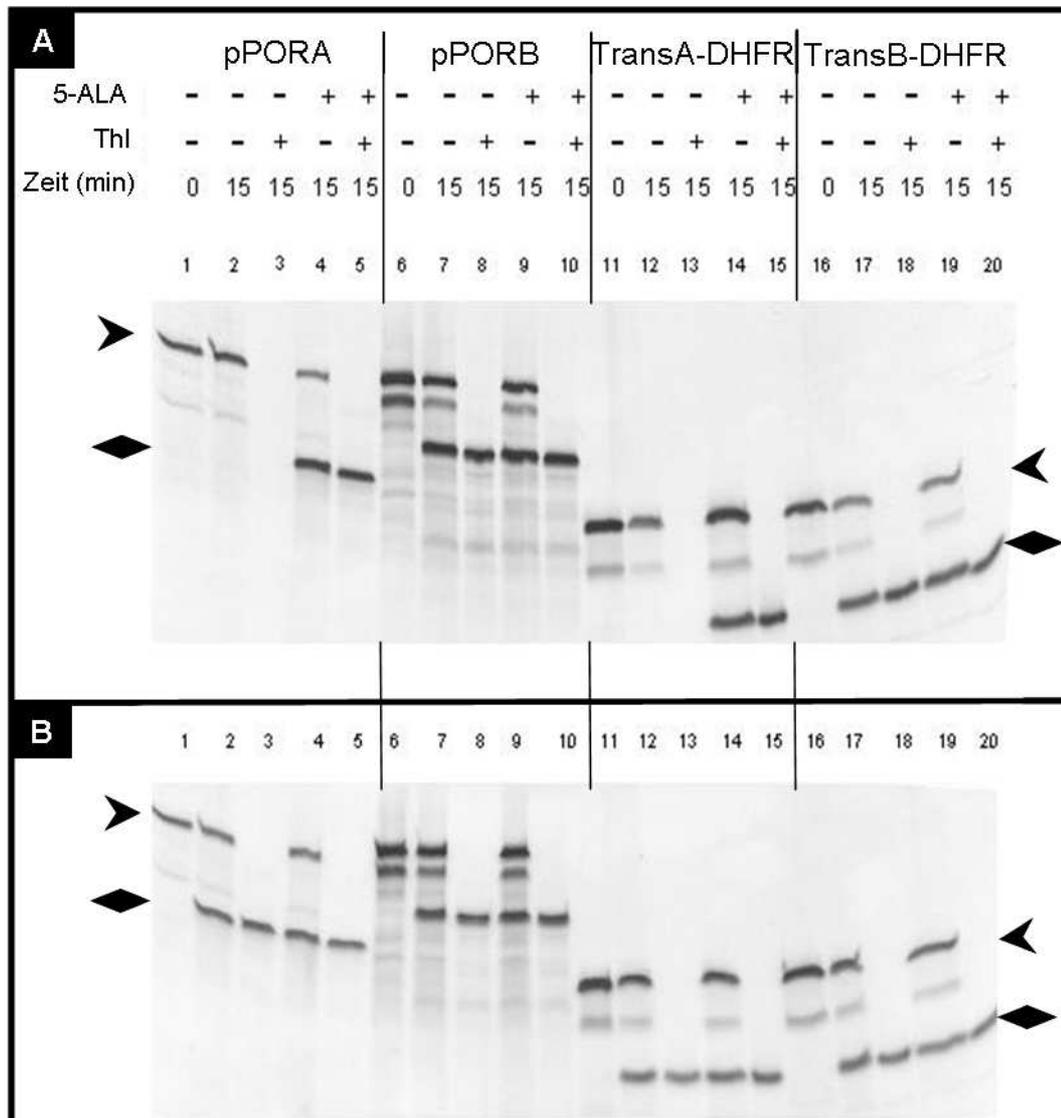


Abb. 20: Import von pPORA, pPORB sowie TransA-DHFR und TransB-DHFR:

Import von pPORA, pPORB sowie TransA-DHFR und TransB-DHFR, die durch gekoppelte In-Vitro-Transkription/Translation in Gegenwart von ^{35}S -Methionin hergestellt wurden, in isolierte Chloroplasten, die aus frischen (A) bzw. Gerstenprimärblättern nach Flotation auf Leitungswasser (B) isoliert worden waren. Ein Aliquot der Chloroplasten wurde vor dem Import mit in Phosphatpuffer gelöstem ALA inkubiert (+ALA), um intraplastidäres Pchlid zu produzieren. Ein anderes Aliquot wurde in Phosphatpuffer allein inkubiert (Pchlid-freie Kontrolle, -ALA). Die Importreaktion wurde nach 15 min abgestoppt. Proteine wurden extrahiert und nach Auftrennung durch 1D-SDS-PAGE autoradiographisch nachgewiesen. Präkursor: \blacktriangleright ; reifes Protein: \blacklozenge

Die Abb. 20 zeigt die entsprechenden Ergebnisse. Hierbei stellte sich heraus, dass pPORB und transB-DHFR mit nahezu identischer Effizienz in Pchlid-freie und Pchlid-haltige Chloroplasten importiert werden. Jedoch war die generelle Importkapazität

der Plastiden aus Chloroplasten, die aus Wasser-flotierten Blättern stammten, (Abb. 20B) in der Regel geringer als jene, die mit Chloroplasten aus der Frischkontrolle bestimmt worden waren (Abb. 20A). In Chloroplasten, die aus Methyljasmonat-behandelten Blättern stammten, war kein reifes (importiertes) PORB-Protein nachweisbar (Ergebnisse nicht präsentiert). pPORA und transA-DHFR wurden, in Übereinstimmung mit früheren Befunden (REINBOTHE *et al.*, 1997), nur in Pchlid-haltige, nicht jedoch Pchlid-freie Chloroplasten der Frischkontrolle importiert. Chloroplasten aus Blättern nach Flotation auf Wasser importierten pPORA/transA-DHFR unabhängig davon, ob sie Pchlid enthielten oder nicht. Eine Behandlung von Blättern mit Methyljasmonat vor der Chloroplastenisolation wirkte sich wie im Fall von pPORB hemmend auf den Import beider Präkursoren aus.

Der Befund, dass pPORA/transA-DHFR in Pchlid-freie Plastiden mit gleicher Effizienz wie in Pchlid-haltige importiert wurden, legte die Vermutung nahe, dass Änderungen in der Plastidenhülle abgeschnittener Blätter nach Flotation auf Leitungswasser aufgetreten waren. Während beide Vorstufenproteine in Chloroplasten aus der Frischkontrolle in Abhängigkeit von Pchlid und damit höchst wahrscheinlich durch den PTC importiert wurden, erfolgte in die Chloroplasten aus Wasser-flotierten Blättern ein Pchlid-unabhängiger Import, der möglicherweise durch die TIC-TOC-Maschinerie vermittelt wurde. Um diese Vermutung zu prüfen, sollten *Crosslinking*-Analysen durchgeführt werden, um die beim Import interagierenden Partner für pPORA/transA-DHFR zu identifizieren.

Der transA-DHFR-Präkursor wurde dazu verwendet, über *Crosslinking* mit L-[3-(Trifluoromethyl)-3-diazirin-3-*H*-yl]phenylalanin (TmdPhe) (HIGH *et al.*, 1993; Brunner, 1996) die Protein- bzw. Lipidzusammensetzung der Plastidenhülle direkt "abzugreifen". Hierzu wurde das Transitpeptid derart verändert, dass es an distinkten Stellen den TmdPhe-Rest trug: An den Positionen 2 plus 65 (TransA1-DHFR), nur an Position 2 (TransA2-DHFR) bzw. nur an Position 65 (TransA3-DHFR). Die Methode beruht darauf, dass auf DNA-Ebene künstlich Amber-Kodonen eingeführt werden, die dann durch eine Amber-Suppressor-tRNA, die den TmdPhe-Test trägt, "dechiffriert" werden können. Durch In-Vitro-Mutagenese und nachfolgende gekoppelte In-Vitro-Transkription/Translation können die TmdPhe-Reste somit an distinkten Stellen in das Transitpeptid eingebracht werden.

Da das Transitpeptid von pPORA (TransA) alle für den substratabhängigen Transport notwendigen Informationen enthält (REINBOTHE *et al.*, 1997), wurden in den folgenden Experimenten hauptsächlich chimäre TmdPhe-haltige TransA-DHFR-Präkursoren verwendet (siehe oben). Alle Präkursoren wurden in Gegenwart von ^{35}S -Methionin und der TmdPhe-Suppressor-tRNA, die uns freundlicherweise von J. Brunner, ETH Zürich, Schweiz, zur Verfügung gestellt wurde, translatiert.

Die drei unterschiedlichen Präkursoren, TransA1-DHFR, TransA2-DHFR und TransA3-DHFR, wurden für 15 min in Gegenwart verschiedener ATP- und GTP-Konzentrationen mit isolierten Gersten-Chloroplasten inkubiert. Diese wurden aus frischem Pflanzenmaterial sowie Pflanzen gewonnen, die für 24 h auf Wasser bzw. einer 45 μM wässrigen Lösung von Methyljasmonat im Licht floriert worden waren.

Die Abbildung 21 zeigt die *Crosslinking*-Produkte. Hierbei offenbarte sich, dass die Bandenmuster für alle Präkursoren und Plastidentypen unterschiedlich waren. Für Chloroplasten aus den frisch geernteten Blättern (Abb. 21B-D) konnten *Crosslinking*-Produkte von 160 kDa, 83 kDa, 65/66 kDa als auch 49 kDa und 47 kDa nachgewiesen werden. Co-Immunfällungen zeigten, dass es sich zumindest bei einigen um kovalente Produkte der TransA1, 2 bzw. 3-DHFR-Präkursoren mit den zuvor identifizierten Proteinen der PTC-Importmaschinerie handelt, z.B. bei dem 83 kDa Crosslink-Produkt um das kovalente Produkt aus TransA1 bzw. 2-DHFR und dem 52 kDa-Protein. Gleiches gilt auch für das 16 kDa-Protein (CP47, Daten nicht gezeigt), Andererseits stellte sich heraus, dass das 47 kDa-Protein offenbar nicht direkt mit dem Präkursor interagiert (siehe die Co-Immunofällung in Abb. 21C, Spur 11).

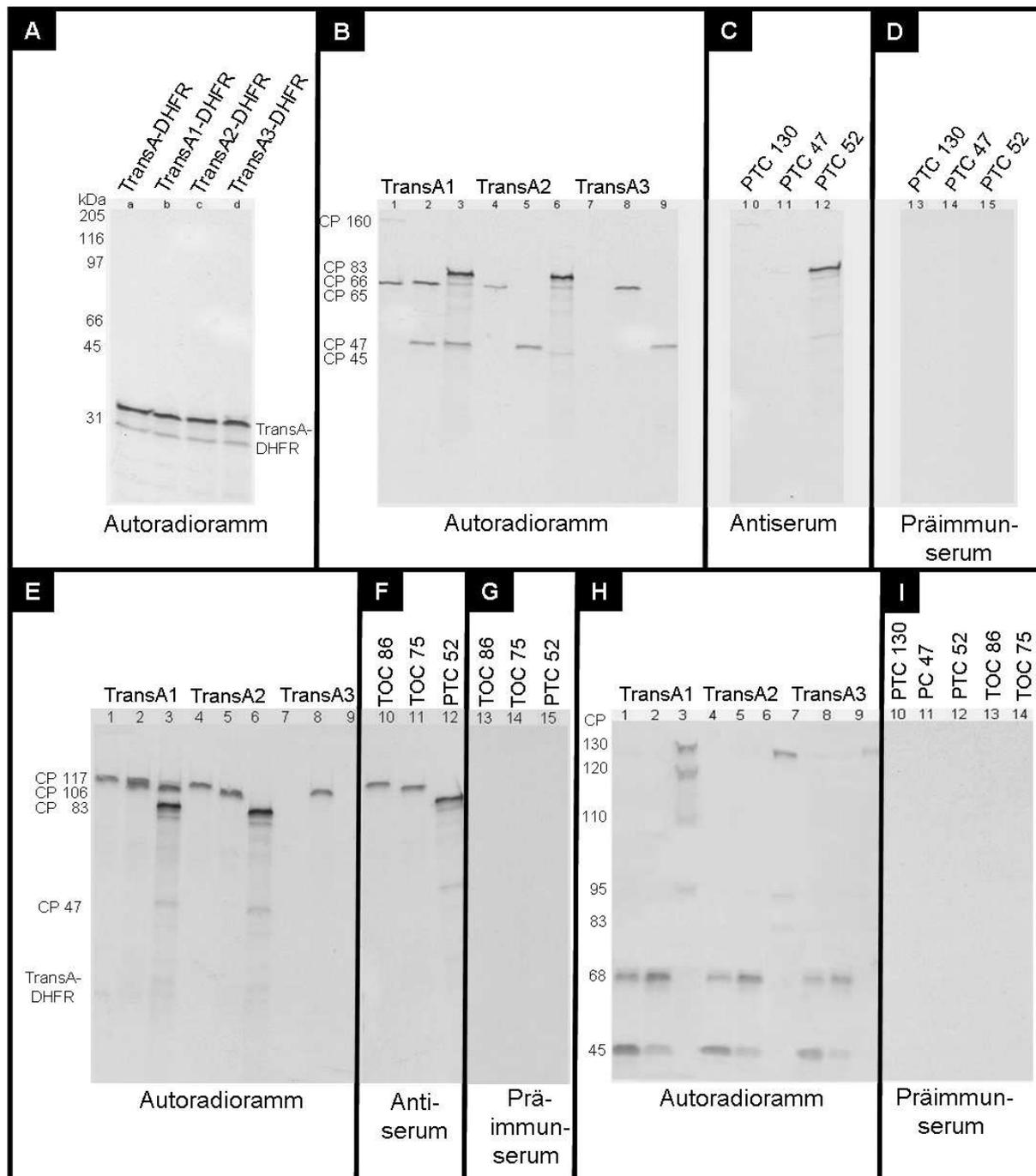


Abb. 21: Crosslinking-Partner der chimären TmdPhe-haltigen Präkursoren:

TransA1-DHFR, TransA2-DHFR und TransA3-DHFR, die in Gegenwart von ^{35}S -Methionin und einer TmdPhe-Suppressor-tRNA durch gekoppelte In-vitro-Transkription/Translation synthetisiert (Autoradiogramm der In-vitro-Translationsprodukte nach Trennung durch 1D-SDS-PAGE ist dargestellt in **A**) und mit isolierten Gersten-Chloroplasten inkubiert wurden. Diese wurden aus frischem Pflanzenmaterial (**A-D**) sowie Pflanzen gewonnen, die für 24 h auf Wasser (**E-G**) bzw. einer 45 μM wässrigen Lösung von Methyljasmonat (**H-I**) im Licht floriert worden waren. Die Inkubation wurde in Gegenwart von entweder 0,1 mM ATP (Spuren 1,2 und 3 in **B**, **E** und **H**), 0,1 mM ATP und 0,1 mM GTP (Spuren 4,5 und 6 in **B**, **E** und **H**) oder 2 mM ATP und 0,1 mM GTP (Spuren 7,8 und 9 in **B**, **E** und **H**) durchgeführt. Die Bildung von *Crosslinking*-Produkten wurde nach Auftrennung der Plastidenproteine mittels eindimensionaler SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert (**B**, **E** und **H**). Ein Aliquot des Ansatzes mit 2 mM ATP wurde einer Co-Immunpräzipitation mit Anti-DHFR-Antikörper unterworfen (**C**; **F** und **H**). Entsprechende Kontrollen wurden mit Prä-Immuneserum durchgeführt (**D**, **G** und **I**). *Crosslinking*-Produkte wurden mit CP und einer Zahl korrespondierend zu ihrer Größe angegeben.

Für Chloroplasten aus den mit Wasser behandelten Blättern war das Bandenmuster an *Crosslinking*-Produkten ganz unterschiedlich (Abb. 21E-G). Hierbei konnten Produkte von ca. 117 kDa, 106 kDa und 83 kDa nachgewiesen werden. Mit Ausnahme des 83 kDa-*Crosslinking*-Produktes konnten diese nach entsprechenden Co-Immundefällungen als nicht verwandt zu den zuvor identifizierten PTC-Proteinen klassifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Entsprechende Kontroll-Fällungen demonstrierten jedoch, dass es sich - wie oben vermutet wurde - um *Crosslinking*-Produkte zwischen dem Transitpeptid und Toc86 (117 kDa-Crosslink-Produkt) bzw. Toc75 (106 kDa-Crosslink-Produkt) handelt. TransA-DHFR (und damit auch das authentische pPORA) wurden demnach tatsächlich durch den TIC-TOC-Apparat importiert.

Aus Methyljasmonat-behandelten Blättern isolierte Chloroplasten erbrachten ein völlig anderes *Crosslinking*-Muster (Abb. 12H und I). Keines der zuvor identifizierten Proteine schien an die TransA1, 2 bzw. 3-DHFR-Präkursoren gebunden zu sein. Entsprechende Co-Immundefällungen mit den gegen das 16 kDa-Protein bzw. 47 kDa-Protein, als auch gegen Toc86 und Toc75 gerichteten Antikörpern waren in allen Fällen negativ.

Resümee:

Zum Vergleich von Proteinimportkapazitäten von Chloroplasten unterschiedlicher Entwicklungsstufen wurden die Isoenzyme der NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase verwendet, wobei gezeigt werden konnte, dass der Import von pPORB durch den Standardproteinimportapparat (TIC-TOC Maschinerie) und der Import von pPORA entwicklungsabhängig - über einen pPORA-spezifischen Importapparat (PTC) - erfolgte. Dieses entwicklungsabhängige Importverhalten macht den pPORA-Import zu einem geeigneten Monitor, um seneszenzbedingte Änderungen in der Proteinzusammensetzung der Plastidenhülle zu erfassen. Änderungen der TIC-TOC-Maschinerie allein hingegen können auch über veränderte Importkapazitäten von pPORB erfasst werden.

Untersuchungen des Importverhaltens im Falle von pPORB in Chloroplasten ergaben, dass sowohl in frischen Blättern als auch bei Flotation abgeschnittener Blätter auf Wasser ein Import unabhängig von der Anwesenheit von Pchlid im

Chloroplasten erfolgte. Eine Behandlung von Blättern mit Methyljasmonat vor der Chloroplasten-isolation wirkte sich hemmend auf den Import des Präkursors aus. pPORA wurde, wie zu erwarten war, nur in Pchlid-haltige, nicht jedoch Pchlid-freie Chloroplasten der Frischkontrolle importiert. Eine Behandlung von Blättern mit Methyljasmonat vor der Chloroplastenisolation wirkte sich, wie im Fall von pPORB, hemmend auf den Import des Präkursors aus. Chloroplasten aus Blättern nach Flotation auf Wasser importierten pPORA überraschenderweise unabhängig davon, ob sie Pchlid enthielten oder nicht.

Die daraufhin angeschlossenen *Crosslinking*-Experimente zeigten, dass pPORA tatsächlich über die TIC-TOC-Maschinerie in die Chloroplasten (aus Blättern nach Flotation auf Wasser) importiert wurden. Im Gegensatz dazu zeigten sich bei den Chloroplasten aus frischen Blättern zumindest einige der erwarteten *Crosslink*-Produkte zwischen pPORA und PTC.

Aus mit Methyljasmonat behandelten Blättern isolierte Chloroplasten erbrachten ein völlig anderes *Crosslinking*-Muster, wobei weder Proteine der TIC-TOC-Maschinerie noch des PTC identifiziert werden konnten.

Da sich eine Methyljasmonat-Behandlung von abgeschnittenen Blättern jedoch immer hemmend auf den Import auswirkte, kann davon ausgegangen werden, dass es zu gravierenden Veränderungen des ganzen oder Teilen des Standardproteinimportapparates kommen muss.

3.4. Spezielle elektronenmikroskopische Untersuchungen von Veränderungen des Standardproteinimportapparates in der äußeren Plastidenhülle in Folge einer Methyljasmonat-Behandlung

Mögliche Veränderungen des Standardproteinimportapparates in der äußeren Plastidenhülle während der durch Methyljasmonat vermittelten Seneszenz sollte mit Hilfe von speziellen elektronenmikroskopischen Methoden untersucht werden. Dabei lag das Hauptaugenmerk auf dem integralen Teil des Standardproteinimportapparates der äußeren Plastidenhülle, der den zentralen Kanal durch die äußere Hüllmembran bildet (TOC 75) und damit von zentraler Bedeutung für den eigentlichen Durchtritt kerncodierter Proteine in den Plastiden ist. Des Weiteren sollte auch das wahrscheinlich als Rezeptor fungierende Protein TOC 159 immunologisch detektiert und mit Hilfe von speziellen rasterelektronenmikroskopischen Methoden dargestellt werden.

3.4.1. Mögliche Veränderungen des integralen Membranproteins TOC 75 der äußeren Plastidenhüllmembran während der durch Methyljasmonat ausgelösten Seneszenz

3.4.1.1. Identifizierung von TOC 75 an Ultradünnschnitten von Gerstenprimärblättern durch Immunogoldmarkierung

Mit Hilfe der Immunogoldmarkierung (siehe Material und Methoden) war es möglich, TOC 75 an Ultradünnschnitten von 7 Tage alten Gerstenprimärblättern zu identifizieren. Wie in Abb. 22 zu erkennen, waren wenige TOC 75 representierende Immuno-goldsignale an oder in der Nähe der Plastidenhülle zu erkennen. Auf Grund des für die Immunocytochemie verwendeten Verfahrens (K4M-Harzsystem, keine Schwermetall- Kontrastierung; siehe Material und Methoden) war die Ultrastruktur

des Plastiden weniger gut zu erkennen. Da zudem die räumliche Entfernung von Goldmarker und Antigen etwa 25 nm beträgt (PLATTNER und ZINGSHEIM, 1987), konnte die genaue Lage des Zielantigens (TOC 75) nicht bestimmt werden. Auf Grund der wenigen Immunogoldsignale im Querschnitt und dem zusätzlichen Auftreten von unspezifischen Immunogoldsignalen war auch keine quantitative Aussage möglich. Da TOC 75 ein integrales Protein der äußeren Plastidenhülle ist und an Ultradünnschnitten nur sehr kleine Bereiche der Plastidenhüllmembran exponiert sind und somit zur Reaktion mit spezifischen Antikörpern zur Verfügung stehen, war es notwendig, eine geeignete Methode zur Oberflächendarstellung der Plastidenhülle zu finden.

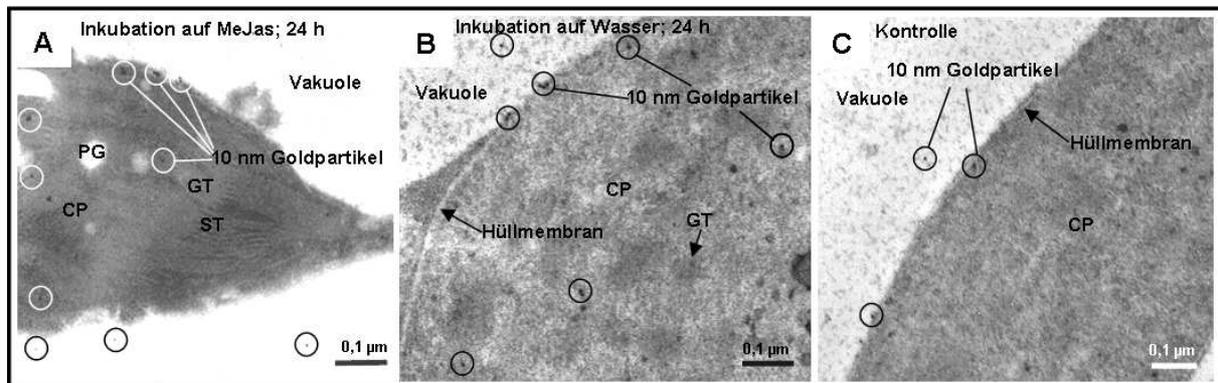


Abb. 22: Immunogoldmarkierung von TOC 75 an Ultradünnschnitten (primärer Antikörper: polyklonaler anti-TOC 75-Antikörper; sekundärer Antikörper: mit 10 nm Goldpartikeln konjugiert):

A: Immunmarkierter Ultradünnschnitt eines Chloroplasten eines 7 Tage alten Gerstenprimärblatts (= Ausgangswert). Deutlich zu sehen sind die Immungoldsignale (10 nm Goldpartikel), die allerdings nicht nur im Bereich der Hüllmembranen auftraten.

B: Immunmarkierter Ultradünnschnitt eines Chloroplasten eines 7 Tage alten Gerstenprimärblatts nach 24 h Inkubation mit Methyljasmonat. Auch hier sind die Immungoldsignale deutlich erkennbar; jedoch war auch hier keine eindeutige Lokalisation an den Hüllmembranen möglich.

C: Immunmarkierter Ultradünnschnitt eines Chloroplasten eines 7 Tage alten Gerstenprimärblatts nach 24 h Inkubation mit Wasser (= Kontrolle). Die Immungoldsignale sind deutlich erkennbar, aber es war keine eindeutige Zuordnung zu dem Bereich der Hüllmembranen möglich.

3.4.1.2. Topographische Darstellung und topologische Identifizierung der inneren und äußeren Plastidenhüllmembran im Gefrierbruch

Mit Hilfe der Gefrierbruchtechnik können u. a. biologische Membransysteme in ihrer Fläche dargestellt und untersucht werden. Da der Bruch bei gefrorenen biologischen Proben weitgehend entlang der hydrophoben Mitte der Membransysteme erfolgt (PINTO DA SILVA und KAN., 1984), können Informationen zur Topographie und

Topologie dieser Strukturen dreidimensional in genügend hoher räumlicher Auflösung erhalten werden.

Abb. 23A zeigt einen bei -97°C gefriergebrochenen ganzen Chloroplasten eines 7 Tage alten Gerstenprimärblattes. Deutlich zu unterscheiden sind die topographisch unterschiedlichen Höhenniveaus der resultierenden Bruchflächen. Diese Bruchflächen repräsentieren jeweils die hydrophoben (Membran-) Bereiche der äußeren- (OE-EF = *Outer Envelope Exoplasmatic Fracture Face*) sowie der inneren Chloroplastenhüllmembranen (IE-PF = *Inner Envelope Protoplasmatic Fracture Face*).

