

**Entwicklungs- und jasmonatabhängiges Vorkommen eines  
23 kDa Proteins der Gerste (*Hordeum vulgare* L. cv. Salome)**

**Dissertation**



zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Uta Demus

geb. am 23.08.1968 in Halle (Saale)

Gutachter:

1. Prof. Dr. C. Wasternack
2. Prof. Dr. U. Johanningmeier
3. Dr. A. van Lammeren

Halle (Saale), den 17.11.1999

## Bibliographische Beschreibung

---

DEMUS, Uta

Entwicklungs- und jasmonatabhängiges Vorkommen eines 23 kDa Proteins der Gerste  
(*Hordeum vulgare* cv. Salome)

102 S., 27 Abb., 5 Tab., 180 Lit.

Halle-Wittenberg, Martin-Luther-Universität  
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)

Dissertation A

---

# INHALTSVERZEICHNIS

Seite

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	1
1.1.	Jasmonate	1
1.2.	Jasmonatwirkung	3
1.2.1.	Einfluß von Jasmonaten auf Entwicklungs- und Wachstumsprozesse	4
1.2.2.	Einfluß von Jasmonaten bei biotischen und abiotischen Streßereignissen	6
1.3.	Jasmonatinduzierte Änderungen der Genexpression	8
1.4.	Jasmonatinduzierte Proteine der Gerste	10
1.5.	Ziel der Arbeit	13
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	15
2.1.	Materialien	15
2.1.1.	Pflanzenmaterial	15
2.1.2.	Inkubationslösungen	15
2.1.3.	Bakterienstämme, Plasmide	15
2.1.4.	Nährmedien und Antibiotika	15
2.1.5.	Protein-Antikörper	16
2.2.	Methoden	16
2.2.1.	Isolation von Nukleinsäuren	16
2.2.1.1.	Isolation von pflanzlicher genomischer DNA (gDNA)	16
2.2.1.2.	Isolation von pflanzlicher Gesamt-RNA	17
2.2.1.3.	Isolation von Plasmid-DANN	18
2.2.2.	Restriktion von Nukleinsäuren	19
2.2.3.	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	19
2.2.4.	Methoden zur Fixierung von Nukleinsäuren auf Trägermembranen	20
2.2.5.	DNA-Fragmentisolation aus Agarosegelen	21
2.2.6.	Hybridisierung von Nukleinsäuren	21
2.2.6.1.	Markierung von DNA-Sonden	21
2.2.6.2.	Hybridisierung und Detektion	22
2.2.7.	Transformation von rekombinanten Plasmiden	23
2.2.7.1.	Selektion positiver Klone	23
2.2.8.	Isolation von Gesamt-Protein aus Pflanzen	24
2.2.9.	Isolation von Zellkernen und deren Proteinextrakt	24

2.2.10.	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen	26
2.2.10.1.	Eindimensionale Auftrennung	26
2.2.10.2.	Zweidimensionale Auftrennung	27
2.2.11.	Blotting von Proteinen	28
2.2.12.	Nachweis spezifischer Proteine mittels Antikörper	29
2.2.13.	Zytologische Arbeitsmethoden	29
2.2.14.	„tissue-printing“	32
2.2.15.	Osmolalitätsbestimmung	32
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>33</b>
3.1.	<i>Jip23</i> -Expression in der Entwicklung der Gerste ( <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Salome)	33
3.1.1.	<i>Jip23</i> -Expression während der Samenreifung	33
3.1.2.	<i>Jip23</i> -Expression während der Keimlingsentwicklung	34
3.1.3.	<i>Jip23</i> -Expression in verschiedenen Geweben von unterschiedlich alten Keimlingen	37
3.1.3.1.	<i>Jip23</i> -Expression in verschiedenen Geweben und Organen von 6 Tage alten Keimlingen	38
3.1.3.2.	<i>Jip23</i> -Expression in Geweben von 6, 8 und 22 Tage alten Keimlingen	39
3.1.4.	Gewebespezifische Lokalisation der <i>jip23</i> -Expression im 48 h alten Keimling	40
3.2.	Expression anderer JIP-Gene in der Keimlingsentwicklung der Gerste ( <i>Hordeum vulgare</i> L. cv.Salome)	44
3.3.	Vergleich des Vorkommens von Genen, die für JIP23 codieren, in den Gerstenkultivaren Salome und Gerbel	45
3.4.	<i>Jip23</i> -Expression in Keimlingen verschiedener Getreidearten bzw. Gerstenkultivare	47
3.5.	Isoformen von JIP23 und ihr unterschiedliches Auftreten in Keimlingen und in JM-behandelten Blättern	49
3.6.	Vorkommen von JIP23 im Zellkern	51
3.6.1.	JIP23-Akkumulation außerhalb und innerhalb des Zellkerns	51
3.6.2.	Isoformen von JIP23 im Zellkern	54
3.6.3.	JIP23 in Proteinextrakten aus Pellet- bzw. Überstandfraktionen lysierter Zellkerne	55

3.7.	Jasmonsäure- und Abscisinsäure-Gehalte in verschiedenen Geweben und unterschiedlich alten Gerstenkeimlingen ( <i>Hordeum vulgare</i> L. cv.Salome)	57
3.8.	<i>Jip23</i> -Expression in Keimlingen der Gerste ( <i>Hordeum vulgare</i> L. cv.Salome)nach exogener Manipulation der Keimung	61
3.8.1.	Induzierbarkeit der <i>jip23</i> -Expression nach Applikation von Jasmonsäuremethylester (JM)	61
3.8.2.	<i>Jip23</i> -Expression nach Hemmung der Jasmonatbiosynthese durch Tetcyclacis	62
3.8.3.	<i>Jip23</i> -Expression in Keimlingen ohne Endosperm	64
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>67</b>
4.1.	Akkumulation und Lokalisation der JIP23-Genprodukte in der Entwicklung der Gerstenpflanze	68
4.2.	Isoformen von JIP23	72
4.3.	Lokalisation von JIP23 in verschiedenen Zellkompartimenten	75
4.4.	Induktion der <i>jip23</i> -Expression	78
4.4.1.	Einfluß von Jasmonaten	78
4.4.2.	Einfluß von osmotischem Streß	84
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>86</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>89</b>

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
cDNA	copy-DNA bzw. komplementäre DANN
CSPD	3-(4-Methoxy Spiro[1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclodecan]-4-yl)phenylphosphat, Na <sub>2</sub>
DAP	days after pollination
DNA	Desoxyribonucleinsäure
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
gFG	Gramm Frischgewicht
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JA	Jasmonsäure
JIP	jasmonatinduziertes Protein
JM	Jasmonsäuremethylester
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
mRNA	"messenger RNA"
NBT	Nitrotetrazolium Blau
ORF	"open reading-frame" bzw. offener Leserahmen
PEG	Polyethylenglycol
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
RuBPCase	Ribulosebisphosphat-Carboxylase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolettes Licht
Vol.	Volumenteil



Verwendung von  $\alpha$ -Linolensäure (LeA). Pflanzenmembranen enthalten in ihren Glycerolipiden und Phospholipiden viel LA in veresterter Form.

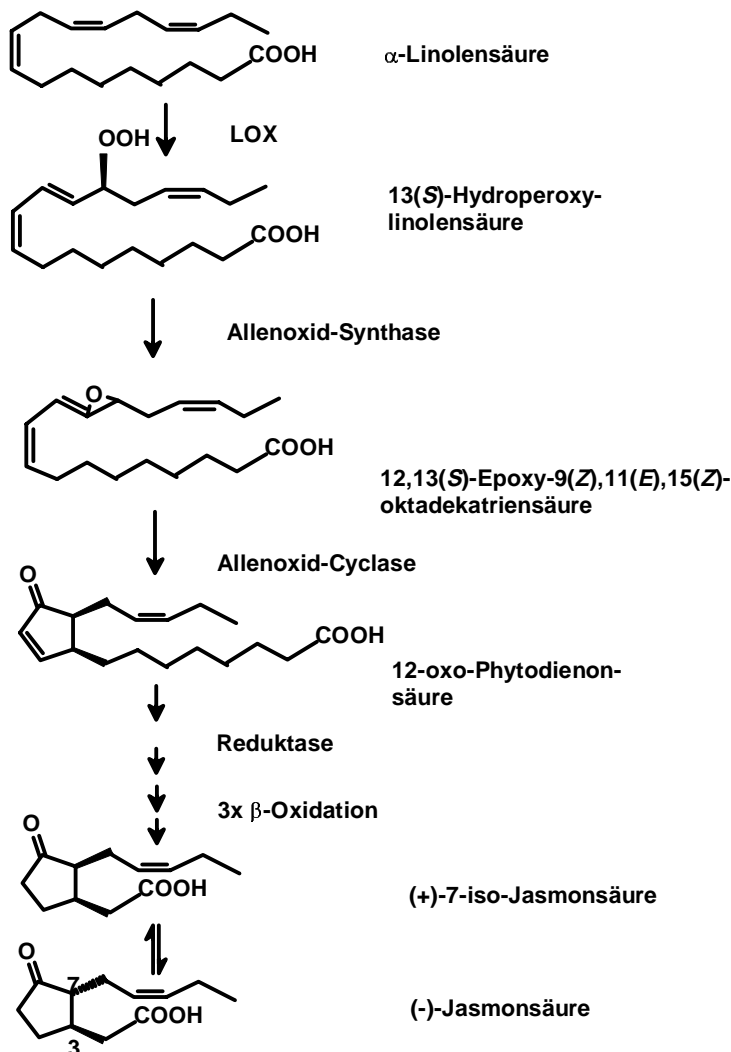


Abb.2  
Biosyntheseweg der Jasmonsäure

Es wird vermutet, daß durch Phospholipasen LeA aus Membranen freigesetzt wird und so für die Synthese von JA zur Verfügung steht (FARMER und RYAN, 1992). Durch eine Lipoxygenase (LOX) wird LeA in 13-Hydroperoxylinolensäure umgewandelt. Diese Hydroperoxyverbindung ist Substrat einer Allenoxidsynthase, deren Produkt anschließend durch eine Allenoxidcyclase zu 12-oxo-Phytodienonsäure umgesetzt wird. Durch Reduktion und dreimalige  $\beta$ -Oxidation entsteht die instabile (+)-7-iso-JA, die zur stabilen Form (-)-JA epimerisiert wird (s. Abb.1).

(-)-JA kann zu ihren Methylestern und zahlreichen Konjugaten, wie Aminosäurekonjugaten, umgesetzt werden. Viele dieser Verbindungen sind auch biologisch aktiv (Übersicht bei



CREELMAN und MULLET, 1997a; WASTERNACK, 1999). In höheren Pflanzen werden Jasmonate vorrangig durch Hydroxylierung, Glykosylierung, Konjugatbildung mit Aminosäuren, oder Veresterung metabolisiert (SEMBDNER und PARTHIER, 1993; SEMBDNER et al., 1994; KLECZKOWSKI und SCHELL, 1995).

Wird im weiteren Text von Jasmonaten gesprochen, sind unter diesem Begriff Jasmonsäure, ihre Methylester und Aminosäurekonjugate zusammengefaßt.

Jasmonate werden in Algen, Pilzen, Farnen, Gymnospermen und Angiospermen synthetisiert (UEDA et al., 1991a, 1991b ; MIERSCH et al., 1986, 1987; UEDA und KATO, 1980; MEYER et al., 1984; DATHE et al., 1981; YAMANE et al., 1981). Der endogene Jasmonatlevel variiert in Abhängigkeit vom Gewebe- bzw. Zelltyp, dem Entwicklungsstadium und den auf die Pflanze einwirkenden biotischen und abiotischen Umweltreizen (Übersicht bei CREELMAN und MULLET, 1995; 1997a).

Während über das Auftreten von Jasmonaten als Signal viele Daten vorliegen, ist nichts darüber bekannt, wie dieses Signal wieder abgestellt wird. Ein zeitlich und örtlich begrenztes Auftreten von JA könnte durch „Abtransport“ vom Wirkort (PARCHMANN et al., 1997), Kompartimentierung (HARMS et al., 1995), Inaktivierung (MUELLER und BRODSCHELM, 1994; SEMBDNER et al., 1994) oder Abbau (KOCH et al., 1997) entstehen. Koch et al. konnten kürzlich einen Abbau von JA zu biologisch inaktivem Jasmon nachweisen.

## **1.2. JASMONATWIRKUNG**

In den 80er Jahren wurde gezeigt, daß Jasmonate pflanzliche Wachstumsprozesse hemmen (YAMANE et al., 1981; DATHE et al., 1981) und Blattseneszenzsymptome auslösen (UEDA und KATO 1980). Jasmonate wurden als im Pflanzenreich ubiquitär verbreitet erkannt (YAMANE et al., 1981; MEYER et al., 1984; MIERSCH et al., 1986; UEDA et al, 1991a, 1991b, NETO et al. 1991; CREELMAN et al., 1992; MIERSCH et al., 1992).

Die Wirkung von Jasmonaten wurde meist durch Applikation an Pflanzen oder Pflanzenteilen untersucht (Übersicht bei SEMBDNER und PARTHIER, 1993). Dabei beobachtete man inhibierende und stimulierende Wirkungen sowohl auf Prozesse der Pflanzenentwicklung und des Wachstums (1.2.1.) als auch auf biotische und abiotische Streßereignisse (1.2.2.).

### 1.2.1. Einfluß von Jasmonaten auf Entwicklungs- und Wachstumsprozesse von Pflanzen

Jasmonate können Prozesse wie 1) Keimung, 2) Wurzel- und Sproßwachstum, 3) Morphogenese, 4) Blüten- und Fruchtentwicklung, 5) Speicherung von Kohlenstoff- und Stickstoffreserven oder 6) Seneszenz beeinflussen.

1) Die Samenkeimung wird in verschiedenen Pflanzenfamilien entweder inhibiert (YAMANE et al., 1981; SEMBDNER UND GROSS, 1986), bleibt unbeeinflusst oder wird stimuliert (DALETSKAYA und SEMBDNER, 1989; RANJAN und LEWAK, 1992). Es wurde festgestellt, daß die Keimung nicht ruhender Samen inhibiert und die ruhender Samen stimuliert wird. 10 bis 20 h nach Samenquellung konnte in Sojabohnen- (CREELMAN und MULLET, 1995) und Gerstenkeimlingen (HAUSE et al., 1996) ein Jasmonat-Anstieg beobachtet werden. Möglicherweise haben Jasmonate eine Funktion bei der Mobilisierung der Samenspeicherstoffe.

2) Auf die Auxin-induzierte Koleoptilenelongation des Hafers (UEDA et al., 1995) und das Wachstum von Wurzeln (STASWICK et al., 1992; BERGER et al., 1995) üben Jasmonate eine hemmende Wirkung aus. Die Abszission von Blättern wird gefördert (UEDA et al., 1991c). Der wachstumsinhibierende Effekt bei beiden Ereignissen beruht auf der Hemmung der Synthese von Zellwandpolysacchariden (MIYAMOTO et al., 1997). Beim Blattfall konnte zudem eine Stimulation des Abbaus von Polysacchariden der Zellwand durch JA-aktivierte Zellulasen nachgewiesen werden (MIYAMOTO et al., 1997).

3) An morphogenetischen Ereignissen wie der Bildung von Speicherknollen bei Kartoffel und Süßkartoffel, Zwiebelbildung bei Zwiebel und Knoblauch oder der Rankenkrümmung von *Bryonia dioica* sind Jasmonate beteiligt (Übersicht bei KODA, 1997). Zur Knollenbildung der Kartoffel sind Kurztagbedingungen und induzierende Verbindungen notwendig. Tuberonsäure und ihre O- $\beta$ -D-Glukoside wurden als die Knollenbildung initiierende Verbindungen in Kartoffelblättern identifiziert. Die chemische Struktur von Tuberonsäure ist der von JA sehr ähnlich. Es konnte gezeigt werden, daß JA und ihre Methylester *in vitro* eine stark induzierende Wirkung auf die Knollenbildung der Kartoffel

haben. Der tatsächliche Effekt von JA auf die Knollenbildung *in vivo* bedarf aber noch der Klärung.

In den Prozeß der Rankenkrümmung sind ebenfalls Jasmonate als Signalmoleküle involviert (FALKENSTEIN et al., 1991, WEILER et al., 1993). Nach mechanischer Stimulation der Ranken von *Bryonia dioica* steigen Jasmonate und insbesondere PDA (12-oxo-Phytodienonsäure), eine Vorläuferverbindung von JA, an. Wegen dieser zeitlichen Korrelation von PDA-Anstieg und dem Grad der Rankenkrümmung, wird PDA als vorrangiges Signal der Rankenkrümmung angesehen (STELMACH et al., 1998).

4) In reproduzierenden Geweben der Pflanze wurden besonders hohe Jasmonatgehalte gemessen (MEYER et al., 1984; CREELMAN und MULLET, 1995), was einen Einfluß auf Blüten-, Frucht- und Samenbildung vermuten läßt.

Der Einfluß von Jasmonaten auf die Blütenentwicklung wurde mittels Mutanten näher charakterisiert. Die Mutante *fad3-2fad7-2fad8* (Arabidopsis) kann keine JA bilden, da die zur Synthese notwendige Ausgangsverbindung  $\alpha$ -Linolensäure durch Defekt von  $\omega$ -3-Desaturasen nicht gebildet werden kann (McCONN und BROWSE, 1996). Die Folge ist männliche Sterilität der Blüten und die Unfähigkeit lebensfähige Pollen freizusetzen. Diese Wirkung ist durch exogene Applikation von JA aufhebbar. Eine andere Mutante von Arabidopsis, *coil*, ist JA-insensitiv und bildet ebenfalls männlich sterile Blüten aus (FEYS et al., 1994).

Prozesse wie Reifung, Karotenoidsynthese oder Expression von Speicherproteinen sind während der Fruchtentwicklung durch Jasmonate modulierbar. Die Stimulation der Fruchtreifung von Tomaten und Äpfeln erfolgt über die Aktivierung des Ethylen-bildenden Enzyms (EFE) durch Jasmonate und damit der Bildung von Ethylen (CZAPSKI et al., 1992). Die Applikation von JA an Tomatenfrüchte stimuliert die Karotenoidsynthese (SANIEWSKI und CZAPSKI, 1983). In Blüten und sich entwickelnden Früchten zeigen jasmonatresponsive vegetative Speicherproteine (VSPs von Sojabohne und Arabidopsis) eine hohe Expressionsrate (BERGER et al., 1995; STASWICK, 1989).

5) Viele Samenspeicherproteine wie Napin oder Cruciferin (WILEN et al., 1991) und vegetative Speicherproteine (VSPs) wie Patatin, Sporamin, VSP $\alpha$  und  $\beta$  oder Lipoxygenasen (STASWICK, 1994) sind durch Jasmonate induzierbar. VSPs können zu Zeiten größerer Kohlenstoff- und Stickstoffverfügbarkeit in vegetativen Geweben und während der Samenentwicklung akkumulieren. Einigen dieser Proteine konnte neben der Speicherfunktion

als C- und N-Reserve auch eine Enzymfunktion zugeordnet werden z.B. Patatin als Lipidacylhydrolase und VSP $\alpha$  und  $\beta$  als saure Phosphatasen. Diese doppelte Funktion unterliegt einer komplexen Regulation durch JA, externe Reize wie Verwundung, Zucker, Licht, Phosphat und einer Abhängigkeit von der Entwicklung der Pflanze (MASON und MULLET, 1990; BERGER et al., 1995; CREELMAN und MULLET, 1997a,b). VSPs scheinen Teil eines „sink/source“-Systems zu sein, wobei Zucker als Sensor und Jasmonat als Regulator fungiert. Diese Annahme wird durch die Anwesenheit von Promoterelementen sowohl für Glukose als auch für JA in VSP-Genen unterstützt (KIM et al., 1992; MASON et al., 1993).

6) Die Applikation von Jasmonaten an Blättern führt zum Verlust von Chlorophyll, gestörten Thylakoidmembranen sowie einer Abnahme von Proteinen, die in den Prozeß der Photosynthese integriert sind (WEIDHASE et al., 1987b; PARTHIER, 1990; HAUSE et al., 1994, ROLOFF et al., 1994). Diese Fakten führten zu der Annahme, daß Jasmonate eine Rolle in der Seneszenz photosynthetischer Gewebe spielen. Eine Analyse der endogenen Jasmonatgehalte in seneszierenden Blättern wurde bisher nicht durchgeführt. Die Frage nach der Mitwirkung von Jasmonaten bei der im Entwicklungsverlauf einer Pflanze natürlich auftretenden Seneszenz bleibt aus diesem Grund noch zu klären.

Die nach Jasmonatapplikation an Blättern auftretenden seneszenzartigen Symptome könnten auf eine von Creelman und Mullet (1997a) postulierten Rolle von Jasmonaten im Zusammenhang mit hohen Jasmonatgehalten in Zellteilungszonen, jungen Blättern und reproduzierenden Organen stehen. In diesen Bereichen besteht eine starke Zellteilungsaktivität und dadurch ein erhöhter Bedarf an Nährstoffen. Jasmonate könnten hier Signalfunktion zur Verringerung bzw. Hemmung der Synthese von Proteinen für die Photosynthese besitzen, um ein Bereitstellen von Nährstoffreserven für Wachstumsprozesse zu gewährleisten.

### **1.2.2. Einfluß von Jasmonaten bei biotischen und abiotischen Streßereignissen**

Jasmonate spielen als Signalmoleküle bei den Abwehrreaktionen von Pflanzen nach abiotischen oder biotischen Streßfaktoren eine große Rolle.

Abiotische Streßereignisse wie etwa osmotischer Streß (LEHMANN et al., 1995), Trockenstreß (REINBOTHE et al., 1992b), mechanischer Streß (WEILER et al., 1994),

Hitzestreß (HERDE et al., 1996) können über einen endogenen Anstieg von Jasmonaten eine veränderte Genexpression auslösen.

Zum Schutz vor UV-Licht oder hoher Lichtintensität können Jasmonate zur Synthese von Anthozyanen in der Pflanze führen. So konnte nach JM-Behandlung nur in unter Licht gewachsenen Sojabohnenkeimlingen eine Akkumulation von Anthozyan nachgewiesen werden (FRANCESCHI und GRIMES, 1991).

Im gesamten Zeitraum der Entwicklung einer Pflanze besteht die Gefahr, daß sie durch Verwundung, z.B. bei Insektenbefall, oder andere Ereignisse wie Pathogenbefall geschädigt wird (biotische Streßfaktoren). Die Pflanze wehrt sich durch die Synthese von Proteinen (Proteinaseinhibitoren, Thionine, Defensine), die ihren Abwehrstatus erhöhen („Immunantwort“ der Pflanze) bzw. Bildung toxischer Verbindungen (Phytoalexine, Alkaloide, Flavonoide) vermittelt durch Jasmonate.

Insbesondere die Rolle der Jasmonate in der Antwort der Pflanze auf Verwundung ist detailliert untersucht. Die Expression der Gene, die für Proteinaseinhibitoren (*pin*) codieren, wird am Ende einer durch Verwundung ausgelösten Signalkaskade induziert, in der JA ein zentrales Element ist (RYAN, 1992; SCHALLER und RYAN, 1995). In Tomate und Sojabohne akkumulieren nach Verwundung Jasmonate (CREELMAN et al., 1992; PENA-CORTES et al., 1995; CONCONI et al., 1996). Exogen applizierte  $\alpha$ -Linolensäure, PDA oder JA induzieren in Tomate die *pin2*-Expression als Wundantwort, (Proteinaseinhibitor II) (FARMER und RYAN, 1992; PENA-CORTES et al., 1996). Die Antwort kann sich lokal im betroffenen Blatt als auch systemisch zeigen. Die lokale Antwort in Tomate wird über einen endogenen Anstieg von Jasmonaten vermittelt (PENA-CORTES et al., 1995). Die systemische Antwort beginnt mit einem Peptid, das als Systemin bezeichnet wurde (PEARCE et al., 1991). Systemin wird am Ort der Verwundung aus dem Propeptid Prosystemin gebildet und über das Phloem weitertransportiert (NARVAEZ-VASQUEZ et al., 1995). Über einen Anstieg von Jasmonaten erfolgt dann ebenfalls wie bei der lokalen Antwort die *pin2* Expression.

Anders als bei Verwundung wird die Wirkung von Jasmonaten nach Pathogenbefall kontrovers diskutiert. Für eine bedeutende Rolle von Jasmonaten als Signalmoleküle in der Pflanze-Pathogen-Beziehung sprechen folgende Daten: Elizitierung von pflanzlichen Zellkulturen führt zu einem transienten Anstieg von JA verbunden mit der Expression von Phytoalexinen (GUNDLACH et al., 1992). Proteine mit Aktivitäten, die sich gegen Pathogene richten wie Thionine, Defensine oder Lipoxygenasen, sind durch JA induzierbar

(ANDRESEN et al., 1992; PENNINGCKX et al., 1996; ROSAHL, 1996). Eine Vorbehandlung mit JA führt in Tomate und Kartoffel zu lokalem und systemischem Schutz gegen *Phytophthora infestans* (COHEN et al., 1993).

Trotz dieser eindeutigen Belege für eine Funktion von Jasmonaten bei der Antwort der Pflanze auf Pathogenangriffe sprechen besonders in monokotylen Pflanzen einige Fakten gegen die generelle Signalwirkung dieser Verbindungen in der Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen. In der homologen rassenspezifischen Interaktion von Gerste mit Mehltau (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) konnte keine Rolle für JA in chemisch induzierten oder genetischen Resistenzmechanismen gefunden werden (KOGEL et al., 1995; HAUSE et al. 1997). Des weiteren konnte in Reis und Mais die JA-unabhängige Expression von normalerweise JA-responsiven PR-Proteinen (pathogenesis related) nachgewiesen werden (SCHWEIZER et al., 1997; CORDERO et al., 1994).

### 1.3. JASMONATINDUZIERTE ÄNDERUNGEN DER GENEXPRESSION

Jasmonate sind Signale von Genexpressionsänderungen. Diese Änderungen können Repressions- und/oder Induktionsereignisse beeinhalten.

Die wenigen bisher identifizierten Proteine, deren Synthese nach exogener Jasmonatapplikation bzw. ansteigendem endogenen Jasmonatgehalt einer Repression unterliegen, sind Chloroplastenproteine (REINBOTHE et al., 1994a). So führt Jasmonatgabe an Gerstenblättern zur Verminderung bis Stop der Translation bestimmter "housekeeping"-Proteine, während die Transkriptionsprodukte nur geringfügig weniger oder unverändert nachweisbar sind (MÜLLER-URI et al., 1988). Dem entspricht eine starke Abnahme der RuBPCase-Proteinmenge (ROLOFF et al., 1994). REINBOTHE et al. (1993a) konnte für die Transkripte der großen Untereinheit der RuBPCase eine Verlängerung der 5'-untranslatierten Region um 35 bp nachweisen. Dies führte zu der Hypothese, daß alternatives Spleißen der prä-mRNA zu einer veränderten Bindung der Transkripte an den Ribosomen führt, in dessen Folge die Proteinsynthese vermindert abläuft. Auch die Rate der Translationsinitiation anderer Transkripte wie z.B. für die kleine Untereinheit der RuBPCase oder Chlorophyll a/b bindende Proteine des "light harvesting complex", wurde durch JA-Behandlung erniedrigt (REINBOTHE et al., 1993b, 1993c). Görschen et al. (1997a) konnte in transgenem Tabak nachweisen, daß das Genprodukt des eingebrachten jasmonatresponsiven Genes aus der

Gerste (JIP60, jasmonatinduziertes Protein) eine hemmende Wirkung auf die Elongation der Translation spezieller mRNAs hat.

Herausragendes Merkmal von Jasmonatwirkungen ist die positive Kontrolle der Genexpression. Jasmonatapplikation führt in vielen Pflanzenarten zur Neusynthese spezifischer Proteine. Eine große Zahl von jasmonatresponsiven Genen und/oder deren Genprodukten, den jasmonatinduzierbaren Proteinen (JIPs) wurden bisher isoliert und identifiziert (Übersichten bei SEMBDNER und PARTHIER, 1993; CREELMAN und MULLET, 1997a; WASTERNAK, 1999). Die Genprodukte können klassifiziert werden in solche, die bei der vegetativen Speicherung und der Embryogenese involviert sind und solche, die eine Rolle bei Abwehrreaktionen der Pflanze haben.

Zur ersten Gruppe gehören vegetative Speicherproteine (STASWICK, 1994; MASON und MULLET, 1990; BERGER et al., 1995), Samenspeicherproteine wie Napin und Cruciferin (WILEN et al., 1991) und mRNAs für LEA-ähnliche Proteine (late-embryogenesis-abundant, REINBOTHE et al., 1992a).

Zur zweiten Gruppe zählen Proteinaseinhibitoren (KOIWA et al., 1997), Thionine (ANDRESEN et al., 1992; EPPLE et al., 1995), Zellwandproteine (CREELMAN et al., 1992), Ribosomen inaktivierende Proteine (CHAUDHRY et al., 1994; REINBOTHE et al., 1994b; GÖRSCHEN et al., 1997a), Enzyme der JA-Biosynthese (BELL und MULLET, 1993; HEITZ et al., 1997; ROYO et al., 1996; FEUSSNER et al., 1995, LAUDERT et al., 1996), Enzyme der Phytoalexinsynthese wie Phenylalaninammoniumlyase, Chalconsynthase, 4-Coumarat:CoA Ligase (BLECHERT et al., 1995; GUNDLACH et al., 1992; DITTRICH et al., 1992).

Identifiziert wurden viele der aufgeführten Proteine in Pflanzen oder Pflanzenteilen, die einer exogenen Applikation mit Jasmonaten unterzogen wurden. Induktoren der Genexpression solcher Proteine können aber auch Ereignisse wie Verwundung, osmotischer Streß oder Elizitierung sein. Gleichzeitig wurde dann ein endogener Anstieg des Jasmonatgehaltes (Neusynthese von Jasmonaten) gemessen, der mit der Genexpression korrelierbar ist (z.B. PENA-CORTES et al., 1995; LEHMANN et al., 1995, GUNDLACH et al., 1992). Die Signalkette führt vereinfacht dargestellt vom äußeren Reiz über Jasmonate als Signalmoleküle bis zur Genexpressionsänderung.

Allerdings wurden auch Belege dafür gefunden, daß JA-induzierbare Gene nach Einwirkung von Streßfaktoren exprimiert werden, ohne daß ein endogener Anstieg von JA erfolgt (BUNKER et al., 1995; SCHWEIZER et al., 1997). Nicht alle JA-responsiven Gene sind sowohl durch exogene Applikation als auch durch einen endogenen Anstieg von Jasmonaten induzierbar. Die Gene *jrg5*, *10* und *12* bzw. das Gen für eine Lipoxygenase aus Gerste werden nur durch exogenes Jasmonat als Signal induziert (LEE et al., 1996; VÖRÖS et al., 1998). Diese Befunde weisen auf unterschiedliche Signalwege für exogene und endogene Jasmonate bzw. verschiedene Streßfaktoren hin und bedürfen weiterer Untersuchungen.

Das Ende der Signalkaskade für Jasmonate stellen die Promotoren der jasmonatresponsiven Gene dar. Durch Promoteranalysen verschiedener JA-induzierbarer Gene wurden Sequenzen ermittelt, die für die JA-Responsivität verantwortlich sind. So wurde in der Sojabohne eine G-Box im Promoter des Genes für Proteinaseinhibitor II aus Tomate und für das vegetative Speicherprotein B aus Sojabohne (KIM et al., 1992; MASON et al., 1993) und palindrome Sequenzen im Cathepsin D Inhibitor-Promoter aus Tabak (ISHIKAWA et al., 1994) oder LOX1-Promoter aus Gerste (ROUSTER et al., 1997) identifiziert. Diese Sequenzen sind für die JA-Responsivität notwendig, aber nicht hinreichend. Neben vermuteten trans-agierenden Faktoren wurden in einigen Promotoren cis-Elemente entdeckt, die z.B. eine Induktion durch Zucker (KIM et al., 1992; MASON et al., 1993), Entwicklung (KEIL et al., 1989; LORBERTH et al., 1992) oder Verwundung (KEIL et al., 1989; PALM et al., 1990; THIPYAPONG und STEFFENS, 1997) vermitteln können.

#### **1.4. JASMONATINDUZIERTE PROTEINE DER GERSTE**

In unserer Arbeitsgruppe wurden die meisten Untersuchungen im Hinblick auf Jasmonatwirkung und Genexpressionsänderungen mit der Gerstenart *Hordeum vulgare* L. cv. Salome durchgeführt. Phänotypisches Merkmal einer JA- bzw. JM-Applikation an Gerstenblättern ist eine Blattvergilbung, die schon nach 24 h Inkubation erkennbar ist. Die Blätter verlieren außerdem ihre Turgeszenz. Diese Merkmale verstärken sich mit der Inkubationsdauer und werden dann irreversibel.

Die Jasmonatapplikation induziert die Expression spezifischer Gene und führt so zur *de-novo*-Synthese der jasmonatinduzierten Proteine (JIPs) mit den Molekulargewichten von 6 kDa, 10/12 kDa, 23 kDa, 30 kDa, 37 kDa, 52 kDa, 60 kDa, 88 kDa, 92 kDa, 98 kDa und 100 kDa



(WEIDHASE et al., 1987a; MÜLLER-URI et al., 1988; PARTHIER, 1991; ANDRESEN et al., 1992; REINBOTHE et al., 1992b; HAUSE et al., 1994; FEUßNER et al., 1995). Auch andere Induktoren wie Trockenheit, verschiedene Zucker oder ABA führen über einen endogenen Anstieg von Jasmonaten zur Akkumulation dieser Proteine im Gerstenblatt.

Die Proteine mit den molekularen Massen von 23 kDa, 37 kDa und 60 kDa akkumulieren am stärksten. Sie sind immunologisch untereinander nicht kreuzreaktiv (HERRMANN et al., 1989). Mit Hilfe monospezifischer, polyklonaler Antikörper gegen die abundantesten JIPs aus Gerste (*Hordeum vulgare*) wurde gezeigt, daß die auch in vielen anderen Pflanzenfamilien nach Jasmonatapplikation auftretenden Proteine immunologisch nicht in Beziehung zu den JIPs der Gerste stehen (HERRMANN et al., 1989).

Jasmonatinduzierte Proteine der Gerste sind kerncodiert und werden an cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert (WEIDHASE et al., 1987a). Die JIPs unterliegen einer unterschiedlichen Syntheserate und Akkumulation (MÜLLER-URI et al., 1988). Es finden, wenn überhaupt, dann nur kleine posttranslationale Modifikationen statt, die die Proteingröße nicht betreffen. Der Vergleich von *in vivo* markierten und *in vitro* translatierten JIPs zeigte identische Positionen im Polyacrylamidgel (MUELLER-URI et al., 1988).