In Abb. 23 B verläuft der Bruch zum größten Teil so, dass der hydrophobe Teil der inneren Chloroplastenhüllmembran zu erkennen ist. Lediglich im linken oberen Quadranten verläuft der Bruch zum Teil durch den hydrophoben Teil der äußeren Chloroplastenhüllmembran.

Bei vergrößerter Darstellung dieses Bereiches (Abb. 23C) ist deutlich eine differenzierte Verteilungsdichte von Partikeln (Topologie) mit ca. 5 nm bis 10 nm Durchmesser der topographisch unterschiedlichen Höhenniveaus der resultierenden Bruchflächen zu erkennen; dabei zeichnet sich die die äußere Hüllmembran repräsentierende Bruchfläche (OE-EF) durch eine wesentlich geringere Partikeldichte gegenüber der die innere Hüllmembran repräsentierende Bruchfläche (IE-PF) aus (LEFORT-TRAN, 1980; CLINE *et al.*, 1985). Nach Auszählung der Partikel ergab sich für die die äußere Hüllmembran repräsentierende Bruchfläche (OE-EF) eine durchschnittliche Partikeldichte von 491 ± 140 pro μm^2 und für die die innere Hüllmembran repräsentierende Bruchfläche (IE-PF) eine durchschnittliche Partikeldichte von 1749 ± 98 pro μm^2 . Das Verhältnis der unterschiedlichen Partikeldichten von 1 zu 3,6 entspricht auch den in der Literatur (LEFORT-TRAN, 1980; CLINE *et al.*, 1985) genannten Werten von ca. 1 zu 4 (Abb. 23D). Somit war es auch in der vorliegenden Arbeit möglich, die innere und äußere Plastidenhüllmembran im Gefrierbruch darzustellen und, auf Grund von topographischen und topologischen Merkmalen, zweifelsfrei zu identifizieren.

In Abb. 23C ist am äußeren rechten Bildrand zudem auch noch ein kleiner Teil der äußeren Oberfläche der Inneren Hüllmembran zu sehen (IE-PS = *Inner Envelope-Plasmatic Surface*); darin sind deutlich 5 kanalähnliche Strukturen zu erkennen, deren ungefähre Durchmesser 5 nm beträgt. Dabei könnte es sich um den

zentralen Kanal des Proteinimportapparates der inneren Hüllmembran (TIC Komplex) handeln.

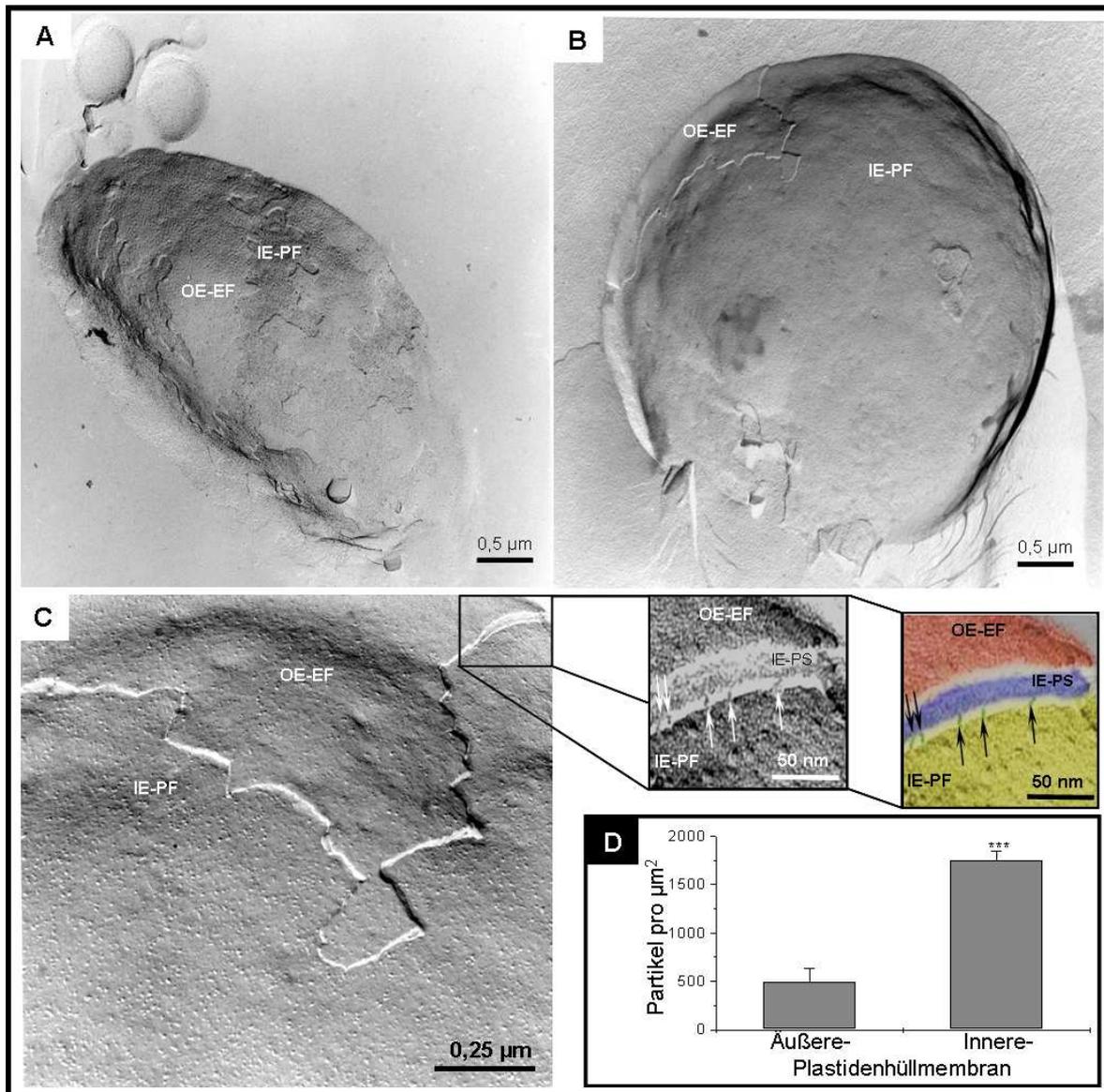


Abb. 23: Topographische Darstellung und topologische Identifizierung der inneren und äußeren Plastidenhüllmembran im Gefrierbruch:

A: Gefrierbruch eines isolierten ganzen Chloroplasten eines 7 Tage alten Gerstenprimärblatts; der Bruch zeigt wechselweise die hydrophobe Seite der äußeren- (OE-EF) und der inneren- (IE-PF) Chloroplastenmembran.

B: Gefrierbruch eines isolierten ganzen Chloroplasten eines 7 Tage alten Gerstenprimärblatts; der Bruch verläuft weitgehend entlang der hydrophoben Seite der inneren Chloroplastenmembran (IE-PF).

C: Vergrößerter Bereich mit den hydrophoben Seiten der äußeren- (OE-EF) und der inneren- (IE-PF) Chloroplastenmembran und mit deren charakteristischen, unterschiedlichen Partikeldichten. Ebenso zu sehen ist die äußere Oberfläche der inneren Hüllmembran (IE-PS = *Plasmatic Surface*) mit kanalähnlichen Strukturen. Im markierten Ausschnitt: stark vergrößertes, hoch aufgelöstes Detailbild der kanalähnlichen Strukturen (Pfeile) in der äußeren Membranhälfte der inneren Chloroplastenmembran (zur Veranschaulichung derselbe Ausschnitt nochmals coloriert).

D: Unterschiedliche Partikeldichte der äußeren und der inneren Chloroplastenmembran ($n = 3$). Durch den hoch signifikanten Unterschied der Partikeldichten ergibt sich somit eine Möglichkeit zur eindeutigen Identifizierung und Zuordnung der jeweiligen Bruchflächen.

Die Kennzeichnung von Signifikanzniveaus erfolgt durch die Sternsymbolik: $p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***.

3.4.1.3. Darstellung und Identifizierung von TOC 75 in der äußeren Plastidenhüllmembran durch *SDS Freeze-Fracture Replica Labeling* (SDS-FRL)

Die SDS-FRL-Methode ermöglicht es, die konventionelle Gefrierbruchtechnik mit immunocytochemischen Verfahren zu kombinieren (FUJIMOTO, 1995). Diese neue Technik erlaubt es, nicht nur Topographie und Topologie biologischer Membranen im EM darzustellen, sondern ist auch zugleich in der Lage, bestimmte Komponenten in solchen Membranen immunologisch zu identifizieren.

Abb. 24A zeigt eine SDS-FRL eines isolierten Chloroplasten (eines 8 Tage alten Gerstenprimärblatts) mit Anti-TOC 75 Antikörper (detektiert mit 10 nm Gold-konjugiertem sekundären Antikörper; siehe Material und Methoden) in Abhängigkeit der Topographie der Bruchflächen. Die meisten Immunsignale (10 nm Goldpartikel) sind auf der die äußere Hüllmembran repräsentierenden Bruchfläche (OE-EF) lokalisiert. Daneben werden aber auch einige wenige Immunsignale von Anti-TOC 75 auf der die innere Hüllmembran repräsentierenden Bruchfläche (IE-PF) detektiert. Diese Immunsignale könnten von vorhandenen Kontaktstellen (*contact sites*, CLINE *et al.*, 1985; SCHNELL und BOBEL, 1993; XENIA *et al.*, 1997) beider Hüllmembranen herrühren, da sich hier beim Proteintransport durch die Hüllmembranen die beiden multimeren Proteinkomplexe TOC und TIC sehr stark annähern und so vermutlich im Gefrierbruch nicht immer vollständig zu trennen sind. Denkbar wäre auch, dass der polyklonale Anti-TOC 75-Antikörper auch zu einem gewissen Grad Epitope bestimmter Proteinkomponenten des TIC Komplexes auf der IE-PF erkennt. Dazu müssten diese Komponenten aber eine strukturell große Ähnlichkeit mit dem TOC 75 Protein aufweisen. Da sich aber die Hüllmembranen der Plastiden in ihrer Zusammensetzung unterscheiden – gemäß der Endosymbiontentheorie stammt die äußere Hüllmembran von der Wirtszelle und weist somit eher eukaryotische Merkmale auf wohingegen die innere Hüllmembran eher prokaryotische Merkmale, auf Grund ihrer Abstammung von Vorläufern der Cyanobakterien trägt – ist eine strukturell große Ähnlichkeit der Epitope nicht sehr wahrscheinlich.

Abb. 24B stellt einen Ultradünnschnitt durch einen Chloroplasten (eines 8 Tage alten Gerstenprimärblatts) dar. Neben anderen ultrastrukturellen Details der Pflanzenzelle,

wie etwa Zellwand, Mitochondrien, Golgiapparat, Vakuole, Tonoplast, Plasmalemma und Ribosomen, sind deutlich die beiden Hüllmembranen des Chloroplasten (im Querschnitt) zu erkennen. Bereits hier ist zu sehen, dass der Abstand zwischen den Hüllmembranen nicht überall gleich ist. Ein stark vergrößerter Ausschnitt (Abb. 24D) aus dem Bereich der beiden Hüllmembranen lässt deutlich die Kontaktstellen (*Contact sites*) von äußerer und innerer Hüllmembran erkennen, an denen möglicherweise die TOC - TIC Proteinkomplexe während des Proteindurchtritts durch die Hüllmembranen räumlich stark angenähert sind. Solche Kontaktstellen der Hüllmembranen der Plastiden wurden auch von SCHNELL und BLOBEL (1993) im Zuge der Identifikation von Proteinimportintermediaten beschrieben.

In Abb. 24C ist eine Doppelmarkierung mit polyklonalem Anti-TOC 75-Antikörper (detektiert mit 10 nm goldkonjugiertem sekundären Antikörper) und mit einem monoklonalen Anti-MOG-Antikörper [ein Antikörper gegen eine Monooxygenase, die gemäß GRAY *et al.*, (1995) ausschließlich in der inneren Hüllmembran lokalisiert ist und kein strukturelles oder funktionelles Pendant in der äußeren Hüllmembran aufweist; detektiert mit 5 nm goldkonjugierten sekundären Antikörper] gezeigt. Das Immunsignal der Anti-TOC 75-Antikörper (10 nm Goldpartikel) ist ausschließlich auf der die äußere Hüllmembran repräsentierende Bruchfläche (OE-EF) zu erkennen. Das Immunsignal der Anti-MOG-Antikörper (5 nm Goldpartikel) befindet sich ausschließlich auf der die innere Hüllmembran repräsentierenden Bruchfläche (IE-PF).

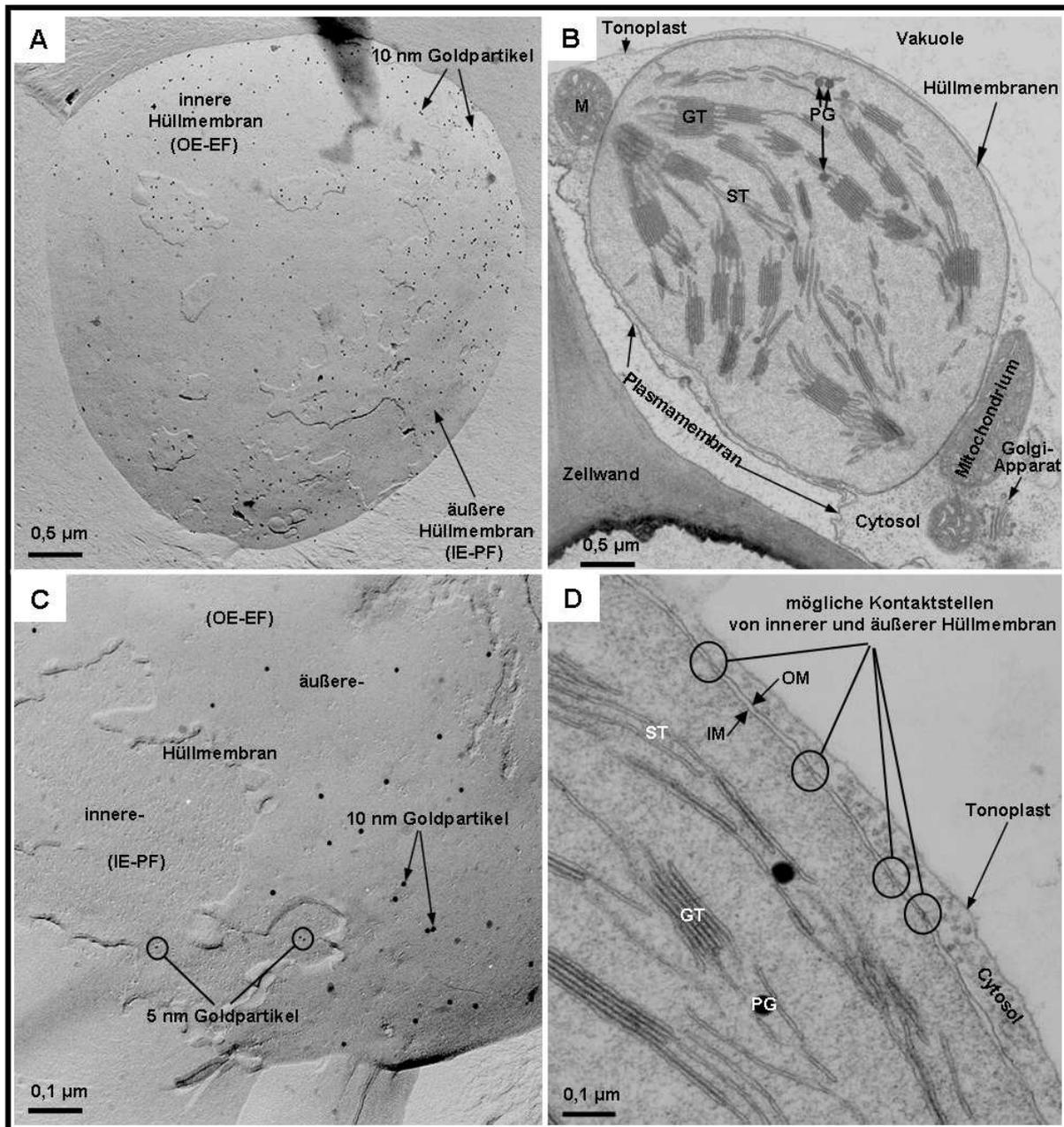


Abb. 24: Darstellung und Identifizierung von TOC 75 in der äußeren Plastidenhüllmembran mittels SDS-FRL:

A: SDS-FRL eines isolierten Chloroplasten (eines 8 Tage alten Gerstenprimärblatts) mit Anti-TOC 75-Antikörper (10 nm Goldpartikel). Deutlich sind die markierten Bruchflächen der inneren und äußeren Hüllmembran zu sehen, wobei die Goldpartikel überwiegend auf der die äußere Hüllmembran repräsentierenden Bruchfläche (OE-EF) lokalisiert sind.

B: Ultradünnschnitt (Querschnitt) durch einen Chloroplasten eines 8 Tage alten Gerstenprimärblatts. Neben anderen ultrastrukturellen Details der Pflanzenzelle sind deutlich die beiden Hüllmembranen des Chloroplasten (im Querschnitt) zu erkennen. Bereits bei dieser Vergrößerung ist zu sehen, dass der Abstand zwischen den Hüllmembranen nicht überall gleich ist.

C: SDS-FRL Doppelmarkierung mit polyklonalem Anti-TOC 75-Antikörper (10 nm Goldpartikel) und mit einem monoklonalen Anti-MOG-Antikörper (5 nm Goldpartikel). Das Immunsignal der Anti-TOC 75-Antikörper (10 nm Goldpartikel) ist ausschließlich auf der die äußere Hüllmembran repräsentierenden Bruchfläche (OE-EF) zu erkennen. Das Immunsignal der Anti-MOG-Antikörper (5 nm Goldpartikel) befindet sich ausschließlich auf der die innere Hüllmembran repräsentierenden Bruchfläche (IE-PF).

D: Vergrößerter Ausschnitt aus dem Bereich der beiden Hüllmembranen mit möglichen Kontaktstellen von äußerer und innerer Hüllmembran. Die Kontaktstellen (*Contact sites*) von äußerer und innerer Hüllmembran, an denen möglicherweise die TOC - TIC Proteinkomplexe während des

Proteindurchtritt durch die Hüllmembranen räumlich stark angenähert sind, sind hier deutlich zu erkennen (mit Kreise markiert).

Abkürzungen: GT: Granathylakoide, IM: innere Hüllmembran, OM: äußere Hüllmembran, PG: Plastoglobuli, ST: Stromathylakoide

3.4.1.4. Analyse der TOC 75 Dichte in der äußeren Plastidenhüllmembran während der durch Methyljasmonat vermittelten Seneszenz mit Hilfe der SDS-FRL

Ein weiterer großer Vorteil der SDS-FRL Methode ist deren hohe Sensitivität. Da es sich hier um einen immunologischen Einzelmolekülnachweis handelt, können behandlungsbedingte Veränderungen der TOC 75 Dichte nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ - bezogen auf die Hüllmembranfläche einzelner Plastiden - detektiert werden.

Nach Inkubation von 7 Tage alten Gerstenprimärblättern mit Methyljasmonat fand ein sukzessiver, zeitabhängiger Rückgang der TOC 75 Dichte statt; so verminderte sich die TOC 75 Dichte von anfangs $9,9 \pm 1,3 \text{ G}/\mu\text{m}^2$ (=Goldpartikel pro μm^2 Plastidenhüllmembranfläche) nach 8 h Inkubation auf $8,2 \pm 1,6 \text{ G}/\mu\text{m}^2$. Nach weiterer Inkubation mit Methyljasmonat verminderte sich die TOC 75 Dichte nochmals drastisch über $4,1 \pm 0,5 \text{ G}/\mu\text{m}^2$ nach 16 h auf letztendlich $1,4 \pm 0,8 \text{ G}/\mu\text{m}^2$ nach insgesamt 24 h (siehe Abb. 25K; D, E, F, G).

Die parallel durchgeführte Inkubation von 7 Tage alten Gerstenprimärblättern mit Wasser zeigte keine signifikante Änderung der Dichte von TOC 75 gegenüber dem Ausgangswert; so betrug die Dichte von TOC 75 nach 8 h $10,3 \pm 3,5 \text{ G}/\mu\text{m}^2$, nach 16 h $11,5 \pm 3,3 \text{ G}/\mu\text{m}^2$ und nach 24 h $13,2 \pm 2,0 \text{ G}/\mu\text{m}^2$ (siehe Abb. 25K; A, B, C, G). Ebenfalls keine Änderung der TOC 75 Dichte gegenüber dem Ausgangswert zeigten Plastiden aus 8 Tage alten, im Gewächshaus in Erdkultur gewachsenen Gerstenprimärblättern ($10,3 \pm 1,8 \text{ G}/\mu\text{m}^2$; siehe Abb. 25K; H, G).

Eine Überprüfung der Spezifität des primären Antikörpers (Anti-TOC 75-Antikörper) in der SDS-FRL an gefriergebrochenen Thylakoidmembranen ergab keine unspezifischen Immunsignale des Anti-TOC 75-Antikörpers (Abb. 25J). Auch die Spezifität des sekundären goldkonjugierten Antikörpers in der SDS-FRL wurde durch eine Inkubation des sekundären goldkonjugierten Antikörpers alleine (also ohne primären Antikörper) mit einem gefriergebrochenen Plastiden überprüft (siehe Abb. 25I).

Da bei der SDS-FRL Methode eine spezifische Immunmarkierung nur auf der Seite der Replika erfolgen kann, die noch einen Teil des biologischen Materials aufweist, ist entweder sicherzustellen, dass nur diese Seite für die Markierung zugänglich ist oder es ist zu überprüfen, ob sich die Immungoldpartikel auf einer Seite der Replika befinden. Dazu ist es notwendig, Stereoaufnahmen solcher immungoldmarkierter Replika anzufertigen. In Abb. 25L ist eine Stereoaufnahme einer mit Anti-TOC 75-Antikörper immunmarkierten Replika einer Plastidenhüllmembran gezeigt, die ein entsprechendes Immunsignal eindeutig nur auf einer Seite der Replika aufweist (zu betrachten mit einer Rot - Grün Brille; alternativ: Stereoaufnahmen im Anhang). Darüber hinaus zeigte eine REM-Aufnahme (Abb. 25M) einer markierten Replika (gemischtes Sekundär- und Rückstreuelektronenbild mit SE/BSE-Detektor) dass sich die Goldpartikel deutlich als helle, punktförmige Strukturen von der Pt/C-Fläche der Replika abhoben. Auf Grund des Rückstreuelektronensignals erscheint der Durchmesser der Goldpartikel allerdings etwas größer als 10 nm.

Wie in den Kapiteln zuvor gezeigt wurde, hat eine Methyljasmonatinkubation von Gerstenprimärblättern einen Einfluss auf den Gehalt bestimmter plastidärer Proteine (Rubisco, LHC II) im Plastiden. Ein weiterer durch Methyljasmonat bedingter Mechanismus der Regelung des plastidären Proteingehalts könnte auch in Veränderungen der in den Hüllmembranen eingebetteten Proteinimportkomplexe liegen. Schon KEEGSTRA *et al.* (1989) wiesen der ungewöhnlichen Lipidzusammensetzung der Plastidenhülle eine direkte oder indirekte Rolle im Proteintransportprozess zu. Unterstützung erhielt diese Vermutung durch die Beobachtung, dass sich die Proteintransportaktivität durch Behandlungen, die den Lipidgehalt der äußeren Plastidenhülle beeinflussen, signifikant verändert (KERBER und SOLL, 1992; BRUCE, 2001). Wie wir hier erstmalig eindrucksvoll zeigen konnten, nimmt die Dichte des TOC 75 Proteins, das ja den zentralen Teil des TOC-Multiproteinkomplexes bildet, in der äußeren Plastidenhülle nur unter Methyljasmonateinfluss innerhalb von 24 Stunden dramatisch ab (Verlust der TOC 75 Immunsigaldichte gegenüber dem Ausgangswert um mehr als 85 %), wobei sich die Abnahme schon von Beginn an zeigt und bereits nach 16 Stunden Inkubationszeit mehr als die Hälfte des Ausgangswertes erreicht hat. Ob Methyljasmonat dabei direkt etwa durch Veränderungen an der Hüllmembran selbst, oder indirekt, z. B. über die Beeinflussung von Transkription/Translation, *turnover-*

Raten oder gezielter Steigerung proteolytischer Abbauaktivitäten des TOC 75 wirkt, ist nicht geklärt.

Dass eine Inkubation von Gerstenprimärblättern mit Methyljasmonat vorzeitig Seneszenz auszulösen und zu verstärken vermag, und der Umstand, dass der Abbau von Membranbestandteilen durch Lipidperoxidation ein charakteristisches Merkmal der Blattseneszenz (v. a. bei Monokotyledonen) darstellt (BACHMANN *et al.*, 2002), macht eine Veränderung der Lipidzusammensetzung der Plastidenhüllmembranen im Laufe der Methyljasmonatwirkung plausibel. Zu den Hauptbestandteilen der Plastidenmembranen gehören ungesättigte Fettsäuren wie die α -Linolensäure und Linolsäure (SOMMERVILLE *et al.*, 2000), die beide als Substrate für Lipoxygenasen (LOX) dienen, die die (positions- und stereo-) spezifische Einführung von molekularem Sauerstoff in Position C-9 (9-LOX) oder C-13 (13-LOX) katalysieren (BRASH, 1999). Die 13-LOX ist ein Schlüsselenzym des Octadecanoid-Stoffwechselwegs, der zur endogenen Bildung des in die Seneszenz involvierten Phytohormons Jasmonsäure führt, und ist, mit anderen Isoformen der LOX zusammen, hauptsächlich im Stroma und z. T. auch in der inneren Hüllmembran des Plastiden lokalisiert. Die zu den JIPs gehörende, in den Plastiden lokalisierte 13-LOX (FEUSSNER *et al.*, 1995; VÖRÖS *et al.*, 1998), ist durch Jasmonsäure induzierbar und bildet somit die kausale Verbindung zwischen dem Phytohormon Jasmonsäure, den LOX- (Iso-)Enzymen und der Seneszenz. Eine Veränderung der Lipidzusammensetzung der Plastidenhülle von Methyljasmonat-inkubierten Gerstenprimärblättern erfolgt also zum überwiegenden, wenn nicht ausschließlichen Teil über LOX vermittelte Lipidperoxidation. Oxylipide, wie etwa die Isomere 12- oder 16-Hydroperoxyoctadecatriensäure, die indikativ für autooxydative Prozesse wären (RUSTERUCCI *et al.*, 1999; BERGER *et al.*, 2001), konnten, im Gegensatz zur natürlichen Seneszenz bei Bäumen und *Arabidopsis* Blättern (BERGER *et al.*, 2001), in Blättern von Gerste nicht nachgewiesen werden (BAUMANN *et al.*, 2002). Durch vergleichende Expressionsanalysen von drei 13-LOX Isoformen in Reaktion auf Jasmonsäureinkubation konnte eine zeitlich unterschiedliche Aktivierung (innerhalb einer und bis zu 18 Stunden) der einzelnen Formen beobachtet werden (ROYO *et al.*, 1996; HEITZ *et al.*, 1997). Durch diese unterschiedliche Aktivierung der Isoformen und der Lokalisation aller Isoformen im Plastiden kann darauf geschlossen werden, dass ein Lipidabbau der Chloroplastenmembranen ein frühes Ereignis der Methyljasmonat vermittelten

Seneszenz darstellt. Dass durch diese frühen und starken Veränderungen der Lipide der Plastidenmembranen auch Veränderungen im Gehalt an den in den Hüllmembranen eingebetteten Proteinen und Proteinimportkomplexen wie z. B. dem integralen Membranprotein TOC 75, auftreten können, ist anzunehmen und würde den von uns beobachteten, rapiden Verlust von TOC 75 (siehe oben) unter Methyljasmonatinkubation erklären. Somit könnten Veränderungen im Proteingehalt der Plastidenhülle als Monitor für seneszenzbedingte Änderungen der Plastidenhülle auf der Ebene der Lipide dienen.

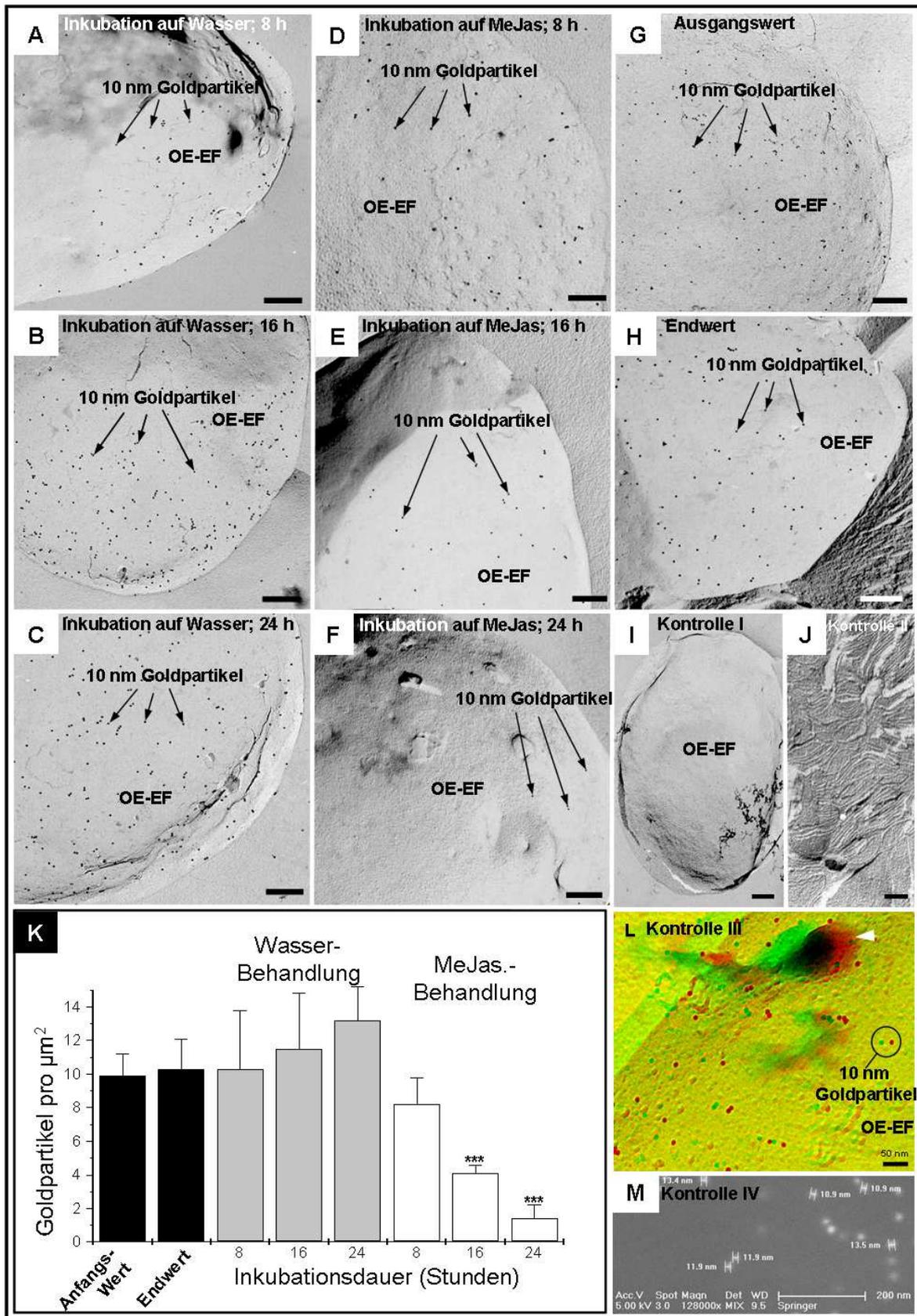


Abb. 25: Quantitative Veränderung der TOC 75 Dichte in der äußeren Plastidenhüllmembran während 24-stündiger Methyljasmonatinkubation:

A-C: SDS-FRL mit Anti-TOC 75-Antikörper von isolierten Plastiden (Hüllmembranflächen) aus 7 Tage alten Gerstenprimärblättern nach unterschiedlich langer Inkubation auf Wasser (Inkubationsdauer: A: 8 h, B: 16 h, C: 24 h). Deutlich ist die mit 10 nm Goldpartikel markierte Bruchfläche der äußeren

Hüllmembran (OE-EF) zu sehen; eine augenfällige Veränderung der Markierungsdichte des TOC 75 Immunsignals im Laufe der 24-stündigen Inkubation war nicht erkennbar.

D-F: SDS-FRL mit Anti-TOC 75-Antikörper von isolierten Plastiden (Hüllmembranflächen) aus 7 Tage alten Gerstenprimärblättern nach unterschiedlich langer Inkubation auf Methyljasmonat (Inkubationsdauer: D: 8 h, E: 16 h, F: 24 h). Auch hier ist die mit 10 nm Goldpartikeln markierte Bruchfläche der äußeren Hüllmembran (OE-EF) deutlich zu erkennen. Es ergab sich allerdings eine deutliche Verminderung der Markierungsdichte des TOC 75 Immunsignals im Laufe der 24-stündigen Inkubation, und zwar dergestalt, dass nach 24-stündiger Inkubation nur noch wenige einzelne Immunsignale detektierbar waren.

G: SDS-FRL mit Anti-TOC 75-Antikörper von isolierten Plastiden (Hüllmembranflächen) aus 7 Tage alten Gerstenprimärblättern (Anfangswert).

H: SDS-FRL mit Anti-TOC 75-Antikörper von isolierten Plastiden (Hüllmembranflächen) aus 8 Tage alten Gerstenprimärblättern (Endwert).

I: SDS-FRL mit sekundärem goldkonjugierten Antikörper (10 nm Goldpartikel) von isolierten Plastiden (Hüllmembranflächen) aus 7 Tage alten Gerstenprimärblättern (Kontrolle goldkonjugierte Immunoglobulin Fraktion). Es waren keine Immunsignale erkennbar.

J: SDS-FRL mit Anti-TOC 75-Antikörper von isolierten Plastiden (Thylakoidmembranen) aus 7 Tage alten Gerstenprimärblättern (Kontrolle unspezifische Bindung). Ganz vereinzelt wurde eine vernachlässigbare, unspezifische Bindung ($< 0,1 \text{ G}/\mu\text{m}^2$) beobachtet.

K: Grafische Darstellung der TOC 75 Dichte (Goldpartikel pro μm^2 Plastidenhüllmembranfläche) in Abhängigkeit der Inkubationsdauer mit Methyljasmonat bzw. Wasser; Anfangs- und Endwert (SDS-FRL aus isolierten Plastiden aus 7 bzw. 8 Tage alten Gerstenprimärblättern). Die Markierungsdichten des Endwertes und aller drei Zeitpunkte der Inkubation auf Wasser unterschieden sich nicht signifikant von der Markierungsdichte des Ausgangswertes. Ein anderes Verhalten zeigte sich bei Methyljasmonatinkubation: schon nach 16 h Inkubation war ein deutlicher (hoch signifikanter) Rückgang der Markierungsdichte zu erkennen, der sich bis zum Ende hin nochmals drastisch verschärfte.

Für alle Datensätze gilt: $10 \leq n \leq 12$. Die Kennzeichnung von Signifikanzniveaus erfolgt durch die Sternsymbolik: $p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***.

L: Stereoaufnahme einer SDS-FRL mit Anti-TOC 75-Antikörper von isolierten Plastiden (Hüllmembranflächen) aus 7 Tage alten Gerstenprimärblättern. Die Immunmarker (10 nm Goldpartikel) befinden sich tatsächlich nur auf einer Seite (Oberseite) der Replika (zu betrachten mit einer Rot-Grün-Brille, oder alternativ: Stereobildpaare, siehe Anhang). Weiterhin zu sehen ist eine leichte Verunreinigung mit nicht vollständig abgelöstem biologischem Material (Pfeilspitze). Original- und weitere, zusätzliche Stereoaufnahmen: siehe Anhang.

M: REM-Aufnahme einer markierten Replika (SE/BSE-Detektor) zur Identifizierung und Größenbestimmung der Goldpartikel: Die Goldpartikel heben sich deutlich als helle, punktförmige Strukturen von der Pt/C-Fläche der Replika ab. Auf Grund des Rückstreuелеktronensignals erscheint der Durchmesser der Goldpartikel allerdings etwas größer als 10 nm.

Resümee:

Mit Hilfe der Immungoldmarkierung von TOC 75 am Ultradünnschnitt war weder eine hinreichende qualitative, noch quantitative Aussage über mögliche Veränderungen des Membranproteins im Zuge einer Methyljasmonat-Behandlung möglich. Erst die Kombination der konventionellen Gefrierbruchtechnik, die eine einwandfreie topographische Darstellung und topologische Identifizierung der inneren und äußeren Plastidenhüllmembranen erlaubt, mit der SDS-FRL, die eine sichere immunologische Darstellung des integralen Membranproteins TOC 75 ermöglicht, gelang es, seneszenzbedingte Veränderungen der Hüllmembran zu detektieren. Wir konnten hier erstmalig eindrucksvoll zeigen, dass die Dichte des TOC 75 Proteins, das ja den zentralen Teil des TOC Multiproteinkomplexes bildet, in der äußeren

Plastidenhülle unter Methyljasmonateinfluss innerhalb von 24 Stunden dramatisch abnimmt (Verlust der TOC 75 Immunsignaldichte gegenüber dem Ausgangswert um mehr als 85 %). Diese starke Veränderung im Proteingehalt der Plastidenhülle unter Methyljasmonateinfluss kann auch als Monitor von seneszenz-bedingten Änderungen der Plastidenhülle auf der Ebene der Lipide dienen.

3.4.2. Darstellung des peripheren Teils des Membranproteins TOC 159 der äußeren Plastidenhüllmembran

Eine weitere wichtige Komponente des Standardproteinimportapparates der äußeren Plastidenhülle ist das Membranprotein TOC 159, (PERRY und KEEGSTRA, 1994; KESSLER *et al.*, 1994; BÉDARD und JARVIS, 2005) dessen weitaus größter Anteil sich an der Peripherie der äußeren Plastidenhülle befindet. Nur ein kleiner integraler Teil des Proteins dient als Verankerung in der Hüllmembran. Auf Grund dieser topographischen Exposition ist TOC 159 einem immunologischen Nachweis mittels SDS-FRL kaum zugänglich (da beim Gefrierbruch die Biomembranen ja größtenteils entlang der hydrophoben Seiten gespalten werden). Um jedoch ein solches peripheres Membranprotein eines Organells immunocytochemisch im Elektronenmikroskop darzustellen, stehen zwei Methoden zur Wahl: Die Immunocytochemie an ganzen isolierten Plastiden mit anschließender Negativ-Kontrastierung (Transmissionselektronenmikroskopie) und die Immunocytochemie an ganzen isolierten Plastiden mit anschließender Präparation für die Rasterelektronenmikroskopie.

3.4.2.1. Immunologischer Nachweis von TOC 159 an ganzen isolierten Plastiden mit anschließender Negativ Kontrastierung (TEM)

Abb. 26 zeigt TEM Aufnahmen mit Anti-TOC 159 Antikörper immunmarkierter und anschließend negativ-kontrastierter isolierter Plastiden aus Gerstenprimärblättern nach 24-stündiger Inkubation entweder mit Methyljasmonat oder Wasser (zur Kontrolle). Bei beiden Behandlungen sind die die TOC 159 repräsentierenden Immunsignale (10 nm Goldpartikel) auf oder am negativ kontrastierten Plastiden zu

erkennen (Abb. 26A, B, b); eine Inkubation der isolierten Plastiden mit dem sekundären goldkonjugierten Antikörper alleine ergab kein Immunsignal (Abb. 26C). Bei der Methyljasmonatinkubation scheint die Dichte des Immunsignals von TOC 159 etwas geringer zu sein (Abb. 26A) als bei der Kontrolle (Inkubation auf Wasser, Abb. 26B). Da aber bei der Negativ-Kontrastierung mit Uranylacetat die Granathylakoide beim Durchstrahlen als sehr dunkle Bildbereiche erscheinen und eine einwandfreie topographische Identifizierung der äußeren Hüllmembran nicht möglich ist, konnte das vorhandene Immunsignal weder hinreichend topologisch bestimmt noch quantifiziert werden.

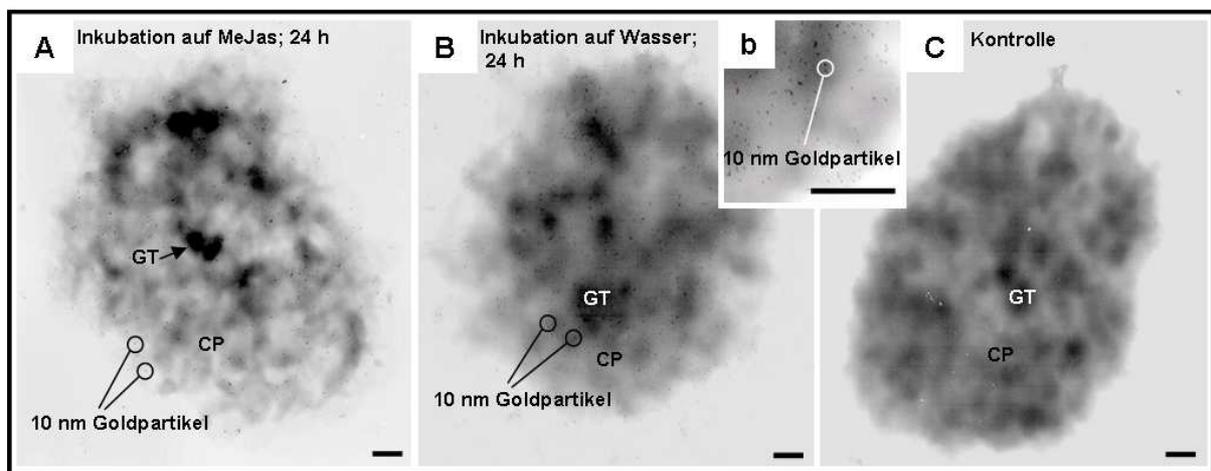


Abb. 26: Immunologischer Nachweis von TOC 159 an ganzen isolierten Plastiden mit anschließender Negativ Kontrastierung (TEM):

A: TEM Aufnahme eines Anti-TOC 159 immunmarkierten und negativkontrastierten isolierten Plastiden eines 7 Tage alten Gerstenprimärblatts nach 24-stündiger Inkubation auf Methyljasmonat. Als elektronendichte, und somit dunkle Bereiche sind die Granathylakoide zu erkennen. Darüber hinaus kann auch das Immunsignal (10 nm Goldpartikel) identifiziert werden.

B: TEM Aufnahme eines Anti-TOC 159 immunmarkierten und negativ kontrastierten isolierten Plastiden eines 7 Tage alten Gerstenprimärblatts nach 24-stündiger Inkubation auf Wasser (Kontrolle). Auch hier sind die elektronendichten, dunklen Bereiche der Granathylakoide zu erkennen. Ebenfalls kann hier das Immunsignal, in Form der 10 nm Goldpartikel, identifiziert werden.

b: Vergrößerter Bereich aus Abb. B: Die 10 nm Goldpartikel des Immunsignals sind hierbei einwandfrei zu identifizieren.

C: TEM Aufnahme eines nur mit sekundärem goldkonjugierten Antikörper (10 nm Goldpartikel) immunmarkierten und negativkontrastierten isolierten Plastiden eines 7 Tage alten Gerstenprimärblatts nach 24-stündiger Inkubation auf Wasser (Kontrolle). Nur die dunklen, die Granathylakoide repräsentierenden Bereiche sind zu erkennen; ein Immunsignal in Form der 10 nm Goldpartikel fehlt.

Abkürzungen: CP: Chloroplast, GT: Granathylakoide
Größenmaßstabsbalken in den Aufnahmen: entspricht 0,5 μm

3.4.2.2. Darstellung von isolierten Plastiden bzw. der Oberfläche der äußeren Plastidenhüllmembran im Rasterelektronenmikroskop (REM)

Um ein Antigen an der äußeren Plastidenhüllmembran mit dem REM detektieren zu können, muss zuerst sichergestellt werden, dass die äußere Oberfläche von isolierten Plastiden in hinreichend guter Auflösung im REM abgebildet werden kann. Nachdem isolierte Plastiden auf speziellen Objektträgern (mit Poly-L-Lysin beschichtet) immobilisiert sind, erfahren diese eine herkömmliche Präparation zur Rasterelektronenmikroskopie (Fixieren, Entwässern, Kritisch-Punkt-Trocknung; siehe MM); anschließend werden die so gewonnenen Proben mit Kohlenstoff beschichtet und im Niedervolt REM abgebildet (siehe Material und Methoden).

Abb. 27A zeigt einen isolierten Plastiden im Niedervolt REM; in der Übersicht stellt sich der Plastid auf Grund der Präparation mehr oder weniger als kugeliges Gebilde von ca. 2 μm bis 3 μm Durchmesser dar. Des Weiteren sind durch die Präparation auftretende Schrumpfungen als leichte Dellen der äußeren Oberfläche zu erkennen. In dieser Vergrößerung (ca. 10.000-fach) allerdings, sind keine weiteren Details der Oberfläche zu erkennen. Abb. 27B zeigt einen stark vergrößerten Teil der äußeren Oberfläche eines Plastiden (Vergrößerung ca. 40.000-fach) mit erkennbarer Strukturierung. Deutlich aufgelöst ist eine porenartige Struktur und helle, globuläre Strukturen der Oberfläche in Abb. 27C (Vergrößerung ca. 130.000-Fach) zu erkennen. Bei den hellen globulären Strukturen an der Oberfläche handelt es sich vermutlich um präzipitiertes Fixans (OsO_4 ; mit energiedispersiver Mikrobereichsanalyse = EDX detektiert, nicht gezeigt).

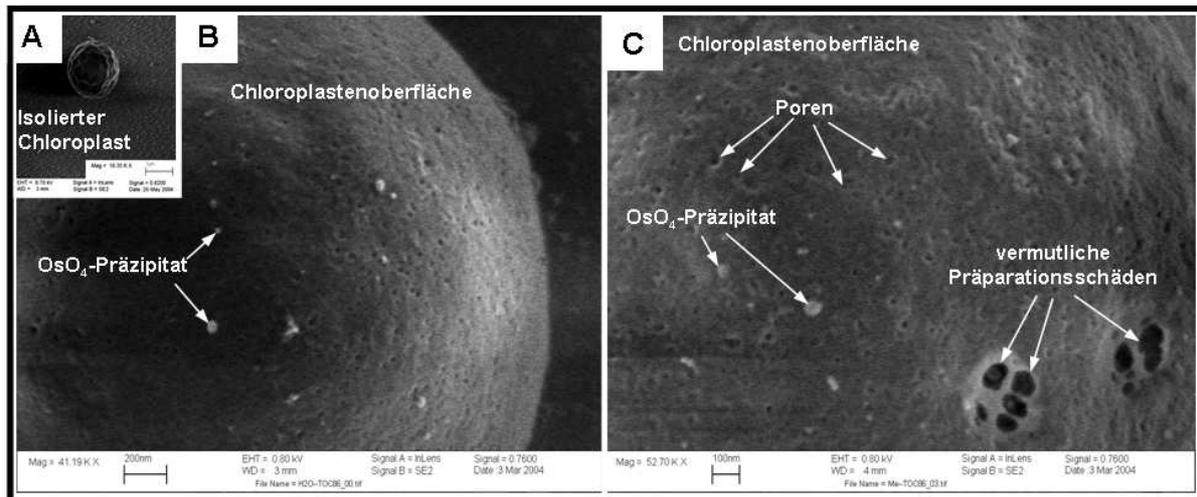


Abb. 27: Darstellung von isolierten Plastiden bzw. der Oberfläche der äußeren Plastidenhüllmembran im Rasterelektronenmikroskop (REM):

A: isolierter Plastid im Niedervolt-REM in der Übersicht. Deutlich ist die durch die Präparation bedingte, kugelige Form des Plastiden zu erkennen.

B: stark vergrößerter Bereich der äußeren Oberfläche mit deutlich sichtbaren porenartigen Strukturen eines isolierten Plastiden im Niedervolt REM. Bei den hellen, globulären Strukturen handelt es sich um präzipitiertes OsO_4 .

C: Hochaufgelöste Detailaufnahme der porenartig strukturierten äußeren Plastidenoberfläche. Neben den Poren mit wenigen nm Durchmesser, sind auch größere, ca. 100 nm Durchmesser aufweisende „Löcher“ zu erkennen, bei denen es sich vermutlich um Präparationsartefakte handelt.

3.4.2.3. Immuno-rasterelektronenmikroskopischer Nachweis von TOC 159 an ganzen isolierten Plastiden

Wie unter 3.3.2.2. gezeigt, ist es möglich, isolierte Plastiden so zur REM zu präparieren, dass ihre Oberfläche in für die Immunlokalisation von Antigenen mittels goldkonjugierter Antikörper genügender Auflösung und Vergrößerung dargestellt werden kann. Um jedoch die verwendeten Immunmarker, die 10 nm Goldpartikel der goldkonjugierten Antikörper, zu detektieren, ist es notwendig, unterschiedliche Modi der Signaldetektion des REM zu verwenden. Während das Sekundärelektronenbild (SE = *Sekundary Electrons*) allein nur eine Information der Topographie einer Oberfläche gibt, zur Detektion der Goldpartikel auf der mit Kohlenstoff beschichteten Oberfläche des Plastiden jedoch auch ein „Materialkontrast“ vonnöten ist, ist es zwingend erforderlich, auch ein Bild der Rückstreuielektronen (BSE = *Back Scattered Electrons*) mit zu verarbeiten (siehe Abb. 28).

Abb. 28A zeigt ein SE-Bild eines immunmarkierten (mit Anti-TOC 159 Antikörper, detektiert mit 10 nm Gold-konjugiertem, sekundären Antikörper) Plastiden; das SE-Bild zeigt nur die in Folge der Präparation stark geschrumpfte und daher gefaltete

Topographie der Plastidenoberfläche ohne erkennbares Immunsignal. Abb. 28B zeigt denselben Plastiden, wobei die SE-/BSE-Signale in geeigneter Weise jeweils einen bestimmten Anteil an der Bildgenerierung haben: Deutlich ist jetzt neben der topographischen Information auch die Topologie der Immunsignale (10 nm Goldpartikel) als „Materialkontrast“ zu erkennen (Abb. 28a und b: jeweils stark vergrößerte Bereiche von A bzw B).

In Abb. 28C ist ein immunmarkierter Plastid (mit Anti-TOC 159 Antikörper, detektiert mit 10 nm Gold-konjugiertem, sekundären Antikörper) im BSE-Bild dargestellt; es ist nahezu keine topographische Oberflächeninformation enthalten, jedoch sind die Immunsignale (10 nm Goldpartikel) deutlich sichtbar. Bei starker Vergrößerung (Abb. 28c; ca. 131.000-fach) und guter Auflösung entspricht der Durchmesser der Signale den 10 nm Goldpartikeln des eingesetzten Gold-konjugiertem, sekundären Antikörpers (welcher die Anti-TOC 159 Antikörper detektiert).

Abb. 28 D zeigt wiederum einen immungoldmarkierten Plastiden im SE-/BSE-Modus mit einer anderen Gewichtung der Signale; dadurch werden auch interne Strukturen des Plastiden sichtbar: Unter der sich als feiner „Schleier“ darstellenden Hüllmembran zeichnen sich die Granathylakoide als helle „scheibenförmige“ Strukturen ab. Bei den kleineren, sehr hellen, globulären Partikeln mit einem Durchmesser von ca. 50 nm - 100 nm könnte es sich um Plastoglobuli handeln; dafür spricht auch der helle „Materialkontrast“, der von in lipidreichen Plastoglobuli eingelagertem OsO_4 (Fixier- und Kontrastiermittel) herrühren könnte. In der starken Vergrößerung (Abb. 28d) sind - neben den soeben genannten Strukturen - vor allem die Goldpartikel sehr gut zu erkennen. Auch tritt in starker Vergrößerung und hoher Auflösung die Hüllmembran des Plastiden mit einer partikelähnlichen Subultrastruktur zu Tage.