Bisher konnten für fünf JIPs cDNA-Klone durch differentielles "screening" von cDNA-Banken, die aus jasmonatbehandelten bzw. dunkelgelagerten Gerstenblättern für JIP60 hergestellt wurden, isoliert werden (JIP6, JIP23, JIP37, JIP60, JIP100, s. Tab.1).

Funktionen sind nur für einige JIPs bekannt. JIP6 wurde über Sequenzhomologien als Blatthionin (ANDRESEN et al., 1992) identifiziert.

Die Funktion von JIP37 ist noch nicht geklärt. Kürzlich konnte aber eine Sequenzhomologie zu einer Phytase festgestellt werden (MAUGENEST et al., 1997).

Funktionelle Analysen mit JIP60 ergaben, das dieses Protein eine neue Form eines ribosomeninaktivierenden Proteins (RIP) ist, das eine regulative Rolle während der Proteinsynthese als Antwort auf Streßbedingungen vermittelt durch Jasmonate hat (CHAUDHRY et al., 1994, REINBOTHE et al., 1994b, GÖRSCHEN et al., 1997a). Lokalisiert ist JIP60 im Zytoplasma und im Zellkern (HAUSE et al., 1994).

Die Proteine mit den molekularen Massen von 92, 98 und 100 kDa wurden immunologisch als Lipoxygenasen (LOX, FEUßNER et al., 1995) identifiziert. LOX-92 und LOX-100 sind in den Chloroplasten lokalisiert. Für LOX-100 konnte eine cDNA isoliert werden, die in *E.coli* überexprimiert wurde. Diese rekombinante Lipoxygenase wurde als 13-LOX charakterisiert (VÖRÖS et al., 1998). Die Autoren diskutieren für LOX-100 eine Funktion in der Jasmonatbiosynthese ebenso wie die Degradation von chloroplastidären

Membranbestandteilen während phänotypisch seneszenzähnlichen Symptomen, die während einer JM-Behandlung auftreten.

Die abundanten JIPs werden sowohl nach JA- als auch ABA-Applikation exprimiert. Um die Signalwege von JA und ABA voneinander abkoppeln zu können, wurden in unserer Arbeitsgruppe mit Hilfe der Methode des "differential display" Gene identifiziert, die nur nach JA-Applikation induziert werden. Diese Gene, die *jrgs* (jasmonatregulierte Gene, Tab.1), werden nach JA-Applikation nur auf einem geringen Level exprimiert (LEE et al., 1996).

Nach Jasmonatapplikation am Gerstenblatt akkumuliert JIP23 am stärksten (WEIDHASE et al., 1987a). Bisher konnte keine Homologie zu Proteinen mit bekannter Funktion gefunden werden. Es besteht allerdings eine Homologie zu einem Protein aus *Atriplex canescens*, dessen Funktion aber unbekannt ist. Das Gen für dieses Protein wird durch Wassermangel induziert (CAIRNEY et al., 1995). Aus jasmonatbehandelten Blättern des Gerstenkultivars Carina konnte ein cDNA-Klon isoliert werden, der 923 bp und einen ORF für ein 23 kDa großes Translationsprodukt umfaßt (ANDRESEN et al., 1992).

JIP23 akkumuliert im JM-behandelten Gerstenblatt bis zu 25% der Gesamtproteinmenge (ROLOFF et al., 1994). Es ist im Zytoplasma, in der Vakuole, den Peroxisomen und bis zu einer Inkubationsdauer von 35 h auch im granulären Bereich des Zellkerns lokalisiert (HAUSE et al., 1994; HAUSE, persönl. Mitteilung). Durch *in situ* Hybridisierung wurde gezeigt, daß die Genexpression nach JM-Applikation in allen lebenden Zellen des Gerstenblattes stattfindet (RICHWIEN, 1993). In 48h JM-inkubierten Gerstenblättern konnte JIP23 immunzytologisch in den Epidermiszellen, den Mesophyllzellen (HAUSE et al., 1997) und Zellen des Phloems (HAUSE, persönl. Mitteilung) nachgewiesen werden.

Induziert wird die JIP23-Genexpression im Gerstenblatt nicht nur nach Applikation von Jasmonaten sondern auch ABA, Trockenstreß (REINBOTHE et al., 1992b), verschiedenen Zuckern bzw. Zuckeralkoholen (Glukose, Sorbitol, Polyethylenglykol u.a.). Die Genexpression korreliert dabei immer mit einem endogenen Anstieg von Jasmonaten (LEHMANN et al., 1995). Es erfolgt keine Induktion nach ebenfalls osmotisch wirkender NaCl-Applikation (kein endogener JA-Anstieg, LEHMANN et al., 1995), Verwundung oder Pathogenbefall (KOGEL et al., 1995; HAUSE et al., 1997).

Protein/cDNA	Induktion durch:	Proteinfunktion	Zitat
JIP6	JA, ABA, Sorbitol, Trockenstreß, Verwundung,	Blatthionin	Andresen et al., 1992
JIP23	JA, ABA, Sorbitol, Trockenstreß, verschiedene Zucker	Unbekannt	Andresen et al., 1992, Hause et al., 1996, Görschen et al., 1997b
JIP37	JA, ABA, Trockenstreß, verschiedene Zucker	Homologie zu Phytase	Leopold et al., 1994 und 1996, Maugenest et al., 1997
JIP60	JA, ABA	Ribosomeninaktivierendes Protein (RIP)	Becker und Apel, 1992; Chaudhry et al., 1994; Görschen et al., 1997a
JIP100	exogene JA	Lipoxygenase (LOX2-Typ)	Feussner et al., 1995; Vörös et al., 1998
<i>jrg1</i>	JA	Unbekannt	Lee et al., 1996
<i>jrg5</i>	exogene JA	Kaffeoyl-O-Methyltransferase	Lee et al., 1997
<i>jrg10</i>	JA	Homologie zu Chalconsynthase	Lee et al., 1996
<i>jrg12</i>	JA	Unbekannt	Lee et al., 1996

Tab.1: JIPs und *jrgs* der Gerste

### 1.5. ZIEL DER ARBEIT

Bisherige Untersuchungen zur Expression der JIP-Gene der Gerste bezogen sich ausschließlich auf die Induzierbarkeit durch exogen appliziertes Jasmonat bzw. ABA oder durch äußere Streßeinwirkungen wie etwa Trockenstreß und osmotischer Streß. Mehrfach (s. oben) war jedoch zumindest phänotypisch/physiologisch eine Rolle von JA auf Wachstums- und Entwicklungsprozesse beobachtet worden ohne molekulare Erklärung. Eine molekulare

Analyse der Jasmonatwirkung in der Entwicklung der Gerste wurde deshalb eine notwendige Aufgabe. Diesem Problem widmet sich die vorliegende Arbeit unter Nutzung von JIP23 als Reporterprotein.

Eine Möglichkeit die Funktion von JIP23 unter abiotischen Streß zu analysieren, ist die heterologe bzw. homologe Transformation mit einem JIP23-Gen. Die heterologe Transformation wurde in unserer Arbeitsgruppe paralell zu der in dieser Arbeit dargestellten Analysestrategie im Tabaksystem vorgenommen. Dabei wurden phänotypisch und biochemische Folgen einer JIP23-Überexpression analysiert (GÖRSCHEN et al., 1997b). Trotz jahrelanger Bemühungen standen erst nach Beginn meiner Untersuchungen erfolgversprechende Protokolle zur Gerstentransformation zur Verfügung und werden z.Zt. in unserer Arbeitsgruppe u. a. für die Funktionsanalyse von JIP23 angewendet.

Die hier gewählte Strategie beinhaltet die Analyse der *jip*-Expression in der Gerstenentwicklung mittels Northern-Hybridisierung und immunologisch an Westernblots bzw. durch *in situ*-Hybridisierung und immunzytologisch an Geweben. Das Expressionsmuster des Reportergens sollte so zeitlich und örtlich verfolgt werden. Gleichzeitig sollten Jasmonatbestimmungen durchgeführt werden, um den Einfluß der auftretenden endogenen Jasmonatmenge auf die Jasmonatwirkung (Expression des Reportergens) zu studieren und so bei bestehendem Zusammenhang eine Jasmonatmengenkorelation aufstellen zu können.

Da über Sequenzvergleiche in Datenbanken JIP23 keine Funktion zuzuordnen ist, sollte durch Auffinden einer zeitlich und örtlich spezifischen Expression und dem Untersuchen der Kompartimentierung der Isoformen dieses Proteins ein Zugang zur Klärung der Funktion gefunden werden.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. MATERIALIEN

#### 2.1.1. Pflanzenmaterial

Alle Experimente wurden mit Pflanzenmaterial der Sommergerste Kultivar Salome (*Hordeum vulgare* L. cv.Salome) durchgeführt. Die Anzucht von 6 - 7 Tage bzw. mehrere Wochen alten Pflanzen erfolgte in Erde unter Gewächshausbedingungen mit Dauerlicht ( $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) bei  $24^\circ\text{C}$  und einer relativen Luftfeuchte von 60%. Bis zu 3 Tage alte Keimpflanzen wurden durch Auslegen von Gerstensamen (Karyopse und Spelzen zusammen) auf feuchtem Filterpapier (2 Lagen) in Petrischalen, die mit Aluminiumfolie abgedunkelt wurden, bei  $24^\circ\text{C}$  angezogen. Als andere Gerstensorten bzw. Getreidearten kamen Sommergerste, *Hordeum vulgare* L. cv. Gelbel, Sommerweizen, *Triticum aestivum* cv. Hatri und Sommerroggen, *Secale cereale* cv. Petka zur Anwendung.

#### 2.1.2. Inkubationslösungen

Blattsegmente von 7 Tage alten Pflanzen oder Keimlinge (bis zu 3 Tagen alt) wurden für definierte Zeiten in Glasschalen bei RT (Blattsegmente unter Dauerlicht, Keimlinge auf durchtränktem Zellstoff und abgedunkelten Glasschalen) auf folgenden Lösungen inkubiert:  
 45  $\mu\text{M}$  (+)-Jasmonsäuremethylester (JM; Firmenich SA, Genf, Schweiz)  
 90  $\mu\text{M}$  (+)-Abscisinsäure (ABA; Serva, Heidelberg)  
 100  $\mu\text{M}$  Tetcyclacis (BASF, Dr. W. Rademacher, Limburger Hof)

#### 2.1.3. Bakterienstämme, Plasmide

Zur Plasmidamplifikation wurde der Stamm DH5 $\alpha$  (HANAHAN, 1985) des Bakteriums *Escherichia coli* verwendet.

Folgende rekombinante Plasmide kamen zur Anwendung:

<b>Klonbezeichnung</b>	<b>Insert</b>	<b>Referenz</b>
pHvJ3015	CDNA, für JIP23 codierend	ANDRESEN et al., 1992
pHvJS37	CDNA, für JIP37 codierend	LEOPOLD et al., 1996
pHvJ611	CDNA, für JIP60 codierend	BECKER und APEL, 1992

#### 2.1.4. Nährmedien und Antibiotika

LB-Medium:

1 %	Bacto-Trypton
0,5 %	Hefeextrakt
0,5 %	NaCl
plus 1,4 %	Bacto-Agar für Festmedien

TFB-Medium:

Lösung 1:	12 g	Bacto-Trypton	Lösung 2:	2,31 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	24 g	Hefeextrakt		12,54 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ad 100 ml
	4 ml	Glycerin ad 900 ml			

Nach dem Autoklavieren wurden 9 Teile Lösung 1 und 1 Teil Lösung 2 gemischt.

Antibiotika

Die im folgenden aufgelisteten Antibiotika kamen bei der Amplifikation von Bakterienklonen zum Einsatz:

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin in H <sub>2</sub> O	100 mg/ml	100 µg/ml
Tetracyclin in 70% EtOH	5 mg/ml	20 µg/ml
Chloramphenicol in 100% EtOH	30 mg/ml	30 µg/ml

Tab.3: Antibiotikaanwendungen

Alle Stammlösungen wurden sterilfiltriert.

**2.1.5. Protein-Antikörper**

Antikörper gegen die jasmonatinduzierbaren Proteine JIP23, JIP37 und JIP60 standen in der Arbeitsgruppe zur Verfügung und wurden angewendet:

Antikörper-bezeichnung:	AK gegen Protein:, aus Species:	Protein zur AK-Gewinnung isoliert aus/über:
anti-JIP23	JIP23, <i>H. vulgare</i> cv. Salome	2D-PAGE und His-tag Reinigung des im Klon pJC40-23 exprimiertem Proteins
anti-JIP37-his	JIP37, <i>H. vulgare</i> cv. Salome	His-tag Reinigung des im Klon pJC40-37 exprimierten Proteins
anti-JIP60	JIP60, <i>H. vulgare</i> cv. Salome	1D-PAGE

Tab.2: Antikörper gegen JIPs der Gerste

**2.2. METHODEN****2.2.1. Isolation von Nukleinsäuren****2.2.1.1. Isolation von pflanzlicher genomischer DNA (gDNA)**

Die Isolation von gDNA aus Gerste erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von WIENAND und FEIX (1980) in folgenden Arbeitsschritten:

- 10 g Pflanzenmaterial mit flüssigem Stickstoff mörsern
- Aufnahme des entstandenen Pulvers in 20 ml Extraktionspuffer
- Inkubation des Gemisches für 1 h bei 4 °C unter leichtem Schütteln
- Entfernung von Proteinen durch Extraktion mit jeweils 1 Vol. Phenol, Phenol/Chloroform (1:1), Chloroform (je 10 min zentrifugieren, 6000 rpm)
- Fällung der Nukleinsäuren mit 1 Vol. Isopropanol, 5 min RT,
- Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 6000 rpm
- Pellet mit 70%igem EtOH waschen
- resuspendieren des Pellets in 1x TE-Puffer
- RNase-Behandlung für 30 min bei 37 °C (50µg/ml)
- nochmals Extraktion der Lösung mit 1 Vol. Chloroform
- Fällung der gDNA mit 1/10 Vol. 3 M NaCl und 2,5 Vol. EtOH (30 min, -20 °C)
- Zentrifugation 15 min bei 4 °C und 6000 rpm
- Pellet waschen, trocknen und in einem geeigneten Vol. 1x TE-Puffer resuspendieren

<u>Extraktionspuffer:</u>	50 mM	Tris-HCl pH 7,6
	50 mM	EDTA
	100 mM	NaCl
	10 mM	β-Mercaptoethanol
	2 %	SDS

#### Phenol:

Phenol muß vor der Verwendung zum Extrahieren von Proteinen mit einer wässrigen Lösung gesättigt werden da ansonsten ein Verlust der wässrigen Nukleinsäurelösung durch Übergang dieser in die phenolische Phase auftritt.

- Phenol 2 - 3 mal mit dem gleichen Volumen der jeweils nötigen wässrigen Lösung (1x TE für Nukleinsäuren, 0,1 M Tris für Proteine) ausschütteln

<u>10x TE-Puffer:</u>	100 mM	Tris-HCl pH 8,0
	10 mM	EDTA

#### **2.2.1.2. Isolation von pflanzlicher Gesamt-RNA**

Die RNA wurde nach einem modifizierten Protokoll von LOGEMANN et al. (1987) isoliert. Hierzu wurden alle Lösungen und Arbeitsgeräte RNase-frei gemacht bzw. sterilisiert und mit Handschuhen zur Vermeidung von Kontamination mit Rnasen gearbeitet.

- 1 g Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver mörsern
- Zugabe von 4 ml Lysispuffer (s. unten) und 4 ml Phenol zum Pulver
- weiterhin mörsern bis zum Auftauen
- Überführung der Lösung in Zentrifugengläser und Zugabe von 2 ml Chloroform
- nach kräftigem Schütteln bei 4 °C für 10-20 min zentrifugieren (12000 rpm)
- nochmals Extraktion der wässrigen Phase mit: 4 ml Phenol/Chloroform im Verhältnis 1:1  
und 4 ml Chloroform
- jeweils 10 min bei 4 °C und 12000 rpm zentrifugieren
- Fällung der RNA mit 0,6 Vol. Isopropanol, 1 h bei -20 °C

- abzentrifugieren der RNA für 5 min bei 4 °C, 12000 rpm
- Pellet in 1 ml RNase-freiem H<sub>2</sub>O lösen
- erneute Fällung der RNA mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2,5 Vol. EtOH für mindestens 1 h bei -20 °C
- Zentrifugation wie oben, waschen des Pellets mit EtOH und trocknen im Vakuum
- resuspendieren der RNA in einem geeigneten Vol. H<sub>2</sub>O

Lysispuffer:	100 mM	Tris-HCl pH 8,6
	2 %	Sarcosyl (w/v)
	25 mM	EDTA
	25 mM	EGTA
	100 µM	β-Mercaptoethanol

### 2.2.1.3. Isolation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde mit der Methode der (1) alkalischen Lyse nach BIRNBOIM und DOLY (1979) für die Sequenzierung und Präparationen im größeren Maßstab bzw. (2) nach einem Protokoll von SERGHINI et al. (1989) für Minipräparationen isoliert.

#### (1) Alkalische Methode

Die jeweils in Klammern stehenden Angaben beziehen sich auf die Isolation einer größeren Menge an Plasmid-DNA.

- animpfen von 2 ml (20 ml) LB-Medium (s. 2.1.4., mit entsprechendem Antibiotikum) mit einer Bakterieneinzelkolonie
- inkubieren über Nacht bei 37 °C unter Schütteln
- sedimentieren der Bakterien-Übernachtskultur, 1 min, 10.000 rpm, 4 °C
- resuspendieren des Pellets in 100 µl (1 ml) kalter Lösung 1
- Zugabe von 2 mg/ml Lysozym und Inkubation für 5 min bei RT
- Zugabe von 200 µl (2 ml) Lösung 2, vorsichtig mischen und 5 min im Eisbad inkubieren
- vorsichtig mit 150 µl (1,5 ml) Lösung 3 mischen und weitere 5 min im Eisbad belassen
- 20 min zentrifugieren bei 4 °C und 15000 rpm
- im Überstand RNA bei 37 °C für 30 min verdauen (RNase A 50µg/ml)
- extrahieren mit je 1 Vol. Phenol (s.2.2.1.1.) bzw. Chloroform, je 5 min zentrifugieren
- fällen der DNA mit 2,5 Vol. EtOH
- nach 1 h Inkubation bei -20 °C für 10 min zentrifugieren, 4 °C, 15000 rpm
- Pellet mit 70%igem EtOH waschen, vakuumtrocknen und in 1x TE-Puffer (s. 2.2.1.1.) lösen

#### Lösung 1:

50 mM Glukose  
10 mM EDTA  
25 mM Tris-HCl pH 8,0

#### Lösung 2:

0,2 N NaOH  
1 % SDS  
(frisch)

#### Lösung 3:

3 M Natriumacetat pH 4,8





**(2) RNA-Formaldehyd-Elektrophorese**

RNA wurde mit 3 V/cm Elektrodenabstand in denaturierenden Agarosegelen folgender Zusammensetzung aufgetrennt:

1,5 % Agarose (w/v)  
3,9 % Formaldehyd (v/v)                      in Elektrophorese-Puffer

10 µg RNA wurden zuvor denaturiert mit: 17 µl Denaturierungspuffer für 15 min, 65 °C  
- Inkubation für 1 min im Eisbad  
- Zugabe von 5 µl RNA-Probenpuffer

Elektrophorese-Puffer:	10 mM	Natriumphosphat pH 6,5 (Mischung aus Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O und NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O)
	1,76 %	Formaldehyd (v/v)
Denaturierungs-Puffer:	50 %	Formamid (v/v), gereinigt
	7,4 %	Formaldehyd (v/v)
	10 mM	Natriumphosphat pH 6,5
	10 mM	EDTA pH 8,0
RNA-Probenpuffer:	0,5 %	SDS (w/v)
	25 %	Glycerin (v/v)
	0,25 %	Bromphenolblau (w/v)
	5 mM	EDTA pH 8,0
	50 µg/ml	Ethidiumbromid

**2.2.4. Methoden zur Fixierung von Nukleinsäuren auf Trägermembranen**

Um spezifische DNA- oder RNA-Moleküle durch Hybridisierung mit DNA-Sonden nachweisen zu können, müssen die Nukleinsäuren nachdem sie in Gelen der Größe nach aufgetrennt wurden, auf eine geeignete Trägermatrix übertragen und fixiert werden. Benutzt wurde ungeladene Nylonmembran (porablot NYamp, 0,2 µm, Macherey & Nagel).

Die Übertragung erfolgte sowohl für (1) DNA (Southernblot) als auch für (2) RNA (Northernblot) durch Kapillartransfer für ca. 16 h (Aufbau wie in Standard-Literatur angegeben, z.B. MANIATIS, 1982).

Nach Fotografieren der DNA- bzw. RNA-Muster mittels UV-Licht, wurde das Gel wie folgt behandelt:

**(1) Southernblot:**

Depurinisierung mit 0,25 N HCl, 15 min

Denaturierung mit 0,5 N NaOH, 30 min

Neutralisierung mit 1,5 M NaCl / 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5, 15 min

**(2) Northernblot:**

Äquibrierung in 20 x SSC, 20 min

Nylonmembran 5 min in sterilem H<sub>2</sub>O und 5 min in 20 x SSC inkubieren.

Es folgte der Aufbau des Kapillarblots.

20 x SSC:	3 M	NaCl
	0,3 M	Natriumcitrat

Die transferierten Nukleinsäuren wurden anschließend durch UV-Bestrahlung (UV-Stratalinker<sup>®</sup> 1800, Stratagene, Heidelberg) und backen bei 80 °C für 2 h fixiert.

**2.2.5. DNA-Fragmentisolierung aus Agarosegelen**

DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurden mit Hilfe des “QIAEX Gel Extraction Kit” der Firma QIAGEN (Hilden) nach dem Herstellerprotokoll isoliert. Das Prinzip beruht auf der Bindung von DNA an speziell aktivierte Silicagel-Partikel und somit das einfache Isolieren und Reinigen der gebundenen DNA im gleichen Reaktionsgefäß. So isolierte Fragmente kamen markiert als Sonden für Hybridisierungen zum Einsatz.

**2.2.6. Hybridisierung von Nukleinsäuren**

Das Prinzip der Hybridisierung beruht auf der Paarung von einzelsträngigen homologen Nukleinsäurebereichen und dient zur Detektion von Genen oder deren Transkripten. Dazu wird ein DNA-Fragment eines schon bekannten Genes bzw. einer bekannten cDNA, dessen homologe Sequenz in Gesamt-RNA bzw. -DNA detektiert werden soll, markiert.

**2.2.6.1. Markierung von DNA-Sonden**

DNA-Fragmente wurden mit Digoxigenin-11-Desoxyuridintriphosphat (DIG-11-dUTP) durch “random priming” markiert. Dazu diente ein “DIG-high prime labeling kit” der Firma Boehringer, (Mannheim).

Die Reinigung der markierten Probe von nichtinkorporierten Nukleotiden erfolgte über Sephadex<sup>®</sup> G-50 Säulen (NICK<sup>™</sup> Columns, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) nach Angaben des Herstellers.

Durch den Vergleich der markierten DNA mit DNA-Sonden bekannter Konzentration im “dot-blot”-Verfahren wurde die zur Hybridisierung nötige Menge bestimmt.

Die Markierung mit DIG-11-dUTP dient zum Sichtbarmachen der hybridisierenden Nukleinsäurebereiche durch die Möglichkeit der Bindung von Antikörpern am Digoxigenin. Diese Antikörper sind wiederum mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (AP) assoziiert. Alkalische Phosphatase setzt geeignete Substrate um, was zu Farbniederschlägen (NBT/X-Phosphat) bzw. Chemilumineszenz (CSPD) führt.

### 2.2.6.2. Hybridisierung und Detektion

Mit den markierten Proben wurde sowohl DNA als auch RNA, auf Trägermembranen fixiert oder während der *in situ*-Hybridisierung in Semidünnschnitten, hybridisiert.

#### Vorhybridisierung:

-in Hybridisierungsröhren (blue max™, Falcon®, oder Bachofer, 4,5 cmØ)  
1-2 h bei der jeweiligen Hybridisierungstemperatur (60 - 65°C) mit ca. 10 ml

Prähybridisierungslösung:   0.25 mM   Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
  1 mM    EDTA  
  20 % (w/v)   SDS  
  0,5 % (w/v)   “Blocking reagent” (Boehringer, Mannheim)

#### Hybridisierung:

-DNA-Sonde denaturieren, 5 min 95 °C, 1 min Eisbad und in 5-10 ml vorgewärmter Prähybridisierungslösung gegen die alte Lösung austauschen

-Inkubation für 10 - 16 h im Hybridisierungssofen bei der jeweiligen Hybridisierungstemperatur unter ständiger Durchmischung

Entfernung von nicht gebundenen Sondenmolekülen durch waschen mit:

20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
1 mM EDTA  
1 % (w/v) SDS  
2x 20 min bei der jeweiligen Hybridisierungstemperatur

Detektiert wurden die Hybridmoleküle nach folgenden Arbeitsschritten bei RT:

- 5 min äquilibrieren in Puffer 1
- 1 h inkubieren in Puffer 2
- 30 min inkubieren in Puffer 2 mit Anti-DIG-AP-Konjugat (1:15000 = 50mU/ml)
- 4x 10 min waschen mit Puffer 1, zur Entfernung ungebundener Antikörper
- 5 min äquilibrieren in Substratpuffer

#### **entweder:**

5 min Inkubation in Substratlösung CSPD, anschließend Einschweißen in Folie und Exponierung mit Röntgenfilm (AGFA,ISO 9001) für geeigneten Zeitraum

#### **oder:**

Inkubation im Dunkeln bis zum sichtbaren Farbniederschlag in Substratlösung NBT/BCIP und anschließend Abstoppen der Reaktion mit 20 mM Tris-HCl pH 2,9 / 1 mM EDTA

Puffer 1:                   0,3 M    Maleinsäure  
  3 M    NaCl  
  0,3 % (w/v)    Tween 20                   pH 8,0

Puffer 2:                   0,5 % (w/v)    “Blocking reagent”    in Puffer 1

<u>Substratpuffer:</u>	100 mM	Tris-HCl	
	100 mM	NaCl	
	50 mM	MgCl <sub>2</sub>	pH 9,5

CSPD (Boehringer, Mannheim) 1 % (v/v) in Substratpuffer

NBT/BCIP 35 µl NBT (75 mg/ml in 70 % DMF)  
45 µl BCIP (50 mg/ml in DMF)  
(in 10 ml Substratpuffer)

### 2.2.7. Transformation von rekombinanten Plasmiden

Zur Amplifikation von zur Hybridisierung benutzten Sonden wurden die fremdgenenthaltenden Vektoren in Bakterien transformiert.

Die Übertragung der rekombinanten Plasmide erfolgte in kompetente Bakterienzellen, die nach der Methode von MANDEL und HIGA (1970) vorbereitet wurden.

- animpfen von 5 ml LB-Medium (s. 2.1.4.) mit einer Bakterieneinzelkolonie
- inkubieren unter Schütteln bis zur OD<sub>550</sub> von 0,3 (37 °C, 200 rpm)
- überimpfen von 0,5 ml der Vorkultur in 30 ml frisches LB-Medium
- inkubieren bis zur OD<sub>550</sub> von 0,48
- abkühlen für 10 min im Eisbad
- 5 min zentrifugieren, 4000 rpm, 4 °C
- Pellet in 7,5 ml sterilem 0,1 M CaCl<sub>2</sub> vorsichtig resuspendieren
- 30 min im Eisbad lagern
- 5 min zentrifugieren (wie oben)
- Pellet in 0,65 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> resuspendieren
- vor Verwendung einige Stunden im Eisbad inkubieren, oder aber in Aliquots von 50 - 100 µl mit flüssigem Stickstoff schockfrosteten und bei -70 °C aufbewahren

In so vorbereitete Bakterienzellen wurden rekombinante Plasmide nach folgendem Protokoll übertragen:

- auftauen der Bakterienzellen und Lagerung für 10 - 60 min im Eisbad
- zugeben der DNA (maximal ¼ des Volumens) und inkubieren für 30 min im Eisbad
- Hitzeschockbehandlung für 1 min bei 42 °C, anschließend abkühlen 1 min im Eisbad
- zugeben von 400 µl LB-Medium oder Medium A
- Erholungsphase von 1 - 2 h bei 37 °C
- ausplattieren der Bakterienkultur in geeigneten Mengen auf LB-Festmedien

#### 2.2.7.1. Selektion positiver Klone

Eine Selektion auf die fremdgenenthaltenden Bakterien erfolgte über die vektorvermittelten Antibiotikaresistenzen bzw. die Umsetzungsmöglichkeit des Farbstoffes X-Gal durch β-Galaktosidase (MILLER, 1972). Fremdgene werden in das β-Galaktosidasegen kloniert, wodurch die Expression dieses Genes verhindert wird. Die fehlende β-Galaktosidase setzt den in das Wachstumsmedium zugegebenen Farbstoff X-Gal nicht zum Indoxylderivat um, welches

an der Luft zum blauen 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo oxydieren würde. So bleiben die Bakterienkolonien farblos. Als Induktor für die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase fungiert IPTG.

-Zusatz von 167  $\mu$ l 2 % X-Gal (in DMF) und 333  $\mu$ l 100 mM IPTG zu 100 ml LB-Festmedium (Antibiotikakonzentration wie unter Punkt 2.1.4. angegeben)

### 2.2.8. Isolation von Gesamt-Protein aus Pflanzen

Proteine wurden entweder gleichzeitig mit Gesamt-RNA, durch Ausfällung aus der ersten Phenolphase (s. 2.2.1.2.) oder nach einem Protokoll von MEYER et al. (1988) isoliert. Folgende Arbeitsschritte sind nach MEYER et al. dazu notwendig:

- zermörsern von 5 Blattsegmenten in flüssigem Stickstoff
- Zugabe von: 1 Spatelspitze Seesand
  - 3 ml Phenol (Tris-HCl pH 8,0-gesättigt)
  - 3 ml Tris-HCl pH 8,0 (phenolgesättigt)
- mörsern bis zum Auftauen
- 30 min unter rühren bei 4 °C inkubieren
- zentrifugieren bei RT, 10 min, 6000 rpm
- Phenolphase in neues Reagenzglas überführen
- Proteine mit 4 Vol. 0,1 M  $\text{NH}_4$ acetat in Methanol ausfällen (4 h, -20 °C)
- pelletieren mit 6000 rpm, 10 min
- waschen des Pellets mit 0,1 M  $\text{NH}_4$ acetat/Methanol
- lufttrocknen und aufnehmen in geeignetes Volumen 1x Probenpuffer

1x Probenpuffer:	3,4 ml	1 M Tris-HCl pH 6,8	
	5 ml	Glycerin	
	5,75 ml	20 % SDS	
	2,5 ml	$\beta$ -Mercaptoethanol	ad 50 ml

### 2.2.9. Isolation von Zellkernen und deren Proteinextrakt

Zellkerne aus Gerste wurden nach einem Protokoll von WILLMITZER & WAGNER (1981), modifiziert von MÖSINGER & SCHÄFER (1984), isoliert. Aus lebendem Blattmaterial wurden die Kerne wie folgt isoliert:

- zerschneiden von 20 g Blättern in 1 cm große Stücke
- spülen mit kaltem Wasser, anschließend mit Plasmolysepuffer
- Zugabe von 70 ml Plasmolysepuffer mit:
  - 220 mg Cellulase (Serva, aus *Aspergillus niger*)
  - 110 mg Pectinase (Serva)
- infiltrieren des Puffers in die Blattstücke durch Wasserstrahlpumpen-Vakuum, 2 x 3 min
- 70 min inkubieren bei RT unter Schütteln (ca. 200 rpm)
- abgießen der Lösung über Nylonnetz (45  $\mu$ m Porengröße)
- waschen der Blattstücke mit Puffer A
- überführen der Blattstücke in Becherglas und Zugabe von 10 ml Puffer A je g Blattmaterial
- 4x 15 sec. mixen mit Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel, IKA<sup>®</sup>-Labortechnik), zwischendurch im Eisbad kühlen

- filtrieren des Homogenats durch Nylonnetze mit 90 µm und nachfolgend 20 µm Porengröße (ohne Druck)
- zentrifugieren der Lösung 5 min mit 1500x g (alle Zentrifugationsschritte bei 4 °C)
- Pellet in Puffer A resuspendieren und mit 1,25 Vol. Puffer B gut mischen
- durch Nylonnetz (20 µm) filtrieren und 5 min mit 2500 rpm zentrifugieren
- Überstand nochmals 4 x zentrifugieren
- Pellets in Puffer C sammeln
- resuspendierte Pellets plus 1 Vol. Puffer C für 10 min zentrifugieren, 5000 rpm
- abpipettieren der oberen, die Kerne enthaltende Schicht
- zugeben von 3 Vol. Puffer A und zentrifugieren, 5 min, 3000 rpm (Kerne pelletieren)
- 2x waschen der Kerne mit NRB-Puffer, jeweils mit 3000 rpm pelletieren
- letztes Pellet in NRB-Puffer bei -20 °C aufbewahren oder frisch isolierte Kerne für weitere Analysen in geeignete Puffer aufnehmen

<u>Plasmolysepuffer:</u>	0,7 M	Mannitol oder Sorbitol
	10 mM	MES/NaOH pH 5,8
	5 mM	EDTA
	0,1 %	BSA (w/v)
	0,2 mM	PMSF

1x Puffer A: Mischung aus Puffer A1 und A2:

5x Puffer A1:	1,25 mM	Saccharose
	50 mM	NaCl
	25 mM	EDTA
	0,75 mM	Spermin
	2,5 mM	Spermidin
	50 mM	MES/NaOH pH 6,0
5x Puffer A2:	1,0 mM	PMSF
	3 %	Triton X-100 (v/v)
	10 %	Dextran (w/v)
	0,5 %	BSA (w/v)

<u>Puffer B:</u>	112,6 g	Percoll
	28,1 g	5x Puffer A1 mit HCl auf pH 6,0
	0,6 %	Triton X-100 (v/v)
	20 mM	β-Mercaptoethanol

<u>Puffer C:</u>	22,5 g	Percoll
	3 g	5x Puffer A1 mit HCl auf pH 6,0
	0,6 %	Triton X-100 (v/v)
	20 mM	β-Mercaptoethanol

<u>NRB-Puffer:</u>	20 %	Glycerin (v/v)
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10 mM	β-Mercaptoethanol
	50 mM	Tris-HCl pH 7,8

Proteinextraktion aus den Zellkernen:

- Aufnahme der Kerne in 1x Probenpuffer (s. 2.2.10.)
- Inkubation für 5 min im Thermoblock, 95 °C
- 3 min vortexen, 1 min zentrifugieren, 15000 rpm

**oder**

- frische Zellkerne zur Lyse in Lösungen verschiedener Salz- bzw. Detergenz-Konzentration aufnehmen und solange inkubieren, bis die Kerne lysiert sind (Beobachtung unter dem Mikroskop)
- anschließend zentrifugieren der Suspensionen (10 min, 15000 rpm)
- Überstand plus 1 Vol. 2x Probenpuffer (s. 2.2.8.)
- Pellet in 1x Probenpuffer aufnehmen

## 2.2.10. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Proteine wurden mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt.