Das fast vollständige Fehlen eines TOC 159 Immunsignals könnte daran liegen, dass der periphere Teil dieses Proteins – gemäß dem „*targeting*“-Modell (JARVIS und ROBINSON, 2004), bei dem TOC 159 als Präproteinrezeptor z.T. frei im Cytosol vorliegt – während der Isolation der Plastiden größtenteils verloren geht. *Crosslinking*-Daten scheinen zu belegen, dass TOC 159 als primärer Präproteinrezeptor fungiert (PEERY und KEEGSTR, 1994; MA *et al.*, 1996; KURANOV und SCHNELL, 1997; BAUER *et al.*, 2000) und darüber hinaus wahrscheinlich nur für den Transport photosynthetischer Proteine in den Plastiden verantwortlich ist (BAUER *et al.*, 2000; SMITH *et al.*, 2004). Diese Erkenntnis und

der Umstand, dass es offensichtlich unterschiedliche Proteinimportwege und auch, spezifisch für unterschiedliche Klassen von Präproteinen, strukturell unterschiedlich zusammengesetzte Proteintransportkomplexe gibt (IVANOVA *et al.*, 2004; KUBIS *et al.*, 2004 SMITH und SCHNELL, 2004; BÉDARD und JARVIS, 2005) wäre auch vorstellbar, dass in dem Stadium der Versuchspflanzen (voll ausgewachsene Gerstenprimärblätter) fast kein Import von photosynthetischen Präkursoren in den Plastiden erfolgt und somit auch nahezu kein TOC 159 vorhanden ist. Dem gegenüber steht allerdings die starke Markierungsdichte von TOC 159 an isolierten, ganzen Plastiden (TEM, Negativkontrast, siehe oben).

Die allgemein geringe Dichte des Immunsignals von TOC 159 auf der Plastidenoberfläche ist aber evtl. auch bedingt durch die lange Prozedur der Präparation für die REM. Vor allem aber die Entwässerung mit Aceton und die anschließende Kritisch-Punkt-Trocknung (KPT) könnten einen negativen Effekt - nämlich die Ablösung der Antikörper - hervorrufen. Damit ist die Technik in diesem Stadium noch nicht geeignet, v. a. quantitative Aussagen über etwaige behandlungsbedingte Unterschiede der Immunsignaldichte von TOC 159 zu machen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Methode es erlaubt, mit hinreichender Auflösung eine Immungoldmarkierung an so sensiblen, schwer zu präparierenden Objekten wie Organellen zu detektieren. Verbesserungen der Isolations- und Präparationstechniken von Plastiden, sowie die Nutzung des ESEM Modus (*Environmental Scanning Electron Microscope*) des Rasterelektronenmikroskops, bei dem eine Entwässerung der Proben (sowohl mit Lösungsmittel, als auch die KPT) entfallen würde, hätten eine gute Aussicht, diese Methode auch zu qualitativen und quantitativen Analysen einsetzbar zu machen.

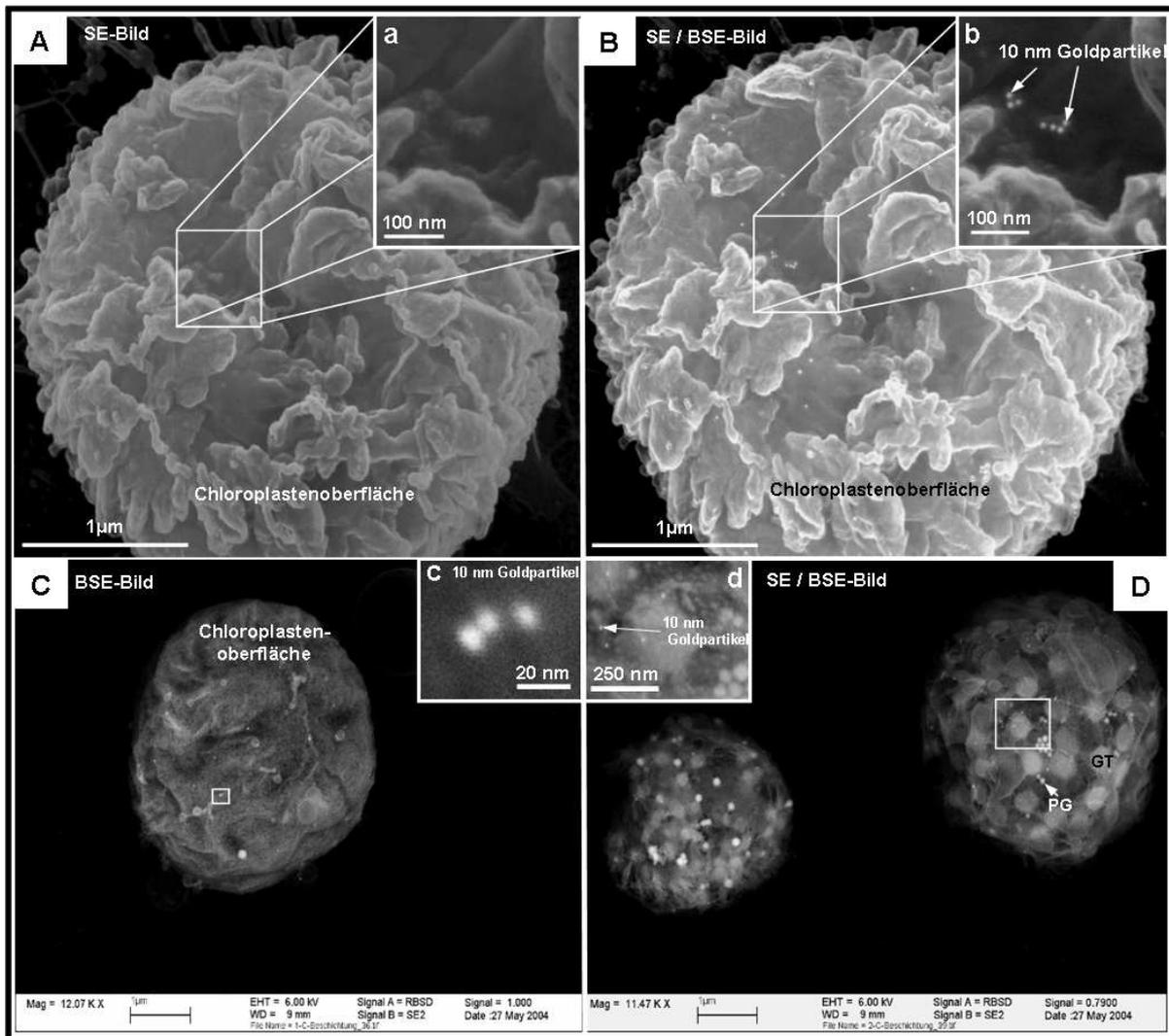


Abb. 28. Immuno-rasterelektronenmikroskopischer Nachweis von TOC 159 an isolierten Plastiden unter Verwendung von Gold konjugierten, sekundären Antikörper (Goldpartikelgröße: 10 nm)

A: SE Bild eines immunmarkierten (mit Anti-TOC 159-Antikörper, detektiert mit Gold konjugiertem, sekundären Antikörper) Plastiden; nur die Topographie der Plastidenoberfläche ist zu erkennen (**a:** starke Vergrößerung aus Abb. A)

B: SE/BSE Bild des Plastiden aus Abb. A; neben der Topographie der Plastidenoberfläche ist auch deutlich das Immunsignal (Anti-TOC 159-Antikörper, detektiert mit Gold konjugiertem, sekundären Antikörper, Goldpartikelgröße: 10 nm) als „Materialkontrast“ zu sehen (**b:** starke Vergrößerung aus Abb. B)

C: Immunmarkierter (Anti-TOC 159-Antikörper, detektiert mit Gold konjugiertem, sekundären Antikörper, Goldpartikelgröße: 10 nm) Plastid im BSE-Modus; nahezu keine Topographie der Oberfläche sichtbar, jedoch guter „Materialkontrast“ der 10 nm Immunsignale (**c:** stark vergrößerter Bildausschnitt mit drei 10 nm Goldpartikel).

D zeigt wiederum einen immunmarkierten (Anti-TOC 159-Antikörper, detektiert mit Gold konjugiertem, sekundären Antikörper, Goldpartikelgröße: 10 nm) Plastiden im SE-/BSE-Modus mit einer anderen Gewichtung der Signale; Neben inneren Strukturen (Granathylakoide, Plastoglobuli) und den 10 nm Immunsignalen ist auch eine Subultrastruktur der äußeren Hüllmembranoberfläche zu erkennen.

Abkürzungen: BSE: rückgestreute Elektronen (*B*ack *S*cattered *E*lectrons), SE: Säkunderelektronen (*S*ecundary *E*lectrons).

Resümee:

Eine weitere wichtige Komponente des Standardproteinimportapparates der äußeren Plastidenhülle ist das Membranprotein TOC 159, dessen weitaus größter Anteil sich an der Peripherie der äußeren Plastidenhülle befindet. Eine Darstellung dieses peripheren Teils des Membranproteins war aber nur mit Hilfe der Immunraster-elektronenmikroskopie isolierter Chloroplasten möglich. Hierbei zeigte sich allerdings eine allgemein geringe Immunsignaldichte des TOC 159, welche entweder im physiologischen Zustand der Versuchspflanzen, oder aber durch die langwierige Probenpräparation für die REM begründet ist. Im letztgenannten Falle, hätten Verbesserungen der Isolations- und Präparationstechniken von Plastiden, sowie die Nutzung des ESEM Modus des Rasterelektronenmikroskops, eine gute Aussicht, diese Methode auch zu qualitativen und quantitativen Analysen einsetzbar zu machen.

4. Zusammenfassung

Die Seneszenz eines Blattes umfaßt dessen abschließende Phase im pflanzlichen Entwicklungsprozess und stellt somit eine der wichtigsten Schlüsselpositionen im Lebens- und Entwicklungszyklus des Individuums dar. Sie ist gekennzeichnet durch hoch komplexe, stark regulierte Prozesse, die durch eine serielle Abfolge physiologischer Ereignisse zur Mobilisierung und Rückgewinnung von Nähr- und Mineralstoffen führt. Daher sind dramatische Veränderungen auf molekularem, biochemischem und strukturellem Niveau untrennbar mit der Seneszenz verbunden. Im Rahmen dieser Arbeit sollten seneszenzbedingte Veränderungen an Plastiden untersucht werden, wobei der Frage, ob die Plastidenhüllmembran bis in relativ späte Phasen der Seneszenz unverändert bleibt, oder ob es schon in frühen Abschnitten der Plastidenentwicklung zu (seneszenz-) spezifischen Veränderungen kommt, speziell Rechnung getragen werden. Ein besonderer Schwerpunkt des Interesses galt zudem dem Standardproteinimportapparat der Plastiden, der so genannten TIC-TOC-Maschinerie.

Dazu wurde zunächst ein experimentelles System etabliert, bei dem es möglich war, Seneszenz in Primärblättern der Gerste gezielt zu induzieren und deren Ablauf, im Vergleich zur natürlichen Seneszenz, zu beschleunigen. Als Kriterium zur Auswahl des experimentellen Systems - und zum anschließenden Vergleich mit der natürlich ablaufenden Seneszenz - stellte sich die Kombination zweier Parameter als hinreichend verlässlich heraus: dabei handelte es sich um den makroskopisch gut wahrnehmbaren Abbau von Chlorophyll und, mit Hilfe der Elektronenmikroskopie visualisierbare Veränderungen der Plastidenultrastruktur, allen voran eine Vergrößerung der Plastoglobuli.

Von den vier getesteten seneszenz-auslösenden Faktoren (zwei physikalische Behandlungen: Verdunkelung der Pflanzen oder Bestrahlung mit UV-Licht und zwei Phytohormonbehandlungen: Inkubation mit Ethylen oder Methyljasmonat), zeigte einzig die Behandlung mit Methyljasmonat beide der erwarteten seneszenz-spezifischen Veränderungen.

Die Veränderungen infolge der Methyljasmonatbehandlung mussten zunächst näher charakterisiert werden, um sie dann mit denen während der natürlichen Seneszenz vergleichen zu können. Dabei zeigte das experimentelle System „Methyljasmonat-

induzierte Seneszenz“ in Bezug auf die im Rahmen dieser Arbeit ausgewählten und geprüften seneszens-spezifischen Marker, wie Chlorophyllabbau, zelluläre (strukturelle) Veränderungen sowohl der Blattparenchymzellen und des Plastoms, als auch die ultrastrukturellen Veränderungen der Plastiden, eine hohe Übereinstimmung mit der während der Entwicklung auftretenden natürlichen Seneszenz. Somit sahen wir das experimentelle System „Methyljasmonat-induzierte Seneszenz in Gerstenprimärblättern“ als geeignet an, um damit seneszenz-spezifische Änderungen der Plastidenhülle zu untersuchen.

Es sollte getestet werden, ob die Plastidenhülle – wie lange Zeit vermutet wurde – bis in späte Phasen der Seneszenz unverändert bleibt oder ob es bereits relativ zeitig zu Veränderungen in der Struktur und/oder Zusammensetzung der Plastidenhülle kommt. Solche seneszenzspezifischen Veränderungen der Plastidenhülle sollten sich v. a. auch auf den Import von kernkodierten, chloroplastidären Proteinen auswirken und somit am veränderten Gehalt dieser Proteine im Plastiden messbar sein. So war eine Methyljasmonatinkubation abgeschnittener Gerstenprimärblätter offensichtlich in der Lage, innerhalb von nur 24 Stunden eine quantitativ messbare Abnahme der Menge zweier wichtiger Proteine (Rubisco und LHC II) des Plastiden zu bewirken. Für diese beobachtete Abnahme könnten aber sowohl verminderte Synthese-, als auch erhöhte Abbauraten (oder beides in Kombination) der betroffenen Proteine verantwortlich sein. Daneben ist aber auch noch eine (zusätzliche) Regelung über die Importraten der jeweiligen Proteine in die Plastiden denkbar. Aus diesem Grund wurden die Genexpressionsmuster von chloroplastidären Proteinen und die seneszenz-spezifischen Veränderungen der Plastidenhülle – insbesondere des Proteinimports - analysiert.

Die Analyse der Genexpressionsmuster der chloroplastidären Proteine Rbcs und LHC II ergaben nun, dass unter Methyljasmonateinfluss die jeweiligen korrespondierenden mRNA-Mengen dieser Proteine abnahmen. Da gleichzeitig keine mengenmäßige Abnahme der rRNA-Mengen zu verzeichnen war, handelte es sich offensichtlich nicht um einen generellen RNA-Abbau. Die Abnahme der Konzentration der plastidären, photosynthetisch wichtigen Proteine Rbcs und LHC II war zumindest zum Teil durch eine Abnahme ihrer Synthese bedingt. Bei einem an Chlorophyllabbau beteiligten Protein – LLS1 (= PAO = Phaeophorbide a Oxygenase) – wurde demgegenüber bei Methyljasmonatinkubation ein Ansteigen der

Proteinmenge im Chloroplasten beobachtet, was zu der Annahme führt, dass es auch während der Methyljasmonat-induzierten Seneszenz einen funktionierenden Proteinimportapparat geben sollte. Prinzipiell sind neben spezifischen Änderungen der Proteinimportmaschinerie (Veränderungen einzelner Komponenten oder des gesamten Standardproteinimportapparates, möglicherweise die Bildung eines seneszenzspezifischen Importapparates) auch unspezifische Änderungen in der Protein- und/oder Lipidzusammensetzung der Plastidenhülle denkbar, die sich dann auf den Proteinimport indirekt auswirken würden.

Zum Vergleich von Proteinimportkapazitäten von Chloroplasten unterschiedlicher Entwicklungsstufen wurden die Isoenzyme der NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase verwendet, wobei gezeigt werden konnte, dass der Import von pPORB durch den Standardproteinimportapparat (TIC-TOC Maschinerie) und der Import von pPORA entwicklungsabhängig - über einen pPORA-spezifischen Importapparat (PTC) in Abhängigkeit vom Substrat Protochlorophyllid (Pchlid) - erfolgte. Dieses entwicklungsabhängige Import-Verhalten macht den pPORA-Import zu einem geeigneten Monitor, um seneszenzbedingte Änderungen in der Proteinzusammensetzung der Plastidenhülle zu erfassen. Änderungen der TIC-TOC-Maschinerie allein hingegen können auch über veränderte Importkapazitäten von pPORB erfasst werden.

Untersuchungen des Importverhaltens im Falle von pPORB in Chloroplasten ergab, dass sowohl in Plastiden aus frischen Blättern als auch in Chloroplasten die nach Flotation abgeschnittener Blätter auf Wasser isoliert worden waren, ein Import unabhängig von der Anwesenheit von Pchlid im Chloroplasten erfolgte. Eine Behandlung von Blättern mit Methyljasmonat vor der Chloroplastenisolation wirkte sich hemmend auf den Import des Präkursors aus. pPORA wurde, wie zu erwarten war, nur in Pchlid-haltige, nicht jedoch Pchlid-freie Chloroplasten der Frischkontrolle importiert. Eine Behandlung von Blättern mit Methyljasmonat vor der Chloroplastenisolation wirkte sich, wie im Fall von pPORB, hemmend auf den Import des Präkursors aus. Chloroplasten aus Blättern nach Flotation auf Wasser importierten pPORA überraschenderweise unabhängig davon, ob sie Pchlid enthielten oder nicht.

Die daraufhin angeschlossenen *Crosslinking*-Experimente zeigten, dass pPORA tatsächlich über die TIC-TOC-Maschinerie in den Chloroplasten (aus Blättern nach Flotation auf Wasser) importiert wurde. Im Gegensatz dazu zeigten sich bei den

Chloroplasten aus frischen Blättern zumindest einige der erwarteten *Crosslink*-Produkte zwischen pPORA und den Komponenten des PTC-Komplexes. Die aus mit Methyljasmonat behandelten Blättern isolierten Chloroplasten erbrachten ein völlig anderes *Crosslinking*-Muster, wobei weder Proteine der TIC-TOC-Maschinerie noch des PTC-Komplexes identifiziert werden konnten. Da sich eine Methyljasmonat-Behandlung von abgeschnittenen Blättern jedoch immer hemmend auf den Import auswirkt, kann davon ausgegangen werden, dass es jedenfalls zu gravierenden Veränderungen des ganzen oder Teilen des Standardprotein-importapparates kommen muss.

Diese Veränderungen des Standardproteinimportapparates in der äußeren Plastidenhülle während der durch Methyljasmonat vermittelten Seneszenz wurden mit Hilfe von speziellen elektronenmikroskopischen Methoden untersucht. Dabei lag das Hauptaugenmerk auf dem integralen Teil des Standardproteinimportapparates der äußeren Plastidenhülle, der den zentralen Kanal durch die äußere Hüllmembran bildet (TOC 75) und damit von zentraler Bedeutung für den eigentlichen Durchtritt kerncodierter Proteine in den Plastiden ist.

Mit Hilfe der Immungoldmarkierung von TOC 75 am Ultradünnschnitt war weder eine hinreichende qualitative noch quantitative Aussage über mögliche Veränderungen des Membranproteins im Zuge einer Methyljasmonat-Behandlung möglich. Erst durch die Kombination der konventionellen Gefrierbruchtechnik, die eine sichere topographische Darstellung und topologische Identifizierung der inneren und äußeren Plastidenhüllmembranen erlaubt, mit der SDS-FRL, die einen sicheren immunologischen Nachweis des integralen Membranproteins TOC 75 ermöglicht, gelang es, seneszenzbedingte Veränderungen der Hüllmembran zu detektieren. Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Dichte des TOC 75 Proteins, in der äußeren Plastidenhülle unter Methyljasmonateinfluss innerhalb von 24 Stunden dramatisch abnimmt (Verlust der TOC 75 Immunsignaldichte gegenüber dem Ausgangswert um mehr als 85 %). Dieser deutliche Verlust von TOC 75 in der Plastidenhülle nach Methyljasmonatbehandlung deutet darauf hin, dass eine spezifische Regulation des Imports photosynthetisch wichtiger Proteine während der künstlich induzierten Seneszenz auftritt. Es sollte daher getestet werden, ob auch andere Komponenten der TIC-TOC-Maschinerie mengenmäßig abnehmen.

Eine weitere wichtige Komponente des Standardproteinimportapparates der äußeren Plastidenhülle ist das Membranprotein TOC 159, dessen weitaus größter Anteil sich an der Peripherie der äußeren Plastidenhülle befindet. Eine Darstellung dieses peripheren Teils des Membranproteins war aber nur mit Hilfe der Immunraster-elektronenmikroskopie isolierter Chloroplasten möglich. Hierbei zeigte sich allerdings eine allgemein geringe Immunsignaldichte des TOC 159, welche entweder im physiologischen Zustand der Versuchspflanzen, oder aber durch die langwierige Probenpräparation für die REM begründet war. Im letztgenannten Falle hätten Verbesserungen der Isolations- und Präparationstechniken von Plastiden, sowie die Nutzung des ESEM Modus des Rasterelektronenmikroskops eine gute Aussicht, diese Methode auch zu qualitativen und quantitativen Analysen einsetzbar zu machen.

5. Summary

Leaf senescence marks the final stage of plant development and holds one of the most important key positions of the individual plant life and development. Senescence is indicated by highly complex, strongly regulated processes leading to mobilisation and recycling of nutrients and minerals by serial sequences of physiological events. Therefore, dramatic changes on a molecular biological, protein chemically and ultra structurally level are inseparably linked with senescence.

In the framework of this study senescence caused changes on plastids should be investigated. Special interest is given to the question whether the plastid envelope remains unchanged since relatively late stages of senescence or whether there are also senescence specific changes in early stages of plastid development. A certain focus of the interest lies on the protein import machinery of the plastid, the so called TIC-TOC-machinery.

First of all an experimental system, which makes it possible to induce and to accelerate senescence specifically in Barley primary leaves, was established. In order to choose such an experimental system – and to compare it with the naturally occurring senescence – the combination of two parameters are reliable: one was the macroscopically good detectable degradation of chlorophyll and the other was changes of the plastid ultra structure especially the increase of size of plastoglobuli with the aid of electron microscopy.

Out of four tested systems (two physical treatments: darkening and UV-radiation of plants and two phytohormone treatments: incubation either with ethylene or methyljasmonate) only treatment with methyljasmonate showed both of the necessary senescence specific changes.

In order to combine this system with the naturally occurring senescence, it had to be characterized closely. Our experimental system was highly related to the naturally occurring senescence according to the chosen and proofed senescence specific markers, like chlorophyll degradation, ultra structural changes of leaf parenchyma cells and the plastome, and ultra structural changes of plastids. Therefore we regarded our system as suitable to investigate senescence specific changes of the plastid envelope.

Such senescence specific changes of the plastid envelope should influence the import of nucleus encoded, chloroplastidic proteins and should be detectable by changes of these proteins in the plastid. Obviously, incubation of detached barley primary leaves with methyljasmonate was able within 24 hours to cause a quantitative measurable decrease of two important proteins (Rubisco and LHC II) in the plastid. Responsible of this detected degradation could be decreased synthesis- as well as increased degradation-rates (or both in combination) of the influenced proteins. Another possibility is an additional regulation of the import rates of such proteins. Therefore the gene expression pattern of chloroplastidic proteins and the senescence specific changes of the plastid envelope – especially the protein import – were analysed.

Result of the analyses of the gene expression pattern of the chloroplastidic proteins Rubisco and LHC II was that under the action of methyljasmonate the corresponding mRNA-amounts of these proteins decreased. Because there are no changes in the rRNA-amounts detectable simultaneously, it is obviously no general degradation process of RNA. Therefore the decrease of the amount of these interplastidic, photosynthetic proteins Rbcs and LHC II was partly caused by degradation of syntheses. In contrast, the amount of a photosynthetic non relevant protein – LLS1 (phaeophorbide a oxygenase) – increases in methyljasmonate treated plastids, leading to the assumption that during methyljasmonate induced senescence at least one functionally protein import apparatus exist. Theoretically, these might be remainings of the still existing TIC-TOC-machinery or modifications of it or a new senescence specific import apparatus. Besides these specific changes of the import apparatus there are also protein import influencing unspecific changes possible.

In order to combine the capacity of protein import of plastids at different developmental stages the isoenzymes of NADPH: protochlorophyllid-oxidoreductase was used. It could be shown that pPORB was transported by the standard protein transport apparatus (TIC-TOC-machinery) and pPORA – depending on the developmental stage – by a pPORA specific way. These developmental stage depended import behaviour of pPORA is a suitable monitor to record senescence specific changes of the plastid envelope. Changes of the TIC-TOC-machinery on its own are also recordable by changes of the different import capacities of pPORB.

Investigations of the import behaviour in case of pPORB in chloroplasts prepared of fresh leaves or of detached, water floated leaves showed, that the import was Pchlid

independent. Treatment of detached leaves with methyljasmonate inhibits the import of the precursor. pPORA was imported only in Pchl_{id} containing and not in Pchl_{id} free chloroplasts of fresh leaves as expected. Surprisingly, pPORA was imported independently in chloroplasts of detached, water floated leaves, whether they contain Pchl_{id} or not.

The following cross linking experiments showed that in deed pPORA was translocated by the TIC-TOC-machinery in the chloroplasts (of detached, water floated leaves). In contrast, a few of the expected cross linking products between pPORA and PTC are found in chloroplasts of fresh leaves. Cross linking pattern of chloroplasts of methyljasmonate treated leaves are completely different and neither proteins of the TIC-TOC-machinery nor of PTC were detectable. Because methyljasmonate treatment always inhibits the import, it is supposed that there are serious changes of the whole standard protein import apparatus or at least of parts of it.

These possible changes of the standard protein import apparatus of the outer plastid envelope during methyljasmonate caused senescence were investigated with special electron microscopic methods. There the main emphasis was placed on the integral part of the standard protein import apparatus of the outer plastid envelope building the central channel thru the outer envelope membrane (TOC 75) and is therefore of great importance for the translocation of nuclear coded proteins into the plastids.