### 2.2.10.1. Eindimensionale Auftrennung

Proteine wurden durch eine modifizierte SDS-PAGE nach LAEMMLI (1970) nach ihrem Molekulargewicht in der Minigelapparatur "Minivert" (Biotec-Fischer, Reiskirchen, Gelgröße: 80 x 60 x 1 mm) in 12 % igen PAA-Gelen vertikal aufgetrennt. Zur Erhöhung der Trennschärfe der Proteinbanden wurden die Proben vor dem Trenngel über ein geringerprozentiges Startgel konzentriert.

- vor Beladen des Gels, denaturieren der in 1x Probenpuffer befindlichen Proteine für 3 min bei 95 °C
- einlaufen der Proben in das Gel mit 20 mA/Gel für 30 min, anschließend weitere Auftrennung mit 40 mA/Gel
- Anfärbung der Proteine im Gel mit Coomassie- (DAVIS, 1964) oder Silberfärbung (BLUM et al., 1987)

oder Proteinblotting (s. 2.2.11.)

Gelpuffer:                    3 M    Tris-HCl pH 8,45  
                                     0,3 %    SDS (w/v)

Acrylamidlösung:            48 %    Acrylamid (w/v)  
                                     1,5 %    N,N'-Methylenbisacrylamid (w/v)

Trenngel: (12 %)            2,42 ml    Acrylamidlösung  
                                     3,3 ml    Gelpuffer  
                                     4,28 ml    H<sub>2</sub>O  
                                     10 µl    TEMED  
                                     40 µl    10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS)



Startgel:

0,5 ml	Acrylamidlösung
1,55 ml	Gelpuffer
4,2 ml	H <sub>2</sub> O
10 µl	TEMED
30 µl	10 % APS

Elektrophoresepuffer:

72 g	Glycin
15 g	Tris
5 g	SDS ad 5 l mit H <sub>2</sub> O

### 2.2.10.2. Zweidimensionale Auftrennung

Zweidimensional wurden die Proteine nach der Methode von O'FARRELL et al. (1975), modifiziert von WARING et al. (1978) aufgetrennt.

#### 1. Dimension:

isoelektrische Fokussierung (IEF) unter denaturierenden Bedingungen in PAA-Rundgelen (Ø 2 mm, Länge 140 mm)

PAA-Rundgellösung:

8,25 g	Harnstoff
2 ml	Acrylamid/Methylenbisacrylamidlösung (28,4 : 1,6)
3 ml	10 % NP 40 (v/v)
0,6 ml	Ampholin pH 5 - 8
0,3 ml	Ampholin pH 3,5 - 10
3 ml	H <sub>2</sub> O

filtrieren durch Zellulosenitratfilter (Sartorius AG, Göttingen, Porengröße 0,45 µm)

Zugabe von: 20 µl TEMED  
 25 µl 10 % APS (w/v)  
 Polymerisation für mehrere Stunden,  
 (Gele währenddessen mit 8 M Harnstoff-Lösung überschichten)

Probenvorbereitung: -65 µl Proteinlösung (in 1x Probenpuffer, s. 2.2.8.)

Zugabe von 3,5 µl Ampholin (pH 3,5 - 10)  
 25 µl 30 % NP 40 (v/v)  
 50 mg Harnstoff

Auftragen auf die Gele nach vollständigem Lösen des Harnstoffes

Durchführung der IEF:

Kathodenpuffer:	0,02 N NaOH
Anodenpuffer:	0,01 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>

(beide Puffer vor Nutzung entgasen)

-Auftrennung für 30 min mit 300 V, dann 10 - 14 h 500 V

-Rundgele anschließend aus den Glasröhrchen herausdrücken und in Äquilibrationslösung 2x 30 min inkubieren (äquilibrierte Rundgele sind bei -20 °C aufbewahrbar)

<u>Äquilibriumslösung:</u>	für 100 ml:	
	12,5 ml	Tris-HCl, pH 6,8 (0,5 M)
	12 ml	SDS (10%)
	10 ml	Glyzerin
	5 ml	β-Mercaptoethanol + 1 Spatelspitze Serva Blau G

-zur Bestimmung des pH-Gradienten: zerschneiden eines nicht äquilibrierten Rundgels in 1 cm Abschnitte

-Inkubation dieser Stücke einzeln in 1 ml H<sub>2</sub>O für ca. 2h und messen des jeweiligen pH-Wertes mit einer pH-Mikroelektrode (Ingold, Steinbach)

## 2. Dimension: SDS-PAGE in vertikalen Plattengelen der Größe 160 x 180 x 1 mm

-Auftrennung der Fokussierung in 12 %igen PAA-Gelen (Gellösungen und Elektrophoresepuffer s. 2.2.10.1.)

-äquilibrierte Rundgele mit Klebelösung auf das Plattengel auflagern

<u>Klebelösung:</u>	für 10 ml:	
	1 ml	Tris-HCl, pH 6,8 (2M)
	0,1 ml	10% SDS
	50 mg	Agarose
		lösen und auf 9,5 ml auffüllen
	+ 0,5 ml	β-Mercaptoethanol

Elektrophoresebedingungen: -Einlaufen der Proteine mit 20 mA/ Gel  
-weitere Auftrennung mit 40 - 50 mA/ Gel

nach erfolgter Auftrennung: -"blotting" der Gele oder Anfärbung mit Coomassie- bzw. Silberfärbung

### 2.2.11. Blotting von Proteinen

Zur Testung von Proteinextrakten mit speziellen Antikörpern wurden die in PAA-Gelen aufgetrennten Proteine auf Trägermembranen übertragen. Für diesen Proteintransfer wurde ein Protokoll nach KYHSE-ANDERSEN (1984) angewendet.

- zuschneiden von 2 x 8 Lagen Filterpapier und der Nitrozellulosemembran (BA 85, Schleicher & Schüll, Dassel, Porengröße 0,45 µm) auf Gelgröße
- äquilibrieren des PAA-Geles, der Membran und des Filterpapiers in Blotpuffer für 10 min
- Aufbau des "Blots" auf der Anodenplatte der Blot-Apparatur (Biotec-Fischer, Reiskirchen) wie folgt:

8 Lagen Filterpapier	
Membran	
PAA-Gel	
8 Lagen Filterpapier	
<u>Kathodenplatte</u>	(auf Luftblasenfreiheit achten!)

- Transfer für 90 min mit 0,8 mA/cm<sup>2</sup>

<u>Blotpuffer:</u>	3,05 g	Tris-HCl, pH 8,3	
	14,42 g	Glycin	
	200 ml	Methanol	
	0,75 g	SDS	ad 1 l

- zur Kontrolle des Transfers: reversible Anfärbung der Proteine auf der Membran mit "Fast-Green" nach WESTERMEIER (1990)

- anfärben der Membran für 5 min in Färbelösung
- entfärben mit H<sub>2</sub>O bis zum Sichtbarwerden der Proteinbanden
- dokumentieren des Proteinmusters als Xerokopie
- vollständige Entfärbung der Membran mittels 0,2 N NaOH

<u>Färbelösung:</u>	1 % Essigsäure (v/v)
	0,1 % Fast-Green (w/v) (Serva, Heidelberg)

### 2.2.12. Nachweis spezifischer Proteine mittels Antikörper

Nach Übertragung von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen können Proteine mit Hilfe ihrer Antikörper spezifisch detektiert werden. Dies erfolgte in folgenden Arbeitsschritten:

- blockieren unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubieren der Membran in Blockierungspuffer, 1 h unter schütteln
- inkubieren mit dem Primärantikörper (in Blockierungspuffer), 1 h  
(anti-JIP23 1 : 10.000, anti-JIP37 1 : 5.000, anti-JIP60 1 : 1.000)
- Waschschrte: 1x 5 min mit TBS-Puffer  
1x 10 min mit 0,05 % Triton X-100 (v/v) in TBS  
1x 5 min mit TBS-Puffer
- inkubieren mit dem Zweitantikörper, welcher mit Alkalischer Phosphatase konjugiert ist (Anti-rabbit IgG-AP, Boehringer, Mannheim), 1 h, 1 : 10.000 verdünnt in Blockierungspuffer
- Waschschrte: wie oben
- äquilibrieren der Membran für 5 min mit Substratpuffer (s. 2.2.6.2.)
- Farbe- bzw. Chemilumineszenzreaktion mit NBT/BCIP- bzw. CSPD-Lösung wie unter 2.2.6.2. beschrieben

<u>TBS-Puffer:</u>	50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	50 mM	NaCl

Blockierungspuffer: 3 % RSA (Rinderserumalbumin) in TBS-Puffer

### 2.2.13. Zytologische Arbeitsmethoden

Zur Lokalisation von JIP23 bzw. seiner mRNA in spezifischen Zellen bzw. Geweben wurden zytologische Methoden (Immunfluoreszenz, *in situ*-Hybridisierung) angewandt.

Einbettung von Pflanzenmaterial

Die Keimlinge wurden nach folgendem Schema in Polyethylenglykol (PEG) eingebettet:

Fixierung: Inkubation 10 - 16 h in:  
3 % Paraformaldehyd (w/v); 0,1 % Triton X-100 (v/v) in PBS-Puffer  
(5 min Infiltration mit Wasserstrahlpumpenvakuum)

Entwässerung: in aufsteigender Alkoholreihe (10, 30, 50, 70, 90, 96 % EtOH) je 1 h bei RT

Einbettungsschritte bei 55 °C:      PEG : EtOH = 1 : 3  
   PEG : EtOH = 1 : 1  
   PEG : EtOH = 3 : 1  
   100 % PEG                      jeweils 1 - 2 h Inkubation  
PEG ist hier ein Gemisch aus PEG 1500 und PEG 4000 im Verhältnis 2 : 1

Überführung der Keimlinge in Einbettungsformen und langsame Abkühlung

PBS:	135 mM	NaCl
	3 mM	KCl
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	8 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

Schneiden der eingebetteten Objekte

Zum immunhistochemischen Nachweis wurden 2 µm, für *in situ*-Hybridisierungen 5 µm dicke Schnitte mittels eines Rotationsmikrotoms (MICROM HM 335 E) angefertigt.

Diese Semidünnschnitte wurden auf vorbehandelte Objektträger durch Aufnahme an einen Tropfen 40 % PEG 6000 (in PBS) übertragen. Die Objektträger wurden vorher mit Poly-L-Lysinlösung (SIGMA) beschichtet, um die Gewebeschnitte auf den Objektträgern verankern zu können. Poly-L-Lysin ermöglicht durch seine Kationenstruktur Wechselwirkungen mit anionischen Strukturen der Gewebeschnitte, wodurch es zur Adhäsion zwischen Schnitt und Objektträger kommt.

Immunzytologischer Nachweis von JIP23

JIP23 konnte in Semidünnschnitten durch folgende Behandlungen detektiert werden:

- Inkubation der Objektträger 10 min in PBS in Glasküvetten
- 5 min in 0,1 M NH<sub>4</sub>Cl in PBS
- 5 min PBS
- 30 min 1 % BSA in PBS (w/v)
- 5 min 0,1% BSA in PBS
- 1 h Inkubation mit erstem Antikörper in feuchter Kammer bei 37 °C  
oder über Nacht bei 4 °C (anti-JIP23 1:1000 verdünnt)
- waschen 4 x 10 min 0,1 % BSA in PBS
- 1 h Inkubation mit dem zweiten Antikörper (fluoreszenzmarkierter Antikörper, FITC,

Fluoresceinisothiocyanat) in einer feuchten Kammer bei 37 °C in der Verdünnung von 1 : 60

- waschen 2 x 10 min in PBS
- 15 min Anfärbung mit 1 mg/l DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole, SIGMA, St. Louis, USA) in PBS
- waschen 2 x 10 min in PBS
- einschließen der Schnitte in Citifluor-glycerol (Citifluor Ltd., London) oder 0,2% (w/v) para-Phenylendiamin in Glyzerin (Zellkerne zeigen eine gelbe Fluoreszenz)
- auswerten der Objektträger mit einem Epifluoreszenzmikroskop "Axioplan" (Zeiss, Jena) mit folgenden Filtern: BP 485/20/ /FT 510/ /LP 520

### in situ-Hybridisierung

Die akkumulierte mRNA, die für JIP23 codiert, wurde mit Hilfe einer DIG-markierten cDNA-Sonde (Markierung s.2.2.6.1.) in den Gewebeschnitten detektiert.

- waschen der auf Objektträger übertragenen Schnitte mit 0,01 M Tris-HCl pH 8,0 (10 min)
- 1 h inkubieren in 1 % BSA in 0,01 M Tris-HCl pH 8,0
- acetylieren mit 0,25 % Essigsäureanhydrid in frisch angesetztem 0,1 M Triethanolamin pH 8,0 für 10 min
- waschen 2x 5 min mit 2x SSC (s. 2.2.4.)
- prähybridisieren in einer feuchten Kammer 1 h bei 45 °C mit 1 - 3 ml Prähybridisierungslösung pro Objektträger:
 

50 %	Formamid
4 x	SSC
150 µg/ml	tRNA
0,5 %	"blocking reagent"
40 units/ml	RNasin
- austauschen der Prähybridisierungslösung durch Hybridisierungslösung (Prähybridisierungslösung mit DIG-markierter, denaturierter DNA-Sonde (100ng/ml)) und Inkubation 10 - 16 h bei 45 °C in feuchter Kammer
- waschen bei 45 °C: 10 min mit 50 % Formamid/4 x SSC  
10 min mit 4 x SSC  
5 min mit Wasser
- inkubieren bei RT für 5 min in Waschpuffer (100 mM Tris-HCl pH 7,5 / 150 mM NaCl)
- 30 min 1 % "blocking reagent" in Waschpuffer
- 1 h inkubieren mit Anti-DIG-AP-Konjugat (Boehringer, Mannheim) in einer Verdünnung von 1 : 3000
- waschen mit Waschpuffer 2 x 15 min
- äquilibrieren für 5 min in Substratpuffer (s.2.2.6.2.)
- inkubieren der Schnitte mit 100 µl NBT/BCIP-Lösung (s. 2.2.6.2.) mit Deckglas in umgekehrter Orientierung in einer dunklen, feuchten Kammer bis zum Farbniederschlag
- abstoppen der Farbreaktion mit 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 2,9
- einschließen der Schnitte in Glycergen (SIGMA) oder Abstopplösung
- Auswertung erfolgt mit der Hellfeld- und der differentiellen Interferenzkontrastmikroskopie mit dem Mikroskop "Axioplan" (Zeiss, Jena)

#### 2.2.14. “tissue-printing”

Diese Methode, die von CASSAB und VARNER (1987, 1989) entwickelt wurde, erlaubt einfach und schnell Proteine, für die ein spezifischer Nachweis vorliegt (Antikörper, proteinspezifische Farbreaktion), in Geweben nachzuweisen.

Dazu wurde frisches Pflanzenmaterial (z.B. Blatt, Keimling) senkrecht angeschnitten und der herausquellende Zellsaft auf Zellstoff abgetupft. Danach wurde die Schnittfläche auf zuvor mit 0,2 M  $\text{CaCl}_2$  behandelte Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell BA83, Porengröße 0,2  $\mu\text{m}$ ) für etwa 2 Sekunden gepresst.

Die so aus dem Zellsaft an der Membran fixierten Proteine konnten nun mit Antikörpern auf das Vorhandensein bestimmter Proteinspezies getestet werden (s. unter 2.2.12.).

Zuvor erfolgte noch eine reversible Proteinanfärbung (Amidoschwarzfärbung), um die Übertragungseffizienz des insgesamt fixierten Proteins auf der Membran abzuschätzen und zu lokalisieren.

##### Amidoschwarzfärbung:

- Filter 5 min mit 0,1% Amidoschwarz in 7% Essigsäure färben
- waschen mit  $\text{H}_2\text{O}$  bis der Hintergrund entfärbt ist
- festhalten des Abdruckmusters durch Xerokopieren
- entfärben der Membran in 0,2 M NaOH, anschließend nochmals mit  $\text{H}_2\text{O}$  spülen

#### 2.2.15. Osmolalitätsbestimmung

Das Ziel ist die Bestimmung der Osmolalität in Geweben. Das ist möglich über die Bestimmung des Gefrierpunktes des Zellsaftes.

(-1,858 °C entspricht 1 Osmol/kg  $\text{H}_2\text{O}$ )

Die Angaben erfolgten in MPa (1000 mOsm = 22,4 at, 1 at = 98066,5 Pa, 1 mOsm=0,002196 MPa) als Ausdruck des Zelldruckes.

Mit Hilfe eines geeichten Osmometers (Mikroosmometer, Firma Hermann Roebling Messtechnik) erfolgte die Bestimmung der Osmolalität verschiedener Keimlingsgewebe. Durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen der Gewebe und anschließendes Zentrifugieren wurde der Zellsaft gewonnen (etwa 50  $\mu\text{l}$  sind ausreichend). Geeicht und vermessen wurde nach dem Protokoll des Geräteherstellers.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. *Jip23*-EXPRESSION IN DER ENTWICKLUNG DER GERSTE (*Hordeum vulgare* cv. Salome)

Die Expression von jasmonatinduzierbaren Genen (*jips*) der Gerste wurde vielfach im photosynthetisch aktiven, reifen Primärblatt untersucht. Nach exogener Applikation von Jasmonaten bzw. einem exogen ausgelösten (z.B. durch Sorbitstreß, Trockenstreß) endogenen Anstieg von Jasmonaten werden JIPs neu synthetisiert. Diese Proteine sind hier die Antwort auf Jasmonate als ein Signal, das durch auftretende Streßbedingungen auslösbar ist. Unklar ist aber, ob *jips* der Gerste auch entwicklungsabhängig exprimiert werden. Dieser Frage gelten die im vorliegenden Abschnitt dargestellten Untersuchungen. Unterschiedliche Stadien der Gerstenentwicklung in der Samenreifung, in der Samenkeimung und Keimlingsentwicklung wurden auf das Vorhandensein von Genprodukten der *jips* in verschiedenen Organen und Geweben überprüft. Vorwiegend wurde die *jip23*-Expression analysiert, da JIP23 nach Jasmonatapplikation im Blatt am stärksten akkumuliert.

##### 3.1.1. *Jip23*-Expression während der Samenreifung

Untersucht wurden Gesamt-RNA und Gesamt-Protein aus Geweben der Ähren (Spelze, Granne, Karyopse) einer ausgewachsenen Gerstenpflanze (2-3 Monate alt, Gewächshausbedingungen s. 2.1.1.) auf das Vorkommen von JIP23-mRNA und JIP23. Vergleichsweise wurde die Blattbasis des jüngsten Blattes (Fahnenblatt) untersucht. Drei unterschiedliche Entwicklungsstadien der reifenden Karyopsen (umfaßt Embryo, Endosperm, Perikarp und Testa) wurden analysiert (Abb.3). Definiert wurden diese Stadien nach der Länge der Karyopse (**I**- 2mm, ca. 2 DAP (days after pollination); **II**- 8mm, ca. 9 DAP; **III**- 10mm, ca. 16 DAP; nach BOSNES et al., 1992).

JIP23-mRNA war nur in der Karyopse des ersten Stadiums und in der Spelze des ersten Entwicklungsstadiums zu detektieren. JIP23 war in allen Entwicklungsstadien bzw. Organen nachweisbar, jedoch in unterschiedlicher Menge. Beim Vergleich der detektierbaren Menge an Transkript bzw. Protein in Karyopsen und Spelzen war ein Abfall sowohl der

akkumulierten JIP23-mRNA als auch von JIP23 selbst vom ersten zum dritten Stadium hin zu erkennen. In der Karyopse des ersten Stadiums konnte die größte JIP23-mRNA-Menge detektiert werden und hier war auch JIP23 am stärksten zu finden. In der Granne und der Blattbasis war kein Transkript nachweisbar. JIP23 jedoch konnte nachgewiesen werden.

Die *jip23*-Expression findet während der Samenreifung der Gerste statt, verringert sich aber mit zunehmendem Reifegrad. Im vollständig ausgereiften, trockenen Samen (Abb.5, 0h) war keine *jip23*-Expression zu detektieren.

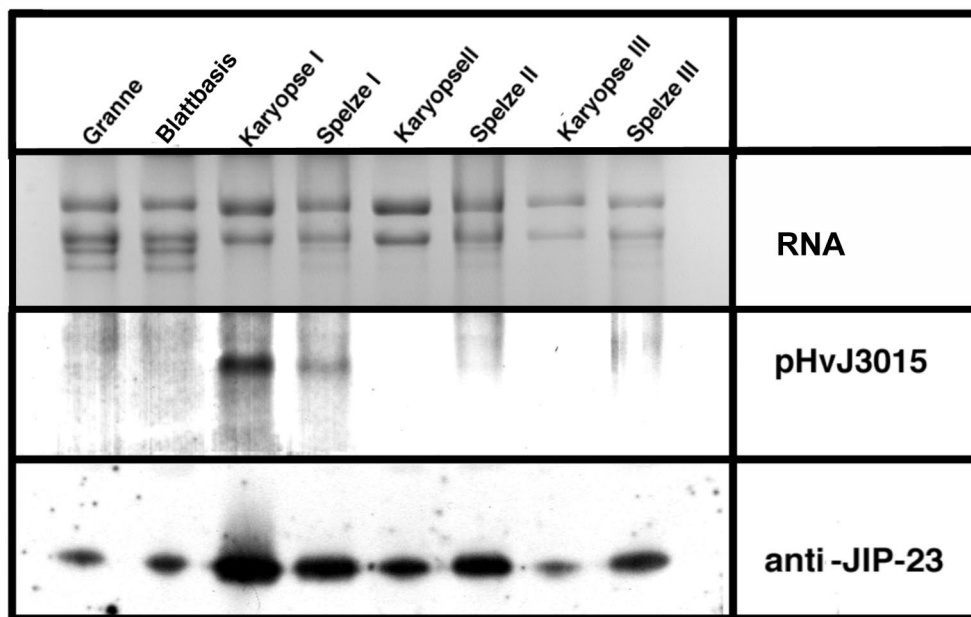


Abb.3

**Akkumulation von *jip23*-Genprodukten in Geweben reifender Ähren des Gerstenkultivars Salome.**

Je 10 µg Gesamt-RNA wurden nach Auftrennung und Übertragung auf eine Trägermembran mit der cDNA-Sonde für JIP23 (**pHvJ3015**) hybridisiert. Je 7 µg Gesamt-Protein wurden nach Auftrennung und Übertragung auf eine Trägermembran mit dem Antiserum gegen JIP23 (**anti-JIP-23**) getestet.

I, II, III sind Bezeichnungen für Karyopsenentwicklungsstadien, die im Text näher erläutert werden.

### 3.1.2. *Jip23*-Expression während der Keimlingsentwicklung

Gerstensamen der Sorte Salome wurden in Petrischalen zur Keimung gebracht (s. 2.1.1.) und zu den angegebenen Zeiten geerntet. Das Endosperm wurde vor dem Einfrieren in Flüssigem Stickstoff entfernt, da es bei der RNA-Isolation durch seinen hohen Gehalt an Kohlenhydraten die Qualität der RNA-Präparation beeinträchtigte.



Die Entfernung des Endosperms war deshalb möglich, weil immunologisch mit Hilfe eines „tissue-print“-Verfahrens (Gewebeabdruck) ausgeschlossen werden konnte, daß JIP23 im Endosperm vorkommt (Abb.4). Im Embryo war dagegen zu beiden ausgewählten Zeitpunkten nach Keimungsbeginn (24h und 72h) JIP23 nachweisbar.

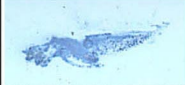

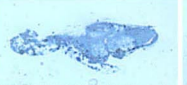

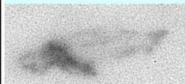
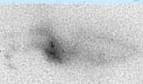
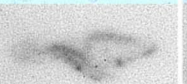
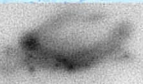
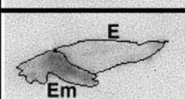
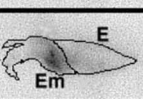
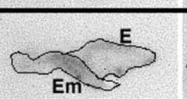
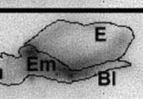
Keimlingsalter	24 h		72 h	
Amido-Schwarz-Färbung				
anti-JIP-23				
Schema				

Abb.4

**Akkumulation von JIP23 in der Keimlingsentwicklung der Gerste cv. Salome, durch Gewebeabdrücke veranschaulicht.**

Je 2 Keimlinge, 24h bzw. 72h alt, wurden längs halbiert und die aufgeschnittenen Hälften zur Übertragung der mit dem Zellsaft austretenden Proteine auf eine Trägermembran gepreßt. Gezeigt ist die Anfärbung der fixierten Proteine durch Amido-Schwarz, die Lokalisation von JIP23 (immunologisch detektiert mit anti-JIP23-Antikörpern) und ein Schema zum besseren Verständnis des Aufbaus der Keimlinge. E- Endosperm, Em- Embryo, Wu- Wurzel, Bl- Blatt

Das Vorkommen von JIP23 und seiner mRNA wurde im Verlauf der Keimlingsentwicklung bis 72 h nach Keimungsbeginn analysiert (Abb.5). Erstmals war JIP23-mRNA zwischen 15 und 25 h nach Keimungsbeginn nachweisbar.

Der anti-JIP23-Antikörper detektierte schon im trockenen Samen (0h) eine Proteinbande, die in ihrer Stärke konstant bis 15 h nach Keimungsbeginn war und im Vergleich zur JM-Kontrolle und den Proteinproben ab 25 h nach Keimungsbeginn ein etwas kleineres Molekulargewicht zu haben schien. Um zu prüfen, ob es sich um eine Kreuzreaktivität zu einer kleiner als 23 kDa großen Proteinbande handelt, wurden noch einmal in einem höherprozentigen PAA-Gel aufgetrennte Proteinextrakte von 14 h bis 22 h alten Keimlingen auf das Vorhandensein von JIP23 geprüft (Abb.6). Im Proteinextrakt von 20 h alten Keimlingen konnten zwei Proteinbanden detektiert werden (Pfeilkopf in Abb.6). Nach zweidimensionaler Auftrennung von Proteinextrakten aus 3 h alten Keimlingen und immunologischem Nachweis mit dem Antikörper gegen JIP23 konnten der Proteinbande mit kleinerem Molekulargewicht aus dem eindimensionalen Proteingel zwei Isoformen zugeordnet werden (nicht gezeigt). Diese haben andere isoelektrische Punkte als die JIP23-Isoformen (zu den Isoformen s. 3.5., Abb.16). Leider konnten diese zwei Isoformen aus einem

Coomassie-Gel nicht isoliert werden, da sie nur in geringer Menge vorhanden waren und nicht sauber von anderen auftretenden Proteinspots trennbar waren. Ein Ansequenzieren war auf diese Weise nicht möglich. Auch eine Affinitätschromatographie mit einer Säule, an die der Antikörper gegen JIP23 gebunden war, führte nicht zur Isolation und Konzentrierung dieser Isoformen (nicht gezeigt). Die Antigenität dieser Proteinspots zu anti-JIP23 war in der Chromatographiesäule nicht stark genug. Das deutet darauf hin, daß zwischen dem Antikörper anti-JIP23 und den beiden Proteinspots nur eine geringe Kreuzreaktivität besteht.

Das Auftreten der ab 20 h zu detektierenden JIP23-Proteinbande (Abb.6, Pfeilkopf) korreliert mit dem Beginn der *jip23*-Expression, die zwischen 15 und 25 h nach Keimungsbeginn liegt. Die Akkumulation von JIP23-mRNA und JIP23 nahm bis 56 h nach Keimungsbeginn zu. Danach wurde weniger Transkript nachweisbar, während die nachgewiesene Menge an JIP23 etwa gleich blieb (Abb.5).

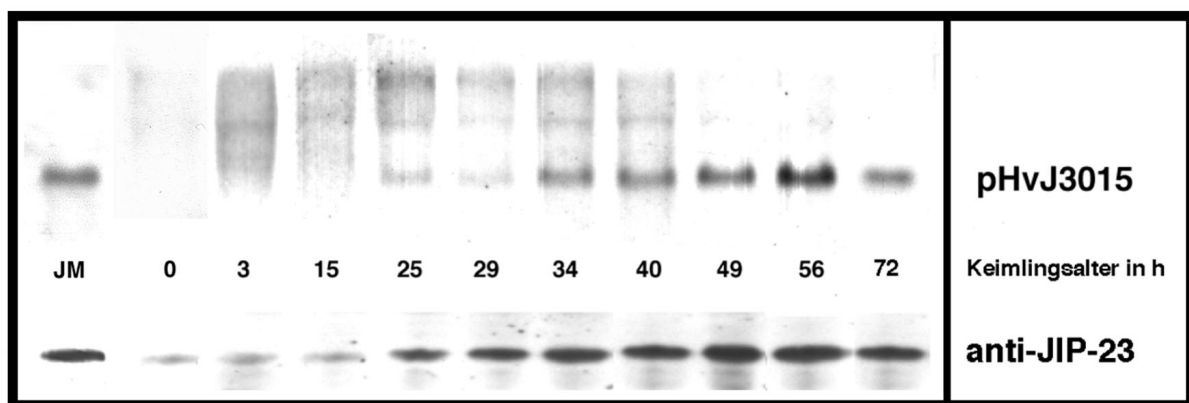


Abb.5

**Akkumulation von *jip23*-Genprodukten während der Keimlingsentwicklung der Gerste cv. Salome.**

Je 10 µg Gesamt-RNA bzw. 7 µg Gesamt-Protein wurden nach Auftrennung und Übertragung auf eine Trägermembran mit der cDNA-Sonde pHvJ3015 bzw. dem Antiserum gegen JIP23 getestet.

**JM**- Kontrollen: RNA (0,5 µg) und Protein (0,7 µg) aus 7 d alten Gerstenblättern, die für 24 h mit JM behandelt wurden.

Die Akkumulation von *jip23*-Genprodukten in Keimlingen wurde mit der im 7 Tage alten Blatt nach JM-Applikation (Flotierung auf 45 µM JM-Lösung, 24 h lang unter Dauerlicht von 120 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) auftretenden verglichen (Abb.5). Dabei mußte wegen großer JIP23-mRNA- bzw. JIP23-Mengenunterschiede zwischen Keimling und JM-behandelten Blatt für letzteres nur 1/20 (RNA) bzw. 1/10 (Protein) der Menge der Keimlinge aufgetrennt werden.

Dieser Vergleich zeigt, daß die Menge an JIP23 bzw. JIP23-mRNA im Maximum der Akkumulation während der Keimlingsentwicklung (bei Betrachtung des gesamten Keimlings) etwa 1/10 jener Menge erreicht, die im Blatt nach 24 h JM-Applikation akkumuliert.

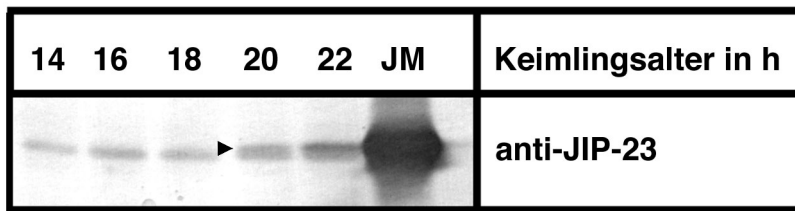


Abb.6

**Kreuzreaktivität des Antiserums gegen JIP23 in Keimlingen der Gerste cv. Salome.**

Je 7 µg Gesamtprotein von verschieden alten Keimlingen wurde nach PAGE-Auftrennung im 14%igen Gel und Fixierung auf einer Trägermembran mit dem Antiserum anti-JIP23 getestet. Der Antikörper zeigt eine Kreuzreaktion zu einer Proteinbande, die kleiner als 23 kDa ist. Der Pfeilkopf zeigt die Proteinprobe, in der JIP23 zuerst detektierbar ist.

**JM**- Kontrollprotein aus 24 h JM-inkubierten Blattsegmenten (7 d alt)

### 3.1.3. *Jip23*-Expression in verschiedenen Geweben von unterschiedlich alten Keimlingen

Zeitlich und räumlich differenzierte Genexpressionsänderungen sind ein Merkmal von Entwicklungsvorgängen. Deshalb wurde die *jip23*-Expression über das bisher analysierte Keimlingsalter hinaus bis zu 22 Tagen nach Keimungsbeginn sowie in verschiedenen Geweben und Organen detektiert.

Für die Verfolgung des zeitlichen Verlaufs der *jip23*-Expression nach Keimungsbeginn, wurden vollständige Keimlinge analysiert. Nicht nur Größe und Gewicht der Keimlinge nahmen mit dem Alter zu. Die Proportionen der einzelnen Gewebe zueinander unterlagen ebenfalls einer ständigen Änderung. Das Scutellum z.B. nahm an Größe nicht zu. Dafür fand ein Wachstum der Wurzeln und des Sproßes statt. Da anzunehmen war, daß die Akkumulation von JIP23 nur in bestimmten Geweben erfolgt, war die Auswertung des zeitlichen Verlaufs der *jip23*-Expression durch Analyse des gesamten Keimlings erschwert. Auch deshalb wurden vergleichende Analysen einzelner Gewebe und zytologische Untersuchungen (*in situ* Hybridisierung, immunzytologischer Nachweis) verschieden alter Keimlinge durchgeführt.

### 3.1.3.1. *Jip23*-Expression in verschiedenen Geweben und Organen von 6 Tage alten Keimlingen

Wiederum ist das Endosperm vor der Isolation von RNA und Protein entfernt worden. Die gewaschenen Pflanzen, deren Primärblatt im Durchschnitt 9 cm lang war, wurden mit einem Skalpell in 9 Abschnitte geteilt: Wurzel (1), Scutellum (2), Mesokotyl (Übergang von der Wurzel zum Sproß, 3), Koleoptile (4), Blattbasis (1 cm, 5) und Primär- und Sekundärblatt (6-9). Primär- und Sekundärblatt wurden nicht voneinander getrennt, sondern gemeinsam nochmals in 4 Abschnitte von je 2 cm Länge zerteilt. In Abbildung 7 ist diese Teilung des Keimlings schematisch dargestellt.