Immuno gold labelling of TOC 75 on ultra thin sections was insufficient to make a qualitative or quantitative statement about possible changes of the membrane protein during methyljasmonate treatment. Only the combination of the conventional freeze fracture technique, which allows a distinct topographic presentation and topological identification of the inner and outer plastid envelope membranes, with the SDS-FRL, allowing a safe immunological identification of the integral membrane protein TOC 75, allows us to detect senescence specific changes of the envelope membrane. We showed here for the first time very impressive, that the density of the TOC 75 protein decreases dramatically within 24 hours under the action of methyljasmonate (loss of TOC 75 immuno signal density of more than 85 % combined with the start value). This strong alternation of the protein content of the plastid envelope during methyljasmonate influence could act as monitor of senescence related changes of the plastid envelope.

An additional important component of the standard protein import apparatus of the outer plastid envelope is the membrane protein TOC 159, whose biggest part is located on the periphery of the outer plastid envelope. The detection of this periphery part of the membrane protein was only possible on isolated chloroplasts with the aid of immuno scanning electron microscopy. But this results in a common weak immuno signal density of TOC 159, which is caused either by the physiological condition of the plants or by the long-lasting preparation of the samples for SEM. In the last mentioned case improvements of the isolation- and preparation methods of plastids as well as application of the ESEM mode of the SEM will be beneficial for using this method for qualitative and quantitative analyses.

6. Literatur

- ACKER, G., 1988. Immunoelectron microscopy of surface antigens (polysaccharides) of gram negative bacteria using pre- and post-embedding techniques, pp. 147-174. In: F. Mayer (ed.) *Methods in microbiology*, vol. **20**. Electron microscopy in microbiology. Academic Press, Inc. (London), Ltd, London.
- ACKER, G., KAMMERER, C., 1990. Localisation of enterobacterial common antigen immunoreactivity in the ribosomal cytoplasm of *Escherichia coli* cells cryosubstituted and embedded at low temperature. *Journal of Bacteriology*, **2**, pp. 1106-1113.
- AGRAWAL, G.K., TAMOGAMI, S., HAN, O., IWAHASHI, H. and RAKWAL, R., 2004. Rice octadecanoid pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **317**(1), pp. 1-15.
- ALDRIDGE, D.C., GALT, S., GILES, D., TURNER, W.B., 1971. Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. *Journal of the Chemical Society*, **C**, pp. 1623-1627.
- ANDERSON, T.F., 1951. Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. *Trans. N.Y. Acad. Sci.*, (Ser. II) **13**, pp. 130-134.
- ANDERSON, T.F., 1953. A method for eliminating gross artifacts in drying specimens. *C. R. Pre. Congr. Int. Microsc. Electron. (Paris)*, pp. 567-576, *Revue d'Optique*, Paris.
- ANDERSSON, A., KESKITALO, J., SJÖÖ DIN, 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. and NILSSON, P., 2004. A transcriptional timetable of autumn senescence. *Genome biology*, **5**(4),.

- APEL, K., SANTEL, H.J., REDLINGER, T.E. and FALK, H., 1980. The protochlorophyllide holochrome of barley (*Hordeum vulgare* L.). Isolation and characterization of the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase. *European Journal of Biochemistry*, **111**(1), pp. 251-258.
- AUSTIN II, J.R., FROST, E., VIDI, P.-., KESSLER, F. and STAEHELIN, L.A., 2006. Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. *Plant Cell*, **18**(7), pp. 1693-1703.
- BACHMANN, A., HAUSE, B., MAUCHER, H., GARBE, E., VOÖ ROÖ S, K., WEICHERT, H., WASTERNAK, C. and FEUSSNER, I., 2002. Jasmonate-induced lipid peroxidation in Barley leaves initiated by distinct 13-LOX forms of chloroplasts. *Biological Chemistry*, **383**(10), pp. 1645-1657.
- BAILEY J.L., WHYBORN A.G. (1963). The osmiophilic globules of chloroplasts - II. Globules of the spinach-beet chloroplast. *Biochim. et Biophys. Acta*, Vol. **78**, pp. 163-174.
- BARCLAY, K.D. and MCKERSIE, B.D., 1994. Peroxidation reactions in plant membranes: Effects of free fatty acids. *Lipids*, **29**(12), pp. 877-882.
- BARENDSE, G.W.M., CROES, A.F., VAN DEN ENDE, G., BOSVELD, M., CREEMERS, T., 1985. Role of hormones on flower bud formation in thinlayer explants of tobacco. *Biol Plant (Praha)* **27**, pp. 408-412.
- BARRACLOUGH, R. and ELLIS, R.J., 1979. The biosynthesis of ribulose bisphosphate carboxylase. Uncoupling of the synthesis of the large and small subunits in isolated soybean leaf cells. *European Journal of Biochemistry*, **94**(1), pp. 165-177.
- BARTON, R., 1966. Fine structure of mesophyll cells in senescing leaves of Phaseolus. *Planta*, **71**, pp. 314-325.
- BARTSCH, SANDRA, 2004. Untersuchungen zur Identität und Aktivität von PTC 52 in *Hordeum vulgare* L.. Diplomarbeit am Lehrstuhl Pflanzenphysiologie der Universität Bayreuth.

- BAUER, J., CHEN, K., HILTBUNNER, A., WEHRLI, E., EUGSTER, M., SCHNELL, D. and KESSLER, F., 2000. The major protein import receptor of plastids is essential for chloroplast biogenesis. *Nature*, **403**(6766), pp. 203-207.
- BAUERSCHMTTT, HEIKE, 2004. Untersuchungen zur Identifizierung eines transienten Chlorophyllspeichers während der Seneszenz. Diplomarbeit am Lehrstuhl Pflanzenphysiologie der Universität Bayreuth.
- BEALE, M.H. and WARD, J.L., 1998. Jasmonates: Key players in the plant defence. *Natural Product Reports*, **15**(6), pp. 533-548.
- BECKER W., APEL K. (1993). Differences in gene expression between natural and artificially induced leaf senescence. *Planta*, Vol. 189, pp. 74-79.
- BÉDARD, J. and JARVIS, P., 2005. Recognition and envelope translocation of chloroplast preproteins. *Journal of Experimental Botany*, **56**(419), pp. 2287-2320.
- BERGER, S., WEICHERT, H., PORZEL, A., WASTERNAK, C., KÜHN, H. and FEUSSNER, I., 2001. Enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation in leaf development. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1533**(3), pp. 266-276.
- BÖLTER, B., SOLL, J., SCHULZ, A., HINNAH, S. and WAGNER, R., 1998. Origin of a chloroplast protein importer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**(26), pp. 15831-15836.
- BORKMANN, R.F., MCLAUGHLIN, J., 1995. The molecular chaperone function of a-crystallin is impaired by UV photolysis. *Photochemistry and Photobiology* **62**, pp. 1046–1051.
- BORMANN, J.F., TERAMURA, A.H., 1993. Effects of ultraviolet-B radiation on terrestrial plants. In: Young AR, Björn L.O., Moan J., Nultsch W., eds. Environmental UV photobiology. New York: Plenum Press, pp.427–471.
- BOURETT, T.M., CZYMMEK, K.J. and HOWARD, R.J., 1999. Ultrastructure of chloroplast protuberances in rice leaves preserved by high-pressure freezing. *Planta*, **208**(4), pp. 472-479.

- BRASH, A.R., 1999. Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *Journal of Biological Chemistry*, **274**(34), pp. 23679-23682.
- BRITT, A.B., 1996. DNA damage and repair in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**(1), pp. 75-100.
- BRUCE CAHOON, A. and STERN, D.B., 2001. Plastid transcription: A menage à trois? *Trends in Plant Science*, **6**(2), pp. 45-46.
- BRUCE, B.D., 2001. The paradox of plastid transit peptides: Conservation of function despite divergence in primary structure. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, **1541**(1-2), pp. 2-21.
- BRUNNER, J., 1996. Use of photocrosslinkers in cell biology. *Trends in Cell Biology*, **6**, pp. 154-157
- BUCHANAN-WOLLASTON, V., 1997. The molecular biology of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany*, **48**(307), pp. 181-199.
- BUTLER, R.D. and SIMON, E.W., 1970. Ultrastructural aspects of senescence in plants. *Adv. Gerontol. Res.*, **3**, pp. 73-129.
- CALDWELL, C.R., 1993. Ultraviolet-induced photodegradation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) microsomal and soluble protein tryptophanyl residues in vitro. *Plant Physiology*, **101**(3), pp. 947-953.
- CALIEBE, A., GRIMM, R., KAISER, G., LÜJ BECK, J., SOLL, J. and HEINS, L., 1997. The chloroplastic protein import machinery contains a Rieske-type iron-sulfur cluster and a mononuclear iron-binding protein. *EMBO Journal*, **16**(24), pp. 7342-7350.
- CHEN, K., CHEN, X. and SCHNELL, D.J., 2000. Mechanism of protein import across the chloroplast envelope. *Biochemical Society Transactions*, **28**(4), pp. 485-491.
- CHEN, X., SMITH, M.D, FITZPATRICK, L, SCHNELL, D.J., 2002. In vivo analysis of the role of atTic20 in protein import into chloroplasts. *The Plant Cell* **14**, pp. 641–654.

- CHEONG, J.-. and CHOI, Y.D., 2003. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends in Genetics*, **19**(7), pp. 409-413.
- CLINE, K., WERNER-WASHBURNE, M., LUBBEN, T.H. and KEEGSTRA, K., 1985. Precursors to two nuclear-encoded chloroplast proteins bind to the outer envelope membrane before being imported into chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry*, **260**(6), pp. 3691-3696.
- COHEN, A.L., 1974. Critical point drying. In: *Principles and Techniques of Scanning Electron Microscopy. Biological Applications*, **1** (Hresg. M.A. Hayat), pp. 44-112. Van Nostrand Reinhold Co., New York.
- DAHLN, C. and CLNE, K., 1991. Developmental regulation of the plastid protein import apparatus. *The Plant Cell*, **3**, pp. 1131-1140.
- DELLA-CIOPPA, G., BAUER, S.C. and KLEIN, B.K., 1986. Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **83**(18), pp. 6873-6877.
- DEMOLE, E., LEDERER, E., MERCIER, D., 1962. Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmine. *Helv. Chim. Acta*, **45**, pp. 675-685.
- 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. *Plant Physiology*, **111**(3), pp. 789-796.
- DOUCE, R. and JOYARD, J., 1982. Purification of chloroplast envelope. In: Edelman *et al.* (eds): *Methods in chloroplast molecular biology*, Elsevier Biomedical Press, pp. 239-256.
- DYER T.A., OSBORNE D.J (1971). Leaf nucleic acids. II. Metabolism during senescence and the effects of kinetin. *J. Exp. Botany*, Vol. **22**, pp. 552-560.
- ELLIS, R.J. and HARTLEY, M.R., 1971. Sites of synthesis of chloroplast proteins. *Nature New Biol.*, **233**, pp.193-196.

- ELLIS, R.J., 1979. The most abundant protein in the world. *Trends in Biochemical Science*, **4**, pp. 241-244.
- ESEN A. (1978). A simple method for quantitative, semiquantitative and qualitative assay of protein. *Anal. Biochem.*, Vol. **89**, pp. 264-273.
- FANG, Z., BOUWKAMP, J.C. and SOLOMOS, T., 1998. Chlorophyllase activities and chlorophyll degradation during leaf senescence in non-yellowing mutant and wild type of *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Experimental Botany*, **49**(320), pp. 503-510.
- FEUSSNER, I., HAUSE, B., VOROS, K., PARTHIER, B. and WASTERNAK, C., 1995. Jasmonate-induced lipoxygenase forms are localized in chloroplasts of barley leaves (*Hordeum vulgare* cv. Salome). *Plant Journal*, **7**(6), pp. 949-957.
- FEY, V., WAGNER, R., BRÄUTIGAM, K. and PFANNSCHMIDT, T., 2005. Photosynthetic redox control of nuclear gene expression. *Journal of Experimental Botany*, **56**(416), pp. 1491-1498.
- FLEGLER S.L., HECKMAN J.W. JR., KLOMPARENS K.L. (1995). Elektronenmikroskopie. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*, Heidelberg, S. 184.
- FUJIMOTO, K., 1995. Freeze-fracture replica electron microscopy combined with SDS digestion for cytochemical labeling of integral membrane proteins - Application to the immunogold labeling of intercellular junctional complexes. *Journal of Cell Science*, **108**(11), pp. 3443-3449.
- FUJIMOTO, K., 1997. SDS-digested freeze-fracture replica labeling electron microscopy to study the two-dimensional distribution of integral membrane proteins and phospholipids in biomembranes: Practical procedure, interpretation and application. *Histochemistry and Cell Biology*, **107**(2), pp. 87-96.
- GHOSH S., HUDAK K.A., DUMBROFF E.B., THOMPSON J.E. (1994). Release of photosynthetic protein catabolites by blebbing from thylakoids. *Plant Physiol.*, Vol. **106**, pp. 1547-1553.

- GHOSH, S., MAHONEY, S.R., PENTEMAN, J.N., PEIRSON, D., DUMBROFF, E.B., 2001. Ultrastructural and biochemical changes in chloroplasts during *Brassica napus* senescence. *Plant Physiol Biochem* **39**: pp. 777–784
- GOGALA, N., 1991. Regulation of mycorrhizal infection by hormonal factors produced by hosts and fungi. *Experientia*, **47**(4), pp. 331-340.
- GRAY, J., CLOSE, P.S., BRIGGS, S.P., JOHAL, G.S, 1997. A novel suppressor of cell death in plants encoded by *Lls1* gene of maize. *Cell* **89**, pp. 25-31.
- GRAY, J., WARDZALA, E., YANG, M., REINBOTHE, S., HALLER, S. and PAULI, F., 2004. A small family of LLS1-related non-heme oxygenases in plants with an origin amongst oxygenic photosynthesizers. *Plant Molecular Biology*, **54**(1), pp. 39-54.
- GRAY, J.C., 2003. Chloroplast-to-nucleus signaling: A role for Mg-protoporphyrin. *Trends in Genetics*, **19**(10), pp. 526-529.
- GRAY, J.C., SORNARAJAH, R., ZABRON, A.A., DUCKETT, C.M., KAHN, M.S., 1995. Chloroplast control of nuclear gene expression. In: *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, ed. P. Mathis, The Netherlands: Kluwer Academics, pp. 543-550.
- GRAY, J.C., SULLIVAN, J.A., WANG, J.-., JEROME, C.A., MACLEAN, D., ALLEN, J.F., HORNER, D.S., HOWE, C.J., LOPEZ-JUEZ, E., HERRMANN, R.G. and LEAVER, C.J., 2003. Coordination of plastid and nuclear gene expression. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*, **358**(1429), pp. 135-145.
- GREENBAUM, N.L. and MAUZERALL, D., 1991. Effect of irradiance level on distribution of chlorophylls between PS II and PS I as determined from optical cross-sections. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, **1057**(2), pp. 195-207.
- GREENBERG, B.M., WILSON, M.I., GERHARDT, K.E. and WILSON, K.E., 1996. Morphological and physiological responses of *Brassica napus* to ultraviolet-B radiation: Photomodification of ribulose-1,5-bisphosphate

- carboxylase/oxygenase and potential acclimation processes. *Journal of Plant Physiology*, **148**(1-2), pp. 78-85.
- GRIFFITH, W.T., 1975. Characterization of the terminal stage of chlorophyll(ide) synthesis in etioplast membrane preparations. *Biochemical Journal*, **152**, pp. 623-635.
- GRUMBACH, K.H., LICHTENTHALR, H.K., 1973. Der Verlauf der Lipochinon und Pigmentsynthese bei einer experimentell induzierten Chloroplasten-degeneration in grünen Keimlingen von *Hordeum vulgare* L. *Z Naturforsch* **28c**, pp.439–445
- GUIAMÉT, J.J., PICHERSKY, E. and NOODÉN, L.D., 1999. Mass exodus from senescing soybean chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, **40**(9), pp. 986-992.
- GUIAMÉT, J.J., TYYSTJÄÄ RVI, E., TYYSTJÄÄ RVI, T., JOHN, I., KAIRAVUO, M., PICHERSKY, E. and NOODÉN, L.D., 2002. Photoinhibition and loss of photosystem II reaction centre proteins during senescence of soybean leaves. Enhancement of photoinhibition by the 'stay-green' mutation *cytG*. *Physiologia Plantarum*, **115**(3), pp. 468-478.
- HABER, A.H., THOMPSON, P.J., WALNE, P.L., TRIPLETT, L.L., 1969. Nonphotosynthetic retardation of chloroplast senescence by light. *Plant Physiology*, **44**, pp. 1619-1628.
- HAK SOO SEO, JONG TAE SONG, CHEONG, J.-., LEE, Y.-., LEE, Y.-., HWANG, I., JONG SEOB LEE and YANG DO CHOI, 2001. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**(8), pp. 4788-4793.
- HE, Y. and GAN, S. 2002. A gene encoding an acyl hydrolase is involved in leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, pp. 805 – 815.
- HE, Y., FUKUSHIGE, H., HILDEBRAND, D.F., GAN, S., 2002. Evidence supporting a role of jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Physiol.* **128**, pp. 876–884.

- HERRMANN G., LEHMANN, J., PETERSON, A., SEMBDNER, G., WIEDHASE, R.A., PARTHIER, B., 1989. Species and tissue-specificity of jasmonate-induced abundant proteins. *Journal of Plant Physiology*, **134**, pp. 703-709.
- HIDALGO, E., DING,H.G., AND DEMPLE,B., 1997. Redox signal transduction via iron-sulfur clusters in the SoxR transcription activator. *Trends in Biochemical Sciences*, **22**, 207-210.
- 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 Cell Physiol.*, Vol. **33**, pp. 1209-1214.
- HIDEMA, J. and KUMAGAI, T., 2006. Sensitivity of rice to ultraviolet-B radiation. *Annals of Botany*, **97**(6), pp. 933-942.
- HIGH, S. and DOBBERSTEIN, B., 1991. The signal sequence interacts with the methionine-rich domain of the 54-kD protein of signal recognition particle. *Journal of Cell Biology*, **113**(2), pp. 229-233.
- HIGH, S., FLINT, N. and DOBBERSTEIN, B., 1991. Requirements for the membrane insertion of signal-anchor type proteins. *Journal of Cell Biology*, **113**(1), pp. 25-34.
- HIGH, S., GORLICH, D., WIEDMANN, M., RAPOPORT, T.A. and DOBBERSTEIN, B., 1991. The identification of proteins in the proximity of signal-anchor sequences during their targeting to and insertion into the membrane of the ER. *Journal of Cell Biology*, **113**(1), pp. 35-44.
- HIGH, S., MARTOGLIO, B., GORLICH, D., ANDERSEN, S.S.L., ASHFORD, A.J., GINER, A., HARTMANN, E., PREHN, S., RAPOPORT, T.A., DOBBERSTEIN, B. and BRUNNER, J., 1993. Site-specific photocross-linking reveals that Sec61p and TRAM contact different regions of a membrane-inserted signal sequence. *Journal of Biological Chemistry*, **268**(35), pp. 26745-26751.
- HINNAH, S.C., HILL, K., WAGNER, R., SCHLICHER, T. and SOLL, J., 1997. Reconstitution of a chloroplast protein import channel. *EMBO Journal*, **16**(24), pp. 7351-7360.

- HIRSCH, S., MUCKEL, E., HEEMEYER, F., VON HEIJNE, G. and SOLL, J., 1994. A receptor component of the chloroplast protein translocation machinery. *Science*, **266**(5193), pp. 1989-1992.
- HOLTORF, H., REINBOTHE, S., REINBOTHE, C., BEREZA, B. and APEL, K., 1995. Two routes of chlorophyllide synthesis that are differentially regulated by light in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**(8), pp. 3254-3258.
- HÖRTENSTEINER, S., 1998. NCC malonyltransferase catalyses the final step of chlorophyll breakdown in rape (*Brassica napus*). *Phytochemistry*, **49**(4), pp. 953-956.
- HÖRTENSTEINER, S., 2006. Chlorophyll degradation during senescence. *Annual Review of Plant Biology*, **57**, pp. 55-77.
- HÖRTENSTEINER, S., WÜTHRICH, K.L., MATILE, P., ONGANIA, K.-. and KRÄUTLER, B., 1998. The key step in chlorophyll breakdown in higher plants. Cleavage of pheophorbide a macrocycle by a monooxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, **273**(25), pp. 15335-15339.
- INABA, T., LI, M., ALVAREZ-HUERTA, M., KESSLER, F., SCHNELL, D.J., 2003. atTic110 functions as a scaffold for coordinating the stromal events of protein import into chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry* **278**, pp. 38617–38627.
- INADA, N., SAKAI, A., KUROIWA, H. and KUROIWA, T., 1998. Three-dimensional analysis of the senescence program in rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles. *Planta*, **205**(2), pp. 153-164.
- INADA, N., SAKAI, A., KUROIWA, H. and KUROIWA, T., 1998. Three-dimensional analysis of the senescence program in rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles: Investigations by fluorescence microscopy and electron microscopy. *Planta*, **206**(4), pp. 585-597.
- INNIS, M.A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J., WHITE, T.J., 1990. *PCR Protocols* (Academic, San Diego).

- IRVING, L. and ROBINSON, D., 2006. On modelling Rubisco turnover: Dynamics and applicability [1]. *New Phytologist*, **170**(2), pp. 204-205.
- IRVING, L.J. and ROBINSON, D., 2006. A dynamic model of Rubisco turnover in cereal leaves. *New Phytologist*, **169**(3), pp. 493-504.
- ISHIDA, H., MAKINO, A. and TADAHIKO, M., 1999. Fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by reactive oxygen species occurs near Gly-329. *Journal of Biological Chemistry*, **274**(8), pp. 5222-5226.
- ITO H., TANAKA A.. (1996). Determination of the activity of chlorophyll b to chlorophyll a conversion during greening of etiolated cucumber cotyledons by using pyrochlorophyllide b. *Plant Physiol. Biochem.*, Vol. **34**, pp. 35-40.
- ITO, H., OHTSUKA, T. and TANAKA, A., 1996. Conversion of chlorophyll b to chlorophyll a via 7-hydroxymethyl chlorophyll. *Journal of Biological Chemistry*, **271**(3), pp. 1475-1479.
- ITO, H., TANAKA, Y., TSUJI, H. and TANAKA, A., 1993. Conversion of chlorophyll b to chlorophyll a by isolated cucumber etioplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **306**(1), pp. 148-151.
- IVANOVA, Y., SMITH, M.D., CHEN, K., SCHNELL, D.J., 2004. Members of the Toc159 import receptor family represent distinct pathways for protein targeting to plastids. *Molecular Biology of the Cell* **15**, pp. 3379–3392.
- JANSEN, M.A.K., GREENBERG, B.M., EDELMAN, M., MATTOO, A.K. and GABA, V., 1996. Accelerated degradation of the D2 protein of photosystem II under ultraviolet radiation. *Photochemistry and Photobiology*, **63**(6), pp. 814-817.
- JARVIS, P. and SOLL, J., 2001. Toc, Tic, and chloroplast protein import. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, **1541**(1-2), pp. 64-79.
- JARVIS, P., ROBINSON, C., 2004. Mechanisms of protein import and routing in chloroplasts. *Current Biology* **14**, pp. R1064–R1077.
- JOY, K.W., ELLIS, R.J., 1975. Protein synthesis in chloroplasts. IV. Polypeptides of the chloroplast envelope. *Biochimica et Biophysica Acta*, **378**, pp. 145-151.

- JOYARD, J., BILLECOCQ, S.G., BARTLET, M.A., BLOCK, N.-H., CHUA, R., DOUCE, C., 1983. Localization of polypeptides to the cytosolic side of the outer envelope membrane of spinach chloroplasts. *J Biol Chem* **258**, pp 10000-10006.
- JOYARD, J., TEYSSIER, E., MIEGE, C., BERNY-SEIGNEURIN, D., MARECHAL, E., BLOCK, M.A., DORNE, A.J., ROLLAND, N., AJLANI, G., DOUCE, R., 1998. The biochemical machinery of plastid envelope membranes. *Plant Physiol*, **118**, pp. 715-723.
- KANWISCHER, M., PORFIROVA, S., BERGMÜLLER, E. and DÖRMANN, P., 2005. Alterations in tocopherol cyclase activity in transgenic and mutant plants of *Arabidopsis* affect tocopherol content, tocopherol composition, and oxidative stress. *Plant Physiology*, **137**(2), pp. 713-723.
- KARPINSKI, S., REYNOLDS, H., KARPINSKA, B., WINGSLE, G., CREISSEN, G., MULLINEAUX, P., 1999. Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science*, **284**, pp. 654–57
- 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**, pp. 97–104.
- KATO, Y., YAMAMOTO, Y., MURAKAMI, S. and SATO, F., 2005. Post-translational regulation of CND41 protease activity in senescent tobacco leaves. *Planta*, **222**(4), pp. 643-651.
- KAWAKAMI, N. and WTANABE, A., 1988. Change in gene expression in radish cotyledons during dark-induced senescence. *Plant Cell Physiology*, **29**, pp 347-353.
- KAWAKAMI, N. and WTANABE, A., 1993. Translatable mRNAs for chloroplast-targeted proteins in detached radish cotyledons during senescence in darkness. *Plant Cell Physiology*, **34**(5), pp 697-704.
- KEEGSTRA, K. and CLINE, K., 1999. Protein import and routing systems of chloroplasts. *The Plant Cell*, **11**, pp. 557-570.

- KEEGSTRA, K., OLSEN, L. J. and THEG, S. M., 1989. Chloroplastic precursors and their transport across the envelope membranes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **40**, pp. 471-501.
- KENNETH CLINE, MARGARET WERNER-WASHBURNE, JAEN ANDREWS², AND KENNETH KEEGSTRA, 1984. Thermolysin Is a Suitable Protease for Probing the Surface of Intact Pea Chloroplasts. *Plant Physiology*, **75**, pp.675-678.
- KERBER, B. and SOLL, J., 1992. Transfer of a chloroplast-bound precursor protein into the translocation apparatus is impaired after phospholipase C treatment. *FEBS Letters*, **306**(1), pp. 71-74.
- KESKITALO, J., BERGQUIST, G., GARDESTROÖ M, P. and JANSSON, S., 2005. A cellular timetable of autumn senescence. *Plant Physiology*, **139**(4), pp. 1635-1648.
- KESSLER, F., BLOBEL, G., PATEL, H.A. and SCHNELL, D.J., 1994. Identification of two GTP-binding proteins in the chloroplast protein import machinery. *Science*, **266**(5187), pp. 1035-1039.
- KESSLER, F., SCHNELL, D. and BLOBEL, G., 1999. Identification of proteins associated with plastoglobules isolated from pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts. *Planta*, **208**(1), pp. 107-113.
- KHAN, S., ANDRALOJC, P.J., LEA, P.J. and PARRY, M.A.J., 1999. 2'-carboxy-D-arabitol 1-phosphate protects ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase against proteolytic breakdown. *European Journal of Biochemistry*, **266**(3), pp. 840-847.
- KIM, C. and APEL, K., 2004. Substrate-Dependent and Organ-Specific Chloroplast Protein Import in *Planta*. *Plant Cell*, **16**(1), pp. 88-98.
- KIM, C., HAM, H. and APEL, K., 2005. Multiplicity of different cell- and organ-specific import routes for the NADPH-protochlorophyllide oxidoreductases A and B in plastids of *Arabidopsis* seedlings. *Plant Journal*, **42**(3), pp. 329-340.
- KITAJIMA, K. and HOGAN, K.P., 2003. Increases of chlorophyll a/b ratios during acclimation of tropical woody seedlings to nitrogen limitation and high light. *Plant, Cell and Environment*, **26**(6), pp. 857-865.

- KIVIMÄÄ ENPÄÄ ÄÄ , M., SUTINEN, S., MEDIN, E.-., KARLSSON, P.E. and SELLDÉN, G., 2001. Diurnal changes in microscopic structures of mesophyll cells of Norway spruce, *Picea abies* (L.) Karst., and the effects of ozone and drought. *Annals of Botany*, **88**(1), pp. 119-130.
- KODA, Y., 1992. The role of jasmonic acid and related compounds in the regulation of plant development. *International Review of Cytology*, **135**, pp. 155-199.
- KOŁODZIEJEK, I., KOZIOŁ, J., WAŁĘŻA, M. and MOSTOWSKA, A., 2003. Ultrastructure of Mesophyll Cells and Pigment Content in Senescing Leaves of Maize and Barley. *Journal of Plant Growth Regulation*, **22**(3), pp. 217-227.
- KOURANOV, A., CHEN, X., FUKS, B. and SCHNELL, D.J., 1998. Tic20 and Tic22 are new components of the protein import apparatus at the chloroplast inner envelope membrane. *Journal of Cell Biology*, **143**(4), pp. 991-1002.
- KOURANOV, A., SCHNELL, D.J., 1997. Analysis of the interactions of preproteins with the import machinery over the course of protein import into chloroplasts. *Journal of Cell Biology* **139**, pp. 1677–1685.
- KROPAT, J., OSTER, U., RUDIGER, W. and BECK, C.F., 2000. Chloroplast signalling in the light induction of nuclear HSP70 genes requires the accumulation of chlorophyll precursors and their accessibility to cytoplasm/nucleus. *Plant Journal*, **24**(4), pp. 523-531.
- KUBIS, S., PATEL, R., COMBE, J., 2004. Functional specialization amongst the *Arabidopsis* Toc159 family of chloroplast protein import receptors. *The Plant Cell* **16**, pp. 2059–2077.
- KÜCHLER, M., DECKER, S., HÖRMANN, F., SOLL, J. and HEINS, L., 2002. Protein import into chloroplasts involves redox-regulated proteins. *EMBO Journal*, **21**(22), pp. 6136-6145.
- KUNG, S.-D., 1977. Expression of chloroplast genomes in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, **28**, pp. 401-437.

- KURA-HOTTA, M., HASHIMOTO, H., SATOH, K., KATOH, S., 1990. Quantitative determination of changes in the number and size of chloroplasts in naturally senescing leaves of rice seedlings. *Plant Cell Physiology*, **31**(1), pp.33-38.
- KURA-HOTTA, M., SATOH, K. and KATO, S., 1987. Relationship between photosynthesis and chlorophyll content during leaf senescence of rice seedlings. *Plant Cell Physiology*, **28**(7), pp. 1321-1329.
- KUTÍK, J., HOLÁ, D., KOČOVÁ, M., ROTHOVÁ, O., HAISEL, D., WILHELMOVÁ, N. and TICHÁ, I., 2004. Ultrastructure and dimensions of chloroplasts in leaves of three maize (*Zea mays* L.) inbred lines and their F1 hybrids grown under moderate chilling stress. *Photosynthetica*, **42**(3), pp. 447-455.
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, Vol. **227**, pp. 680-685.
- LICHTENTHALER, H.K., 1968. Plastoglobules and fine structure of plastides. *Endeavour*, **27**, pp. 144-149.
- LICHTENTHALER, H.K., 1969. Plastoglobuli und Lipochinongehalt der Chloroplasten von *Cereus peruvianus* (L.) Mill. *Planta*, Vol. **87**, pp. 304-310.
- LICHTENTHALER, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, Vol. **48**, pp. 350-382.
- LICHTENTHALER, H.K., PEVELING E., 1968. Plastoglobuli und osmiophile cytoplasmatische Lipideinschlüsse in grünen Blättern von *Hoya carnos*a R. Br. *Zeitschr. f. Pflanzenphysiologie.*, Vol. **2**, pp. 153-165.
- LICHTENTHALER, H.K., PEVELING, E., 1967. Plastoglobuli in verschiedenen Differenzierungsstadien der Plastiden bei *Allium cepa* L. (Plastoglobuli in various differentiation stages of plastides in *Allium cepa* L.). *Planta*, **72**, pp. 1-13.
- LICHTENTHALER, H.K., SPEY., B., 1966. Über die osmiophilen globulären Lipideinschlüsse der Chloroplasten. *Z Naturforsch* **21b**, pp. 690–697.
- LIN, J.-. and WU, S.-., 2004. Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant Journal*, **39**(4), pp. 612-628.

- LITHGOW, T., 2000. Targeting of proteins to mitochondria. *FEBS Letters*, **476**(1-2), pp. 22-26.
- LÜBECK, J., HEINS, L. and SOLL, J., 1997. Protein import into chloroplasts. *Physiologia Plantarum*, **100**(1), pp. 53-64.
- LÜBECK, J., SOLL, J., AKITA, M., NIELSEN, E. and KEEGSTRA, K., 1996. Topology of IEP110, a component of the chloroplastic protein import machinery present in the inner envelope membrane. *EMBO Journal*, **15**(16), pp. 4230-4238.
- MA, Y., KOURANOV, A., LASALA, S.E. and SCHNELL, D.J., 1996. Two components of the chloroplast protein import apparatus, IAP86 and IAP75, interact with the transit sequence during the recognition and translocation of precursor proteins at the outer envelope. *Journal of Cell Biology*, **134**(2), pp. 315-327.
- MASLENKOVA, L., KURBANOVA, I.M., KYURDOV, B.A., DADASHEVA, S.B., GADZHIEVA, R.M., ZANEV YU. and GASANOV, R.A., 1990. The role of extrinsic polypeptides of oxygen-evolving photosystem II particles functioning in higher plants. *Biokhimiya*, **55**(12), pp. 2122-2128.
- MASLENKOVA, L.T., ZANEV, Y. and POPOVA, L.P., 1990. Oxygen-evolving activity of thylakoids from barley plants cultivated on different concentrations of jasmonic acid. *Plant Physiology*, **93**(4), pp. 1316-1320.
- MATILE, P., 2000. Biochemistry of Indian summer: Physiology of autumnal leaf coloration. *Experimental Gerontology*, **35**(2), pp. 145-158.
- MATILE, P., HÖRTENSTEINER, S. and THOMAS, H., 1999. Chlorophyll degradation. *Annual Review of Plant Biology*, **50**, pp. 67-95.
- MATILE, P., HÖRTENSTEINER, S., THOMAS, H. and KRÄUTLER, B., 1996. Chlorophyll breakdown in senescent leaves. *Plant Physiology*, **112**(4), pp. 1403-1409.
- MAY, T. and SOLL, J., 1999. Chloroplast precursor protein translocon. *FEBS Letters*, **452**(1-2), pp. 52-56.

- MCKERSIE, B.D. and THOMPSON, J.E., 1978. Phase behaviour of chloroplast and microsomal membranes during leaf senescence. *Plant Physiology*, **61**, pp. 639-643.
- MCRAE, D.G., THOMPSON, J.E., 1983. Senescence-dependent changes in superoxide anion production by illuminated chloroplasts from bean leaves. *Planta* **158** pp. 185–193.
- MEHTA, R.A., FAWCETT, T.W., PORATH, D., MATTOO, A.K., 1992. Oxidative stress causes rapid membrane translocation and *in vivo* degradation of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase. *Journal of Biological Chemistry* **267**, pp. 2810–2816.
- MEYER, A., MIERSCH, O., BÜTTNER, C., DATHE, W., SEMBDNER, G., 1984. Occurrence of the plant growth regulator jasmonic acid in plants. *J. of Plant Growth Regul.*, **3**, pp. 1-8.
- MIERSCH, J., GRANCHAROV, K. and KRAUSS, G.-., 1987. Biological activity and mode of action of some dihydroorotic and dihydroazaorotic acid derivatives. *Biomedica Biochimica Acta*, **46**(5), pp. 307-315.
- MIR, A.N., PEREZ, R., SCHWALLIER, P., BEAUDRY, R., 1999. Relationship between ethylene response manipulation and volatile production in jonagold variety apples. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, pp. 2653-2659.
- MORENO, J. and SPREITZER, R.J., 1999. C172S substitution in the chloroplast-encoded large subunit affects stability and stress-induced turnover of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, **274**(38), pp. 26789-26793.
- MORTINOIA E., HECK V., DALLING M.J., MATILE P. (1983). Changes in chloroplast number and chloroplast constituent in senescing barley leaves. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, Vol. **178**, pp. 147-155.
- MUELLER, M.J., 1997. Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. *Physiology Plantarum* **100**, pp. 653–663.
- NIELSEN, E., AKITA, M., DAVILA-APONTE, J., KEEGSTRA, K., 1997. Stable association of chloroplastic precursors with protein translocation complexes

- that contain proteins from both envelope membranes and a stromal Hsp100 molecular chaperone. *EMBO Journal*, **16**, pp. 935–946.
- NOODÉN, L.D. and LEOPOLD, A.C., 1980. Phytohormones and the regulation of senescence and abscission. In: *Phytohormones and Related Compounds: A Comprehensive Treatise*, ed. D.S. Letham, P.B. Goodwin, T.J.V. Higgins, Vol. 2. Amsterdam: Elsevier. 1980.
- NOODÉN, L.D. and LINDOO, S.J., 1978. Monocarpic senescence. What's new? *Plant Physiology*, **9**, pp. 25-28.
- NOODÉN, L.D., 1988. The phenomena of senescence and aging. In: Nooden, L.D., Leopold A. C.: *Senescence and aging in plants*. pp. 5-12, *Academic Press*, San Diego.
- NOODÉN, L.D., GUIAMÉT, J.J. and JOHN, I., 1997. Senescence mechanisms. *Physiologia Plantarum*, **101**(4), pp. 746-753.
- NOTT, A., JUNG, H.-., KOUSSEVITZKY, S. and CHORY, J., 2006. Plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Annual Review of Plant Biology*, **57**, pp. 739-759.
- OLSEN, L.J. and KEEGSTRA, K., 1992. The binding of precursor proteins to chloroplasts requires nucleoside triphosphates in the intermembrane space. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, pp. 433-439.
- ORZÁREZ, D., GRANELL, A., 1997. DNA fragmentation is regulated by ethylene during carpel senescence in *Pisum sativum*. *Plant Journal*, **11**, pp. 137±144
- OSBORNE, D.J., 1967. Hormonal regulation of leaf senescence. *Symposium of the Society of Experimental Biology*, **21**, pp. 305-322.
- OSWALD, O., MARTIN, T., DOMINY, P.J. and GRAHAM, I.A., 2001. Plastid redox state and sugars: Interactive regulators of nuclear-encoded photosynthetic gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**(4), pp. 2047-2052.
- OTEGUI, M.S., NOH, Y.-., MARTÍNEZ, D.E., VILA PETROFF, M.G., STAEHELIN, L.A., AMASINO, R.M. and GUIAMET, J.J., 2005. Senescence-associated

- vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of *Arabidopsis* and soybean. *Plant Journal*, **41**(6), pp. 831-844.
- PARTHIER, B. 1990. Jasmonates: hormonal regulators or stress factors in leaf senescence? *J. Plant Growth Regul.* **9**, pp. 57 – 63.
- PARTHIER, B., 1988. Gerontoplasts – the yellow end of ontogenesis of chloroplasts. *Endocytobiosis Cell Research*, **5**, pp. 163-190.
- PARTHIER, B., BRÜCKNER, C., DATHE, W., HAUSE, B., HERRMANN, G., KNÖFEL, H.-D., KRAMELL, H.-M., KRAMELL, R., LEHMANN, J., MIERSCH, O., REINBOTHE, S., SEMBDNER, G., WASTERACK, C., zur NIEDEN, U., 1992. Jasmonates: Metabolism, biological activities, and modes of action in senescence and stress responses. In: *Progress in Plant Growth Regulation*, C.M. Karssen, L.C. van Loon and D.D. Vreugdenhil, eds. (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), pp. 276-285.
- PERRY, S.E. and KEEGSTRA, K., 1994. Envelope membrane proteins that interact with chloroplastic precursor proteins. *Plant Cell*, **6**(1), pp. 93-105.
- PERRY, S.E., BUVINGER, W.E., BENNETT, J. and KEEGSTRA, K., 1991. Synthetic analogues of a transit peptide inhibit binding or translocation of chloroplastic precursor proteins. *Journal of Biological Chemistry*, **266**(18), pp. 11882-11889.
- PFANNSCHMIDT, T., 2003. Chloroplast redox signals: How photosynthesis controls its own genes. *Trends in Plant Science*, **8**(1), pp. 33-41.
- PFANNSCHMIDT, T., NILSSON, A. and ALLEN, J.F., 1999. Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature*, **397**(6720), pp. 625-628.
- PINTO DA SILVA, P., KAN, F.W., 1984. Label-fracture: A method for high resolution labelling of cell surfaces. *Journal of Cell Biology*, **99**, pp. 1156-1161.
- PLATTNER, H., ZINGSHEIM, H.P., 1987. Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell- und Molekularbiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, pp. 125-148.

- POPOVA, L.P., TSONEV, T.D., VAKLINOVA, S.G., 1988. Changes in some photosynthetic and photorespiratory properties in barley leaves after treatment with jasmonic acid. *Journal of Plant Physiology*, **132**, pp. 257-261.
- PORRA R.J., THOMPSON W.A., 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. et Biophys. Acta*, Vol. **975**, pp. 384-394.
- PRUŽ INSKÁ, A., TANNER, G., AUBRY, S., ANDERS, I., MOSER, S., MÜ LLER, T., ONGANIA, K.-., KRÄ UTLER, B., YOUN, J.-., LILJEGREN, S.J. and HÖ RTENSTEINER, S., 2005. Chlorophyll breakdown in senescent *Arabidopsis* leaves. Characterization of chlorophyll catabolites and of chlorophyll catabolic enzymes involved in the degreening reaction. *Plant Physiology*, **139**(1), pp. 52-63.
- REID, M.S., 1995. Ethylene in plant growth, development and senescence. In: Davis, P.J. (ed) *Plant hormones*, **2ed** edn. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 486-508.
- REINBOTHE, C., APEL, K. and REINBOTHE, S., 1995. A light-induced protease from barley plastids degrades NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase complexed with chlorophyllide. *Molecular and Cellular Biology*, **15**(11), pp. 6206-6212.
- REINBOTHE, C., PARTHIER, B. and REINBOTHE, S., 1997. Temporal pattern of jasmonate-induced alterations in gene expression of barley leaves. *Planta*, **201**(3), pp. 281-287.
- REINBOTHE, C., POLLMANN, S., DESVIGNES, C., WEIGELE, M., BECK, E. and REINBOTHE, S., 2004. LHPP, the light-harvesting NADPH:protochlorophyllide (Pchlde) oxidoreductase:Pchlde complex of etiolated plants, is developmentally expressed across the barley leaf gradient. *Plant Science*, **167**(5), pp. 1027-1041.

- REINBOTHE, C., SATOH, H., ALCARAZ, J.-. and REINBOTHE, S., 2004. A novel role of water-soluble chlorophyll proteins in the transitory storage of chlorophyllide. *Plant Physiology*, **134**(4), pp. 1355-1365.
- REINBOTHE, C., TEWES, A., LUCKNER, M. and REINBOTHE, S., 1992. Differential gene expression during somatic embryogenesis in *Digitalis lanata* analyzed by in vivo and in vitro protein synthesis. *Plant Journal*, **2**(6), pp. 917-926.
- REINBOTHE, S., POLLMANN, S., SPRINGER, A., JAMES, R.J., TICHITSKY, G. and REINBOTHE, C., 2005. A role of Toc33 in the protochlorophyllide-dependent plastid import pathway of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase (POR) A. *Plant Journal*, **42**(1), pp. 1-12.
- REINBOTHE, S., QUIGLEY, F., GRAY, J., SCHEMENEWITZ, A. and REINBOTHE, C., 2004a. Identification of plastid envelope proteins required for import of protochlorophyllide oxidoreductase A into the chloroplast of barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**(7), pp. 2197-2202.
- REINBOTHE, S., QUIGLEY, F., SPRINGER, A., SCHEMENEWITZ, A. and REINBOTHE, C., 2004. The outer plastid envelope protein Oep16: Role as precursor translocase in import of protochlorophyllide oxidoreductase A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**(7), pp. 2203-2208.
- REYMOND, P. and FARMER, E.E., 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology*, **1**(5), pp. 404-411.
- REYMOND, P., WEBER, H., DAMOND, M. and FARMER, E.E., 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **12**(5), pp. 707-719.
- REYNOLDS D.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, Vol. **17**, pp. 208-212.

- RICHLY, E, und LEISTER, D., 2004. A improved prediction of chloroplast proteins reveals diversities and commonalities in the chloroplast proteomes of *Arabidopsis* and rice. *Gene*, **329**, pp. 11-16.
- RICHLY, E., DIETZMANN, A., BIEHL, A., KURTH, J., LALOI, C., *ET AL.*, 2003. Covariations in the nuclear chloroplast transcriptome reveal a regulatory master-switch. *EMBO Rep.*, **4**, pp. 491–98
- 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 Mol. Biol.*, Vol. **9**, pp. 343-353.
- RODONI, S., SCHELLENBERG, M. and MATILE, P., 1998. Chlorophyll breakdown in senescing barley leaves as correlated with phaeophorbide a oxygenase activity. *Journal of Plant Physiology*, **152**(2-3), pp. 139-144.
- ROYO, J., VANCANNEYT, G., PÉREZ, A.G., SANZ, C., STÖRMANN, K., ROSAHL, S. and SÁNCHEZ-SERRANO, J.J., 1996. Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. *Journal of Biological Chemistry*, **271**(35), pp. 21012-21019.
- RYAN, C.A., 2000. The system in signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim Biophys Acta* **1477**: 112–121.
- SANDERS, P.M., LEE, P.-Y., BIESGEN, C., BOONE, J.D., BEALS, T.P., WEILERB, E.W., GOLDBERG, R.B., 2000. The *Arabidopsis* DELAYED DEHISCENCE1 gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *Plant Cell*, **12**, pp. 1041–1062.
- SANGER, F., NICKLEN, S. and COULSON, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**(12), pp. 5463-5467.
- SANTOS, I., FIDALGO, F., ALMEIDA, J.M. and SALEMA, R., 2004. Biochemical and ultrastructural changes in leaves of potato plants grown under supplementary UV-B radiation. *Plant Science*, **167**(4), pp. 925-935.

- SCHALLER, F., 2001. Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. *Journal of Experimental Botany*, **52**(354), pp. 11-23.
- SCHALLER, F., SCHALLER, A. and STINTZI, A., 2004. Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *Journal of Plant Growth Regulation*, **23**(3), pp. 179-199.
- SCHEUMANN, V., SCHOCH, S. and RÜDIGER, W., 1999. Chlorophyll b reduction during senescence of barley seedlings. *Planta*, **209**(3), pp. 364-370.
- SCHNELL, D.J. and BLOBEL, G., 1993. Identification of intermediates in the pathway of protein import into chloroplasts and their localization to envelope contact sites. *Journal of Cell Biology*, **120**(1), pp. 103-116.
- SCHNELL, D.J., BLOBEL, G., KEEGSTRA, K., KESSLER, F., KO, K. and SOLL, J., 1997. A consensus nomenclature for the protein-import components of the chloroplast envelope. *Trends in Cell Biology*, **7**(8), pp. 303-304.
- SCHNELL, D.J., KESSLER, F. and BLOBEL, G., 1994. Isolation of components of the chloroplast protein import machinery. *Science*, **266**(5187), pp. 1007-1012.
- SCOTT, S.V., THEG, S.M., 1996. A new chloroplast protein import intermediate reveals distinct translocation machineries in the two envelope membranes: energetics and mechanistic implications. *Journal of Cell Biology* **132**, pp. 63–75.
- SEEDORF, M., WAEGEMANN, K. and SOLL, J., 1995. A constituent of the chloroplast import complex represents a new type of GTP-binding protein. *Plant Journal*, **7**(3), pp. 401-411.
- SEMBDNER, G. and PARTHIER, B., 1993. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **44**(1), pp. 569-589.
- SHEVCHENKO A., WILM M., VORM O., MANN M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*, Vol. **68**, pp. 850-858.

- SMART C.M. (1994). Transley review no. 64 - Gene expression during leaf senescence. *New Phytol.*, Vol. **126**, pp. 419-448.
- SMITH M.D., LICATALOSI D.D., THOMPSON J.E. (2000). Co-association of cytochrome *f* catabolites and plastid-lipid-associated protein with chloroplast lipid particles. *Plant Physiol.*, Vol. **124**, pp. 211-221.
- SMITH P.K., KROHN R.I., HERMANSON G.T., MALLIA A.K., GARTNER F.H., PROVENZANO M.D., FUJIMOTO E.K., GOEKE N.M., OLSON B.J., KLENK D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, Vol. **150**, pp. 76-85.
- SMITH, M.D. and SCHNELL, D.J., 2004. Chloroplast protein targeting: multiple pathways for a complex organelle. In: *Protein movement across membranes*. Edited by J. Eichler. Eureka, Georgetown, Tex. Pp. 1-16.
- SMITH, M.D., 2006. Protein import into chloroplasts: An ever-evolving story. *Canadian Journal of Botany*, **84**(4), pp. 531-542.
- SMITH, M.D., ROUNDS, C.M., WANG, F., CHEN, K., AFITLHILE, M. and SCHNELL, D.J., 2004. atToc159 is a selective transit peptide receptor for the import of nucleus-encoded chloroplast proteins. *Journal of Cell Biology*, **165**(3), pp. 323-334.
- SOHRT, K. and SOLL, J., 2000. Toc64, a new component of the protein translocon of chloroplasts. *Journal of Cell Biology*, **148**(6), pp. 1213-1221.
- SOMERVILLE, C., BROWSE, J., JAWORSKI, J.G. and OHLROGGE, J. 2000. Lipids. In: *Biochemistry und Molecular Biology of Plants*, R.L. Jones, ed. (Rockville, MD, USA: American Society of Plant Physiologists), pp. 456 – 527.
- SPICKERS, N., 1999. Alterungsabhängige Veränderungen lipoider und phenolischer Inhaltsstoffe in der photoautotrophen Suspensions-zellkultur von *Chenopodium rubrum*. PhD thesis Bayreuth.
- SPREY B., LICHTENTHALER H.K. (1966). Zur Frage der Beziehungen zwischen Plastoglobuli und Thylakoidgenese in Gerstenkeimlingen. *Zeitschr. f. Naturforschung*, Heft **7**/Band **21b**, pp. 697-699.

- Š PUNDOVÁ, M., POPELKOVÁ, H., ILÍK, P., SKOTNICA, J., NOVOTNÝ, R. and NAUŠ, J., 2003. Ultra-structural and functional changes in the chloroplasts of detached barley leaves senescing under dark and light conditions. *Journal of Plant Physiology*, **160**(9), pp. 1051-1058.
- SPURR A.R. (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.*, Vol. **26**, pp. 31-43.
- STAHL, T., GLOCKMANN, C., SOLL, J., HEINS, L., 1999. Tic40, a new 'old' subunit of the chloroplast protein import translocon. *Journal of Biological Chemistry* **274**, pp. 37467–37472.
- STEINMÜLLER D., TEVINI M. (1985). Composition and function of plastoglobuli - I. Isolation and purification from chloroplasts and chromoplasts. *Planta*, Vol. **163**, pp. 201-207.
- STODDART, J.L., THOMAS, H., 1982. In: Boutler D, Parthier B (eds) Encyclopedia of plant physiology, NS, vol 14A: Leaf senescence. Springer, Berlin Heidelberg New York. Pp. 592-636
- STRAND, A., ASAMI, T., ALONSO, J., ECKER, J.R. and CHORY, J., 2003. Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrinix. *Nature*, **421**(6918), pp. 79-83.
- STRID, A., CHOW, W.S. and ANDERSON, J.M., 1990. Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on photosynthesis in *Pisum sativum*. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, **1020**(3), pp. 260-268.
- SUZUKI, T., KUNIEDA, T., MURAI, F., MORIOKA, S. and SHIOI, Y., 2005. Mg-dechelation activity in radish cotyledons with artificial and native substrates, Mg-chlorophyllin a and chlorophyllide a. *Plant Physiology and Biochemistry*, **43**(5), pp. 459-464.
- SVESHNIKOVA, N., GRIMM, R., SOLL, J. and SCHLEIFF, E., 2000. Topology studies of the chloroplast protein import channel Toc75. *Biological Chemistry*, **381**(8), pp. 687-693.