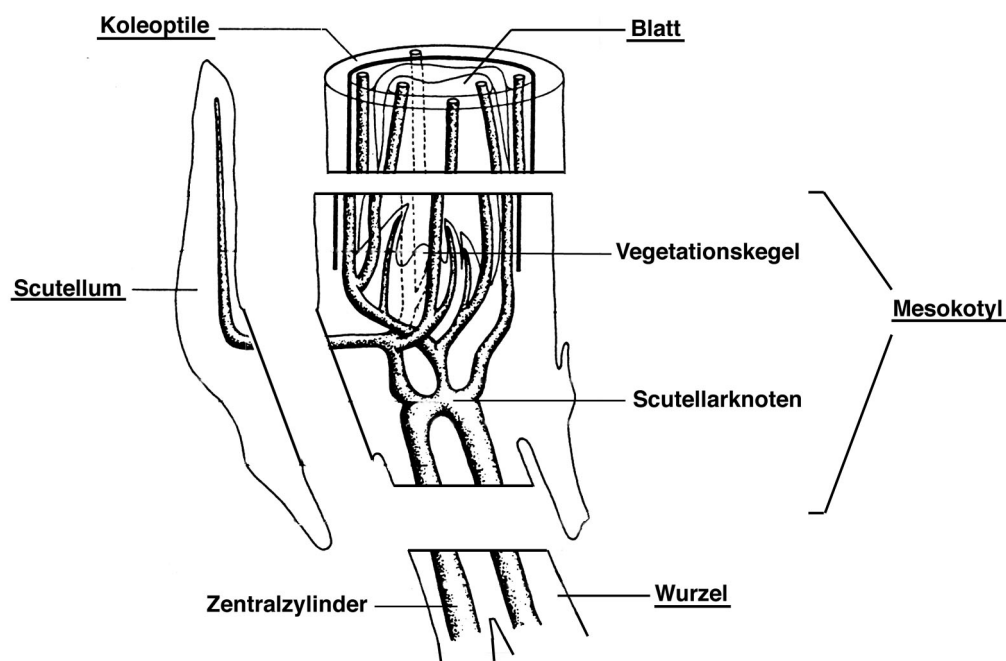


Abb.7

**Schematische Ansicht eines zerlegten Gerstenkeimlings.** (verändert nach Esau 1965 und Hause et al. 1996)  
Blatt- und Wurzelbereich sind nur teilweise dargestellt. Unterstrichen wurden die in Abb.8 als Proben genutzten Gewebe bzw. Organe.

Die gewonnenen Gewebe bzw. Organe aus 6 Tage alten Gerstenkeimlingen wurden bezüglich des Vorhandenseins von JIP23-mRNA und JIP23 analysiert und verglichen (Abb.8). JIP23-mRNA war im Scutellum, im Mesokotyl und in der Blattbasis detektierbar. JIP23 war dagegen in allen untersuchten Geweben bzw. Organen, wenn auch in unterschiedlichen Mengen nachweisbar. So wurde nur sehr wenig JIP23 in Wurzel, Koleoptile und ebenfalls in den Blattabschnitten gefunden. Außerdem war eine stetige Abnahme der Menge von JIP23 von der Blattbasis bis zur Blattspitze (Abb.8, Probe Blatt 8.+9. cm) zu erkennen. Die stärkste

JIP23-Akkumulation zeigte das Scutellum. In Mesokotyl und Blattbasis konnten etwa gleiche JIP23-Mengen nachgewiesen werden, die aber geringer als im Scutellum waren.

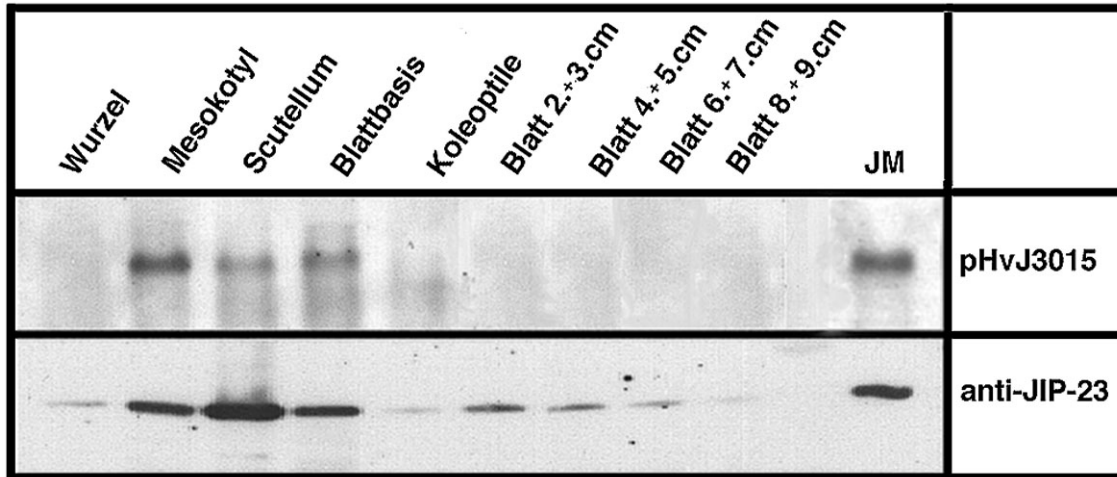


Abb.8

**Akkumulation von *jip23*-Genprodukten in Geweben 6 Tage alter Keimlinge der Gerste cv. Salome.**

Die zur RNA- bzw. Proteinisolierung genutzten Gewebe wurden, wie in Abb.7 dargestellt, voneinander getrennt. Als Blattbasis wurde der erste Zentimeter der Blätter oberhalb des Vegetationskegels definiert. Primär- und Sekundärblatt wurden nicht voneinander getrennt, sondern zusammen in je 2 cm lange Segmente zerschnitten.

**JM**- Kontrollen: RNA (0,5 µg) und Protein (0,7 µg) aus 7 d alten Gerstenblättern, die für 24 h mit JM behandelt wurden.

Je 10 µg Gesamt-RNA bzw. 7 µg Gesamt-Protein wurden nach Auftrennung und Übertragung auf eine Trägermembran mit der cDNA-Sonde pHvJ3015 bzw. dem Antiserum gegen JIP23 geprobt.

Die nachgewiesenen Transkript- und Proteinmengen korrelieren nur teilweise miteinander. Im Mesokotyl akkumulierte die größte JIP23-mRNA-Menge. Hier war aber weniger JIP23 als im Scutellum zu finden. Umgekehrt verhielt sich die Relation für das Scutellum: Bei stärkster JIP23-Akkumulation lag weniger JIP23-mRNA als im Mesokotyl vor.

Zum Vergleich der auftretenden Mengen von *jip23*-Genprodukten wurde wiederum RNA bzw. Protein von 24 h mit JM behandelten Blättern im Verhältnis 1:20 bzw. 1:10 (gegenüber Keimlingsproben) aufgetragen.

### 3.1.3.2. *Jip23*-Expression in Geweben von 6, 8 und 22 Tage alten Keimlingen

Um die *jip23*-Expression in Geweben/Organen unterschiedlicher Entwicklungsstadien zu prüfen, wurden Gewebe verschieden alter Gerstenkeimlinge auf das Vorhandensein von JIP23-mRNA und JIP23 getestet.

Von sechs, acht und 22 Tage alte Keimlingen wurden jeweils drei Proben (1- Wurzel, 2- Scutellum und Mesokotyl, 3- Blattbasis mit Koleoptile, s. Abb.7) analysiert.

JIP23 konnte in allen Proben detektiert werden (Abb.9). Die Menge an JIP23 nahm aber mit zunehmendem Alter der Keimlinge ab. Zu allen untersuchten Zeiten war in der Probe, die Scutellum und Mesokotyl enthält (2), die größte Menge an JIP23 zu finden.

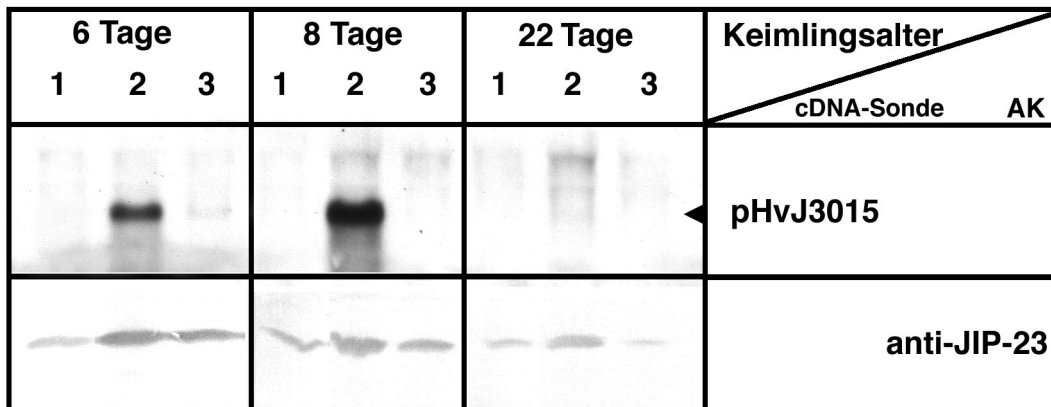


Abb.9

**Akkumulation von JIP23-Genprodukten in Organen 6, 8 bzw. 22 Tage alter Keimlinge der Gerste cv. Salome.**

1: Wurzel, 2: Scutellum und Mesokotyl, 3: Blattbasis (1 cm), (siehe auch Abb.7)

Je 10 µg Gesamt-RNA bzw. 7 µg Gesamt-Protein wurden nach Auftrennung und Übertragung auf eine Trägermembran mit der cDNA-Sonde pHvJ3015 bzw. dem Antiserum gegen JIP23 getestet.

Im Scutellum und Mesokotyl konnte JIP23-mRNA zu allen untersuchten Zeiten nachgewiesen werden, war allerdings am 22. Keimungstag nur noch in äußerst geringer Menge vorhanden. Am 6. Keimungstag war außerdem noch eine geringe Transkriptmenge in der Blattbasis zu detektieren. In Wurzeln konnte, obwohl hier JIP23 akkumuliert, keine JIP23-mRNA gefunden werden.

### 3.1.4. Gewebespezifische Lokalisation der *jip23*-Expression im 48 h alten Keimling

Den makroskopischen Analysen sollten nun zytologische Untersuchungen zur Lokalisation der *jip23*-Expression in den Geweben folgen. Dazu dienten sowohl die Methode der *in situ*-Hybridisierung zum Nachweis von JIP23-mRNA als auch die Immunfluoreszenzdetektion des JIP23-Vorkommens.

In Abbildung 10 sind Querschnitte durch 48 h alte Gerstenkeimlinge dargestellt. Die schematische Darstellung zeigt die Schnittebenen zur besseren Orientierung im Keimling an (vgl. auch Abb.7).

Die *jip23*-Expression war im 48 h alten Keimling in den epidermalen Zellen des Scutellums, die an das Endosperm angrenzen detektierbar (Abb.10b-b''). Auch im Leitgefäßsystem des Scutellarknotenbereiches (Abb.10d-d''') und in der Wurzelbasis (Abb.10c-c'') war *jip23*-Expression nachzuweisen. Koleoptile und Blattbasis wiesen JIP23-mRNA und JIP23 nur in den Leitbündeln auf (Abb.10a-a''). In der Blattbasis konnte JIP23 nur in sehr geringer Menge in den Leitbündeln detektiert werden (nicht gezeigt), während seine mRNA gut nachweisbar war (Abb.10a'). In Scutellum und Scutellarknotenbereich waren JIP23-mRNA und JIP23 kolokalisiert. Im Zentralzylinder von Wurzel und den Leitbündeln von Koleoptile und Blatt war JIP23-mRNA in Zellen, die den Tracheen des Xylems benachbart waren detektierbar, während JIP23 im Phloembereich und in der Koleoptile auch in Bündelscheidenzellen vorzufinden war.

Im Zentralzylinder der Wurzelbasis war JIP23 zwischen den Xylemsträngen, im Phloembereich vorhanden. Das wird besonders gut sichtbar durch die Eigenfluoreszenz (gelb-orange) der Xylemzellwände in Abb.10c (Pfeilkopf). Auch im Scutellarknotenbereich ist die Eigenfluoreszenz der Tracheidenzellwände gut zu erkennen (Abb.10d''', Pfeilkopf in d'''). Das Vorkommen von JIP23, erkennbar an der grünen Fluoreszenz, war dagegen immer in den Zellen des angrenzenden Phloems nachweisbar. Die in Abbildung 10c, d''' und d'''' sichtbare gelbe Fluoreszenz der Zellkerne ist auf den Zusatz von para-Phenylendiamin als Antibleichmittel in der Einbettungslösung zurückzuführen.

Das Phloem konnte eindeutig durch Anilinblaubehandlung der Schnitte identifiziert werden. Anilinblau färbt die auf den Siebplatten der Siebröhren des Phloems abgelagerte Kallose an. Außerdem wurden mit einem Antiserum gegen die H<sup>+</sup>-ATPase die Geleitzellen, die durch ihren hohen Gehalt an H<sup>+</sup>-ATPase gekennzeichnet sind (MICHELET und BOUTRY, 1995) markiert. Unter Nutzung dieses Markers für Geleitzellen wurde mit Hilfe des anti-JIP23-Antikörpers JIP23 in den Geleitzellen des Phloems in 6 Tage alten Keimlingen lokalisiert (vergleiche HAUSE et al. 1996 im Anhang).

Im 6 Tage alten Keimling war die *jip23*-Expression in den gleichen Geweben nachweisbar wie im 48 h alten Keimling. Im Unterschied zu 48 h alten Keimlingen konnte aber in 6 Tage alten Keimlingen JIP23 nicht nur in den epidermalen Zellen, sondern auch in den

parenchymatischen Zellen, also allen Zellen des Scutellums gefunden werden. In den Parenchymzellen des Scutellums wurde hier mehr JIP23 lokalisiert als in den Epidermiszellen des Scutellums (vgl. Abb.10b-b'' mit HAUSE et al. 1996, Abb.6b im Anhang). Im 48 h alten Keimling wurde JIP23 dagegen nur in einigen Parenchymzellen des Scutellums nachgewiesen (Abb.10b).

Als Ergebnis der Lokalisationsstudien der *jip23*-Expression im Keimling konnte festgestellt werden, daß eine JIP23-Akkumulation in vorrangig jenen Geweben stattfindet, die dem Nährstofftransport dienen. Das sind sowohl Zellen des Phloems im Leitgefäßsystem als auch epidermale und parenchymatische Zellen des Scutellums.

Abb.10

**Gewebespezifische Lokalisierung der *jip23*-Genprodukte im Keimling der Gerste cv. Salome.**

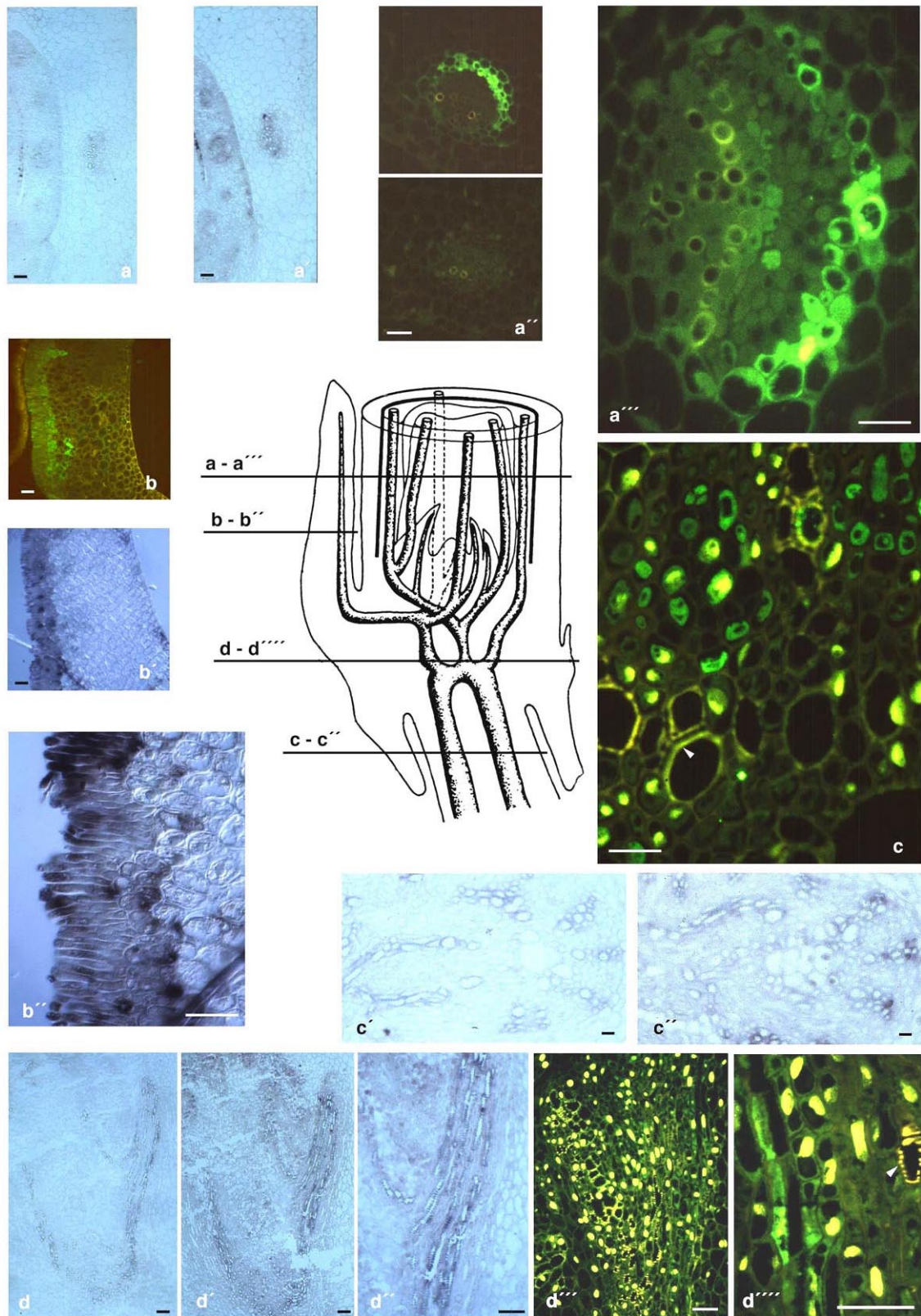
48 h alte Keimlinge wurden in verschiedenen Ebenen quer geschnitten und das JIP23-Transkript durch *in situ*-Hybridisierung mit der cDNA pHvJ3015 bzw. das Protein JIP23 durch indirekte Immunfluoreszenz mit FITC-konjugierten Antikörpern nachgewiesen.

Das Schema dient zum Einordnen der gewählten Schnittebenen im Keimling.

**(a - a'')** **Schnitt durch Primärblatt und Koleoptile.** (a)- *in-situ*-Hybridisierung ohne cDNA pHvJ3015 zur Kontrolle. Niederschlag bildet sich nur an den stark verdickten Wänden der Xylemgefäße. (a')- *in situ*-Hybridisierung mit cDNA pHvJ3015. Nur Zellen des Koleoptilenleitbündels (rechte Bildseite), die dem Xylem dicht benachbart sind und Zellen des Phloems der Leitbündel des Primärblattes (linke Bildseite), zeigen eine durch den blau-violetten Farbniederschlag (NBT/BCIP) sichtbare Markierung. (a'')- Markierung von JIP23 im Koleoptilenleitbündel mit anti-JIP-23 (grüne Fluoreszenz in der oberen Bildhälfte). Keine Markierung sichtbar nach Kontrolle mit dem Präimmunserum gegen JIP23. (a''')- Vergrößerte Darstellung eines mit anti-JIP23 getesteten Koleoptilenleitbündels. Die Markierung von JIP23 ist im Phloembereich und Zellen der dem Phloem benachbart liegenden Bündelscheide zu erkennen. **(b - b'')** **Querschnitt durch das Scutellum.** (b)- Markierung von JIP23 im Scutellum, besonders in den länglichen Epidermiszellen. (b')- *in-situ*-Hybridisierung im Scutellum, ebenfalls ist die Markierung vorwiegend in den Epidermiszellen zu finden. (b'')- Vergrößerung aus (b'). **(c - c'')** **Querschnitte durch den Wurzelbasisbereich.** (c)- JIP23-Markierung im Wurzelbasisbereich. Die Markierung liegt zwischen den Xylemsträngen (gelbe Autofluoreszenz der Xylemzellwände, s. Pfeilkopf), im Phloembereich. (c')- *in-situ*-Hybridisierung ohne cDNA pHvJ3015 zur Kontrolle. Niederschlag bildet sich nur an den stark verdickten Wänden der Xylemgefäße. (c'')- *in-situ*-Hybridisierung mit cDNA pHvJ3015. Markiertes Transkript ist in den Xylemsträngen dicht benachbarten Zellen zu finden. **(d - d''')** **Querschnitte oberhalb des Scutellarknotens.** (d)- *in-situ*-Hybridisierung ohne cDNA pHvJ3015 zur Kontrolle. Spezifische Markierung ist nicht zu erkennen. (d')- *in-situ*-Hybridisierung mit cDNA pHvJ3015. Markierung ist vor allem in den Leitbündeln zu finden, aber auch in angrenzenden parenchymatischen Zellen. (d'')- Vergrößerung aus (d'). (d''')- JIP23-Nachweis. Markierung befindet sich ebenfalls vor allem in den Leitbündeln. (d'''')- Vergrößerung von Phloem- und angrenzenden Xylemzellen (erkennbar an der gelb-orangen Autofluoreszenz des eingelagerten Lignins, s. Pfeilkopf). Die Zellkerne zeigen eine gelbe Fluoreszenz bedingt durch das Antibleichmittel (para-Phenylendiamin). Die Markierung ist hier eindeutig im Zytoplasma von an Siebröhren angrenzenden Zellen zu erkennen.

Die Balken repräsentieren jeweils 50 µm.





### 3.2. EXPRESSION ANDERER JIP-GENE IN DER KEIMLINGSENTWICKLUNG DER GERSTE (*Hordeum vulgare* L. cv. Salome)

Jasmonatresponsive Gene der Gerste codieren für Proteine mit unterschiedlichen molekularen Massen und Funktionen und sind insgesamt nicht einer Genfamilie zuzuordnen. Allerdings werden viele dieser Proteine durch Streßformen wie z.B. osmotischem Streß oder Trockenstreß gemeinsam synthetisiert. Deshalb sollte überprüft werden, ob diese simultane Genexpression nach exogener Streßbehandlung auch in dem Entwicklungsprogramm Keimung bzw. Keimlingsentwicklung abläuft.

Das Vorkommen und die Akkumulation von zwei mRNAs, die für JIP37 bzw. JIP60 codieren, wurde getestet. Es konnten keine mRNAs für JIP37 und JIP60 nachgewiesen werden (Abb.11). JIP37 und JIP60 akkumulieren ebenfalls nicht zu den angegebenen Zeitpunkten (nicht gezeigt).

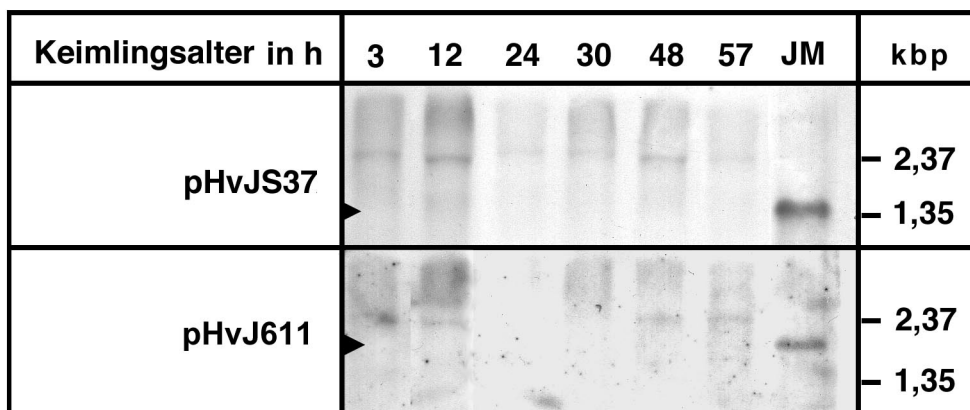


Abb.11

**Prüfung des Vorkommens von JIP37- und JIP60-mRNA während der Keimlingsentwicklung der Gerste cv. Salome.**

Je 10 µg Gesamt-RNA wurde nach Auftrennung und Übertragung auf eine Trägermembran mit der cDNA-Sonde pHvJS37 (JIP37) bzw. pHvJ611 (JIP60) hybridisiert.

**JM:** Kontroll-RNA (0,5 µg) aus 7 d alten Gerstenblättern, die für 24 h mit JM behandelt wurden

Das Vorkommen der Transkripte für JIP37 und JIP60 wurden ebenfalls in Keimlingen unterschiedlichen Alters (6, 8 und 22 Tage alt) analysiert. Die Keimlinge wurden vor Isolation der RNA wieder in drei Teile zerlegt (1- Wurzel, 2- Scutellum und Mesokotyl, 3- Blattbasis mit Koleoptile). JIP37- und JIP60-mRNA war auch hier in den drei verschiedenen Organen bzw. Geweben und zu den untersuchten Zeiten von 6, 8 und 22 Tagen nicht nachzuweisen (Abb.12).

6 Tage			8 Tage			22 Tage			Keimlingsalter cDNA-Sonde
1	2	3	1	2	3	1	2	3	
									— 2,37 ← 1,35 <b>pHvJS37</b>
									— 2,37 ← 1,35 <b>pHvJ611</b>

Abb.12

**Prüfung des Vorkommens von JIP37-mRNA und JIP60-mRNA in Organen 6, 8 bzw. 22 Tage alter Keimlinge der Gerste cv. Salome.**

1: Wurzel, 2: Scutellum und Mesokotyl, 3: Blattbasis (1 cm), (siehe auch Abb.7)

Je 10 µg Gesamt-RNA wurden nach Auftrennung und Übertragung auf eine Trägermembran mit der cDNA-Sonde pHvJS37 (JIP37) und der cDNA-Sonde pHvJ611 (JIP60) getestet.

### 3.3. VERGLEICH DES VORKOMMENS VON GENEN, DIE FÜR JIP23 CODIEREN, IN DEN GERSTENKULTIVAREN SALOME UND GERBEL

Eine JM-Behandlung von Primärblättern des Gerstenkultivars Gerbel (*H. vulgare* cv. hexastichon Alef, var. hybernum) führt im Gegensatz zu Kultivar Salome nicht zur Bildung von JIP23 (HERRMANN et al. 1989). Auch ABA oder Streßbehandlung wie Trockenstreß oder Sorbitflotierung, die zu einem endogenen Anstieg von Jasmonaten führen, sind im Gerbelblatt nicht von der Synthese von JIP23 begleitet (Abb.13). In dem Kultivar Salome dagegen findet die Bildung von JIP23 nach eben diesen Behandlungen statt (LEHMANN et al., 1995; REINBOTHE et al., 1992b).

Durch Southern-Analysen sollte geprüft werden, ob das Gerstenkultivar Gerbel als Verwandte von Gerstenkultivar Salome überhaupt ein *jip23*-Gen trägt.

Die vergleichende Untersuchung der genomischen DNA beider Gerstenkultivare sollte einen Ansatzpunkt zur Erklärung der verschiedenen Expressionsmuster bieten.

Genomische DNA wurde mit drei verschiedenen Restriktionsendonukleasen (HindIII, PstI, XbaI) gespalten und nach Auftrennung im Agarosegel und Übertragung auf eine Trägermembran mit einer cDNA-Sonde, die für JIP23 codiert, hybridisiert.

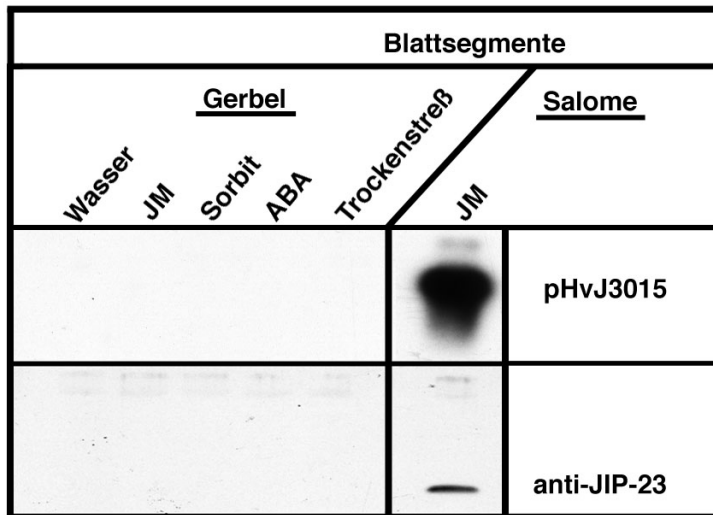


Abb.13

**Prüfung der *jip23*-Expression im Blatt des Gerstenkultivars Gerbel nach verschiedenen Streßbehandlungen.**

5 cm lange Blattsegmente von 7 Tage alten Primärblättern wurden für 24 h auf Wasser, 45 µM JM, 1M Sorbit, 100 µM ABA floriert bzw. einem Trockenstreß ausgesetzt, der bis zu einem Gewichtsverlust von 30 % führte. Als Kontrolle dienten für 24 h auf 45 µM JM florierte Blattsegmente des Gerstenkultivars Salome.

Je 10 µg Gesamt-RNA bzw. 7 µg Gesamt-Protein wurden nach Auftrennung und Übertragung auf eine Trägermembran mit der cDNA-Sonde pHvJ3015 bzw. dem Antiserum gegen JIP23 geprobt.

Es wurden mehrere, verschieden starke DNA-Fragmente zwischen 4 und 10 kb in der XbaI-Spaltung, zwischen 2 und 10 kb in der HindIII-Spaltung und größer als 9 kb in der PstI-Spaltung detektiert (Abb.14). Auffallend war ein zusätzliches DNA-Fragment in größerer Kopienzahl (stärkeres Signal), das in allen Restriktionen der Salome-DNA detektierbar war, nicht jedoch in den Restriktionen von Gerbel-DNA. Querstriche in Abbildung 14 markieren die in beiden Kultivaren vorkommenden gleich großen DNA-Fragmente, die Pfeilköpfe markieren die nur in Salome auffindbaren DNA-Fragmente. Die zusätzlichen DNA-Fragmente deuten darauf hin, daß in dem Genom des Gerstenkultivars Salome ein Gen mehr vorhanden sein könnte als im Genom der Gerbel.

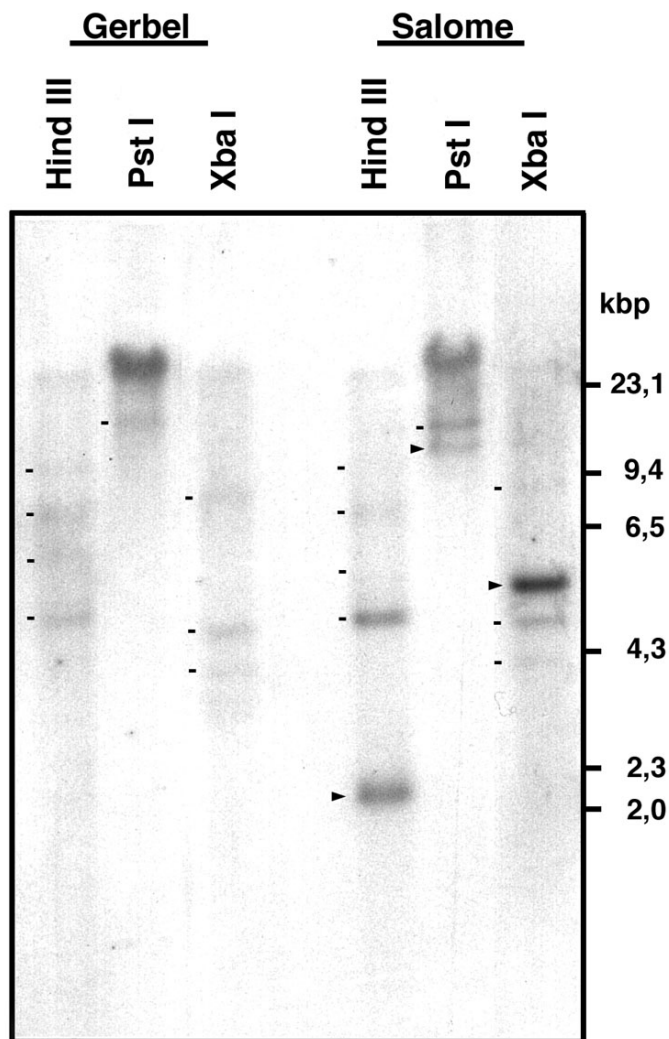


Abb.14

#### Analyse des/der Gene für JIP23 der Gerstenkultivare Gerbel und Salome.

Die rechtsseitig angebrachten Zahlen geben die molekulare Masse der Fragmente einer Hind III verdauten  $\lambda$ -DNA in kbp an. **Querstriche** kennzeichnen DNA-Fragmente, die in beiden Gersten-DNAs auftreten. **Pfeilköpfe** kennzeichnen die nur im Kultivar Salome vorkommenden DNA-Fragmente.

Je 10  $\mu$ g genomische DNA wurde mit 3 verschiedenen Restriktionsendonukleasen (Hind III, Pst I, XbaI) verdaut, im 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Trägermembran fixiert und mit der cDNA-Sonde pHvJ3015 (JIP23) hybridisiert.

### 3.4. *Jip23*-EXPRESSION IN KEIMLINGEN VERSCHIEDENER GETREIDEARTEN BZW. GERSTENKULTIVARE

Der Nachweis eines JIP23-Genes in dem Kultivar Gerbel, das JIP23 nach Behandlung mit Trockenstreß, Sorbit, JM oder ABA nicht bilden kann und offensichtlich ein Gen für JIP23 weniger besitzt als das Kultivar Salome, stellt die Frage, ob diese Kultivarunterschiede auch die *jip23*-Expression während der Keimung betreffen. Hierzu wurde die *jip23*-Expression in

den Kultivaren Gerbel und Salome während der Keimung analysiert. Neben der schon nachgewiesenen *jip23*-Expression in Salomekeimlingen (Abb.15, 6 und 7, vgl. auch Abb.5) konnte auch in Gerbelkeimlingen JIP23-mRNA und JIP23 detektiert werden (Abb.15, 1 und 2). Wie im Kultivar Salome war auch im Kultivar Gerbel keine JIP23-mRNA in der Wurzel nachweisbar (Abb.15, 3).

Da auch Roggen (*Secale cereale* L. cv. Petka) und Weizen (*Triticum aestivum* cv. Hatri) *jip23* bzw. ein homologes Gen tragen, wurden beide Arten ebenfalls auf *jip23*-Expression während der Keimung durch Detektion von mRNA und Protein analysiert. Auch in Roggen- und Weizenkeimlingen war *jip23*-Expression nachweisbar (Abb.15, 4 und 5).

Die Mengen an detektiertem Transkript und Protein sind zwischen Gerste, Roggen, und Weizen jedoch nicht direkt vergleichbar, da Samen mit unterschiedlicher Keimfähigkeit zur Aussaat kamen und die Kinetik der Keimung in den verschiedenen Getreidearten nicht identisch sein muß. Dies betrifft aber nicht die Aussage, ob *jip23*-Expression in der Keimung verschiedener Getreidearten und Gerstensorten stattfindet. Die Untersuchungsergebnisse zeigen eindeutig die *jip23*-Expression während der Keimung von Roggen, Weizen und den beiden Gerstenkultivaren Gerbel und Salome.

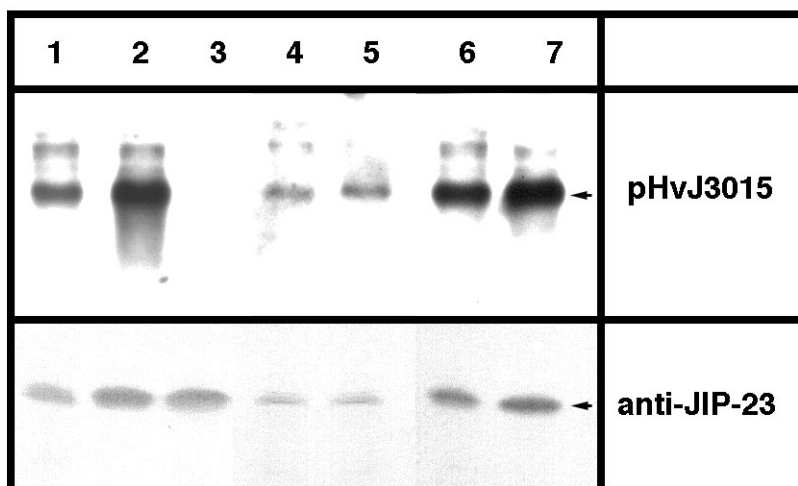


Abb.15

**Akkumulation von *jip23*-Genprodukten in Keimlingen verschiedener Getreidearten.**

1: Keimling, 32 h alt; 2: Keimlingsblatt, 48 h alt; 3: Keimlingswurzel, 48 h alt **Gerste cv. Gerbel**

4: Keimling, 24 h alt **Roggen cv. Petka**

5: Keimling, 48 h alt **Weizen cv. Hatri**

6: Keimling, 24 h alt; 7: Keimling, 32 h alt **Gerste cv. Salome**

Je 10 µg Gesamt-RNA bzw. 7 µg Gesamt-Protein wurden nach Auftrennung und Übertragung auf eine Trägermembran mit der cDNA-Sonde pHvJ3015 bzw. dem Antiserum gegen JIP23 geprobt.

### 3.5. ISOFORMEN VON JIP23 UND IHR UNTERSCHIEDLICHES AUFTRETEN IN KEIMLINGEN UND IN JM-BEHANDELTEN BLÄTTERN

Die *jip23*-Expression führt nach JM-Behandlung zu mehreren Isoformen von JIP23. Nach Auftrennung von Proteinextrakten aus jasmonatbehandelten Blättern wurden im Coomassiegefärbten PAA-Gel drei abundante Proteine von 23kDa mit unterschiedlichen IEP (Isoelektrischer Punkt) identifiziert. Auch nach verschiedenen Streßbehandlungen wie Flotierung auf Sorbitol (WASTERNACK et al., 1995, LEHMANN et al., 1995), Trockenstreß (REINBOTHE et al., 1992b) oder nach ABA-Applikation (LEHMANN et al., 1995) waren diese drei Isoformen nachweisbar. Ob während des Entwicklungsprogrammes Keimung und Keimlingsentwicklung andere Proteinisoformen auftreten als im gestreßten Blatt, sollten zweidimensionale Analysen von Proteinextrakten zeigen.

Verglichen wurden Proteinextrakte aus Keimlingen des Gerstenkultivars Salome und Gerbel und aus Blättern des Gerstenkultivars Salome, die für 72 h auf JM-Lösung flotiert waren. Die Proteinextrakte wurden mittels isoelektrischer Fokussierung und anschließender SDS-PAGE aufgetrennt, auf Trägermembranen übertragen und mit dem Antikörper gegen JIP23 getestet.

Die auftretenden Isoformmuster der einzelnen Proben wurden miteinander verglichen (Abb.16). Keimlinge beider Kultivare (Salome, Gerbel) enthielten in Art und Anzahl identische Isoformen von JIP23 (Abb.16A-C). Die Isoformen waren sowohl im Blatt als auch in der Wurzel zu finden und sind in Abbildung 16 jeweils nummeriert (Abb.16A, B).

In jasmonatbehandelten Gerstenblättern wurden sechs Isoformen detektiert (Nr.2-6). Nur fünf davon konnten auch in Keimlingen wiedergefunden werden (vergl. Abb.16A-C mit 16E, 2-6). Die mit Nummer 7 bezeichnete Isoform war nur in JM-behandeltem Blattmaterial zu identifizieren (Abb.16E). Die Isoform 1 konnte bei diesem Vergleich dagegen nur in Keimlingen detektiert werden. Durch die Mischung von Proteinextrakten aus Keimlingen und aus 72h JM-inkubierten Blättern wird der im Auftreten dieser zwei Isoformen bestehende Unterschied sehr gut sichtbar (Abb.16D).

Isoform 1 ist allerdings nicht keimlingsspezifisch. In 21h JM-inkubierten Blättern konnte diese Isoform detektiert werden (s. 3.6.2., Abb.20).

Die auftretenden Isoformen wurden nicht in gleicher Menge gefunden. In Keimlingen waren die Isoformen 4 und 6 sehr viel schwächer nachzuweisen als die übrigen. Um sie in Keimlingsproteinextrakten überhaupt darstellen zu können, wurden die in Abbildung 16 dargestellten Filter A, B und C stärker exponiert als die übrigen Filter. Dadurch erscheint Isoform 1, die aus Keimlingsproteinextrakt stammt, in Abbildung 16D schwächer als in Abbildung 16A. Isoformen 3, 4 und 6 traten im JM-behandelten Blatt stärker, Isoform 2 dagegen schwächer als im Keimling auf.

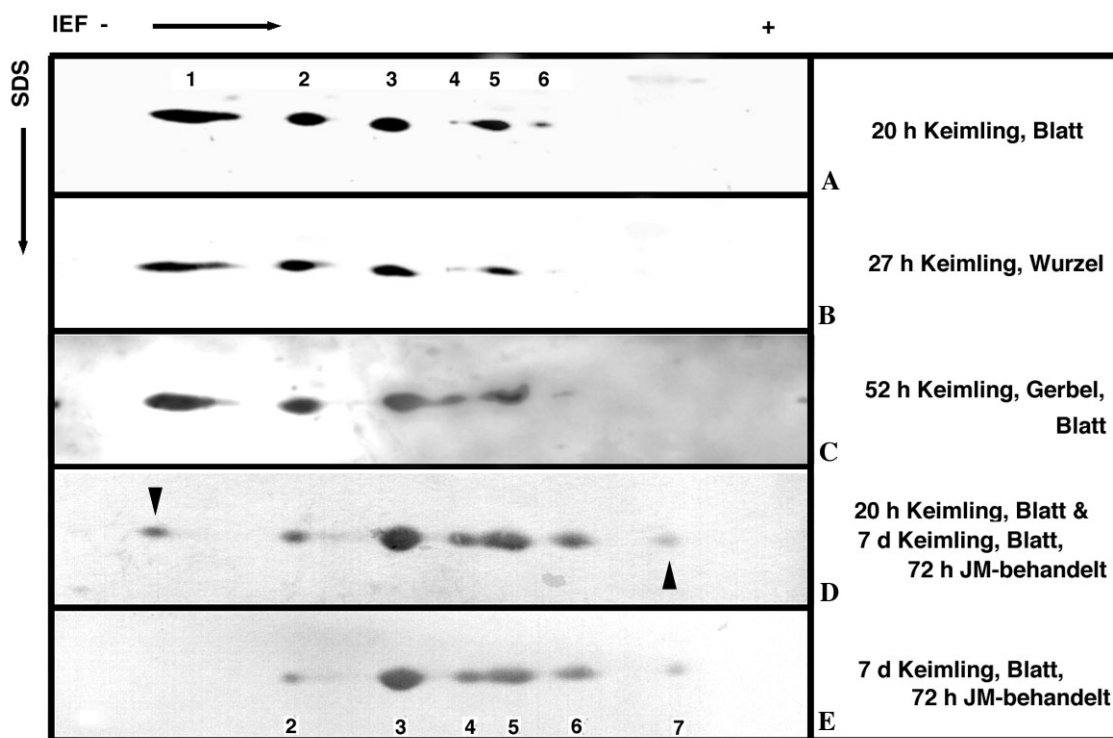


Abb.16

**Vergleich des Vorkommens von Isoformen von JIP23 in Proteinextrakten aus Keimlingen der Gerstenkultivare Salome und Gerbel und aus JM-behandelten Blattsegmenten der Gerste cv. Salome.**

Die Ziffern 1 bis 7 kennzeichnen die einzelnen Isoformen. Die Pfeilköpfe markieren die nicht in allen Proben detektierbaren Isoformen. Gesamtproteinextrakte (250 µg in A,B,C und 25 µg in E;) wurden zweidimensional durch isoelektrische Fokussierung und anschließende PAA-Gelelektrophorese (12 %) aufgetrennt. Nach Übertragung auf Trägermembranen wurde mit dem Antikörper gegen JIP23 geprobt. In D ist die Mischung von 250 µg Keimlings- und 25 µg JM-behandelten Blattproteinextrakt zum Bestimmen der identischen Isoformen gezeigt.

Der Unterschied in JIP23-Isoformenvorkommen zwischen Keimling und JM-behandelten Blatt besteht demzufolge nur in dem alleinigen Auftreten der Isoform 7 in JM-behandelten Blättern und den unterschiedlichen Mengenverhältnissen der Isoformen zueinander. Zwischen der Expression im Keimling und im JM-behandelten Blatt besteht ein Unterschied. Wie die Isoformen von JIP23 gebildet werden, kann durch die zweidimensionalen Analysen jedoch nicht geklärt werden.



### **3.6. VORKOMMEN VON JIP23 IM ZELLKERN**

Ursache für die Bildung mehrerer Isoformen eines Proteins kann eine Funktionsweise unter unterschiedlichen zellulären Bedingungen sein, die sich durch ein gewebespezifisches bzw. auch zellkompartimentspezifisches Auftreten der einzelnen Isoformen zeigt.

Das Vorkommen mehrerer Isoformen von JIP23 wirft die Frage auf, ob diese Isoformen spezifisch auf verschiedene Kompartimente der Zelle verteilt sind und so eine Separierung der Isoformen für weitere Studien sinnvoll macht.

Zellfraktionierungsstudien und Elektronenmikroskopie mit Immunogoldmarkierungen haben das Vorkommen von JIP23 in Mesophyllzellen eines JM-behandelten Blattes in den Peroxisomen, der Vakuole, dem Zytoplasma und dem granulären Interchromatinbereich des Zellkerns gezeigt (HAUSE et al., 1994). Darüber hinaus wurde durch immunzytologische Untersuchungen gezeigt, daß in der Kinetik der JM-Applikation JIP23 nur bis etwa 35 h im Kern zu detektieren war (HAUSE, persönliche Mitteilung). Nach diesem Zeitpunkt war JIP23 nur noch außerhalb des Zellkerns zu finden. JIP23, das an cytoplasmatischen Ribosomen gebildet wird (WEIDHASE et al., 1987a), scheint nach seiner Synthese in den Zellkern transportiert zu werden und ihn später wieder zu verlassen, obwohl es keinen Hinweis auf ein derzeit bekanntes Kernlokalisierungssignal in der Proteinsequenz gibt. Da hier ein Hinweis auf die Funktion von JIP23 zu erwarten war, wurde die zeitabhängige Kernlokalisierung von JIP23 näher untersucht.

#### **3.6.1. JIP23-Akkumulation außerhalb und innerhalb des Zellkerns**

Zellkerne wurden aus JM-behandelten Gerstenblattsegmenten isoliert und in der Qualität der Präparation lichtmikroskopisch kontrolliert (s. Abb.17).

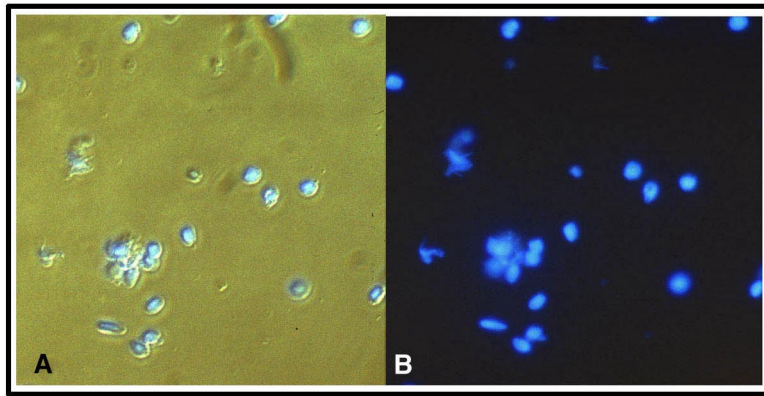


Abb.17

**Zellkernpräparation aus 21h JM-behandelten Gerstenblattsegmenten des Kultivars Salome.**

Nach der Zellkernpräparation wurden die Kerne auf Objektträger pipettiert und mit DAPI (Fluoreszenzfarbstoff zum Anfärben von Nukleinsäuren) angefärbt. In Bild (A) wurde differentielle Interferenzkontrastmikroskopie, in Bild (B) Epifluoreszenzmikroskopie angewendet.

Die Kernproteine wurden extrahiert und Gesamtproteinextrakt aus Gerstenblättern vergleichend immunologisch analysiert. Als Nachweis der Sauberkeit der Kernpräparation wurde ein Proteinextrakt aus 39 h alten unbehandelten Gerstenkeimlingen und deren Zellkernen mitgetestet.

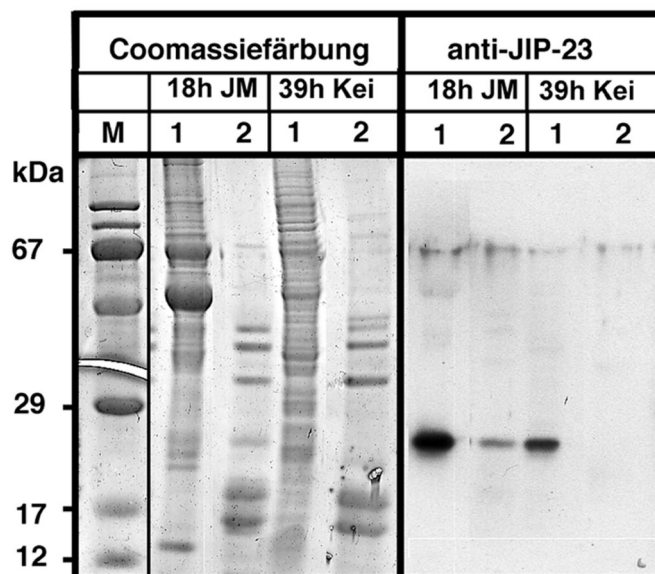


Abb.18

**Vergleich des Auftretens von JIP23 in Proteinextrakten aus Gewebe und aus Zellkernen von Keimlingen bzw. JM-inkubierten Blattsegmenten der Gerste cv. Salome.**

M- Markerproteine, 1- Gesamtproteinextrakt (7 µg), 2- Zellkernproteinextrakt (3 µg)

18h JM- Proteine aus 18 h JM-inkubierten Gerstenblättern, 39h Kei- Proteine aus 39 h alten Gerstenkeimlingen  
Proteinextrakte wurden im 12%igen PAA-Gel aufgetrennt und mit einer Coomassielösung angefärbt bzw. auf eine Trägermembran übertragen und mit dem Antiserum gegen JIP23 getestet.

Abbildung18 zeigt ein mit Coomassie angefärbtes Gel und den immunologisch getesteten Westernblot der gleichen Proteinproben. JIP23 war in 18 h JM-behandelten Blättern sowohl

im Zellkern als auch im Gesamtproteinextrakt detektierbar. Ein Mengenvergleich ist hier nicht durchführbar, da eine einheitliche Bezugsgröße fehlt (Auftragung nach extrahierter Menge und nicht nach den Verhältnissen von Zelle zu Zellkern). In Keimlingen war JIP23 nur im Gesamtproteinextrakt nachweisbar, was mit den Ergebnissen der zytologischen Untersuchungen übereinstimmt (keine Kernlokalisierung von JIP23 im Keimling, nicht gezeigt).

Zur Abschätzung des Verhältnisses der Menge von JIP23 im Kern zur Menge des restlichen Zellproteins wurden aus dem ersten Überstand einer Kernpräparation die nicht nukleären Proteine extrahiert und mit der nukleären Proteinfraktion verglichen. Diese Analyse diente als Voraussetzung für die Festlegung der im Vergleich zweidimensional aufzutrennenden Proteinmengen aus Zellkernen bzw. dem Überstand der Zellkernpräparation (s. 3.6.2.). Kernprotein wurde zusammen mit drei verschiedenen Mengen der nicht nukleären Proteine im Coomassie-gefärbten Gel bzw. im Westernblot analysiert (Abb.19). Beim Vergleich gleicher Proteinmengen außerhalb und innerhalb des Zellkerns war JIP23 außerhalb des Zellkerns von 21 h JM-inkubierten Blättern weniger nachweisbar (vergl. Abb.19, 1 mit 3, je 6  $\mu\text{g}$ ).

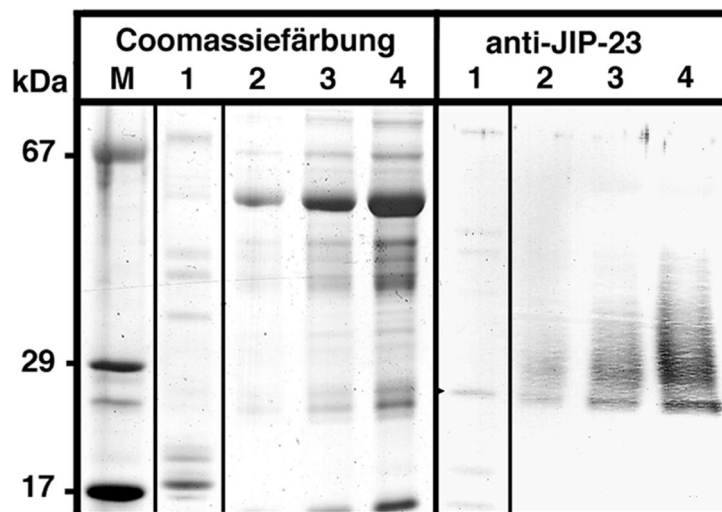


Abb.19

**Abschätzung des Verhältnisses der Menge von JIP23, die außerhalb und innerhalb des Zellkernes in 21 h JM-behandelten Blättern der Gerste cv. Salome vorliegt.**

Verglichen wurden mehrere Proteinmengen zellulärer Proteine des Überstandes einer Zellkernpräparation mit der Proteinmenge aus Zellkernen.

**M-** Markerproteine, **1-** Kernproteinextrakt von 21 h JM-inkubierten Gerstenblättern (6  $\mu\text{g}$ ), **2,3,4-** Proteine des Überstandes der Kernpräparation aus 21 h JM-behandelten Gerstenblättern (2,5; 6 und 12  $\mu\text{g}$ )

Proteinextrakte wurden im 12 %igen PAA-Gel aufgetrennt und mit einer Coomassielösung angefärbt bzw. auf eine Trägermembran übertragen und mit dem Antiserum gegen JIP23 getestet.

### 3.6.2. Isoformen von JIP23 im Zellkern

Im jasmonatbehandelten Gerstenblatt waren mehrere Isoformen von JIP23 in unterschiedlicher Menge zu finden (vgl. Abb.16E). Es stellt sich die Frage, ob diese Isoformen in verschiedenen Zellkompartimenten lokalisiert sind. Deshalb wurden das Auftreten dieser Isoformen innerhalb und außerhalb des Zellkerns in Bezug auf das Muster verglichen. Proteine aus Zellkernen und aus dem Überstand der Kernpräparation von 21 h JM-inkubierten Blättern wurden nach Ladung und Molekulargewicht aufgetrennt, auf eine Trägermembran übertragen und mit dem Antiserum gegen JIP23 getestet. Das im Westernblot nachgewiesene Isoformenmuster beider Fraktionen wurde miteinander verglichen (Abb.20).

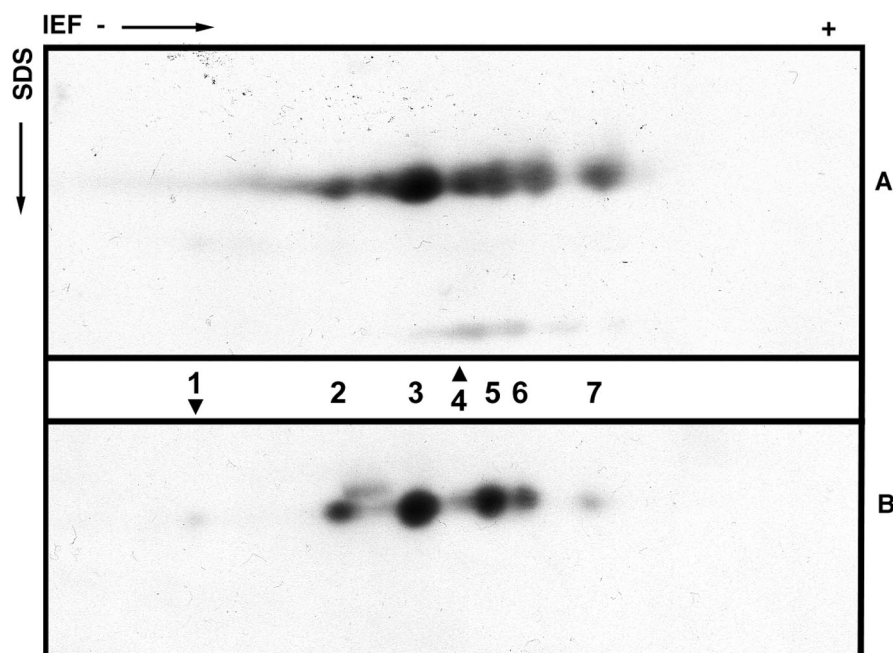


Abb.20

**Vergleich des Vorkommens von Isoformen von JIP23 außerhalb und innerhalb des Zellkerns von 21 h JM-behandelten Blättern der Gerste cv. Salome.**

A- Proteinextrakt aus Zellkernen (100 µg), B- Proteinextrakt aus dem Überstand der Kernpräparation (50 µg), 1 bis 7- Nummerierung der immundetektierbaren Isoformen von JIP23. **Pfeilköpfe** markieren Isoformen, die nicht in beiden Extrakten nachzuweisen waren.

Proteinextrakte einer Kernpräparation aus 21 h JM-behandelten Gerstenblättern wurden isoelektrisch fokussiert, anschließend in einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Trägermembran übertragen und mit dem Antiserum gegen JIP23 getestet.

Zu detektieren waren insgesamt 7 Isoformen. Isoform Nummer 1 war schwach und nur außerhalb des Zellkerns eindeutig detektierbar (Abb.20B). Isoform Nummer 4 dagegen wurde eindeutig nur in der Zellkernproteinfraktion detektiert. Isoformen 2, 3, 5 und 6 lagen

außerhalb und innerhalb des Zellkerns im etwa gleichen Mengenverhältnis vor. Isoform Nummer 7 war im Zellkern stärker konzentriert.

Vergleicht man die Isoformenmuster im Gesamtproteinextrakt von Blättern, die 72 h mit JM inkubiert worden waren (Abb.16E) mit den 21 h inkubierten Blättern, so ist zu erkennen, daß Isoform Nummer 1 nur im 21 h JM-inkubierten Blatt (Abb.20B) nachgewiesen wurde. Diese Isoform war in länger inkubierten Blättern nicht mehr zu detektieren. Sie war entweder nicht mehr vorhanden oder wird von den anderen Isoformen, die in stärkerem Maße im Blatt akkumulieren, überlagert. Alle anderen Isoformen kamen sowohl im 21 h als auch im 72 h JM-inkubierten Gerstenblatt vor.

Der Unterschied im JIP23-Isoformenvorkommen zwischen Keimling und JM-behandelten Blatt besteht in dem alleinigen Auftreten der Isoform 7 in JM-behandelten Blättern (verstärkt im Zellkern) und den unterschiedlichen Mengenverhältnissen der Isoformen zueinander.

### **3.6.3. JIP23 in Proteinextrakten aus Pellet- bzw. Überstandfraktionen lysierter Zellkerne**

JIP23 ist im Zellkern in den granulären Interchromatinbereichen lokalisiert (HAUSE et al., 1994). Aufgrund dieser Tatsache sollten Untersuchungen von Pellet- und Überstandfraktionen von zur Lyse gebrachten Zellkernen zu weiteren Aussagen bezüglich etwaiger Wechselwirkungen von JIP23 mit Bereichen des Zellkerns führen. JIP23 ist ein wasserlösliches Protein, sollte also im Überstand zu detektieren sein.

Die isolierten Zellkerne wurden in gleiche Mengen geteilt, nach Pelletierung in verschiedenen Lösungen (Wasser, NaCl und Triton X-100) resuspendiert und bis zur Lyse auf Eis inkubiert. Die Lyse wurde unter dem Mikroskop beobachtet (s. Abb.21). Die Zellkerne waren nach erfolgter Lyse nicht mehr kugelig, ihre Membranen waren teilweise aufgerissen und bildeten Aggregate (Abb.21B).

Nach erfolgter Lyse der Kerne wurden die Proben 10 min. abzentrifugiert (15.300 rpm, 4 °C). Das Pellet wurde nochmals mit dem jeweiligen Puffer gewaschen und abzentrifugiert. Die Proteine aus dem Überstand wurden mit Aceton gefällt. Die so entstandenen Pellets wurden in gleichen Volumina Probenpuffer aufgenommen und vor dem Auftragen auf das Gel hitzedenaturiert.

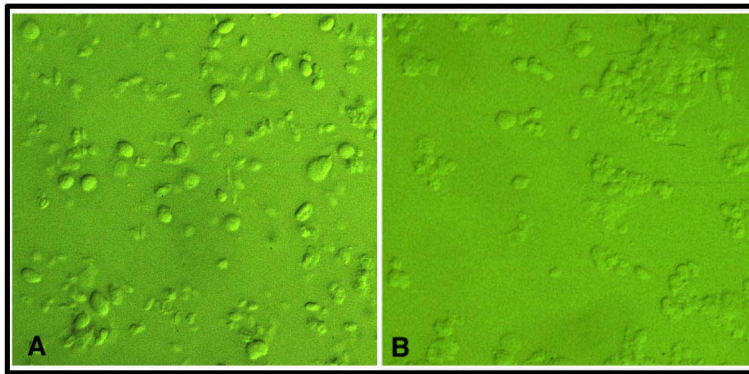


Abb.21

**Vergleich von intakten und lysierten Zellkernen aus 21 h JM-behandelten Blättern der Gerste cv. Salome.**  
**A-** intakte Kerne direkt nach der Isolation (in Puffer A inkubiert), **B-** lysierte Kerne nach 10-minütiger Inkubation in 1M NaCl-Lösung (Vorgehensweise s. Text)

Solche Pellet- bzw. Überstand-Proteinextrakte wurden in eindimensionalen Gelen aufgetrennt (gleiche Volumina aufgetragen), und entweder Coomassie-gefärbt oder auf Trägermembran fixiert, einem Antikörpertest gegen JIP23 unterzogen.

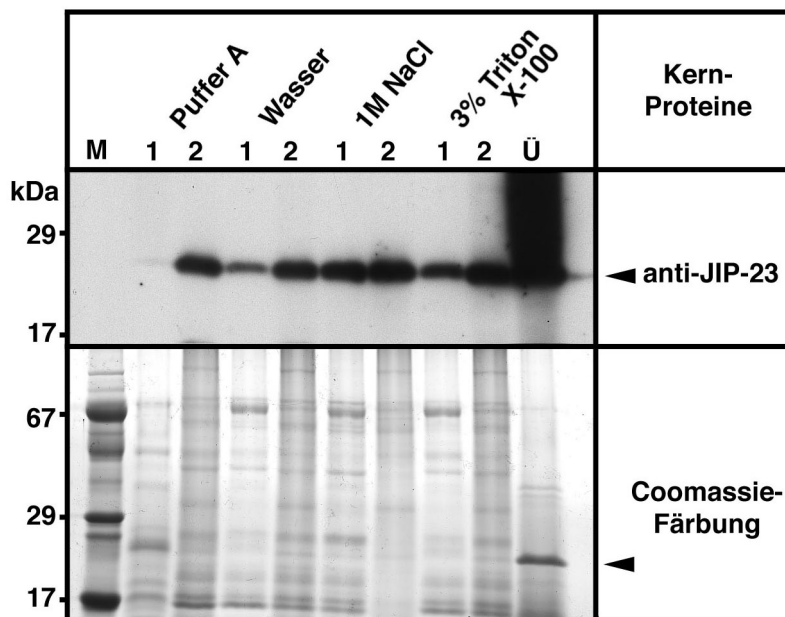


Abb.22

**Vergleich der Proteine aus Überstand und Pellet von in verschiedenen Puffern lysierten Zellkernen aus 30 h JM-behandelten Blättern der Gerste cv. Salome.**

**M-** Markerproteine (Molekulargewichtsangaben in kDa), **Ü-** Proteinextrakt aus dem Überstand der Kernpräparation, **1-** Proteine des Überstandes der lysierten Zellkerne, **2-** Proteine des Pellets der lysierten Zellkerne,

Überstand- und Pellet-Proteine wurden wie im Text beschrieben gewonnen, im 12 %igen PAA-Gel aufgetrennt und mit einer Coomassielösung angefärbt bzw. auf eine Trägermembran übertragen und mit dem Antiserum gegen JIP23 getestet.

Der Vergleich der Coomassie-gefärbten Proteine (Abb.22) zeigt, daß in Gegenwart von 1 M NaCl die meisten Proteine in der Fraktion des Überstandes zu finden waren. Nach Lyse der Kerne in Triton X-100 verblieben dagegen mehr Proteine im Pellet. Bei Lyse in Gegenwart von destilliertem Wasser und Puffer A verblieben weitaus mehr Proteine in der Pelletfraktion. Der Westernblot der gleichen Proteinproben (Abb.22, anti-JIP-23) veranschaulicht, daß JIP23 nach Puffer A-, Wasser- und Triton X-100-Inkubation stärker in der Fraktion der pelletierten Proteine vorkommt. Nur NaCl löste JIP23 stärker aus der Pelletfraktion heraus und ließ etwa die gleiche Menge in der Fraktion des Überstandes erkennen.

JIP23 war unter den gewählten Untersuchungsbedingungen nur schwer aus der Pelletfraktion zu lösen. Das läßt darauf schließen, daß JIP23 eine relativ starke Bindung zu einem oder mehreren Bestandteilen der Pelletfraktion hat.

### **3.7. JASMONSÄURE- UND ABSCISINSÄURE-GEHALTE IN VERSCHIEDENEN GEWEBEN UND UNTERSCHIEDLICH ALTEN GERSTENKEIMLINGEN** *(Hordeum vulgare L. cv. Salome)*

Da die Expression von *jip23* in Gerstenblättern sowohl durch exogene Applikation von (-)-Jasmonsäure (JA), deren Methylester und Aminosäurekonjugaten als auch durch Abscisinsäure (ABA) induzierbar ist, liegt die Vermutung nahe, daß die Synthese von JIP23 auch während der Keimung auf einen Anstieg dieser Signalmoleküle zurückzuführen ist. Deshalb wurde die in Gerstenkeimlingen enthaltene JA anhand ihrer Äquivalente bzw. ABA über einen Enzymimmunoassay auf der Basis von Antiseren nach einem Protokoll von WEILER (1986) quantitativ bestimmt. Zur Anwendung kamen ein Antiserum gegen JA (KNÖFEL et al., 1990) und monoklonale Antikörper gegen ABA (WEILER, 1986). Der Enzymimmunoassay für JA ist hochspezifisch für (-)-JM und die Aminosäurekonjugate von (-)-JA [im Gerstenblatt: (-)-JA-(S)-Valin, (-)-JA-(S)-Leucin, (-)-JA-(S)-Isoleucin]. Diese Messungen wurden freundlicherweise von Dr. R. Atzorn aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

Es kamen die vollständigen Embryonen nach Entfernung von Spelzen und Endosperm zur Analyse. Somit wurden verschiedene Organ- und Gewebearten (Wurzel, Scutellum, Mesokotyl, Blatt, Koleoptile) gemeinsam analysiert. Die Akkumulation von JIP23-mRNA

(Abb.23A) und die Jasmonat- bzw. ABA-Gehalte (Abb.23B, C) wurden in verschiedenen alten Keimlingen verglichen.

Während der Massezunahme der wachsenden Keimlinge ändern sich Größe und Frischgewicht der Organe zueinander. Aus diesem Grund ist es schwer, eine einheitliche Bezugsgröße zur Darstellung der Meßwerte zu finden. Deshalb wurden zur besseren Veranschaulichung die Meßwerte sowohl in pmol pro Gramm Frischgewicht (pmol/gFG, Abb.23B) als auch in pmol pro Keimling (pmol/Keiml., Abb.23C) dargestellt.