- SVESHNIKOVA, N., SOLL, J. and SCHLEIFF, E., 2000. Toc34 is a preprotein receptor regulated by GTP and phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**(9), pp. 4973-4978.
- TERAMURA, A.H., 1983. Experimental ecological genetics in *Plantago*. IX. Differences in growth and vegetative reproduction in *Plantago lanceolata* L. (Plantaginaceae) from adjacent habitats. *American Journal of Botany*, **70**(1), pp. 53-58.
- TEVINI, M., STEINMULLER, D., 1985. Composition and function of plastoglobuli. II. Lipid composition of leaves and plastoglobuli during beech senescence. *Planta*, **163**, pp. 91-96
- THEG, S.M., BAUERLE, C., OLSEN, L.J., SELMAN, B.R., KEEGSTRA, K., 1989. Internal ATP is the only requirement for the translocation of precursor proteins across chloroplastic membranes. *J. Biol. Chem.*, **264**, 6730-6737.
- THIEMANN, K.V., 1980. The senescence of leaves. In: *Senescence in Plants*, K.V. Thiemann, ed. (CRC press Boca Raton, Fla), pp. 85-115.
- THOMAS, H. and STODDART, J.L., 1977. Biochemistry of leaf senescence in grasses. *Ann. Appl. Biol.*, **85**, pp. 461-63.
- THOMAS, H. and STODDART, J.L., 1980. Leaf senescence. *Annual Review of Plant Physiology*, **31**, pp. 83-111.
- THOMAS, H., HILDITCH, P., 1987. Metabolism of thylakoid membrane proteins during foliar senescence. In Thompson W.W., Nothnagel E.A., Huffaker R.C. eds. *Plant Senescence: Its biochemistry and physiology*. *The American Society of Plant Physiologists*, Rockville, MD, pp. 114-122.
- THOMAS, H., OUGHAM, H.J., WAGSTAFF, C. and STEAD, A.D., 2003. Defining senescence and death. *Journal of Experimental Botany*, **54**(385), pp. 1127-1132.
- THOMPSON, J.E., FROESE, C.D., MADEY, E., SMITH, M.D., HONG, Y., 1998. Lipid metabolism during plant senescence. *Prog. Lipid Res.*, Vol. **37**, pp. 119-141.

- TOWIN A.K. (1996). Subcellular fractionation of plant tissues - isolation of chloroplasts and mitochondria from leaves. *Methods Mol. Biol.*, Vol. **59**, pp. 57-68.
- UEDA, J. and KATO, J., 1980. Isolation and identification of a senescence-promoting substance from wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Plant Physiology*, **66**, pp. 246-249.
- UEDA, J. and KATO, J., 1981. Promotive effect of methyl-jasmonate on leaf senescence in the light. *Z. Pflanzenphysiologie*, **103**, pp. 357-359.
- UEDA, J., MYAMOTO, K., AOKI, M., HIRATA, T., SATO, T., MOMOTANI, Y., 1991. Identification of jasmonic acid in *Chlorella* and *Spirulina*. *Bull. Univ. Osaka Perfect. Ser. B*, **23**, pp. 103-108.
- VALDES, OSCAR, 2005. Die Bedeutung von endogenem und künstlichem Auxin für die Kultivierung photoautotropher Zellen von *Chenopodium rubrum*. Dissertation, Universität Bayreuth.
- VALKAMA, E., KIVIMÄÄ ENPÄÄ ÄÄ , M., HARTIKAINEN, H. and WULFF, A., 2003. The combined effects of enhanced UV-B radiation and selenium on growth, chlorophyll fluorescence and ultrastructure in strawberry (*Fragaria x ananassa*) and barley (*Hordeum vulgare*) treated in the field. *Agricultural and Forest Meteorology*, **120**(1-4), pp. 267-278.
- VAN DOORN, W.G., 2005. Plant programmed cell death and the point of no return. *Trends in Plant Science*, **10**(10), pp. 478-483.
- VIDI, P.-., KANWISCHER, M., BAGINSKY, S., AUSTIN, J.R., CSUCS, G., DÖRMANN, P., KESSLER, F. and BRÉHÉLIN, C., 2006. Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles. *Journal of Biological Chemistry*, **281**(16), pp. 11225-11234.
- VIJAYAN, P., SHOCKEY, J., LÉVESQUE, C.A., COOK, R.J. and BROWSE, J., 1998. A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**(12), pp. 7209-7214.

- VOJTA, A., ALAVI, M., BECKER, T., HÖRMANN, F., KÜCHLER, M., SOLL, J., THOMSON, R. and SCHLEIFF, E., 2004. The protein translocon of the plastid envelopes. *Journal of Biological Chemistry*, **279**(20), pp. 21401-21405.
- VON MALEK, B., VAN DER GRAAFF, E., SCHNEITZ, K. and KELLER, B., 2002. The *Arabidopsis* male-sterile mutant *dde2-2* is defective in the ALLENE OXIDE SYNTHASE gene encoding one of the key enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway. *Planta*, **216**(1), pp. 187-192.
- VÖRÖS, K., FEUSSNER, I., KÜHN, H., LEE, J., GRANER, A., LÖBLER, M., PARTHIER, B. and WASTERNAK, C., 1998. Characterization of a methyljasmonate-inducible lipoxygenase from barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome) leaves. *European Journal of Biochemistry*, **251**(1-2), pp. 36-44.
- WAGNER, D., PRZYBYLA, D., OP DEN CAMP, R., KIM, C., LANDGRAF, F., KEUN, P.L., WÜRSCH, M., LALOI, C., NATER, M., HIDEG, E. and APEL, K., 2004. The genetic basis of singlet oxygen-induced stress response of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **306**(5699), pp. 1183-1185.
- WASTERNAK, C. and HAUSE, 2002. Jasmonates and Octadecanoides: signals in plant stress responses and development. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **72**, pp. 165-221.
- WASTERNAK, C. and PARTHIER, B., 1997. Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends in Plant Science*, **2**(8), pp. 302-307.
- WEIDHASE, R., KRAMEL, H., LEHMANN, J., LIEBISCH, W., LERBS, W., PARTHIER, B., 1987a. Methyljasmonate-induced changes in the polypeptide pattern of senescing barley leaf segments. *Plant Science*, **51**, pp. 177-186.
- WEIDHASE, R., LEHMANN, J., KRAMEL, H., SEMBDNER, G., PARTHIER, B., 1987. Degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and chlorophyll in senescing barley leaf segments triggered by jasmonic acid methyl ester, and counteraction by cytokinin. *Physiology Plantarum*, **69**, pp. 161-166.
- WEIDHASE, R., LEHMANN, J., KRAMEL, H., SEMBDNER, G., PARTHIER, B., 1987b. Methyljasmonate-induced changes in the polypeptide pattern of senescing barley leaf segments. *Plant Science*, **51**, pp. 155-186.

- WIEDMANN, M., KURZCHALIA, T.V., BIELKA, H. and RAPOPORT, T.A., 1987. Direct probing of the interaction between the signal sequence of nascent preprolactin and the signal recognition particle by specific cross-linking. *Journal of Cell Biology*, **104**(2), pp. 201-208.
- WIEDMANN, M., KURZCHALIA, T.V., HARTMANN, E. and RAPOPORT, T.A., 1987. A signal sequence receptor in the endoplasmic reticulum membrane. *Nature*, **328**(6133), pp. 830-833.
- WILSON, K.A., MCMANUS, M.T., GORDON, M.E. and JORDAN, T.W., 2002. The proteomics of senescence in leaves of white clover, *Trifolium repens* (L.). *Proteomics*, **2**(9), pp. 1114-1122.
- WILSON, M.I., GHOSH, S., GERHARDT, K.E., HOLLAND, N., BABU, T.S., EDELMAN, M., DUMBROFF, E.B., GREENBERG, B.M., 1995. In vivo photomodification of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase holoenzyme by ultraviolet-B radiation. *Plant Physiology*, **109**, pp. 221–229.
- WITTENBACH, V.A., 1977. Induced senescence of intact wheat seedlings and its reversibility. *Plant Physiology*, **59**, pp. 1039-1042.
- WOOLHOUSE, H.W., 1984. The biochemistry and regulation of senescence in chloroplasts. *Canadian Journal of Botany*, **62**, pp. 2934-2942.
- WOOLHOUSE, H.W. and BATT, T., 1976. The nature and regulation of senescence in plastids. In: *Perspectives in Experimental Biology*, Vol. 2-Botany, ed. N. Sunderland, pp. 163-175. Oxford: Pergamon.
- WU, C., SEIBERT, F.S., KO, K., 1994. Identification of chloroplast envelope proteins in close physical proximity to a partially translocated chimeric precursor protein. *Journal of Biological Chemistry* **269**, pp. 32264–32271.
- XENIA, K.M. and SOLL, J., 1997. Immunolabeling of cryosectioned pea chloroplasts and initial localisation of proteins associated with the protein import machinery. *Planta*, **201**, pp. 119-127.
- XIE, D., FEYS, B.F., JAMES, S., NIETO-ROSTRO, M. and TURNER, J.G., 1998. COI1: An *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science*, **280**(5366), pp. 1091-1094.

- YAMANE H, TAKAGI H, ABE H, YOKAO T, TAKAHASHI N. 1981. Identification of jasmonic acid in three species of higher plants and its biological activities. *Plant Cell Physiology*, **22**, pp. 689–697.
- YTTERBERG, A.J., PELTIER, J.-. and VAN WIJK, K.J., 2006. Protein profiling of plastoglobules in chloroplasts and chromoplasts. A surprising site for differential accumulation of metabolic enzymes. *Plant Physiology*, **140**(3), pp. 984-997.
- ZELISKO, A., GARCÍA-LORENZO, M., JACKOWSKI, G., JANSSON, S. and FUNK, C., 2005. AtFtsH6 is involved in the degradation of the light-harvesting complex II during high-light acclimation and senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**(38), pp. 13699-13704.
- ZIEGLER, J., HAMBERG, M., MIERSCH, O. and PARTHIER, B., 1997. Purification and characterization of allene oxide cyclase from dry corn seeds. *Plant Physiology*, **114**(2), pp. 565-573.

7. Anhang

Bei den numerischen Werten sind jeweils die Mittelwerte \pm Stichproben-
Standartabweichung dargestellt.

Abb. 3: Änderungen des Chlorophyllgehaltes, Chlorophyll *a/b* – Verhältnisse sowie des Frischgewichts der Blätter in Abhängigkeit von der Behandlung

Gesamtchlorophyllgehalt pro Blattflächeneinheit [mg m^{-2}]

Ausgangswert 7 Tage alte Gerstenprimärblätter: 329 ± 29

Behandlung	Tage nach Versuchsbeginn				
	I	II	III	V	VII
Kontrolle	343 \pm 29	339 \pm 24	367 \pm 21	349 \pm 30	344 \pm 26
Methyljasmonat	304 \pm 12	250 \pm 8	241 \pm 7	166 \pm 27	163 \pm 8
Ethylen	313 \pm 24	364 \pm 33	375 \pm 44	342 \pm 38	367 \pm 59
Verdunkelung	301 \pm 43	313 \pm 5	317 \pm 46	237 \pm 13	174 \pm 29
UV-Bestrahlung	324 \pm 14	381 \pm 27	375 \pm 44	196 \pm 30	238 \pm 20

Chlorophyll *a/b* Verhältnisse [relative Einheiten]

Ausgangswert 7 Tage alte Gerstenprimärblätter: $2,9 \pm 0,3$

Behandlung	Tage nach Versuchsbeginn				
	I	II	III	V	VII
Kontrolle	2,9 \pm 0,3	2,9 \pm 0,2	2,7 \pm 0,1	2,9 \pm 0,1	2,8 \pm 0,1
Methyljasmonat	2,8 \pm 0,0	2,3 \pm 0,1	2,1 \pm 0,1	2,6 \pm 0,1	2,8 \pm 0,1
Ethylen	3,0 \pm 0,2	2,9 \pm 0,1	3,3 \pm 0,1	3,0 \pm 0,3	3,2 \pm 0,6
Verdunkelung	3,0 \pm 0,1	3,0 \pm 0,1	2,8 \pm 0,2	2,8 \pm 0,1	2,8 \pm 0,1
UV-Bestrahlung	2,7 \pm 0,1	2,5 \pm 0,1	2,4 \pm 0,3	1,7 \pm 0,2	2,0 \pm 0,1

Gesamtchlorophyllgehalt pro Blattfrischgewicht [mg g^{-1}]

Ausgangswert 7 Tage alte Gerstenprimärblätter: $1,3 \pm 0,1$

Behandlung	Tage nach Versuchsbeginn				
	I	II	III	V	VII
Kontrolle	$1,3 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0$	$1,2 \pm 0,1$
Methyljasmonat	$1,3 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0$	$1,0 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$
Ethylen	$1,3 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,3$
Verdunkelung	$1,3 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0$	$1,0 \pm 0,1$
UV-Bestrahlung	$1,8 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,4$	$3,5 \pm 0,3$	$3,1 \pm 0,5$

Frischgewicht pro Blattfläche [g m^{-2}]

Ausgangswert 7 Tage alte Gerstenprimärblätter: 277 ± 12

†

Behandlung	Tage nach Versuchsbeginn				
	I	II	III	V	VII
Kontrolle	277 ± 12	251 ± 6	264 ± 3	291 ± 19	279 ± 14
Methyljasmonat	258 ± 24	270 ± 21	290 ± 5	270 ± 14	250 ± 10
Ethylen	246 ± 4	308 ± 27	293 ± 27	261 ± 16	288 ± 15
Verdunkelung	240 ± 18	293 ± 22	299 ± 7	278 ± 19	258 ± 20
UV-Bestrahlung	192 ± 25	172 ± 21	117 ± 37	55 ± 8	80 ± 6

Abb. 5: Zeitliche Veränderungen des Gesamtchlorophyllgehaltes bei natürlicher und künstlich induzierter Seneszenz

Gesamtchlorophyllgehalt pro Blattflächeneinheit [mg m^{-2}] bei natürlich ablaufender Blattentwicklung.

Blattalter in Tagen nach der Aussaat							
7	14	21	28	35	42	50	56
174 ± 24	334 ± 18	315 ± 16	343 ± 17	332 ± 20	289 ± 12	140 ± 9	20 ± 19

Gesamtchlorophyllgehalt pro Blattflächeneinheit [mg m^{-2}] von abgeschnittenen, 7 Tage alten Gerstenprimärblättern nach unterschiedlichen Inkubationszeiten
Ausgangswert: 234 ± 25

	Dauer der Inkubation in Tagen					
	1	2	3	4	5	7
Kontrolle	278 ± 53	266 ± 68	241 ± 52	241 ± 44	255 ± 56	211 ± 37
Wasser	270 ± 35	273 ± 49	237 ± 49	249 ± 68	217 ± 44	117 ± 20
Methyljasmonat	242 ± 56	228 ± 38	177 ± 26	134 ± 25	59 ± 7	28 ± 7

Abb. 6: Zellgrößen (mittlere Zellflächen) bei natürlicher ablaufender und künstlich induzierter Seneszenz

Mittlere Zellflächen [μm^2] bei natürlich ablaufender Seneszenz

Blattalter in Tagen			
7	28	50	56
794 ± 367	865 ± 390	677 ± 322	666 ± 316

Mittlere Zellflächen [μm^2] bei künstlich induzierter Seneszenz

Ausgangswert 7 Tage alte Gerstenprimärblätter: ± 278

	Inkubationsdauer in Tagen			
	1	2	4	7
Wasser	638 ± 366	612 ± 255	769 ± 338	601 ± 317
Methyljasmonat	878 ± 435	636 ± 355	711 ± 292	632 ± 327

Abb. 8: Änderungen der Anzahl und Größe der Plastiden pro Parenchymzelle

Mittlere Plastidenzahlen bei natürlich ablaufender Seneszenz

Blattalter in Tagen			
7	28	50	56
9 ± 4	10 ± 4	7 ± 2	4 ± 2

Mittlere Plastidenfläche [μm^2] bei natürlich ablaufender Seneszenz

Blattalter in Tagen			
7	28	50	56
11,8 ± 3,6	8,1 ± 3,0	5,5 ± 0,9	3,9 ± 1,4

Mittlere Plastidenzahlen bei künstlich induzierter Seneszenz

Ausgangswert 7 Tage alte Gerstenprimärblätter: $13 \pm 3,7$

	Inkubationsdauer in Tagen			
	1	2	4	7
Wasser	8,5 ± 4,5	8,3 ± 4,7	11,1 ± 4,0	7,6 ± 3,8
Methyljasmonat	9,6 ± 2,3	7,0 ± 3,5	1,8 ± 0,8	0,4 ± 0,3

Mittlere Plastidenflächen [μm^2] bei künstlich induzierter SeneszenzAusgangswert 7 Tage alte Gerstenprimärblätter: $10 \pm 2,1$

	Inkubationsdauer in Tagen			
	1	2	4	7
Wasser	12,2 ± 2,7	14,0 ± 2,7	13,9 ± 2,6	7,5 ± 1,4
Methyljasmonat	11,6 ± 1,6	11,4 ± 2,2	4,3 ± 1,4	3,1 ± 1,3

Abb. 9: Änderungen der mittleren Größe des Plastoms pro Parenchymzelle

Mittlerer Gesamtplastidenanteil pro Zellanteil [relative Einheiten] bei natürlich ablaufender Seneszenz

Blattalter in Tagen			
7	28	50	56
0,13 ± 0,10	0,1 ± 0,07	0,06 ± 0,02	0,02 ± 0,02

Mittlerer Gesamtplastidenanteil [relative Einheiten] bei künstlich induzierter Seneszenz

Ausgangswert 7 Tage alte Gerstenprimärblätter: \downarrow 0,17 ± 0,10

	Inkubationsdauer in Tagen			
	1	2	4	7
Wasser	0,16 ± 0,13	0,19 ± 0,14	0,20 ± 0,07	0,10 ± 0,06
Methyljasmonat	0,13 ± 0,07	0,13 ± 0,10	0,01 ± 0,007	0,002 ± 0,002

Normierter Gesamtplastidenanteil pro Zellanteil in % vom Ausgangswert (7 Tage) bei natürlich ablaufender Seneszenz

Blattalter in Tagen			
7	28	50	56
100	70	43	18

Normierter Gesamtplastidenanteil pro Zellanteil in % vom Ausgangswert (7 Tage) bei künstlich induzierter Seneszenz

	Inkubationsdauer in Tagen			
	1	2	4	7
Wasser	96	112	118	56
Methyljasmonat	75	75	7	1

Abb. 13: Änderungen der Anzahl und Größe der Plastoglobuli pro Plastid

Mittlere Plastoglobulianzahl bei natürlich ablaufender Seneszenz

Blattalter in Tagen			
7	28	50	56
17,9 ± 6,0	9,7 ± 5,1	13,1 ± 3,8	35,5 ± 4,9

Mittlere Plastoglobulifläche [$10^{-3} \mu\text{m}^2$] bei natürlich ablaufender Seneszenz

Blattalter in Tagen			
7	28	50	56
4,2 ± 2,0	6,0 ± 2,0	19,0 ± 5,0	55,8 ± 28,5

Mittlere Plastoglobulianzahl bei künstlich induzierter Seneszenz

Ausgangswert 7 Tage alte Gerstenprimärblätter: 7,0 ± 6,6

	Inkubationsdauer in Tagen			
	1	2	4	7
Wasser	6,6 ± 4,2	7,5 ± 5,6	9,0 ± 4,6	6,6 ± 4,2
Methyljasmonat	6,0 ± 2,7	8,3 ± 2,1	14,9 ± 7,3	10,5 ± 2,5

Mittlere Plastoglobulifläche [$10^{-3} \mu\text{m}^2$] bei künstlich induzierter Seneszenz

Ausgangswert 7 Tage alte Gerstenprimärblätter: 4 ± 1,2

	Inkubationsdauer in Tagen			
	1	2	4	7
Wasser	5,6 ± 2,5	6,2 ± 2,2	6,9 ± 2,0	12,7 ± 7,5
Methyljasmonat	4,5 ± 2,2	6,9 ± 2,2	17,1 ± 7,3	37,7 ± 12,3

Abb. 15: Quantitative Veränderungen des Rubisco Gehalts im Chloroplasten während 24-stündiger Methyljasmonatinkubation (Dichte der Immungoldpartikel pro μm^2 Plastidenquerschnittsfläche)

Ausgangswert (Immungoldmarkierung an 7 Tage alten Gerstenprimärblättern aus herkömmlicher Anzucht): 85 ± 15

Endwert (Immungoldmarkierung an 8 Tage alten Gerstenprimärblättern aus herkömmlicher Anzucht): 66 ± 7

	Inkubationsdauer in Stunden		
	8	16	24
Wasser	79 ± 9	90 ± 12	73 ± 15
Methyljasmonat	71 ± 6	51 ± 10	37 ± 7

Chromatin: 4 ± 0

Mitochondrien: 2 ± 0

Allgemeiner Hintergrund: 2 ± 0

Abb. 16: Quantitative Veränderungen des LHC II Gehalts im Chloroplasten während 24-stündiger Methyljasmonatinkubation (Dichte der Immungoldpartikel pro μm^2 Plastidenquerschnittsfläche)

Ausgangswert (Immungoldmarkierung an 7 Tage alten Gerstenprimärblättern aus herkömmlicher Anzucht): $10,1 \pm 2,6$

Endwert (Immungoldmarkierung an 8 Tage alten Gerstenprimärblättern aus herkömmlicher Anzucht): $11,3 \pm 1,8$

	Inkubationsdauer in Stunden		
	8	16	24
Wasser	$14,4 \pm 2,2$	$9,3 \pm 1,4$	$15,2 \pm 2,3$
Methyljasmonat	$13,1 \pm 1,4$	$10,6 \pm 1,2$	$6,5 \pm 1,2$

Chromatin: n. d.

Mitochondrien: n. d.

Allgemeiner Hintergrund: n. d.

Abb. 25: Quantitative Veränderungen der TOC 75 Dichte in der äußeren Plastidenhüllmembran während 24-stündiger Methyljasmonatinkubation (Dichte der Immungold-Partikel pro μm^2 Plastidenhüllmembranbruchfläche)

Ausgangswert (Immungoldmarkierung an 7 Tage alten Gerstenprimärblättern aus herkömmlicher Anzucht): $9,9 \pm 1,3$

Endwert (Immungoldmarkierung an 8 Tage alten Gerstenprimärblättern aus herkömmlicher Anzucht): $10,3 \pm 1,8$

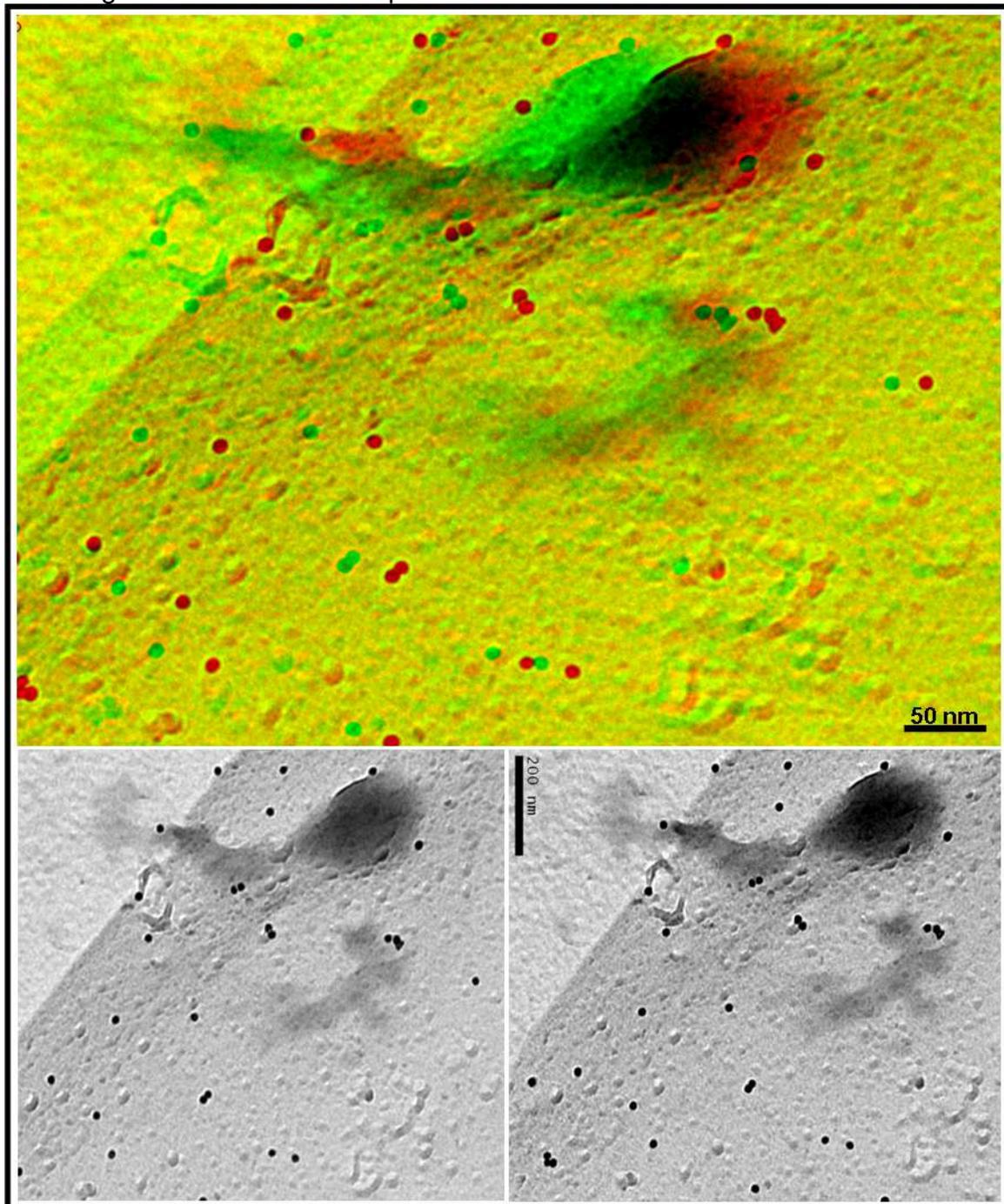
	Inkubationsdauer in Stunden		
	8	16	24
Wasser	$10,3 \pm 3,5$	$11,5 \pm 3,3$	$13,2 \pm 2,0$
Methyljasmonat	$8,2 \pm 1,6$	$4,1 \pm 0,5$	$1,4 \pm 0,8$