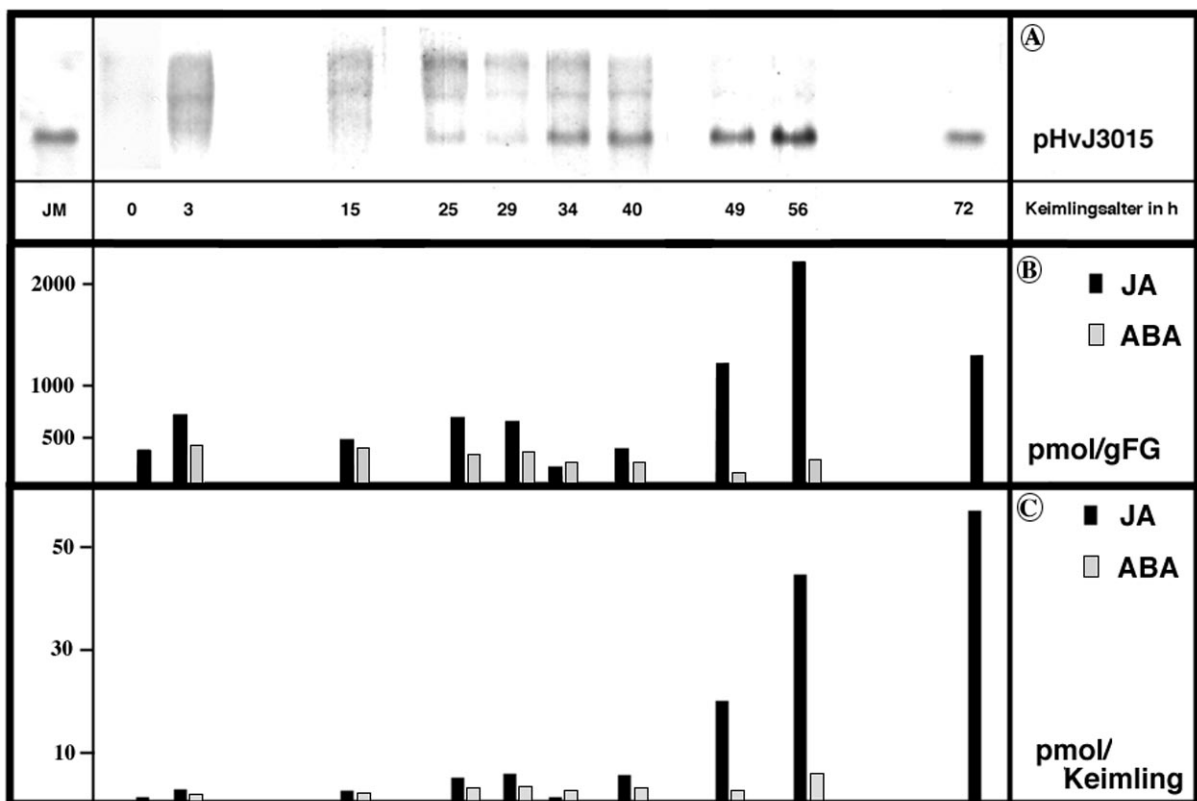


Abb.23

**Akkumulation von Jasmonaten und ABA im Vergleich zur JIP23-Transkriptakkumulation während der Keimung von Samen der Gerste cv. Salome.**

**A:** Transkriptakkumulation von JIP23 in einer Keimlingskinetik von 0 bis 72 h (Erklärung siehe Abb.5)

**B, C:** endogener Gehalt an ABA (**graue Säulen**) und Jasmonatäquivalenten (**schwarze Säulen**), die die Summe von (-)-JM, (-)-JA (methyliert nach der Extraktion aus ganzen Keimlingen) und ihrer Aminosäurekonjugate repräsentieren. Der Meßbereich der Standardkurven lag zwischen 0,05 und 25 pmol (-)-JA mit einer zuverlässigen Bestimmungsgrenze von 0,1 pmol(-)-JA. Angabe der Werte in pmol/gFG (**B**) und pmol/Keimling (**C**). Die dargestellten Werte repräsentieren jeweils den Mittelwert von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, wobei die Abweichung der Werte voneinander bis  $\pm 15\%$  betrug.

Die ermittelten Jasmonat-Gehalte korrelieren in beiden Darstellungsweisen nicht eindeutig mit der Akkumulation des Transkriptes. Fünfundzwanzig Stunden nach Beginn der Keimung, wo erstmals JIP23-mRNA nachweisbar ist, liegt ein Anstieg der endogenen Jasmonate auf



730 pmol/gFG vor (gegenüber 355 pmol/gFG bei 0 h). Nach 25 h Keimung fiel der Gehalt an Jasmonaten ab, stieg dann aber wieder an (bei 49 h über dem Level von 25 h) und erreichte bei 56 h Keimlingsalter 2100 pmol/gFG, also etwa das dreifache des Wertes von 25 h. Ein gleichartiger Abfall und Wiederanstieg der Transkriptmenge war nicht nachzuweisen. Bis zur 56. Keimungsstunde nahm die JIP23-mRNA-Akkumulation stetig zu und fiel danach ab.

In der Darstellung der Gehalte an Jasmonaten pro Keimling (Abb.23C) ist erst von 49 h alten bis zu 72 h alten Pflanzen ein relativ starker Anstieg an Jasmonaten zu erkennen. Vor 49 h Keimungsdauer liegen die gemessenen Werte unter 10 pmol/Keimling.

In den Keimlingen wurde die Menge an ABA in den einzelnen Proben mit Werten zwischen 130 und 442 pmol/gFG bestimmt. Ein Anstieg an ABA über den Zeitraum von 56 Keimungsstunden war nicht zu erkennen (Abb.23B,C).

Um ein Bild über die Verteilung von endogenem Jasmonat- und ABA-Gehalt in den verschiedenen Organen bzw. Geweben des Keimlings zu erhalten, wurden diese Organe bzw. Gewebe von 25 h, 48 h und 6 d alten Gerstenkeimlingen präpariert und einzeln analysiert (s. Abb.7 und 3.1.3.1. zur Erläuterung). Die erhaltenen Werte wurden zusammen mit der ermittelten Akkumulation von JIP23-mRNA dargestellt (Abb.24).

Der Gehalt an Jasmonaten erhöhte sich in Wurzel, Mesokotyl, Scutellum und Blattbasis von 48 h alten Keimlingen gegenüber 24 h alten Keimlingen. Nach 6 Keimungstagen wurde in Wurzel, Scutellum und Blattbasis wieder eine Abnahme der JA-Mengen erkennbar, während im Mesokotyl der Gehalt an Jasmonaten in 6 d alten Keimlingen noch weiter anstieg. Im 6 d alten Blatt nahm der Gehalt an Jasmonaten von der Blattbasis bis zur Blattspitze stetig ab (1800 pmol/gFG - 87 pmol/gFG, Abb.24E). Zu allen drei Zeiten konnte die größte Menge an Jasmonaten in den Geweben gefunden werden, in denen auch am meisten JIP23-mRNA auftrat (Scutellum, Mesokotyl und in 6 d alten Keimlingen zusätzlich in der Blattbasis).

Bei Analyse von Geweben besteht eine Korrelation zwischen der *jip23*-Expression und dem endogenen Jasmonatgehalt.

Der ABA-Gehalt wurde nur in Geweben 24 h alter Keimlinge bestimmt. Die Werte lagen zwischen 33 und 314 pmol/gFG. Ein Zusammenhang zwischen ABA-Akkumulation und *jip23*-Expression war nicht zu erkennen.

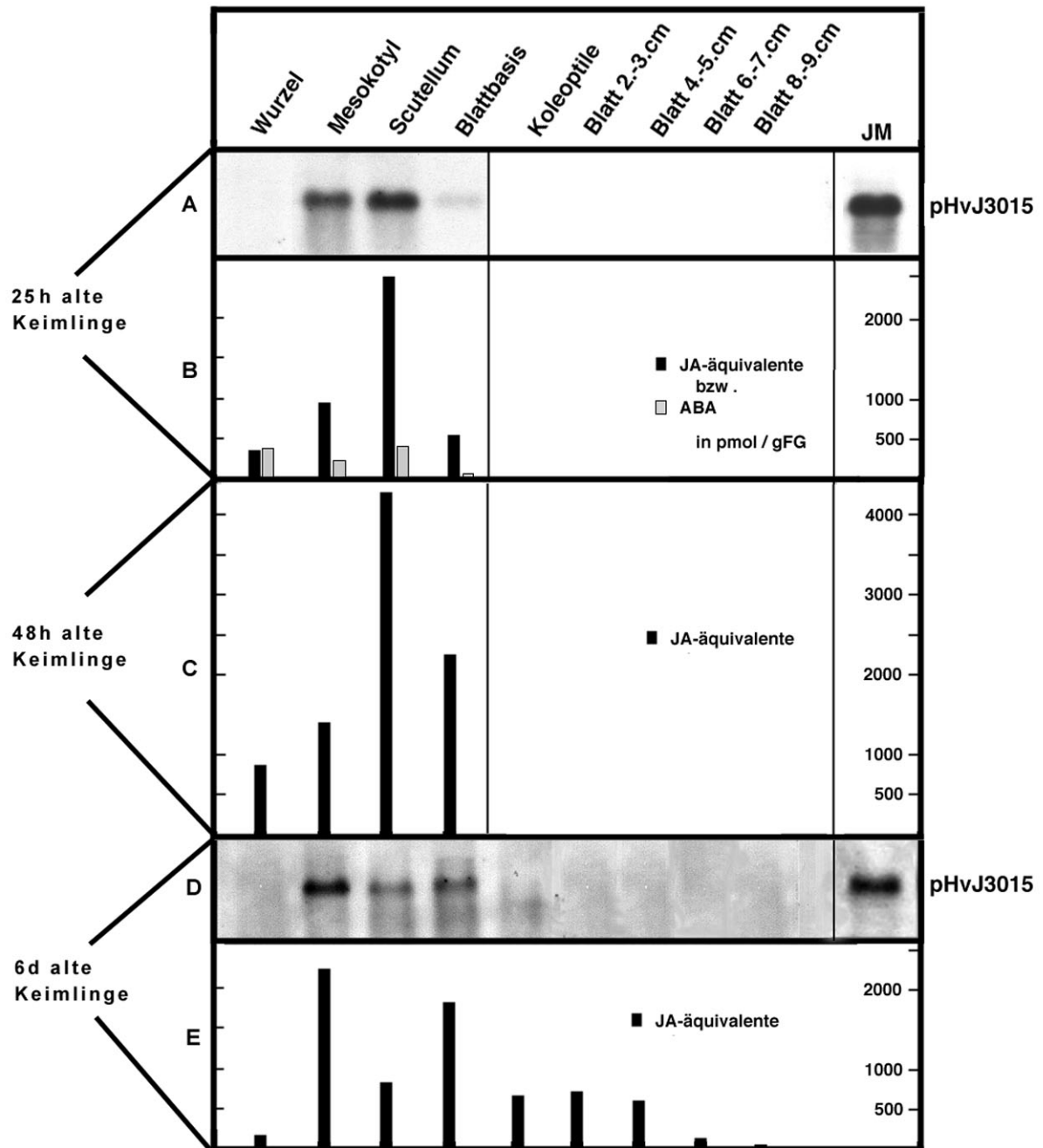


Abb.24

**Akkumulation von Jasmonaten und ABA in Geweben von 25 h, 48 h und 6 d alten Keimlingen der Gerste cv. Salome.**

**A, D:** Transkriptakkumulation von JIP23 in Keimlingsorganen (Erklärung siehe Abb.8)

**B, C, E:** endogener Gehalt an ABA (**graue Säulen**) und Jasmonatäquivalenten (**schwarze Säulen**) in pmol/gFG, die die Summe von (-)-JM, (-)-JA (methyliert nach der Extraktion) und ihrer Aminosäurekonjugate repräsentieren. Der Meßbereich der Standardkurven lag zwischen 0,05 und 25 pmol (-)-JA mit einer zuverlässigen Bestimmungsgrenze von 0,1 pmol(-)-JA. Die dargestellten Werte repräsentieren jeweils den Mittelwert von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, wobei die Abweichung der Werte voneinander bis  $\pm 15\%$  betrug.

### **3.8. *Jip23*-EXPRESSION IN KEIMLINGEN DER GERSTE (*Hordeum vulgare* L. cv.Salome) NACH EXOGENER MANIPULATION DER KEIMUNG**

Die während der Entwicklung des Gerstenkeimlings stattfindende *jip23*-Expression konnte nicht eindeutig mit der bestimmten Menge an endogenen Jasmonaten korreliert werden. Um Hinweise zu bekommen, ob Jasmonate, wie im JM-behandelten Gerstenblatt, auch im Keimling als Signal zur Induktion einer *jip23*-Expression bzw. der Expression anderer *jips* fungieren, wurde die Wirkung von exogen applizierter JM-Lösung auf Keimlinge untersucht (3.8.1.). Die Inhibierung der Jasmonatbiosynthese im Keimling durch Tetcyclacis (3.8.2.) sollte zeigen, ob dadurch die *jip23*-Expression abnimmt/beeinflusst wird.

Da während der Keimung ein Nährstofftransport vom Endosperm über das Scutellum in den Keimling stattfindet und somit ein osmotischer Streß in bestimmten Bereichen/Geweben des Keimlings auftritt, sollte untersucht werden, wie sich das Entfernen des Endosperms und damit der Entfernung der Hauptquelle der osmotisch wirksamen Nährstoffe auf die *jip23*-Expression auswirkt (3.8.3.). Dadurch sollte ein Hinweis auf den möglichen Einfluß von osmotischem Streß auf die Induktion der *jip23*-Expression im Gerstenkeimling erlangt werden.

#### **3.8.1. Induzierbarkeit der *jip23*-Expression nach Applikation von Jasmonsäuremethylester (JM)**

Um zu zeigen, daß Keimlinge auf die exogene Applikation von JM mit der Neusynthese von JIPs reagieren können, wurde folgendes Experiment durchgeführt. Trockene Gerstensamen wurden von ihrem Endosperm befreit und für 20 h auf Wasser angekeimt. Dann wurde ein Teil dieser Keimlinge für weitere 4 h auf Zellstoff, der mit JM-Lösung getränkt war (45 µM), inkubiert. Alle Keimlinge wurden in zwei Teile zerlegt (1-Scutellum bzw. 2-Wurzel, Mesokotyl und Blatt), RNA bzw. Protein daraus isoliert und auf die Expression von *jip23* und *jip37* geprüft.

Die Expression von *jip23* fand sowohl in Keimlingen, die nur auf Wasser keimten als auch in solchen, die mit JM-Lösung behandelt waren statt (Abb.25). Die auf JM-Lösung inkubierten Keimlinge zeigten aber eine stärkere Expression, sowohl im Scutellum als auch in Wurzel, Blatt und Mesokotyl. Die Expression von JIP37 war nur in den JM-behandelten Keimlingen nachzuweisen.

Keimung auf:	Wasser		Wasser JM	
	1	2	1	2
pHvJ3015				
anti-JIP-23				
pHvJS37				
anti-JIP-37				

Abb.25

**Induktion von *jip*-Expression in Keimlingen der Gerste cv. Salome durch exogene JM-Applikation.**

Gerstensamen wurden nach Entfernung des Endosperms 24 h auf Wasser bzw. 20 h auf Wasser und 4 h auf JM-Lösung gekeimt.

Die Keimlinge wurden in zwei Teile zertrennt: **1:** Scutellum und **2:** Wurzel, Mesokotyl, Blatt

Je 10 µg Gesamt-RNA bzw. 7 µg Gesamt-Protein wurden nach Auftrennung und Übertragung auf Trägermembran mit der cDNA-Sonde pHvJ3015 (JIP23) bzw. dem Antiserum gegen JIP23 und der cDNA-Sonde pHvJS37 (JIP37) bzw. dem Antiserum gegen JIP37 geprobt.

**3.8.2. *Jip23*-Expression nach Hemmung der Jasmonatbiosynthese durch Tetcyclacis**

Tetcyclacis ist ein Wachstumsretardant, das als Hemmstoff der Giberellinsäurebiosynthese bekannt wurde (HÄUSER et al. 1990). Darüberhinaus wurde die Hemmung der Synthese von Jasmonaten nachgewiesen, in dessen Folge die jasmonatresponsive Genexpression verhindert war (WASTERNAK et al. 1995). Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die *jip23*-Expression im Gerstenkeimling durch endogene Jasmonate induziert wird, wurde folgendes Experiment durchgeführt.

Gerstensamen wurden auf wassergetränktem Zellstoff für 30 h und 48 h zur Keimung gebracht. Danach wurde ein Teil der Keimlinge auf Zellstoff, getränkt mit einer Tetcyclacis-Lösung (100 µM), umgelegt und für 8 bzw. 26 h inkubiert. Eine 100 µM Tetcyclacis-Lösung blockiert die JA-Synthese in 7 Tage alten Gerstenblättern vollständig, so daß JA-induzierte

*jip*-Expression nicht mehr nachweisbar war (WASTERNACK et al., 1995). Die *jip23*-Expression in den Keimlingen nach dieser Behandlung wurde analysiert (Abb.26).

Die 56 h alten Keimlinge, die auf Wasser und Tetracyclis inkubiert waren (Abb.26, Bahn 2 und 3), wurden mit ebenfalls 56 h alten Keimlingen verglichen, die aber nur auf Wasser angezogen wurden (Abb.26 -1).

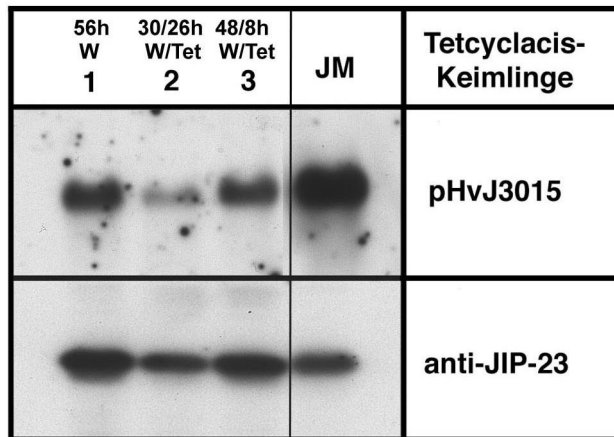


Abb.26

**Vergleich der *jip23*-Expression in Keimlingen der Gerste cv. Salome, die mit und ohne Tetracyclis keimten.**

Samen wurden (1)- 56h auf Wasser, (2)- 30h auf Wasser/26h auf Tetracyclis und (3)- 48h auf Wasser/8h auf Tetracyclis gekeimt. Anschließend wurde die isolierte Gesamt-RNA (10 µg) bzw. der Proteinextrakt (7 µg) elektrophoretisch getrennt, auf Trägermembranen fixiert und auf *jip23*-Genprodukte getestet. Kontrollen (JM) sind RNA (1µg) bzw. Protein (0,7 µg) aus 24h JM-inkubierten Blattsegmenten.

JIP23 und seine mRNA waren in allen Keimlingen nachweisbar. In den Keimlingen, die 56 Stunden auf Wasser wuchsen, wurde die größte Menge an mRNA und Protein akkumuliert. Nach achtstündiger Tetracyclisbehandlung konnte keine eindeutige Abnahme der akkumulierten JIP23-mRNA- bzw. JIP23-Menge festgestellt werden (Abb.26, 3). In den Keimlingen, die für 26 h auf Tetracyclis-Lösung inkubiert waren, konnte dagegen eine Abnahme an JIP23-mRNA und JIP23 (Abb.26, 2) gefunden werden.

Das phänotypische Erscheinungsbild der unterschiedlich angezogenen Keimlinge, die alle nach 56 h Keimung analysiert wurden, war sehr unterschiedlich. Die auf Tetracyclis inkubierten Keimlinge waren nach 56 h viel kleiner, als die nur auf Wasser inkubierten Keimlinge.

Keimlinge	JA-äquivalente in pmol/Keimling	JA-äquivalente in pmol/gFG
56h Wasser (1)	44,8	2038
48h Wasser	20,1	1325
48h Wasser / 8h Tetcyclacis (2)	29,3	976
30h Wasser	5,9	663
30h Wasser / 26h Tetcyclacis (3)	15,9	1060

Tab.4

**Änderung der Akkumulation von Jasmonaten in Gerstenkeimlingen nach Tetcyclacis-Behandlung**

Keimlinge wurden auf Wasser zur Keimung gebracht und ein Teil auf Tetcyclacis für 26 h bzw. 8 h umgelagert. (1), (2) und (3) kennzeichnet die ermittelten Werte für die in Abb.26 dargestellten Northern und Western gleich behandelte Keimlinge. Die Meßwerte stellen den Durchschnitt von drei unabhängigen Experimenten dar.

Zum Nachweis der Hemmung der Jasmonatbiosynthese wurden die Gehalte an Jasmonaten von gleichbehandelten Gerstenkeimlingen bestimmt. Die Werte sind in Tabelle 4 dargestellt. Wie zu erwarten war, konnte in den nur mit Wasser angezogenen Keimlingen der größte Gehalt an Jasmonaten gemessen werden (44,8 pmol/Keimling, (1)). Nach 48 h Wasser und sich anschließender 8-stündiger Tetcyclacisbehandlung wurde ein Wert von 29,3 pmol/Keimling bestimmt ((2)) und nach 26 h Tetcyclacisinkubation mit vorangegangenen 30 h Wasseranzucht wurden nur noch 15,9 pmol/Keimling gemessen ((3)). Zum Vergleich wurden auch Keimlinge vermessen, die für 30 h bzw. 48 h auf Wasser ohne nachfolgende Tetcyclacisbehandlung inkubiert waren. In diesen Keimlingen waren die Gehalte an Jasmonaten geringer als in den Keimlingen, die nach gleicher Stundenanzahl auf Wasser noch für weitere 26 h bzw. 8 h auf Tetcyclacis umgelagert wurden. Da die ermittelten Gehalte an Jasmonaten in den auf Tetcyclacis inkubierten Keimlingen höher waren, kann man davon ausgehen, daß die Jasmonatbiosynthese nicht sofort nach Beginn der Tetcyclacisgabe blockiert wurde.

**3.8.3. *Jip23*-Expression in Keimlingen ohne Endosperm**

Da die Expression von *jip23* nicht auf ABA und auch nicht ausschließlich mit dem Vorhandensein von Jasmonsäure korreliert, wurde auch ein anderer potentieller Induktor geprüft. Nach den Untersuchungen am Primärblatt ist osmotischer Streß ein Induktor für die *jip*-Expression (LEHMANN et al., 1995). Da die im Endosperm gespeicherten Kohlenhydrate

während der Keimung abgebaut und in transportabler Form über das Scutellum dem wachsenden Embryo zugänglich gemacht werden, enthält das Scutellum so Stoffe, die das osmotische Potential erhöhen (HAUSE et al., 1996).

Aus diesem Grund wurden Gerstenembryonen einmal mit und einmal ohne Endosperm gekeimt. Das Endosperm wurde im trockenen Zustand des Samens mechanisch mit einem Skalpell vom Embryo entfernt. Die Spelzen wurden in beiden Fällen vor Keimungsbeginn entfernt. Die Embryonen und Samen (Embryo mit Endosperm) wurden in Petrischalen auf zwei Lagen wassergetränktem Zellstoff 24 h lang inkubiert. Dann wurden die Embryonen mit einem Skalpell in Scutellum bzw. in Mesokotyl, Wurzel und Blatt geteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und später aus diesem Material RNA und Proteine gewonnen.

Diese Proben wurden im Hinblick auf Akkumulation von JIP23-mRNA und JIP23 analysiert (Abb.27). JIP23-mRNA akkumulierte zum größten Teil im Scutellum. Dies gilt gleichermaßen für Embryonen, die sich mit oder ohne Endosperm entwickelten. Dabei akkumulierte wesentlich mehr JIP23-mRNA in Anwesenheit des Endosperms. JIP23 wurde in allen Proben nachgewiesen, akkumulierte aber im Scutellum am stärksten.

	ohne		mit		Endosperm	
	1	2	1	2	JM	
A						pHvJ3015
						anti-JIP-23
B	-0,56	-0,59	-1,1	-0,9		Osmolalität in MPa
C	720		520			JA-äquiv. in pmol/gFG

Abb.27

**Vergleich von *jip23*-Expression, der Osmolalität und der Gehalte an Jasmonaten in Keimlingen der Gerste, die mit oder ohne Endosperm angezogen wurden.**

Gerstensamen wurden **ohne** bzw. **mit** Endosperm 24 h gekeimt. **1:** Scutellum; **2:** Wurzel, Mesokotyl, Blatt

**A:** Je 10 µg Gesamt-RNA bzw. 7 µg Gesamt-Protein wurden nach Auftrennung und Übertragung auf Trägermembran mit der cDNA-Sonde pHvJ3015 bzw. dem Antiserum gegen JIP23 getestet.

**B:** Osmolalität in MPa, **C:** Jasmonatäquivalente in pmol/gFG

In der Abbildung 27B sind die Osmolalität, in 27C die Gehalte an Jasmonaten der einzelnen Proben dargestellt. Die Menge an bestimmten Jasmonaten lag im Bereich der Werte, die für

fast gleichaltrige, normal angezogene Keimlinge (25 h, mit Endosperm und Spelzen, vergleiche Abb.23B) gemessen wurden. Die Osmolalitätsbestimmung ergab für das Scutellum des mit Endosperm gewachsenen Embryos einen relativ hohen Wert von -1,1 MPa. Dagegen war im Scutellum der ohne Nährgewebe gekeimten Embryonen eine geringere Osmolalität zu finden. Sie entsprach der in den anderen Geweben (Wurzel, Mesokotyl, Blatt) gemessenen. Unter den gegebenen Untersuchungsbedingungen besteht eine Korrelation zwischen ansteigendem osmotischen Potential und verstärkter *jip23*-Expression. Es ist jedoch zu beachten, daß die Entfernung des Endosperms ein empfindlicher Eingriff in den Prozeß der Keimung ist. Nährstoffe, die zur Keimlingsentwicklung gebraucht werden, können dem Keimling nicht zugeführt werden. Daraus könnte eine Wachstumsverlangsamung resultieren, die auch zur verringerten Akkumulation von *jip23*-Genprodukten im Keimling führen könnte.



## 4. DISKUSSION

Eine grundlegende Voraussetzung aller Organismen zum Leben ist die Möglichkeit der differentiellen Genexpression. Die zeitliche, räumliche und mengenmäßig unterschiedliche Aktivität von Genen innerhalb eines Organismus ist für seine Entwicklung und Anpassung an sich verändernde Umweltbedingungen unabdingbar. Faktoren, die in Pflanzen gewebespezifisch sowohl während Differenzierungsprozessen als auch als Antwort auf sich verändernde äußere Bedingungen eine differentielle Genexpression auslösen, können abiotisch (z.B. Trockenheit, Licht, Kälte, Mangel an Nährstoffen, Umweltgifte) und biotisch (z.B. Krankheitserreger, Parasiten, Nahrungskonkurrenten) sein. Pflanzen haben aufgrund ihrer ortsgebundenen Lebensweise eine Vielzahl von Anpassungen sowohl auf der Ebene metabolischer Reaktionen als auch durch veränderte Genexpression entwickelt. Dabei sind an der Umsetzung eines auslösenden Reizes in die Änderung eines Expressionsmusters in vielen Fällen Phytohormone beteiligt. Ihre Rolle in der Regulation physiologischer Prozesse kann einzeln oder zu mehreren in einem komplexen bisher meist nicht verstandenen Zusammenspiel erfolgen.

Jasmonate zählen zu den Phytohormonen. Sie gelten als Signal von Wachstum und Entwicklung der Pflanze und wurden auch als wesentliches Signal der Pflanze auf biotischen und abiotischen Streß erkannt (vgl. reviews, CREELMAN und MULLET, 1997a/b; WASTERNACK und PARTHIER, 1997).

Jasmonate induzieren die Bildung spezifischer Proteine. Zu ihnen zählen Enzyme der Alkaloid- und Phytoalexinsynthese, Lipoxygenasen ebenso wie Proteinaseinhibitoren oder Zellwandproteine. Diese Proteine sind in zahlreichen Arten JA-induzierbar. Trotzdem unterscheiden sich die JA-induzierbaren Proteinmuster zwischen verschiedenen Pflanzen, wie z.B. Tabak, Tomate und Gerste oft sehr stark (LEHMANN et al., 1995, WASTERNACK et al., 1996). Für einige der Proteine mit noch ungeklärter Funktion konnte ein speziesspezifisches Vorkommen festgestellt werden (HERRMANN et al., 1989).

#### 4.1. AKKUMULATION UND LOKALISATION DER JIP23-GENPRODUKTE IN DER ENTWICKLUNG DER GERSTENPFLANZE

In der Gerste sind nach exogener JA-Applikation am Blatt zahlreiche jasmonatinduzierbare Proteine identifiziert worden. Dazu zählen z.B. Thionin (JIP6), Lipoxygenasen (JIP92, JIP98, JIP100) und ein ribosomeninaktivierendes Protein (JIP60). Für andere jasmonatinduzierte Proteine war keine Funktion aus Sequenzvergleichen ableitbar. JIP23 ist ein solches Protein unbekannter Funktion. Bisherige Analysen zur Expression der jasmonatinduzierbaren Gene für JIP23, JIP37 und JIP60 der Gerste beschränkten sich auf die Verwendung exogen applizierter Induktoren wie Jasmonate, ABA, Trockenheit oder Zucker am reifen, photosynthetisch aktiven Blatt. Die Expression korreliert hier immer mit einem endogenen Jasmonatanstieg.

Da Jasmonate auch während der Entwicklung und des Wachstums einen Einfluß auf verschiedenste Ereignisse ausüben, wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß im Verlauf der Gerstenentwicklung auch jene Proteine synthetisiert werden, die nach Behandlung mit exogen applizierten Induktoren entstehen. Nachdem JIP23 sowohl während der Samenbildung als auch in Keimpflanzen der Gerste gefunden wurde, sollten Northernblot- und Westernblotanalysen ein genaueres Bild des räumlichen und zeitlichen Musters der Expression von *jip23* in der Gerstenpflanze liefern. Die Expressionsanalysen dienen einerseits dazu, den Unterschied zwischen streßbedingter Expression im Gerstenblatt und endogen bedingter Expression im wachsenden Keimling zu zeigen und andererseits zur Klärung der Funktion von JIP23 beizutragen.

Im Gegensatz zur durch exogen applizierte JM-Lösung oder durch andere Streßformen ausgelösten Expression der JIP-Gene wird während der Keimlingsentwicklung der Gerste nur ein JIP, JIP23, synthetisiert. Es erfolgt keine Koregulation der JIP-Gene wie nach exogen induzierter Expression beschrieben (LEOPOLD, 1994). Die Frage, ob es sich im Keimling und im exogen gestreßten Blatt um die Expression des gleichen *jip23*-Gens handelt, soll an anderer Stelle im Text erläutert werden (s. 4.4.1.).

Untersuchungen zur *jip23*-Expression im Verlauf der Entwicklung ergaben, daß JIP23 in jungen Ähren synthetisiert wird. Dagegen ist sowohl JIP23 als auch seine mRNA im trockenen Samen nicht mehr detektierbar. Offensichtlich findet ein *jip23*-Expressionsstopp statt und es erfolgt ein Abbau des Proteins gleichzeitig mit der Samenreifung.

Im Keimling beginnt die *jip23*-Expression ca. 20 h nach Imbibition (Abb.5).

In unserer Arbeitsgruppe wurde parallel zu den hier dargestellten Untersuchungen die für JIP23 codierende cDNA durch heterologe Transformation in das Tabaksystem eingeführt. Die Überexpression dieser cDNA in transgenen Tabakpflanzen führte zur Herunterregulation der Expression einer Anzahl von Proteinen, wie die kleine und große Untereinheit der RuBPCase (GÖRSCHEN et al., 1997b). Die Autoren postulieren, daß JIP23 durch Verhinderung der Bindung von Transkripten an Ribosomen die Translation bestimmter mRNAs reduziert. Geprüft wurde diese Störung der Translation für die mRNA der kleinen Untereinheit der RuBPCase. Betroffen ist u.a. also ein in die Photosynthese involviertes Protein.

Während der Entwicklung wird JIP23 nur in Zellen exprimiert, die nicht photosynthetisch aktiv sind (Scutellum, Gefäßsystem von Wurzel, Blattbasis, Koleoptile). Im Zusammenhang mit erhöhten Jasmonatgehalten in meristematischen Geweben (Blattbasis bei Monokotylen) postulieren Creelman und Mullet (1997a, s. auch 4.4.1.), daß dies zur Repression chloroplastidärer Proteine beiträgt und so eine vorzeitige Ausbildung des Photosyntheseapparates in der Blattbasis verhindert wird. Berücksichtigt man, daß in diesen Geweben gleichzeitig Zellteilung und Nährstoffimport stattfinden und damit der Energiebedarf sehr hoch ist, sollte es für die Zelle von Vorteil sein, wenn sie andere energieaufwendige Prozesse (hier die Bildung des Photosyntheseapparates) verringert bzw. verhindert.

Daß in der Blattbasis der Photosyntheseapparat noch nicht aktiv ist, wird auch durch das fehlende Chlorophyll phänotypisch belegt. Durch die die Blattbasis umgebende Koleoptile wird der Lichteinfall behindert. Er ist aber zur Entwicklung von Chloroplasten aus den Proplastiden essentiell. JIP23 akkumulierte auch in der Blattbasis 6 Tage alter Keimlinge (Abb.8). Der zytologische Nachweis von JIP23 in 48 h alten Keimlingen zeigte aber, daß mRNA und Protein nur in den Leitbündeln, also in wenigen Zellen von Koleoptile und Blatt vorkommen. Wenn JIP23 die Aufgabe besitzt, an der Verhinderung der Ausbildung des Photosyntheseapparates mitzuwirken, sollte dieses Protein insbesondere in parenchymatischen Zellen der Blattbasis vorkommen. Zytologisch war das nicht nachweisbar. Ein Vorkommen in parenchymatischen Zellen unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten zytologischen Methoden ist dennoch nicht auszuschließen.

Ein Nachweisproblem anderer Art stellte sich bei Analyse von Gesamt-RNA heraus. Sowohl in der Koleoptile als auch den Blattabschnitten oberhalb der Blattbasis wurde bei Analyse von Gesamt-RNA aus 6 Tage alten Keimlingen keine JIP23-mRNA detektiert (Abb.8), jedoch ergaben *in situ*-Hybridisierungen an Blattgewebeschnitten oberhalb der Blattbasis den Nachweis der *jip23*-Expression in Zellen der Leitbündel der Seitennerven (HAUSE, persönliche Mitteilung). Die geringe Menge an JIP23-mRNA in wenigen Zellen der untersuchten Blattabschnitte verdünnt sich vermutlich bei Analyse von Gesamt-RNA erheblich aus und ist deshalb nicht nachweisbar gewesen. JIP23 selbst ist langlebiger als seine mRNA, akkumulierte im Gewebe über einen längeren Zeitraum und war deshalb detektierbar (Abb.8).

Die JIP23 akkumulierenden Geleitzellen können ebenfalls Leukoplasten und Plastiden enthalten, bilden aber keine Stärke (ESAU, 1965). Sie sind photosynthetisch nicht aktiv. Hier wäre ebenfalls ein hemmender Einfluß von JIP23 im Hinblick auf die Bildung des Photosyntheseapparates denkbar, wenngleich in diesen Zellen das reiche Vorkommen von Zuckern eine größere Rolle spielen sollte.

Gerade über jene Zellen, die JIP23 akkumulieren (parenchymatische und epidermale Zellen des Scutellums, Geleitzellen der Leitbündel), werden Nährstoffe transportiert, d.h. sie enthalten verstärkt osmotisch wirksame Kohlenhydrate, unterliegen also einem osmotischen Streß (s. 3.8.3., Abb.27). Es konnten innerhalb der *jip23* exprimierenden Gewebe Unterschiede im zeitlichen Verlauf der JIP23-Akkumulation gefunden werden. Mit zunehmenden Alter der Keimlinge nahm im Scutellum die Akkumulation der JIP23-mRNA ab und dafür im Mesokotyl zu (Abb. 24, 25 h und 6 d). In 48 h alten Keimlingen wurde in den Epidermiszellen und wenigen Zellen des angrenzenden Parenchyms des Scutellums JIP23 gefunden. Dagegen enthalten die meisten Parenchymzellen des Scutellums in 6 Tage alten Keimlingen JIP23, die Epidermiszellen aber nur noch wenig JIP23 (HAUSE et al., 1996, s. Anhang). Die Akkumulation von JIP23 verlagert sich mit zunehmenden Alter der Keimlinge vom Scutellum in das Mesokotyl und die Blattbasis (Abb. 24).

Möglicherweise besteht hier ein Zusammenhang zwischen den aus dem Endosperm stammenden Zuckern und dem Vorkommen von JIP23. Ishida et al. (1996) verfolgten die Veränderungen in der Zusammensetzung der Nährstoffe während der Keimung von Gerstenkeimlingen mittels NMR-Mikroskopie. Sucrose- und Fructosegehalte blieben auf einem relativ konstanten Niveau. Nur der Maltosegehalt stieg bis zum sechsten Tag nach

Keimungsbeginn 6fach an, und fiel dann bis zum neunten Tag auf ein relativ geringes Niveau wieder ab. Über das Scutellum werden die hydrolysierten Speicherkohlenhydrate des Endosperms, vorrangig in Form von Maltose in den Keimling geleitet. Dabei wird Maltose offensichtlich während des Transportes in den Leitbündeln in Sucrose umgewandelt (ISHIDA et al., 1996). Die Zellen und Gewebe, in denen ein starker Nährstofftransport stattfindet, sind ebenfalls die Bereiche, in denen JIP23 akkumuliert. Ishida et al. (1996) konnten zeigen, daß mit Zunahme der Entfernung vom Scutellum die in den Leitbündeln konzentrierten Zucker (vor allem Sucrose) in immer geringerer Menge vorhanden sind. Dies spricht dafür, daß die Zucker allmählich in die benachbarten Mesophyllzellen des wachsenden Blattes transportiert und dort verbraucht werden. An der Blattbasis konnten keine großen Mengen von Zuckern nachgewiesen werden. Das wird auf den hohen Verbrauch von Nährstoffen während der Zellteilung der Meristeme, die an der Blattbasis erfolgt, zurückgeführt.

JIP23 ist genauso wie die zu transportierenden Zucker in den Leitbündeln zu finden. In den Leitbündeln akkumuliert JIP23 in den Geleitzellen. Diese Zellen sind der physiologisch aktive Teil des Siebröhrenkomplexes des Phloems, verantwortlich für die Ernährung benachbarter Zellen und Gewebe durch das Beladen von Sucrose aus dem Mesophyll über die Geleitzellen in die Siebröhren und von dort aus für den Export in entferntere Zellen, die Sucrose verbrauchen.

Durch die Korrelation von JIP23-Akkumulation und physiologischen bzw. biochemischen Charakteristika lassen sich zwei Hypothesen für die Funktion von JIP23 aufstellen (s. auch Tab.5). Das Vorkommen von JIP23 in der Blattbasis korreliert mit der verringerten Expression chloroplastidärer Proteine in diesem Gewebe, in dem Zellteilung verstärkt stattfindet. Zusammen mit dem Vermögen von JIP23 im transgenen Tabaksystem eine Reduktion der Translation bestimmter mRNAs, wie der für die kleine Untereinheit der RuBPCase zu erreichen (GÖRSCHEN et al., 1997b), ist eine Funktion bei der Repression der Ausbildung des Photosyntheseapparates anzunehmen.

Da andererseits eine Korrelation der Akkumulation von JIP23 und osmotisch wirksamen Zuckern erkennbar war, liegt die Vermutung nahe, daß JIP23 ebenso eine Schutzfunktion unter osmotischen Streßbedingungen zu erfüllen hat.

Die Expression eines JIP23-Genes in der Entwicklung scheint in Getreidekeimlingen sorten- bzw. artenübergreifend zu sein, da in etlichen Gerstenkultivaren (HAUSE et al., 1998) und auch anderen Getreidearten (Abb.13) JIP23 während der Keimung vorgefunden wurde.

<u>Vorkommen von JIP23</u>	<u>Korrelierende physiologische/biochemische Merkmale</u>
<u>im Keimling</u>	
Epidermale und parenchymatische Zellen des Scutellums, Geleitzellen des Phloems	hoher Zuckergehalt in diesen Zellen
Scutellum, Mesokotyl, Blattbasis	erhöhter Jasmonatgehalt
Scutellum, Geleitzellen, Blattbasis	Zellen ohne Photosyntheseaktivität, Repression der Ausbildung des Photosyntheseapparates (GÖRSCHEN et al., 1997b; CREELMAN und MULLET, 1997a)
Junge Ähren (Karyopsen, Spelzen, Grannen)	Einlagerung von Nährstoffen, Austrocknung, Abbau der Photosyntheseaktivität, erhöhter Jasmonatgehalt (TEICHMANN, persönl. Mitteilung)
<u>in JM-behandelten Blättern</u>	
Alle lebenden Zellen in JM-beh. Blättern	Erhöhter Jasmonatgehalt, Abbau der Photosyntheseaktivität

Tab.5 Korrelation zwischen Vorkommen von JIP23 und physiologischen/ biochemischen Merkmalen

#### 4.2. ISOFORMEN VON JIP23

Im Proteinextrakt jasmonatbehandelter Gerstenblätter dominieren im coomassiegefärbten Proteingel drei abundante Isoformen von JIP23. Das Auftreten mehrerer Isoformen eines Proteins hängt häufig mit seinen verschiedenen Funktionen zusammen. Wenn darüber hinaus das Isoformenmuster eines Proteins für Entwicklungszustände oder Streßbedingungen spezifisch ist, kann ein funktionaler Zusammenhang bestehen, d.h. das spezifische Vorkommen einer Isoform und einer Entwicklungs-/Streßbedingung hilft Funktionshinweise zu erhalten. Deshalb wurde das Isoformenmuster von JIP23 unter verschiedenen Expressionsbedingungen verglichen.

Durch Detektion mit dem Antikörper gegen JIP23 wurden Anzahl und Mengenverhältnisse im Vergleich zwischen den Isoformen im Gerstenkeimling und im JM-behandelten Blatt bestimmt. Insgesamt konnten sieben Isoformen immunologisch bestimmt werden, die in Anzahl und Menge signifikant und streng reproduzierbar auftraten.

Verglichen mit dem Keimling kommt im JM-behandelten Blatt eine zusätzliche Isoform (Nr.7) vor, die überwiegend im Zellkern lokalisiert ist (Abb.20). Außerdem ist die Relation der Menge der Isoformen im Keimling von der des Blattes verschieden (Abb.16 und 20). Im Keimling überwiegen Isoformen des basischen Bereiches und im JM-behandelten Blatt überwiegen Isoformen des sauren Bereiches.

Insgesamt sind die Unterschiede in den Isoformenmustern von Keimling bzw. JM-behandelten Blatt jedoch relativ gering und ermöglichen deshalb keine weiteren Aussagen ob eine Isoform mit einer spezifischen Funktion zusammenhängt.

Isoformen von funktional gleichen monomeren Proteinen können durch alternierendes Spleißen einer mRNA oder durch die Expression verschiedener Gene entstehen. Dabei unterscheiden sich die Isoformen in ihrer Aminosäuresequenz. Durch posttranslationale Modifikationen können ebenfalls verschiedene Isoformen eines Proteins gebildet werden. Durch die Bildung verschiedener Isoformen ist eine zell- bzw. gewebeadaptierte Regulation möglich.

Für die Entstehung der Isoformen von JIP23 sollen im folgenden die Möglichkeiten der (1) posttranslationalen Modifikation und (2) der Expression verschiedener Gene diskutiert werden.

(1) Der JIP23 codierende cDNA-Klon pHvJ3015 (aus JM-beh. Blättern der Gerstensorte Carina; ANDRESEN et al., 1992) codiert eine Proteinsequenz, in der potentielle Modifikationsorte vorhanden sind. Die Sequenzanalyse ergab potentielle N-Glykosylierungs-, N-Myristylierungs- und Phosphorylierungsorte. Eine *in vivo*-Fütterung von radioaktiv markiertem Phosphat (nicht gezeigt) konnte keine Phosphorylierung einer der Isoformen zeigen. Eine Glykosylierung konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden (PARTHIER, 1991). Trotzdem ist eine posttranslationale Modifikation von JIP23 nicht auszuschließen.

(2) Die im JM-behandelten Blatt detektierten Isoformen können alle aus nur einem Gen entstehen. Görschen et al. (1997b) erzeugten transgene Tabakpflanzen, die ein *jip23* exprimieren. Tabakpflanzen wurden mit einem Konstrukt, das die JIP23-cDNA aus JM-

behandelten Blättern der Gerstensorte Carina enthält, transformiert. Die zweidimensionale Auftrennung der Proteine zeigte, daß die gleichen Isoformen wie in JM-behandelten Blättern der Gerste synthetisiert werden. Es genügt also ein spezifisches Transkript, um mehrere JIP23-Isoformen entstehen zu lassen.

In dem Gerstenkultivar Salome existiert mehr als ein Gen für JIP23 (Abb.14 und GÖRSCHEN, persönl. Mitteilung). Im Keimling wird vermutlich ein anderes JIP23-Gen (s. 4.4.1.) als im JM-behandelten Blatt exprimiert. Da alle Isoformen, die im Keimling synthetisiert werden, auch im JM-behandelten Blatt auftreten (s. Abb.16 und 20), codieren sehr wahrscheinlich alle JIP23-Gene für die gleiche Aminosäuresequenz. Ansonsten wäre im Keimling das Auftreten von Isoformen mit anderen isoelektrischen Punkten als die der im JM-behandelten Blatt vorhandenen Isoformen anzunehmen.

Unterschiede bestehen lediglich in den Mengenverhältnissen der Isoformen in Keimling und JM-behandelten Blatt. Nach *in vitro* Translation von mRNAs aus Keimlingen bzw. JM-behandelten Blättern (nicht gezeigt) waren mehrere Isoformen detektierbar. Auch hier unterscheiden sich die Mengenverhältnisse: Der Keimling enthielt mehr Isoformmenge im basischen Bereich, während das JM-behandelte Blatt im sauren Bereich mehr Isoformmenge trug.

Zwei Vermutungen zur Entstehung der unterschiedlichen Mengenverhältnisse sollen hier kurz dargestellt werden:

- (a) In den JIP23-mRNAs aus Keimlingen bzw. JM-behandelten Blättern bestehen aufgrund der Expression vermutlich unterschiedlicher JIP23-Gene doch geringe Sequenzunterschiede, die zu gleichgroßen Proteinen mit unterschiedlichem isoelektrischen Punkt führen und durch posttranslationale Modifikationen zu weiteren Isoformen in unterschiedlicher Menge umgebildet werden. Da die in ihrer Sequenz unterschiedlichen Isoformen im Keimling und auch im JM-behandelten Blatt identische isoelektrische Punkte besitzen, wäre dann Zufall.
- (b) In der isolierten Gesamt-RNA von Keimling bzw. Blatt existieren Faktoren, die bestimmte posttranslationale Modifikationen vorrangig ablaufen lassen. Diese Faktoren dürften keine Proteinnatur besitzen, da während der RNA-Isolation für die *in vitro* Translation alle Proteine entfernt wurden.



Das Auftreten mehrerer Isoformen von JIP23 scheint auf die Induktion der Expression verschiedener Gene in verschiedenen Geweben und vermutlich stattfindende posttranslationale Modifikationen zurückzuführen zu sein.

#### **4.3. LOKALISATION VON JIP23 IN VERSCHIEDENEN ZELLKOMPARTIMENTEN**

Eine Kompartimentierung biochemischer Prozesse ist für alle eukaryotischen Zellen charakteristisch und essentiell. Der gerichtete Transport der an zytoplasmatischen Ribosomen synthetisierten Proteine in die jeweiligen Zielkompartimente/-organellen ist meist durch eine spezifische Erkennungsinformation in ihrer Sequenz bzw. Struktur definiert. Im folgenden werden mögliche Sortierungswege für JIP23 anhand der derzeit verfügbaren Daten über dieses Protein diskutiert.

Im JM-behandelten Gerstenblatt ist JIP23 in der Vakuole, den Peroxisomen, im Zellkern und im Zytoplasma lokalisiert (HAUSE et al., 1994). Es konnte gezeigt werden, daß das Mengenverhältnis der Isoformen innerhalb und außerhalb des Zellkerns unterschiedlich ist (Abb.20).

In Gerstenkeimlingen wurde JIP23 nicht im Zellkern vorgefunden (Abb.18). Ob hier das Protein in den Peroxisomen vorkommt, wurde bisher nicht untersucht. Die durchgeführten zytologischen Untersuchungen erlauben nur die Aussage, daß JIP23 im Zytoplasma und der Vakuole des Keimlings nachweisbar ist.

JIP23 ist ein an zytoplasmatischen Ribosomen synthetisiertes Protein und muß demzufolge in die Zielorganellen transportiert werden. Welche Transportmöglichkeiten für JIP23 bestehen, soll im folgenden dargestellt werden.

Vakuole: Pflanzliche vakuoläre Proteine besitzen keine einheitlichen Signalsequenzen (SAALBACH et al., 1991). Der Transport erfolgt entweder als Präkursorprotein, wobei während oder nach dem Transport die Signalsequenzen abgespalten werden (DOMBROWSKI et al., 1993), oder das vakuoläre Protein gelangt durch eine Information, die durch die dreidimensionale Struktur des Proteins gegeben ist, in die Vakuole (CHRISPEELS und RAIKHEL, 1992). In der Aminosäuresequenz von JIP23 konnten keine

bekannten Signalsequenzen identifiziert werden (Vergleichssequenzen s. BEDNAREK und RAIKHEL, 1992). Außerdem konnte weder im PAA-Gel noch in der Westernblotanalyse von Proteinextrakten JM-behandelter Gerstenblätter ein mögliches Propeptid identifiziert werden. Die Sortierung von JIP23 in die Vakuole könnte an seine Proteinstruktur gebunden sein. Ob diese Information im Protein enthalten ist, kann über die Transformation von cDNA-Sequenzen in ein heterologes System geklärt werden. In unserer Arbeitsgruppe wurden cDNAs für JIP37 und JIP23 in Tabakpflanzen transformiert. JIP37 wurde im JM-behandelten Gerstenblatt im Zytoplasma, in der Vakuole und im Zellkern lokalisiert (HAUSE et al., 1994). In transgenen Tabakpflanzen konnte JIP37 ebenfalls in diesen Zellkompartimenten detektiert werden (LEOPOLD, 1994), was darauf hinweist, daß im Protein die nötigen Lokalisierungssignale vorhanden sind. JIP23 konnte dagegen im transgenen Tabak nur im Zytoplasma und der Vakuole detektiert werden (HAUSE und GÖRSCHEN, persönliche Mitteilung). Für den Transport in die Vakuole besitzt JIP23 demzufolge ein derzeit noch unbekanntes Erkennungssignal.

Peroxisomen: Der Transport von Proteinen in die Peroxisomen ist an Signalsequenzen am Carboxyterminus bzw. in der Nähe des Aminoterminus gebunden (WOLINS und DONALDSON, 1997). Die Aminosäuresequenz von JIP23 weist keine Homologie zu diesen bekannten Signalen auf (Vergleichssequenzen s. GOULD et al., 1989; SWINKELS et al., 1991). Eine andere Möglichkeit des Transportes in Peroxisomen ist die Bildung von oligomeren Komplexen zwischen Proteinen mit und ohne die Lokalisationssignale (McNEW und GOODMAN, 1994 und 1996). Diese Transportform wäre auch für JIP23 denkbar.

Zellkern: Der Transport in den Zellkern erfolgt durch einen nuklearen Porenkomplex (NPC - nuclear pore complex). Für den effektiven und aktiven Transport von kernlokalisierten Proteinen sind bestimmte Signalsequenzen (NLS - nukleare Lokalisationssignale) innerhalb des reifen Proteins notwendig. Diese NLS-Sequenzen sind kurze Aminosäurefolgen, die reich an Arginin und Lysin sind und nicht an eine spezifische Region im Protein gebunden sind (GARCIA-BUSTOS et al., 1991; HICKS und RAIKHEL, 1995). Die JIP23-Sequenz weist keine Homologie zu derzeit bekannten NLS-Sequenzen auf.

Zwei weitere Möglichkeiten des Transportes in den Zellkern sind:

- (1) die Bildung von Komplexen zwischen Proteinen mit und ohne NLS-Sequenz, wobei das NLS-enhaltende Protein das andere Protein im „Huckepack“ aktiv in den Kern transportiert (NIGG et al., 1991),
- (2) die Diffusion durch den Kernporenkomplex. Die Diffusion in den Zellkern ist in Abhängigkeit von der Molekülstruktur für Moleküle einer Größe bis ca. 60 kDa möglich (SCHLENSTEDT, 1996; WEIS, 1998).

Für JIP23 kommen die beiden zuletzt genannten Möglichkeiten des Transportes in den Zellkern in Frage. Inwieweit diese Transportformen für die wenn auch nur geringen Unterschiede in der Verteilung der Isoformen außerhalb und innerhalb des Kerns verantwortlich sein können (s. Abb.20), kann derzeit nicht beantwortet werden.

Da JIP23 während der JM-Inkubation nur für einen Zeitraum von etwa 35 Stunden im Zellkern zu finden war (HAUSE, persönliche Mitteilung), steht die Frage nach dem gerichteten Export aus dem Kern. Auch dafür sind spezielle Signalsequenzen notwendig (kurze hydrophobe leucinreiche Aminosäurefolgen, WEIS, 1998). Die JIP23-Sequenz enthält aber auch solche Signale nicht. Weshalb der Import von JIP23 in den Kern nur eine bestimmte Zeit innerhalb der JM-Inkubation möglich ist, bleibt noch zu klären.

Im Keimling wurde JIP23 nicht im Zellkern vorgefunden (Abb.18). d.h. ein Zellkernvorkommen von JIP23 erfolgt nur bei JM-Applikation. Der Transport von JIP23 sollte gerichtet in und aus dem Zellkern erfolgen, weil ansonsten eine Gleichverteilung von JIP23 zwischen Zellkern und Zytoplasma zu erwarten ist.

JIP23 wurde im Zellkern im Bereich der Granula des Interchromatins lokalisiert (HAUSE et al., 1994). Diese granulären Strukturen (IG-interchromatin granules) sind membranlos und über netzwerkformende Filamente miteinander verbunden (THIRY, 1995). Sie sind Akkumulationsorte für Splisomenkomponenten, enthalten verschiedene RNA-Typen und haben vermutlich eine Rolle in der Organisation und der Regulation des RNA-Exports ins Zytoplasma als auch dem vorherigen Sortieren und Degradieren von anormalen und redundanten RNA-Molekülen (PUVION und PUVION-DUTILLEUL, 1996). Im Zusammenhang mit der beobachteten Verhinderung der Bindung bestimmter mRNAs an Ribosomen in den eine JIP23-cDNA tragenden transgenen Tabakpflanzen (s. 4.1.), könnte JIP23 in den Interchromatinbereichen eine Funktion durch Bindung von Transkripten haben. In Analogie zu den Hitzeschockproteinen, die als molekulare Chaperone eine Funktion durch Bindung an Proteine besitzen (Übersicht bei BECKER und CRAIG, 1994), wäre für JIP23

eine Funktion im Zellkern als Teil eines Schutz- bzw. Entsorgungsmechanismus für spezifische Transkripte denkbar. Dies setzt eine Bindung von JIP23 an spezielle Komponenten voraus. Die Untersuchungen von Pelletproteinen und löslichen Proteinen aus geplatzten Zellkernen (Abb.22) deutet aber schon eine Bindung von JIP23 an eine oder mehrere nicht näher charakterisierte Komponenten an. JIP23 besitzt möglicherweise auch eine schützende Funktion, die für den Erhalt der Struktur der granulären Bereiche des Interchromatins notwendig ist.

#### **4.4. INDUKTION DER *jip23*-EXPRESSION**

##### **4.4.1. Einfluß von Jasmonaten**

Nach exogener Applikation von JM bzw. verschiedenen Zuckern oder Trockenstreß und damit verbundenem Anstieg der endogenen Jasmonatmenge wird im Gerstenblatt die Synthese von mehreren JIPs induziert. JIP23 ist dabei dominant.

Dagegen kommt es im Verlauf von Samenreifung und Keimung nur zur Induktion einer *jip23*-Expression. Die Expression findet hier im Gegensatz zum JM-behandelten Blatt gewebespezifisch und zellspezifisch statt (s. 3.1.2. und 3.1.4.). Durch Bestimmung der während der Keimung akkumulierten Jasmonatmenge und der *jip23*-Expression sollte geklärt werden, ob die Induktion der Expression eines JIP23-Genes mit den Jasmonatmengen korreliert, d.h. ein funktionaler Zusammenhang bestehen könnte.

Die Analyse von Jasmonatgehalt und Akkumulation von JIP23 bzw. seiner mRNA in Keimlingen über die Zeit ergab keine eindeutige Korrelation. Während das Transkript für JIP23 in den ersten Tagen der Keimung stetig zunimmt, unterliegen die Jasmonatwerte starken Schwankungen (Abb.23).

Jasmonate haben im Verlauf der Entwicklung einer Pflanze vielfältige Aufgaben. Sie sind Bestandteil des Signalweges, der die Expression von Abwehrgenen als Antwort auf verschiedene Streßsituationen aus der Umwelt reguliert (Reviews s. SEMBDNER und PARTHIER, 1993; CREELMAN und MULLET, 1997a). Andererseits haben Jasmonate auch eine Rolle bei der Regulation von Wachstums- und Entwicklungsprozessen (Reviews s. CREELMAN und MULLET, 1997b; KODA, 1997). JA und ihre Ester zeigen verschiedene

Effekte auf das Zellwachstum wie z.B. die Inhibierung der Zellteilung (UEDA und KATO, 1982) und der Zellelongation (UEDA et al., 1995) oder die Förderung der Zellelongation (TAKAHASHI et al., 1994).

Anders als im ausdifferenzierten Gerstenblatt haben Jasmonate in Keimlingen nicht nur eine regulierende Funktion in der Antwort der Gewebe auf Streßereignisse. Neben notwendigen Schutzmechanismen zur Bewältigung von auftretendem Streß muß der Keimling vor allem wachsen, die Gewebe müssen sich erst formieren und die Zellen sich spezialisieren. Creelman und Mullet (1995) bestimmten in Sojabohnenkeimlingen den JA-Gehalt und zeigten, daß in meristematischen Geweben hohe JA-Gehalte vorhanden sind. Sie postulierten in diesen Geweben eine Funktion der Jasmonate bei der Ausprägung des Photosyntheseapparates. Tatsächlich konnte eine spezifische Hemmung der Translation von Transkripten für Chloroplastenproteine unter dem Einfluß von Jasmonaten nachgewiesen werden (REINBOTHE et al., 1993a, 1997). Die Verhinderung der Translation des Transkriptes der kleinen Untereinheit der RuBPCase durch heterolog exprimiertes JIP23 (GÖRSCHEN et al., 1997b, s. auch 4.1.) und die Induzierbarkeit eines *jip23* durch Jasmonate, ist ebenfalls ein Indiz für die Hypothese von Creelman und Mullet.

In sorbitgestreßten Gerstenblättern korreliert ein Anstieg der Menge an Jasmonaten mit der Akkumulation von JIP23 (LEHMANN et al., 1995). Desweiteren verringert sich die Photosyntheseaktivität in diesen Geweben. Creelman und Mullet postulieren, daß durch den erzwungenen Jasmonatanstieg die gestreßten Gewebe in einen Zustand zurückversetzt werden, der dem in frühen Entwicklungsphasen des Blattes entspricht.

Welche Rolle der relativ hohe JA-Gehalt in der Wurzelspitze, der sowohl in der Sojabohne als auch in der Gerste (HAUSE, persönliche Mitteilung) gefunden wurde besitzt, bleibt zu klären.

Im folgenden werden Ergebnisse dieser Arbeit im Hinblick auf die Frage diskutiert, ob die *jip23*-Expression während der Keimlingsentwicklung der Gerste jasmonatabhängig erfolgt.

#### (1) Vergleich der *jip23*-Expression im Keimling mit der in JM-behandelten Blättern

Nach exogener Applikation von JM erfolgt im Blatt eine Koregulation der Expression der verschiedenen JIP-Gene der Gerste (LEOPOLD, 1994). Trotz hoher endogener Jasmonatgehalte konnte im Keimling aber nur die *jip23*-Expression gefunden werden. Das

wirft die Frage auf, wie die Expression der anderen JIP-Gene, die jasmonatresponsiv sind, verhindert wird.

Die exogene Applikation von JM an Keimlinge induziert mindestens die *jip37*-Genexpression und führt zur verstärkten *jip23*-Expression (Abb.25). Wie im Blatt (WEIDHASE et al., 1987a) ist somit auch im Keimling die Induktion von *jips* durch exogene Gabe von JM möglich. Da relativ hohe endogene Jasmonatgehalte in speziellen Geweben des Keimlings (Mesokotyl, Scutellum, Blattbasis, s. Abb.24) gemessen wurden, scheinen JIP-Gene hier einem Repressionsmechanismus zu unterliegen, der ihre Expression verhindert. Denkbar ist das z.B. durch eine Kompartimentierung der Jasmonate oder das entwicklungsabhängige Auftreten von Repressoren in den Jasmonate enthaltenden Geweben.

Ob die verstärkte JIP23-Genproduktakkumulation im JM-behandelten Keimling auf Erhöhung der Expression des schon angeschalteten Gens beruht, konnte nicht festgestellt werden. Im Genom des Gerstenkultivars Salome existieren aber mindestens zwei Gene für JIP23 (GÖRSCHEN, persönl. Mitteilung und Abb.14). Diese beiden Gene könnten unterschiedlich reguliert sein und so die unterschiedlichen Expressionsmuster nach exogenem Streß bzw. im natürlichen Verlauf des Keimlingwachstums entstehen. Ein Gen könnte jasmonatabhängig sein, das andere jasmonatunabhängig bzw. abhängig von Jasmonaten und einem weiteren Faktor, wie Entwicklung oder Zucker (s. 4.4.2.). Auf die Regulation der Expression unterschiedlicher JIP23-Gene wird unter Punkt (2) genauer eingegangen.

Nach Streßeinwirkung z.B. durch Sorbitbehandlung oder Trockenheit am Gerstenblatt steigt der endogene Jasmonatgehalt an und JIPs werden synthetisiert (LEHMANN et al., 1995).

Auch im Keimling stieg der endogene Jasmonatgehalt während der ersten Stunden des Wachstums an, und JIP23 konnte detektiert werden (Abb.23). Die endogene Jasmonatmenge war in den Geweben am größten, in denen auch die größte Transkriptmenge für JIP23 akkumulierte (Scutellum, Mesokotyl, Abb.24A, B und D, E).

Im Sorbit-gestreßten Gerstenblatt beginnt die *jip23*-Expression etwa nach 12 h Inkubation auf 1M-Sorbitlösung. Zwölf Stunden nach Inkubationsbeginn liegt der absolute Gehalt an Jasmonaten bei etwa 3000 pmol/gFG und beträgt 6 h vorher etwa 2000 pmol/gFG (LEHMANN et al., 1995). Im Sorbitgestreßten Blatt muß vermutlich ein bestimmter Level an Jasmonaten vorhanden sein (der über 2000 pmol/gFG liegt), um eine *jip23*-Expression zu induzieren. Im 25 h alten Keimling sind im Scutellum ebenfalls über 2000 pmol/gFG, im Scutellum 48 h alter Keimlinge sogar über 4000 pmol/gFG vorhanden. Im Mesokotyl 25 h alter Keimlinge jedoch konnten nur etwa 1000 pmol/gFG bestimmt werden (Abb.24). Eine

Bewertung der Absolutmengen an Jasmonaten in Keimlingen, bezüglich eines nötigen Levels an Jasmonaten zur Induktion einer *jip23*-Expression ist daher schwer.

Im ausdifferenzierten Gerstenblatt besteht eine Korrelation zwischen dem Anstieg der exogen applizierten JM-Menge bzw. dem endogenen Jasmonatanstieg nach Sorbitolgabe und der daraufhin synthetisierten Transkriptmenge für die JIPs (LEOPOLD, 1994). Im Keimling besteht diese Korrelation nur bedingt. Zwar sind in Geweben mit stärkerer *jip23*-Expression auch verstärkt Jasmonate vorhanden gewesen. Durch die Lokalisation von JIP23 und seiner mRNA in ganz bestimmten Zelltypen des Keimlings (Geleitzellen des Leitgefäßsystems im Scutellarknotenbereich (Mesokotyl) und der Wurzel, in den Koleoptilenleitbündeln, im Scutellum, in den kleinen Blattleitbündeln) wird aber deutlich, daß die Expression sich eben auf diese wenigen Zellen beschränkt. Die Analyse der Verteilung der in diesen Geweben synthetisierten Jasmonate ist mit den derzeitigen Methoden nur unzureichend möglich, so daß eine eindeutige Korrelation zwischen Jasmonatmenge und *jip23*-Expression wie für das Blatt durchführbar, nicht geprüft werden kann.

Für die Beurteilung der gewebespezifischen Expression ist die Art der Jasmonatverbindung ohne Bedeutung. Obwohl Untersuchungen zur Struktur-Wirkungsbeziehung durchaus Unterschiede für einige Verbindungen erbrachten (MIERSCH et al., 1999), liegt die Induzierbarkeit durch die hauptsächlich endogen nachweisbaren Jasmonate (JA, JM, JA-L-Isoleucin) nicht weit auseinander. Außerdem ist JA die überwiegende Komponente, so daß hier auch mit dem ELISA, der die Summe dieser drei Verbindungen erfaßt, Jasmonat bestimmt werden konnte.

Durch die Manipulation der endogenen Jasmonatbiosynthese (Tetcyclacisapplikation) im Keimling im Vergleich mit einer veränderten *jip23*-Expression, sollte der Einfluß von Jasmonaten als Induktor der *jip23*-Expression verdeutlicht werden.

Tetcyclacis ist ein Wachstumsretardant, blockiert die Jasmonatbiosynthese und inhibiert so die JIP-Synthese im Gerstenblatt (HÄUSER et al., 1990, WASTERACK et al., 1995). Nach Tetcyclacisapplikation am Keimling wurden geringere Jasmonatgehalte bestimmt (Tab.4). Außerdem konnte weniger *jip23*-Transkript detektiert werden. Durch die Blockierung der JA-Biosynthese scheint die *jip23*-Expression abzunehmen, was ein Indiz für die Jasmonatinduzierbarkeit im Keimling ist. Mit dieser Aussage muß aber sehr vorsichtig umgegangen werden. Die *jip23*-Expression wird nicht vollständig gestoppt. Die geringere Synthese von *jip23*-Transkript könnte auch die Folge der negativen Beeinflussung der Keimung durch Tetcyclacis als Wachstumsretardant sein. Die Keimung ist ein sehr komplexer Prozeß und es kann nicht ausgeschlossen werden, daß neben der beabsichtigten Hemmung der

Jasmonatbiosynthese die Keimlingsentwicklung gestört war. Die Tetcyclacis-behandelten Keimlinge blieben phänotypisch in ihrer Entwicklung zurück. Während der Inkubation auf Tetcyclacis nahmen die Keimlinge kaum an Länge zu. Daß weniger *jip23*-Transkript zu finden war, könnte auf eine Verlangsamung der Wachstumsprozesse zurückzuführen und so der zeitliche Vergleich der Expression zwischen manipulierten (Tetcyclacisinkubierte) und nicht manipulierten Keimlingen verhindert worden sein.

## (2) JIP23-Gene

Roggen, Weizen und Gerbel, ein ursprüngliches Gerstenkultivar, exprimieren nach Applikation von JM im Blatt neue Proteine (HERRMANN et al., 1989). JIP23 wurde darunter allerdings nicht gefunden (HERRMANN et al., 1989 und Abb.14). Auch in verschiedenen anderen Gerstenkultivaren konnte keine *jip23*-Expression nach Behandlung mit JM nachgewiesen werden (HAUSE et al., 1999). Während des Keimungsprozesses konnte aber in allen untersuchten Getreidearten bzw. Gerstenkultivaren eine *jip23*-Expression detektiert werden (Abb.13, HAUSE et al., 1999). Dieses Ergebnis zeigt, daß mindestens ein JIP23-Gen in diesen Getreidearten existiert und dieses einer anderen Induktionsabhängigkeit unterliegt als das durch exogene Gabe von JM induzierbare im Gerstenkultivar Salome.

Inwieweit hier der Unterschied von Jasmonaten als exogenes bzw. endogenes Signal eine Rolle spielt, ist nicht geklärt. Daß ein solcher Unterschied besteht, belegen zwei Gene aus Gerste, die nur nach exogener Applikation von JM an Blätter induziert werden. *Jrg5* (Koffeinsäure O-methyltransferasegen) und *LOX2:Hv:1* (Lipoxygenasegen) werden nicht nach Sorbitol- und Trockenstreß und damit verbundenem endogenem Jasmonatanstieg exprimiert (LEE et al., 1997; VÖRÖS et al., 1998). Die *jip23*-Expression im Keimling und das Fehlen einer *jip23*-Expression in JM-behandelten Blättern verschiedener Gerstenkultivare spricht für Unterschiede in der Induktion der verschiedenen JIP23-Gene. Für Gerstenkultivare, die auf exogene JM-Applikation nicht mit einer *jip23*-Expression reagieren, konnte auch keine Induktion nach durch Sorbitapplikation ausgelöster Erhöhung endogener Jasmonate beobachtet werden (HAUSE et al., 1999). Deshalb ist anzunehmen, daß das JIP23-Gen welches im Keimling exprimiert wird, entweder vollkommen jasmonatunabhängig ist oder neben Jasmonaten auch eine z.B. entwicklungsabhängige Komponente zur Expression benötigt.