Thylakoide: 0 ; Allgemeiner Hintergrund: 0

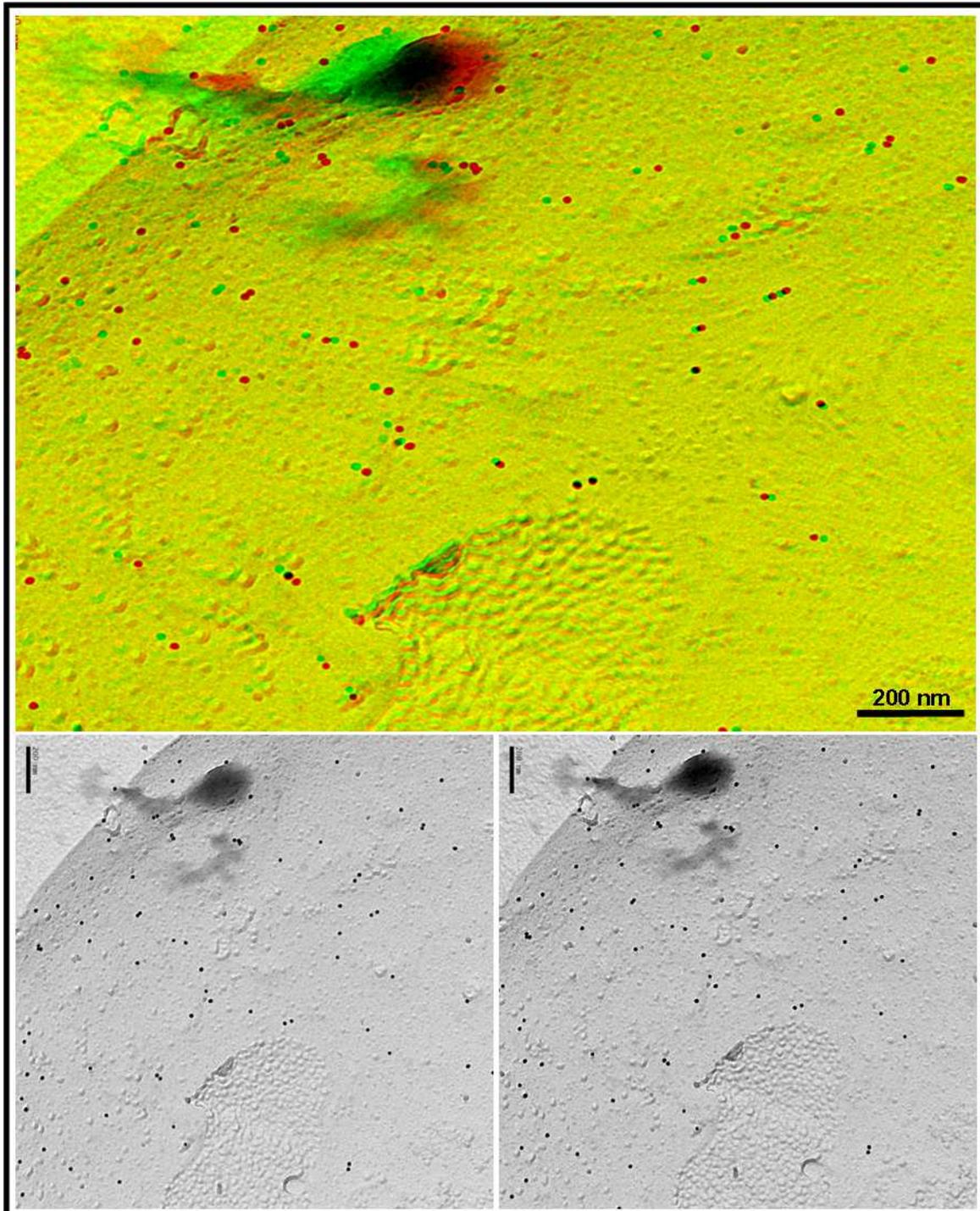
Abb. 25: Quantitative Veränderung der TOC 75 - Dichte in der äußeren Plastidenhüllmembran während 24-stündiger Methyljasmonatinkubation

Abb. 25L: Stereoaufnahme einer SDS-FRL mit Anti-TOC 75 Antikörper von isolierten Plastiden (Hüllmembranflächen) aus 7 Tage alten Gerstenprimärblättern. Die Immunmarker (10 nm Goldpartikel) befinden sich tatsächlich nur auf einer Seite der Replika (zu betrachten mit einer Rot-Grün-Brille, oder alternativ: Stereobildtaare, siehe unten). Weiterhin zu sehen ist eine leichte Verunreinigung mit nicht vollständig abgelöstem biologischem Material.

Um den visuellen Eindruck der Anaglyphen und Stereobilder nicht zu beeinträchtigen, wurde auf eine explizite Beschriftung und Markierung verzichtet. Weitere Erklärungen: siehe Text des Kapitels 3.4.1.4.

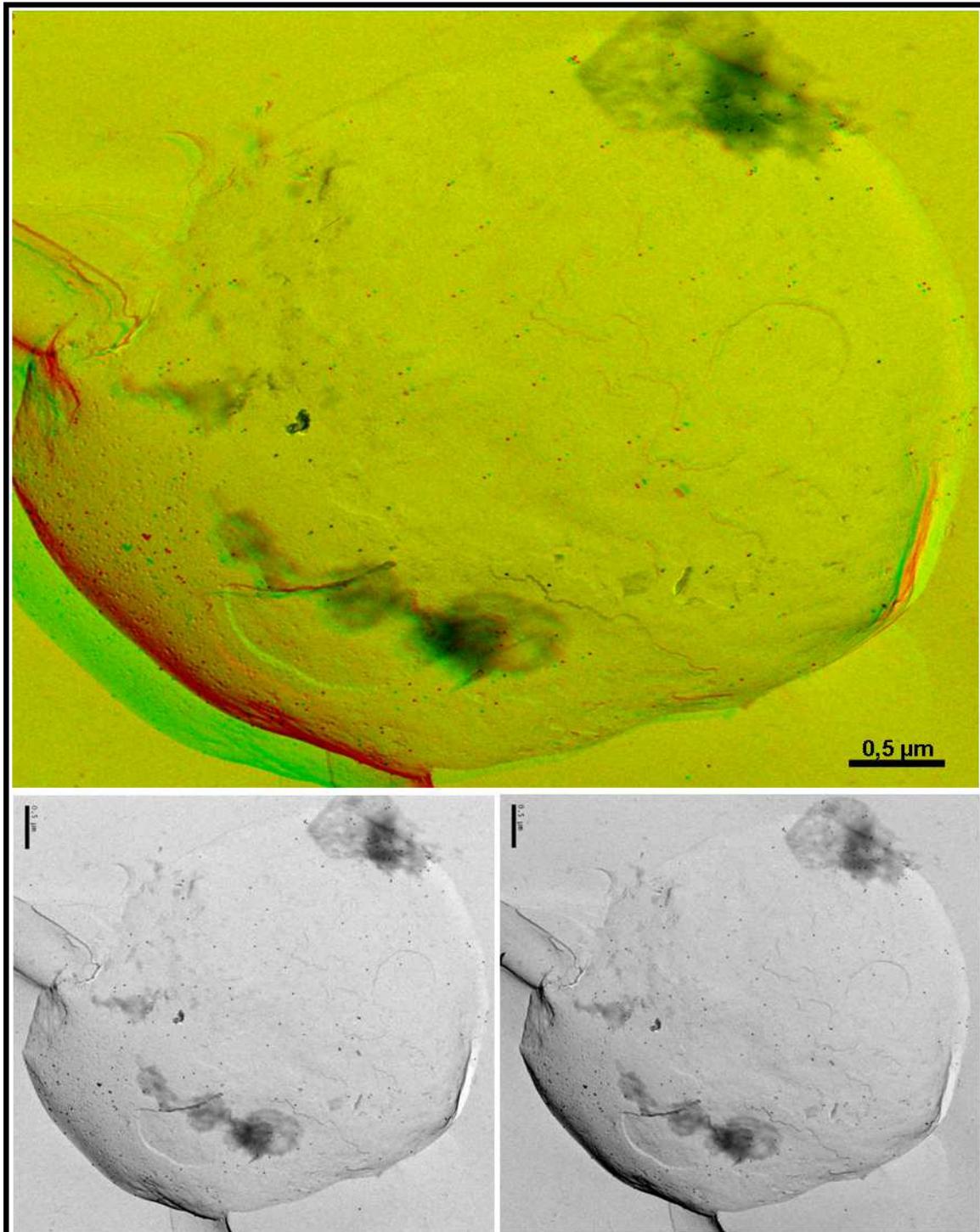


Übersichtsbild, aus dem die obige Abbildung (Abb. 25L) vergrößert wurde. Um den visuellen Eindruck der Anaglyphen und Stereobilder nicht zu beeinträchtigen, wurde auf eine explizite Beschriftung und Markierung verzichtet. Weitere Erklärungen: siehe Text des Kapitels 3.4.1.4.

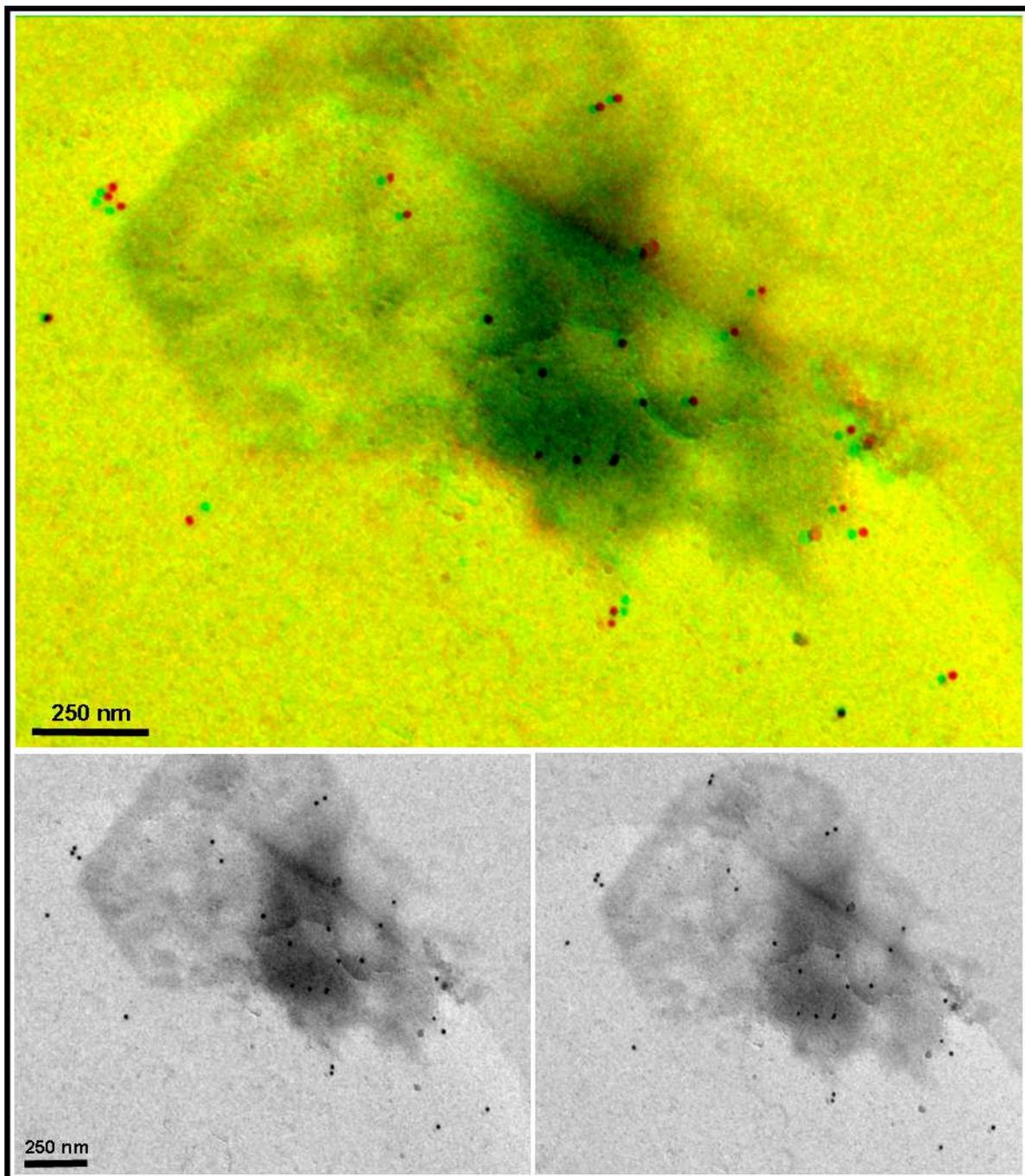


Stereoaufnahme einer SDS-FRL mit Anti-TOC 75 Antikörper von isolierten Plastiden (Hüllmembranflächen) aus 7 Tage alten Gerstenprimärblättern. Zu sehen ist eine Verunreinigung mit nicht vollständig abgelöstem biologischem Material mit Immungoldpartikel (oben rechts).

Um den visuellen Eindruck der Anaglyphen und Stereobilder nicht zu beeinträchtigen, wurde auf eine explizite Beschriftung und Markierung verzichtet. Weitere Erklärungen: siehe Text des Kapitels 3.4.1.4.



Vergrößerung des Bereichs der Verunreinigung; deutlich zu sehen ist die 3 D-Verteilung der Immungoldpartikel innerhalb des zurückgebliebenen biologischen Materials. Dabei sind einige der Immungoldpartikel so weit von der Oberfläche der Replika entfernt, dass eine Verbindung zum Antigen (TOC 75) auf der Replika-Oberfläche nicht gegeben sein kann. Solche Bereiche können nicht zur Auswertung der Immunsigndichter herangezogen werden.



Ein weiteres Beispiel einer SDS-FRL mit Anti-TOC 75 Antikörper von isolierten Plastiden (Hüllmembranflächen) aus 7 Tage alten Gerstenprimärblättern. Die Immunmarker (10 nm Goldpartikel) sind deutlich zu erkennen und befinden sich fast ausschließlich auf oder in unmittelbarer Nähe der OE-EF der Replika. Weiterhin gut zu sehen ist die IE-PF.

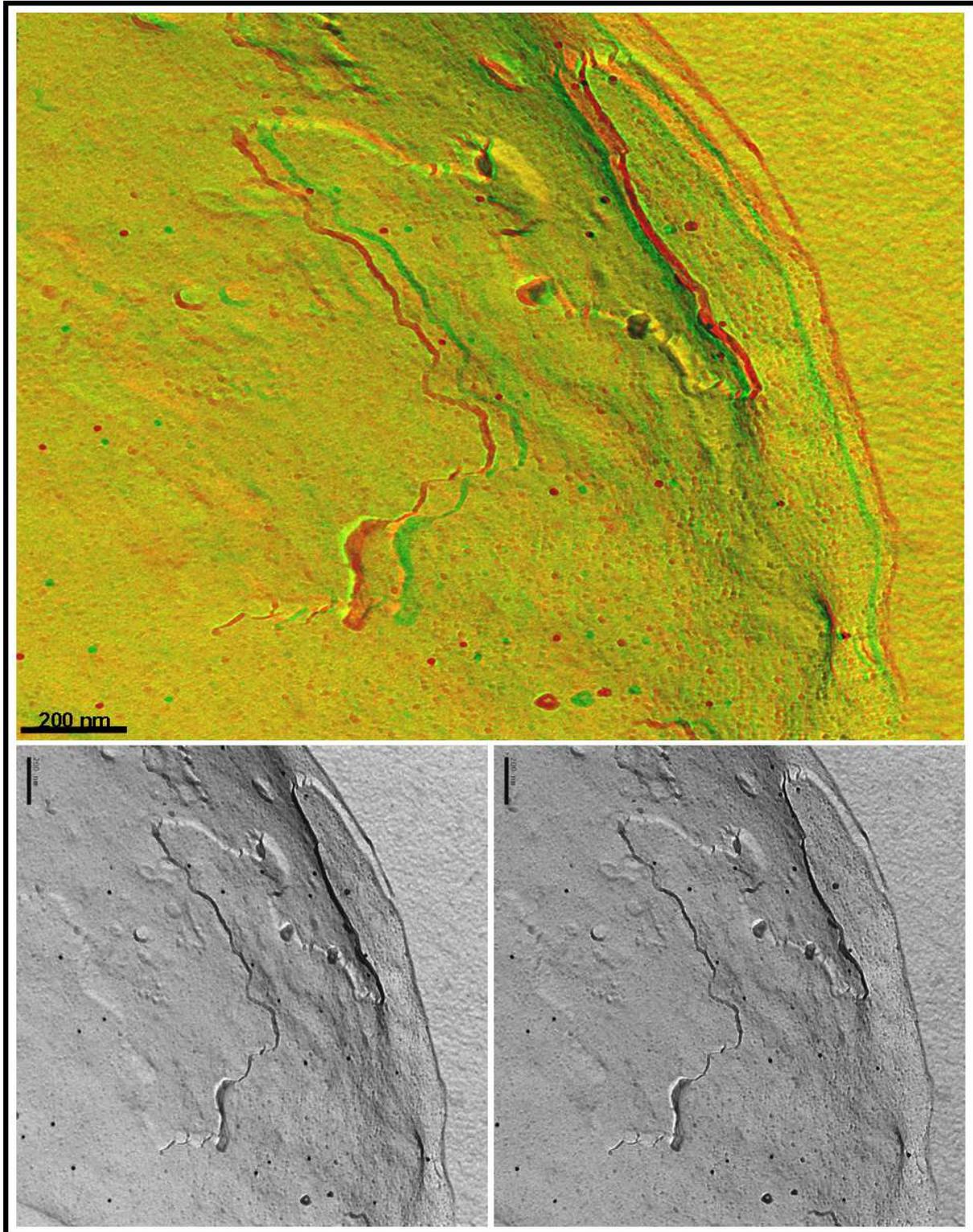
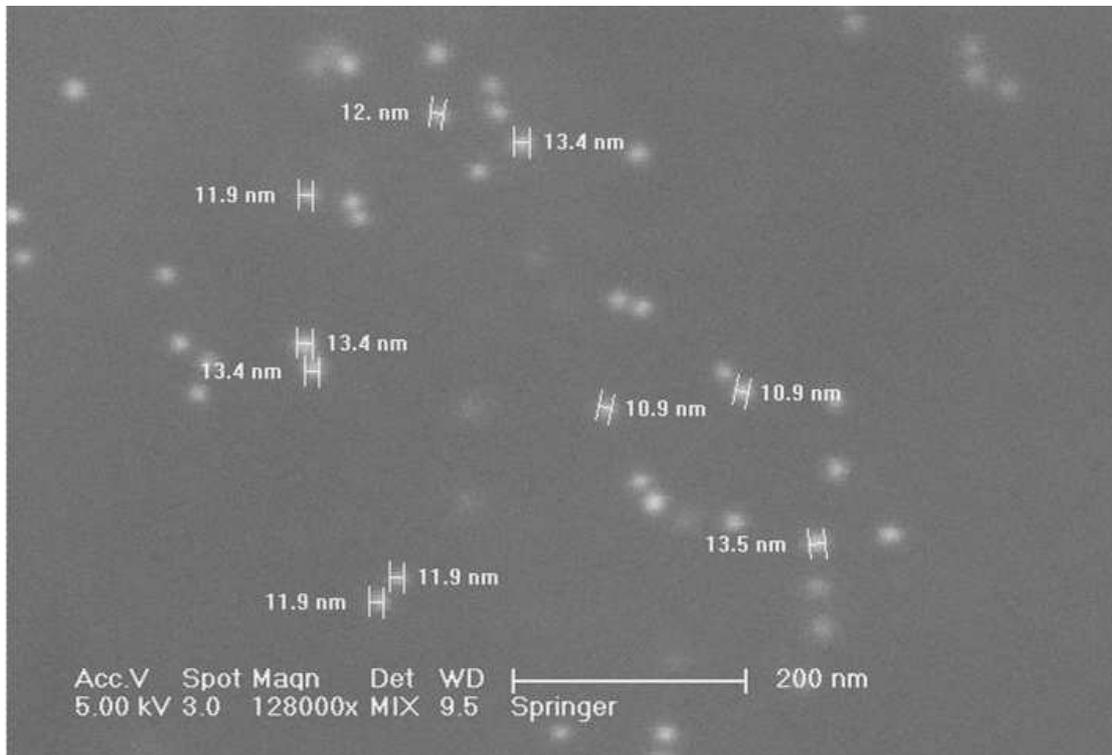


Abb. 25 M: REM-Aufnahme (Philips ESEM XL 30 FEG) einer markierten Replika (SE/BSE-Detektor) zur Identifizierung und Größenbestimmung der Goldpartikel: Die Goldpartikel heben sich deutlich als helle, punktförmige Strukturen von der Pt/C-Fläche der Replika ab. Auf Grund des Rückstreuелеlektronensignals erscheint der Durchmesser der Goldpartikel allerdings etwas größer als 10 nm.



Danksagung

Mein erster und ganz besonderer Dank gilt **Frau Prof. Dr. Christiane Reinbothe**, meiner „Doktormutter“, die mir die Arbeit an diesem Thema ermöglichte, immer ein offenes Ohr für meine wissenschaftlichen und auch sonstigen Fragen hatte, mir stets vertraute und mir auch in schwierigen Zeiten zur Seite stand.

Ganz besonderer Dank gebührt auch **Herrn Prof. Dr. Georg Acker**, Leiter der Abteilung Elektronenmikroskopie der Fachgruppe Biologie (Universität Bayreuth), der mich sehr herzlich aufnahm, und in mir das Interesse zu elektronenmikroskopischen Methoden weckte, mich darin umfassend ausbildete und förderte und stets großen Anteil an meiner Arbeit nahm.

Ganz besonderer Dank auch an Herrn **Prof. Dr. Dr. h. c. Erwin Beck**, für die Möglichkeit, diese Arbeit am Lehrstuhl Pflanzenphysiologie anzufertigen, für sein Interesse an der Arbeit und manchen wissenschaftlichen Anstoß.

Besonderen Dank gebührt auch Herrn **Prof. Dr. Steffen Reinbothe**, für die vielen, umfangreichen molekularbiologischen Arbeiten zu meiner Arbeit.

Bedanken möchte ich mich sowohl bei **Dr. Markus Drechsler** (Makromolekulare Chemie II, Universität Bayreuth) und **Frau Clarissa Abetz** (Experimentalphysik IV, Universität Bayreuth), als auch bei **Herrn Dr. Michael Laue** und **Herrn Pütz** (Universitätsklinik Homburg/Saar) für die Mithilfe bei einigen komplizierten REM- und TEM-Aufnahmen.

Ich danke auch **Herrn Peter van den Plas** (Fa. AURION, Niederlande) und **Herrn Prof. Dr. Paul Verkade** (Abteilung EM des MPI of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden), sowie **Herrn Galetzka** (Fa. Leica, Bensheim) für die wichtigen Hinweise zur Immunocytochemie.

Herrn Köstner danke ich ganz besonders für die Reparatur der für meine Arbeit äußerst wichtigen Gefrierbruch-Anlage.

Ganz besonders Danken möchte ich auch den **Mitarbeitern der Elektronik- und Mechanikwerkstätten**, namentlich **Herr Richter** und **Herr Kauper**, die mit großem Engagement alles reparierten und den **Mitarbeitern der Glasbläserei**, die meine „Sonderanfertigungen“ stets zur vollen Zufriedenheit anfertigten.

Ganz besonders Bedanken möchte ich mich auch bei **Rita Grotjahn**, Abteilung Elektronenmikroskopie der Fachgruppe Biologie (Universität Bayreuth), für die hervorragende Zusammenarbeit, die vielen praktischen Tipps zu allen Fragen der Elektronenmikroskopie und das angenehme Arbeitsklima.

Ganz besonders bedanke ich mich auch bei **Christiane Meinen** und **Petra Zippelius** (Lehrstuhl Pflanzenphysiologie, Universität Bayreuth) für die wertvolle Unterstützung v. a. beim „Goldzählen“ und Flächenmessen und bei **Helga Simper**, für die unvergesslichen Einladungen, die vielen gesellschaftlichen Informationen und das äußerst angenehme „Laborklima“.

Ganz herzlich bedanke ich mich auch bei **Heike Bauerschmitt**, **Sandra Bartsch** und **Frank Buhr** (Lehrstuhl Pflanzenphysiologie), die stets mit Rat und Tat, Tipps und Tricks und so manchem kulinarischen und akustischen Leckerbissen zur Stelle waren und ganz wesentlich das hervorragende „Mikroklima“ im „Labor 06“ mitprägten.

Bedanken möchte ich mich auch bei **Ulrike Füssel**, **Angelika Munck**, **Claudia Rossig**, **Sabrina Zeitler**, **Anja Lepinat**, **Kornelia Hofmann** und **Jens Ritter**, und allen weiteren temporär **Angehörigen von Labor 06** für die nette Arbeitsatmosphäre und Unterstützung.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch noch bei **allen Angehörigen des Lehrstuhls Pflanzenphysiologie**, für die liebe „Betreuung“ und den allzeit lobenden Worten (v. a. die Windbeutel betreffend).

Ganz herzlichen Dank auch noch an alle meine **Freunde**, **Bekannte** und das **Team Kondi**, die mich während dieser Zeit begleitet haben.

Bedanken möchte ich mich auch noch bei **Frau Martina Popp** (ARGE Bayreuth) und **Herrn Neuber** (Arbeitsamt, Bayreuth) für ihre vernünftige und verständnisvolle Art und den angenehmen Umgangston bei den oft schwierigen Sachverhalten.

Ein ganz herzliches Dankeschön auch an **Birgit Titze**, für ihre Liebe und für ihr Verständnis während der letzten Zeit.

Meinen Eltern danke ich im besonderen Maße für ihre großzügige Unterstützung während der nicht immer einfachen Zeit.

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich weder an der Universität Bayreuth noch anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

Bayreuth, den 12. Juni 2007

.....

Armin Springer