Für Gene vegetativer Speicherproteine aus der Sojabohne (vspA und vspB) konnte eine synergistische Koregulation der Expression durch endogene JA und Zucker gezeigt werden (MASON et al., 1992 und 1993). Im Promoter des vspB wurde eine jasmonatresponsive und eine sucroseresponsive Region identifiziert. Durch Deletionsexperimente wurde gezeigt, daß diese Regionen voneinander trennbar sind. Weitere cis-Elemente, die z.B. eine Induktion durch Entwicklung (LORBERTH et al. 1992) oder Verwundung (KEIL et al., 1989) vermitteln können, wurden in Promotoren anderer Gene gefunden.

Der Vergleich von DNA aus Gerbel und aus Salome hinsichtlich des Vorhandenseins von JIP23-Genen weist darauf hin, daß in Salome ein Gen mehr vorliegt als in Gerbel (Abb.15).

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Induzierbarkeit von JIP23-Genen wäre, daß in Salome das zusätzliche JIP23-Gen einen nur oder stark jasmonatresponsiven Promoter hat. Während der Keimung wird dagegen in Salome ein anderes JIP23-Gen, dem die jasmonatresponsive Nukleotidsequenz im Promoter entweder ganz fehlt oder die mit einer z.B. entwicklungsabhängigen Komponente zusammen reguliert oder von dieser überlagert wird, induziert.

Die Exonbereiche der JIP23-Gene, die während der Keimung bzw. im gestreßten Blatt exprimiert werden, dürften kaum Unterschiede aufweisen, da mit den verwendeten Untersuchungsmethoden bis auf eine Ausnahme (eine Isoform zusätzlich im JM-behandelten Blatt) stets die gleichen Isoformen, wenn auch in unterschiedlichen Mengenverhältnissen zu finden waren. Diese Annahme könnte durch Identifizieren der Gene für JIP23 und deren Analyse geklärt werden. Dies erfolgt z.Zt. in der Arbeitsgruppe.

Ein Beispiel für zwei autonom regulierte Gene, die das funktionell gleiche Protein codieren ist die Tryptophandecarboxylase (TDC) aus *Camptotheca acuminata* (Chinesenbaum, LOPEZ-MEYER et al., 1997). Die TDC hat eine Schlüsselrolle in der Monoterpenindolalkaloidbiosynthese und verbindet primären mit sekundärem Stoffwechsel. Es besteht eine hohe Sequenzhomologie auf Nukleotid- (82%) genauso wie auf Aminosäureebene (84%). Enzymatische Tests ergaben eindeutig die TDC-Funktion für beide Proteine. Das Gen *tdc1* wird entwicklungsabhängig reguliert und ist nicht jasmonatresponsiv. Das Gen *tdc2* ist induzierbar durch JM oder Pilzelizitoren und wird dabei nie in ungestreßten Geweben exprimiert. Die Autoren diskutieren die beiden Gene als funktionsspezifischen Bestandteil zweier unabhängiger Abwehrsysteme, eines induzierbaren für *tdc2* und eines, das durch die Entwicklungsprogramme der Pflanze bestimmt wird. Eine solche voneinander unabhängige Regulation verschiedener Gene, die ein funktionell gleiches Protein codieren, wäre auch für JIP23 denkbar.

#### 4.4.2. Einfluß von osmotischem Streß

Während der Keimung und der sich daran anschließenden ersten Entwicklungsphase des Keimlings werden verstärkt Nährstoffe gebraucht. Diese werden zuallererst aus den Speichergeweben, dem Scutellum und dem Endosperm freigesetzt und dem sich entwickelnden Embryo bzw. der Keimpflanze zugeführt. Durch das Massenvorkommen von den zu transportierenden Kohlenhydraten kann es im jeweils betroffenen Gewebe zu osmotischem Streß kommen.

Das osmotische Potential in den Geweben scheint nicht für die Induktion der *jip23*-Expression im Keimling verantwortlich zu sein. Keimlinge, die mit bzw. ohne Endosperm angezogen wurden, zeigten erwartungsgemäß einen hohen bzw. einen niedrigen osmotischen Wert in ihrem Scutellum. Trotzdem bildeten beide Keimungsvarianten JIP23. Die unterschiedlich starke Akkumulation von JIP23 (s. Abb.26) ist vermutlich auf eine Wachstumsverlangsamung durch Nährstoffmangel in den Keimlingen, deren Endosperm entfernt wurde, zurückzuführen.

Nach exogener Streßapplikation an Gerstenblattsegmenten konnte auch keine Korrelation zwischen osmotischem Potential der applizierten Lösung als Stressor und der Expression von *jips* gefunden werden (LEHMANN et al., 1995). Obwohl hier die eingesetzten Lösungen von Glukose bzw. Kochsalz ein gleiches osmotisches Potential besitzen, induziert im Blatt nur Glukose die *jip*-Expression. Die *jip*-Induktion ist im Gerstenblatt also unabhängig vom osmotischen Potential der zum Stressen eingesetzten Lösung. Diskutiert wird hier ein Induktionseffekt bestimmter Zucker im Zusammenhang mit JA über verschieden responsive Promoterelemente in den JIP-Genen, wie sie in Genen für vegetative Speicherproteine schon gefunden werden konnten (KIM et al., 1992; MASON et al., 1993). Auch für die *jip23*-Expression im Keimling ist eine Induktion durch das Auftreten von Zuckern im Zusammenhang mit anderen Faktoren, die entwicklungspezifisch sind, denkbar.

Ausblick:

JIP23 ist in der Gerste sowohl im Blatt als auch im Keimling an der Bewältigung von Streßereignissen beteiligt. Sei es durch eine möglicherweise regulatorische Wirkung auf die Translation bestimmter mRNAs oder eventuell auch strukturell durch eine bestimmte dreidimensionale Struktur.

Die Regulation der *jip23*-Expression ist aber je nach den induzierenden Bedingungen (exogen im Blatt, endogen im Keimling) verschieden. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit der differenzierten Betrachtung der Expression eines funktionell wahrscheinlich identischen Proteins.

Um die Frage der Induktion des in der Entwicklung exprimierten JIP23-Genes zu klären, ist die Analyse seines Promoters erfolgversprechend. Promoterstudien können die Unterschiede in der Induzierbarkeit der *jip23*-Expression zeigen und zum besseren Verständnis der differentiellen *jip23*-Expression beitragen. Die Transformation von JIP23-cDNAs im homologen System (Gerste) stellt eine weitere Möglichkeit zur Funktionsuntersuchung von JIP23 dar. Beide Strategien werden derzeit in der Arbeitsgruppe praktiziert.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Unter Streßbedingungen werden in verschiedensten Pflanzenarten neue Proteine synthetisiert. Jasmonate haben dabei vielfach eine Funktion als Signalmoleküle für die Induktion der Genexpression. Aus jasmonatbehandelten bzw. gestreßten (Trockenstreß, osmotischer Streß) Gerstenblättern sind eine Reihe von jasmonatinduzierbaren Proteinen (JIPs) und/oder deren Gene bekannt. Jasmonaten konnte auch eine regulatorische Wirkung bei Wachstums- und Entwicklungsprozessen nachgewiesen werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der *jips* der Gerste während der Entwicklung und des Wachstums untersucht. Gefunden wurde eine *jip23*-Expression während der Samenreifung und –keimung. Sowohl Northernblot- und Westernblotanalysen als auch *in situ* Hybridisierung und der immunzytologische Nachweis dienten als Methoden zum Verfolgen der Expression eines JIP23-Genes und der Akkumulation seines Genproduktes.

Die Akkumulation von JIP23 und seiner mRNA nimmt im Verlauf des Reifungsprozesses von Gerstensamen des Kultivars Salome ab. Im vollständig ausgereiften, trockenen Samen sind mRNA und Protein nicht mehr nachweisbar.

Im wachsenden Keimling beginnt die *jip23*-Expression ca. 20 h nach Imbibition. Sie ist gewebs- und zellspezifisch. JIP23 und seine mRNA konnten in den Geleitzellen des vaskulären Systems, vor allem im Mesokotyl, und allen Zellen des Scutellums nachgewiesen werden. Eine zeitliche und örtliche Änderung der Expression konnte durch Vergleich verschieden alter Keimlinge beobachtet werden. JIP23-mRNA akkumulierte zuerst stärker im Scutellum (in 25 h alten Keimlingen) und später dann im Bereich des Mesokotyls (in 6 d alten Keimlingen).

Eine Akkumulation anderer, aus JM-behandelten Blättern bekannte JIPs (JIP37, JIP60) findet nicht statt. Im Gegensatz zur koregulierten Expression dieser *jips* im JM-behandelten Blatt wird während der Keimlingsentwicklung nur JIP23 gebildet.

Das gewebs- und zellspezifische Vorkommen von JIP23 während der Keimung ergab Hinweise auf eine mögliche Funktion dieses Proteins. Aufgrund des Vorkommens in Geweben (Scutellum und das vaskuläre System), durch die osmotisch wirksame Nährstoffe aus dem Endosperm in den Keimling transportiert werden, wird für JIP23 eine Schutzfunktion bei osmotisch stressenden Prozessen diskutiert. Andererseits wird für JIP23 eine Funktion bei

der unterschiedlichen Ausprägung des Photosyntheseapparates angenommen, da dieses Protein in Geweben akkumuliert, die photosynthetisch nicht aktiv sind.

Die Isoformenmuster von JIP23 wurden zwischen JM-behandelten Blatt und Keimling verglichen, um über Unterschiede eine nähere Charakterisierung des Proteins zu ermöglichen. In beiden Untersuchungsstadien konnten sechs gleiche Isoformen immunologisch nachgewiesen werden, die sich nur in den vorhandenen Mengen voneinander unterscheiden. Eine siebente Isoform, die nur im JM-behandelten Blatt zu finden war, kennzeichnet neben den erwähnten verschiedenen Mengenverhältnissen die Unterschiede zwischen JM-behandelten Blatt und Keimling.

In JM-behandelten Blättern konnte JIP23 in Zellkernen nachgewiesen werden. Die Untersuchung der Kompartimentierung der Isoformen ergab, daß die Isoformen im Zellkern und im Zytoplasma in unterschiedlicher Menge vorkommen. Einige der mengenmäßig geringer gebildeten Isoformen waren verstärkt im Zellkern zu finden. Diese Spezialisierung der Isoformen führte zu der Annahme, daß ein funktioneller Unterschied zwischen den Isoformen bestehen könnte.

Blätter des Gerstenkultivars Gerbel reagieren nach JM-Behandlung nicht wie Blätter des Gerstenkultivars Salome mit einer *jip23*-Expression. Es konnte gezeigt werden, daß das Gerbelgenom jedoch ein Gen für JIP23 besitzt und dieses während der Keimung auch exprimiert wird. Ebenso exprimieren die Roggensorte Petka und Weizensorte Hatri während der Keimung ein *jip23*. Die Expression dieses Gens während der Keimung scheint in Getreiden arten- und sortenübergreifend stattzufinden.

Darüber hinaus läßt das Vorkommen von mindestens zwei Genen für JIP23 im Genom des Gerstenkultivars Salome und der jasmonatunabhängigen *jip23*-Expression in der Gerbel eine unterschiedliche Induzierbarkeit dieser Gene im JM-behandelten Blatt und im Keimling vermuten.

Da *jip23* im Gerstenblatt jasmonatabhängig exprimiert wird, sollte analysiert werden, ob auch im Keimling ein endogener Jasmonatanstieg die JIP23-Synthese auslöst. Die gleichzeitige Analyse von *jip23*-Expression und Bestimmung der endogenen Jasmonatgehalte ergab aber keine eindeutige Korrelation. Nicht in allen Geweben mit relativ hohem Jasmonatspiegel konnte auch eine dem entsprechende *jip23*-Expression gefunden werden. Auch die Hemmung der Jasmonatbiosynthese im Keimling erbrachte kein eindeutiges Ergebnis. Der Einfluß der in

bestimmten Geweben des Keimlings vorhandenen osmotisch wirksamen, stressenden Nährstoffe wurde untersucht. Ein direkter Einfluß von osmotischen Streß konnte nicht nachgewiesen werden. Diskutiert wird eine nicht (nur) jasmonatabhängige, entwicklungsabhängige Induktion der Gene für JIP23 im Keimling.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Aldrige, D.C., Galt, S., Giles, D., Turner, W.B.** (1971) Metabolites of *Lasiodiploida theobromae*. J. Chem. Soc. (C):1623-1627
- Andresen, I., Becker, W., Schlüter, K., Burges, J., Parthier, B., Apel, K.** (1992) The identification of leaf thionin as one of the main jasmonate-induced proteins of barley (*Hordeum vulgare*). Plant Mol. Biol. 19: 193-204
- Baldwin, I.T., Zhang, Z.-P., Diab, N., Ohnmeiss, T.E., McCloud, E.S., Lynds, G.Y., Schmelz, E.A.** (1997) Quantification, correlations and manipulations of wound-induced changes in jasmonic acid and nicotine in *Nicotiana sylvestris*. Planta 201: 397-404
- Becker, W., Apel, K.** (1992) Isolation and characterisation of a cDNA clone encoding a novel jasmonate-induced protein of barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Mol. Biol. 19: 1065-1067
- Bednarek, S.Y., Raikhel, N.V.** (1992) Intracellular trafficking of secretory proteins. Plant Mol. Biol. 20: 133-150
- Bell, E., Mullet, J.E.** (1993) Characterization of an *Arabidopsis* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. Plant Physiol. 103: 1133-1137.
- Berger, S., Bell, E., Sadka, A., Mullet, J.E.** (1995) *Arabidopsis thaliana* Atvsp is homologous to soybean *VspA* and *VspB* genes encoding vegetative storage protein acid phosphatases, and is regulated similarly by methyl jasmonate, wounding, sugars, light and phosphate. Plant Mol. Biol. 27: 933-942.
- Birnboim, H.C., Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7: 1513-1523
- Blechert, S., Brodschelm, W., Hölder, S., Kammerer, L., Kutchan, T.M., Mueller, M.J., Xia, Z.-Q., Zenk, M.H.** (1995) The octadecanoid pathway: Signal molecules for the regulation of secondary pathways. PNAS USA 92: 4099-4105
- Blum, H., Eyer, H. and Gross, H.-J.** (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Elektrophoresis 8: 93-99
- Bosnes, M., Weideman, F., Olsen, O.-A.** (1992) Endosperm differentiation in barley wild-type and sex mutants. Plant J. 2(5): 661-674
- Bunker, T.W., Koetje, D.S., Stephenson, L.C., Creelman, R.A., Mullet, J.E., Grimes, H.D.** (1995) Sink limitation induces the expression of multiple soybean vegetative lipoxygenase mRNAs while the endogenous jasmonic acid level remains low. Plant Cell 7: 1319-1331.
- Cairney, J., Newton, R.J., Funkhouser, E.A., Chang, S.** (1995) Nucleotide sequence of a cDNA from *Atriplex canescens* (Pursh.) Nutt. . Plant Physiol. 108: 1289-1290

- Cassab, G.I., Varner, J.E.** (1987) Immunocytologization of extensin in developing soybean seed coats by immunogold-silver staining and by tissue printing on nitrocellulose paper. *J. Cell Biol.* 105: 2581-2588
- Cassab, G.I., Varner, J.E.** (1989) Tissue printing on cellulose paper: a new method for immunolocalization of proteins, localization of enzyme activities and anatomical analysis. *Cell Biol. Int. Reports* 13: 147-152
- Chaudhry, B., Müller-Urri, F., Cameron-Mills, V., Gough, S., Simpson, D., Skriver, K., Mundy, J.** (1994) The barley 60 kDa jasmonate-induced protein (JIP60) is a novel ribosome-inactivating protein. *Plant J.* 6: 815-824
- Chrispeels, M.J., Raikhel, N.V.** (1992) Short peptide domains target proteins to plant vacuoles. *Cell* 68: 613-616
- Cohen, Y., Gisi, U., Niderman, T.** (1993) local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic methyl ester. *Phytopathol.* 83: 1054-1062
- Conconi, A., Miquel, M., Browse, J.A., Ryan, C.A.** (1996) Intracellular levels of free linolenic and linoleic acids increase in tomato leaves in response to wounding. *Plant Physiol.* 111: 797-803
- Cordero, M.J., Raventós, D., Segundo, B.S.** (1994). Expression of a maize proteinase inhibitor gene is induced in response to wounding and fungal infection: systemic-response of a monocot gene. *Plant J.* 6: 141-150.
- Crabalona, L** (1967) Sur la présence de jasmonate de méthyle lévogyre [(pentène-2yl)-2oxo-3 cyclopentylacétate de méthyle, cis] dans l'huile essentielle de romarin de Tunisie. *C.R. Acad. Sci. (Paris) Série C* 264: 2074-2076.
- Creelman, R.A., Mullet, J.E.** (1995) Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *PNAS* 92: 4114-4119
- Creelman, R.A., Mullet, J.E.** (1997a) Biosynthesis and action of jasmonates in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 355-381
- Creelman, R.A., Mullet, J.E.** (1997b) Oligosaccharins, brassinolides and jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development and gene expression. *Plant Cell* 9: 1211-1223.
- Creelman, R.A., Tierney, M.L., Mullet, J.E.** (1992) Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4938-4941.



- Czapski, J., Saniewski, M.** (1992) Stimulation of ethylene production and ethylene-forming enzyme in fruits of the non-ripening nor and rin tomato mutants by methyl jasmonate. *J. Plant Physiol.* 139: 265-268
- Daletskaya, T.V., Sembdner, G.** (1989) Effect of jasmonic acid on germination of nondormant and dormant seeds. *Fiziol. Rast.* 36: 1118-1123
- Dathe, W., Rönsch, H., Preiss, A., Schade, W., Sembdner, G., Schreiber, K.** (1981) Endogenous plant hormones of broad bean, *Vicia faba* L. (-)-jasmonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp. *Planta* 153: 530-535.
- Davis, B.J.** (1964) Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad.Sci.* 121: 407-427
- Demole, E., Lederer, E., Mercier, D.** (1962) Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helv. Chim. Acta* 45: 675-685.
- Dittrich, H., Kutchan, T.M., Zenk, M.H.** (1992) The jasmonate precursor, 12-oxo-phytodienoic acid, induces phytoalexin synthesis in *Petroselinum crispum* cell cultures. *FEBS Lett.* 309: 33-36.
- Dombrowski, J.E., Schroeder, M.R., Bednarek, S.Y., Raikhel, N.V.** (1993) Determination of the functional elements within the vacuolar targeting signal of barley lectin. *Plant Cell* 5: 587-596
- Esau, K.,** (1965) *Plant anatomy.* John Wiley and sons, Inc., New York
- Falkenstein, E., Groth, B., Mithöfer, A., Weiler, E.W.** (1991) Methyljasmonate and  $\alpha$ -linolenic acid are potent inducers of tendrils coiling. *Planta* 185: 316-322.
- Farmer, E.E., Ryan, C.A.** (1992) Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4: 129-134.
- Feussner, I., Hause, B., Vörös, K., Parthier, B., Wasternack, C.** (1995) Jasmonate-induced lipoxygenase forms are localized in chloroplasts of barley leaves (*Hordeum vulgare* cv. Salome). *Plant J.* 7: 949-957.
- Feys, J.F., Benedetti, C.E., Penfold, C.N., Turner, J.G.** (1994) Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate and resistant to bacterial pathogen. *Plant Cell* 6: 751-759
- Franceschi, V.R., Grimes, H.D.** (1991) Induction of soybean vegetative storage proteins and anthocyanins by low-level atmospheric methyl jasmonate. *PNAS USA* 88: 6745-6749
- Garcia-Bustos, J., Heitman, J., Hall, M.N.** (1991) Nuclear protein localization. *Biochim. Biophys. Acta* 1071: 83-101

- Gottesmann, S., Halpern, E., and Trisler, P.** (1981) *J. Bacteriol.* 148:265-273
- Görschen, E., Dunaeva, M., Hause, B., Reeh, I., Wasternack, C., Parthier, B.** (1997a) Expression of ribosome inactivating protein JIP60 from barley in transgenic tobacco leads to abnormal phenotype and alterations on the level of translation. *Planta* 202: 470-478
- Görschen, E., Dunaeva, M., Reeh, I., Wasternack, C.** (1997b) Overexpression of the jasmonate-inducible 23kDa protein (JIP23) from barley in transgenic tobacco leads to the repression of leaf proteins. *FEBS letters* 419: 58-62
- Gould, S.J., Keller, G.A., Hosken, N., Wilkinson, J., Subramani, S.** (1989) A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J. Cell. Biol.* 108: 1657-1664
- Gross, D., Parthier, B.** (1994) Novel substances acting in plant growth regulation. *J. Plant Growth Reg.* 13: 93-114
- Gundlach, H., Müller, M. J., Kutchan, T.M., Zenk, M.H.** (1992) Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2389-2393.
- Häuser, C., Kwiatkowski, J., Rademacher, W., Grossmann, K.** (1990) Regulation of endogenous abscisic acid levels and transpiration in oilseed rape by plant growth retardants. *J. Plant. Physiol.* 137: 201-207
- Hanahan, D.** (1983) Studies on Transformation of *E. coli* with Plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580
- Harms, K., Atzorn, R., Brash, A., Kühn, H., Wasternack, c., Willmitzer, L., Pena-Cortes, H.** (1995) Expression of a flax allene oxide synthase cDNA leads to increased endogenous jasmonic acid (JA) levels in transgenic potato plants but not to a corresponding activation of JA-responding genes. *Plant cell* 7: 1645-1654
- Hause, B., Demus, U., Teichmann, C., Parthier, B., Wasternack, C.** (1996) Developmental and tissue-specific expression of JIP23, a jasmonat-inducible protein of barley. *Plant Cell Physiol.* 37:641-649.
- Hause, B., Hertel, S., Klaus, D., Wasternack, C.** (1998) Cultivar-specific expression of the jasmonate-induced protein of 23 kDa (JIP23) occurs in *Hordeum vulgare* L. upon stress treatment but not during seed germination. *Botanica Acta* (in press)
- Hause, B., zur Nieden, U., Lehmann, J., Wasternack, C., Parthier, B.** (1994) Intracellular localization of jasmonate-induced proteins in barley leaves. *Bot. Acta* 107: 333-341.
- Hause, B., Kogel, K.-H., Parthier, B., Wasternack, C.** (1997) In barley leaf calls, jasmonates do not act as a signal during compatible or incompatible interactions with the powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*). *J. Plant Physiol.* 150: 127-132
- Heitz, T., Bergey, D.R., Ryan, C.A.** (1997) A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin and methyl jasmonate. *Plant Physiol.* 114: 1085-1093

- Herde, O., Atzorn, R., Fisahn, J., Wasternack, C., Willmitzer, L., Pena-Cortes, H.** (1996) Localized wounding by heat initiates the accumulation of proteinase inhibitor II in abscisic acid deficient plants by triggering jasmonic acid biosynthesis. *Plant Physiol.* 112: 853-860
- Herrmann, G., Lehmann, J., Peterson, A., Sembdner, G., Weidhase, R.A., Parthier, B.** (1989) Species and tissue specificity of jasmonate-induced abundant proteins. *J. Plant Physiol.* 134: 703-709.
- Hicks, G.R., Raikhel, N.V.** (1995) Protein import into the nucleus: an integrated view. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11:155-188
- Hopke, J., Donath, J., Blechert, S., Boland, W.** (1994) Herbivore-induced volatiles: the emission of acyclic homoterpenes from leaves of *Phaseolus lunatus* and *Zea mays* can be triggered by a  $\beta$ -glucosidase and jasmonic acid. *FEBS Letters* 352:146-150
- Horton, R.F.** (1991) Methyl jasmonate and transpiration in barley. *Plant Physiol.* 96: 1376-1378
- Ishida, N., Koizumi, M., Kano, H.** (1996) Location of sugars in barley seeds during germination by NMR microscopy. *Plant, Cell and Environment.* 19: 1415-1422.
- Ishikawa, A., Yoshihara, T., Nakamura, K.** (1994) Jasmonate-inducible expression of a potato cathepsin D inhibitor-GUS gene fusion in tobacco cells. *Plant Mol. Biol.* 26: 403-414.
- Kakkar, R., Rai, V.** (1993) Plant polyamines in Flowering and fruit ripening. *Phytochemistry* 33: 1281-1288
- Keil, M., Sanchez-Serrano, J.J., Willmitzer, L.** (1989) Both wound-inducible and tuber-specific expression are mediated by the promoter of a single member of the potato proteinase inhibitor II gene family. *EMBO J.* 8: 1323-1330
- Kim, S.R., Choi, J.L., Costa, M.A., An, G.H.** (1992) Identification of G-box sequence as an essential element for methyl jasmonate response of potato proteinase inhibitor-II promoter. *Plant Physiol.* 99: 627-631.
- Kleczkowski, K., Schell, J.** (1995) Phytohormone conjugates:nature and function. *Crit. Rev. Plant Sci.* 14: 283-298
- Knöfel, H.-D., Brückner, C., Kramell, R., Sembdner, G., Schreiber, K.** (1990) Radioimmunoassay for the natural plant growth regulator (-)-jasmonic acid. *Biochem Physiol. Pflanz.* 186:387-394
- Koch, T., Bandemer, K., Boland, W.** (1997) Biosynthesis of *cis*-jasmane: pathway for the inactivation and the disposal of the plant stress hormone jasmonic acid to the gas phase? *Helv. Chim. Acta* 80: 838-850
- Koda, Y.** (1997) Possible involvement of jasmonates in various morphogenic events. *Physiologia Plantarum* 100: 639-647

- Kogel, K.-H., Ortel, B., Jarosch, B., Atzorn, R., Schiffer, R., Wasternack, C.** (1995) Resistance in barley against the powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*) is not associated with enhanced levels of endogenous jasmonates. *Eur. J. Plant Pathol.* 101: 319-332.
- Koiwa, H., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M.** (1997) Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Sciences* 2: 379-383
- Kyhse-Andersen, J.** (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 10, 203-209.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-684
- Laudert, D., Pfannschmidt, U., Lottspeich, F., Hollanderczytko, H., Weiler, E.W.** (1996) Cloning, molecular and functional characterization of *Arabidopsis* allene oxide synthase (CYP74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates. *Plant Mol. Biol.* 31: 323-335
- Lee, J.E., Parthier, B., Löbler, M.** (1996) Jasmonate signalling can be uncoupled from abscisic acid signalling in barley: Identification of jasmonate-regulated transcripts which are not induced by abscisic acid. *Planta* 199: 625-632.
- Lee, J.E., Vogt, T., Hause, B., Löbler, M.** (1997) Methyl jasmonate induces an *O*-Methyltransferase in Barley. *Plant Cell Physiol.* 38(7):851-862
- Lehmann, J., Atzorn, R., Brückner, C., Reinbothe, S., Leopold, J., Wasternack, C., Parthier, B.** (1995) Accumulation of jasmonate, abscisic acid, specific transcripts and proteins in osmotically stressed barley leaf segments. *Planta* 197: 156-162
- Leopold, J.** (1994) Isolation, Sequenzierung und Charakterisierung eines cDNA-Klones und genomischer Sequenzen für ein jasmonatinduzierbares 37-kDa-Protein der Gerste *Hordeum vulgare* L., Dissertation A (PhD thesis), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Biochemie/Biotechnologie.
- Leopold, J.** (1996) Isolation, characterisation and expression of a cDNA coding for a jasmonate-inducible protein of 37 kDa in barley leaves. *Plant, Cell and Environment* 19: 675-684
- Logemann, J., Schell, I., Willmitzer, L.** (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal.Biochem.* 163: 16-20

- Lopez-Meyer, M., Nessler, C.L.** (1997) Tryptophan decarboxylase is encoded by two autonomously regulated genes in *Camptotheca acuminata* which are differentially expressed during development and stress. *The Plant J.* 11(6): 1167-1175
- Lorberth, R., Dammann, C., Ebnet, M., Amati, S., Sanchez-Serrano, J.J.** (1992) Promoter elements involved in environmental and developmental control of potato proteinase inhibitor II expression. *Plant J.* 2: 477-486
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.** (1982) *Molecular cloning - a laboratory manual.* Cold Spring Harbour
- Mandel, M., Higa, A.** (1970) Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53: 159-162
- Maslenkova, L.T., Zanev, Y., Popova, L.P.** (1990) Oxygen-evolving activity of thylakoids from barley plants cultivated on different concentrations of jasmonic acid. *Plant Physiol.* 93: 1316-1320
- Mason, H.S., DeWald, D.B., Mullet, J.E.** (1993) Identification of a methyl jasmonate-responsive domain in the soybean *vspB* promoter. *Plant Cell* 5: 241-251.
- Mason, H.S., DeWald, D.B., Creelman, R.A., Mullet, J.E.** (1992) Coregulation of soybean vegetative storage protein gene expression by methyl jasmonate and soluble sugars. *Plant Physiol.* 98: 859-867
- Mason, H.S., Mullet, J.E.** (1990) Expression of two soybean vegetative storage protein genes during development and in response to water deficit, wounding, and jasmonic acid. *Plant Cell* 2: 569-579.
- Maugenest, S., Martinez, I., Lescure, A.M.,** (1997) Cloning and characterization of a cDNA encoding a maize seedling phytase. *Biochem. J.* 322: 511-517
- McConn, M., Browse, J.** (1996) The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an *Arabidopsis* mutant. *Plant Cell* 8: 403-416
- McNew, J.A., Goodman, J.M.** (1994) An oligomeric protein is imported into peroxisomes in vivo. *J.Cell.Biol.* 127: 1245-1257
- McNew, J.A., Goodman, J.M.** (1996) The targeting and assembly of peroxisomal proteins: some old rules do not apply. *TIBS* 21: 54-58
- Meyer, A., Miersch, O., Büttner, C., Dathe, W., Sembdner, G.** (1984) Occurrence of the plant growth regulator jasmonic acid in plants. *J. Plant Growth Regul.* 3: 1-8.
- Meyer, I., Grosset, J., Chartier, Y. and Cleyet-Marel, J.-C.** (1988) Preparation by two-dimensional electrophoresis of proteins for antibody production: Antibody against proteins whose synthesis is reduced by auxin in tobacco mesophyll protoplasts. *Electrophoresis* 9: 704-712

- Michelet, B., Boutry, M.** (1995) The plasma membrane ATPase. A highly regulated enzyme with multiple physiological functions. *J. Plant Physiol.* 108:1-6
- Miersch, O., Brückner, B., Schmidt, J., Sembdner, G.** (1992) Cyclopentane fatty acids from *Gibberella fujikuroi*. *Phytochem.* 31: 3835-3837.
- Miersch, O., Meyer, A., Vorkefeld, S., Sembdner, G.** (1986) Occurrence of (+)-7-iso-jasmonic acid in *Vicia faba* L. and its biological activity. *J. Plant Growth Regul.* 5: 91-100.
- Miersch, O., Kramell, R., Parthier, B., Wasternack, C.** (1999) Structure-activity relations of substituted, deleted or stereospecifically altered jasmonic acid in gene expression of barley leaves. *Phytochemistry* 50: 353-361
- Miersch, O., Preiss, A., Sembdner, G., Schreiber, K.** (1987) (+)-7-iso-jasmonic acid and related compounds from *Botryodiplodia theobromae*. *Phytochem.* 26: 1037-1039.
- Miller, I.H.** (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbour
- Miyamoto, K., Oka, M., Ueda, J.** (1997) Update on the possible mode of action of the jasmonates: Focus on the metabolism of cell wall polysaccharides in relation to growth and development. *Physiol. Plant.* 100: 631-638
- Mösinger, E., Schäfer, E.** (1984) In vivo phytochrome control of in vitro transcription rates in isolated nuclei from oat seedlings. *Planta* 161: 440-450
- Müller-Uri, F., Parthier, B., Nover, L.** (1988) Jasmonate-induced alteration of gene expression in barley leaf segments analyzed by *in vivo* and *in vitro* protein synthesis. *Planta* 176: 241-247
- Mueller, M.J., Brodschelm, W.** (1994) Quantification of jasmonic acid by capillary gas chromatography – negative chemical ionization – mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 218: 425-435
- Narvaez-Vasquez, J., Pearce, G., Orozco-Cardenas, M., Franceschi, V.R., Ryan, C.A.** (1995) Autoradiographic and biochemical evidence for the systemic translocation of systemin in tomato plants. *Planta* 195: 593-600
- Neto, G.C., Kono, Y., Hyakutate, H., Watanabe, M., Suzuki, Y., Sakurai A.** (1991) Isolation and identification of (-)-jasmonic acid from wild rice, *Oryza officinalis*, as an antifungal substance. *Agric. Biol. Chem.* 55: 3097-3098
- Nigg, E.A., Baeuerle, P.A., Lührmann, R.** (1991) Nuclear import-export: in search of signals and mechanisms. *Cell* 66:15-22
- O'Farell, P.** (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021

- Palm, C.J., Costa, M.A., An, G., Ryan, C.A.** (1990) Wound-inducible nuclear protein binds DANN fragments that regulate a proteinase inhibitor II gene from potato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 603-607
- Parchmann, S., Gundlach, H., Mueller, M.J.** (1997) Induction of 12-oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures. *Plant Physiol.* 115: 1057-1064
- Parthier, B.** (1990) Jasmonates: hormonal regulators or stress factors in leaf senescence? *J. Plant Growth Regul.* 9: 1-7.
- Parthier, B.** (1991) Jasmonates, new regulators of plant growth and development: many facts and few hypotheses on their actions. *Bot. Acta* 104: 446-454
- Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S., Ryan, C.A.** (1991) A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* 253: 995-998
- Peña-Cortés, H., Fisahn, J., Willmitzer, L.** (1995) Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4106-4113.
- Peña-Cortés, H., Liu, X., Sanchez Serrano, J., Schmid, R., Willmitzer, L.** (1992) Factors affecting gene expression of patatin and proteinase-inhibitor-II gene families in detached potato leaves: Implications for their co-expression in developing tubers. *Planta* 186: 495-502.
- Peña-Cortés, H., Prat, S., Atzorn, R., Wasternack, C., Willmitzer, L.** (1996) Abscisic acid-deficient plants do not accumulate proteinase inhibitor II following systemin treatment. *Planta* 198: 447-451.
- Pennickx, A.M.A., Eggermont, K., Terras, F.R.G., Thomma, B.P.H.J., De Samblanx G.W., Buchala, A., Metraux, J.-P., Manners, J.M., Broekaert, W.F.** (1996) Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* 8: 2309-2323
- Popova, L.P., Tsonev, T.D., Vaklinova, S.G.,** (1988) Changes in some photosynthetic and respiratory properties in barley leaves after treatment with jasmonic acid. *J. Plant Physiol.* 132: 257-261
- Puvion, E., Puvion-Dutilleul, F.** (1996) Ultrastructure of the nucleus in Relation to transcription and splicing: roles of perichromatin fibrils and interchromatin granules. *Experimental Cell Res.* 229: 217-225
- Ranjan, R., Lewak, S.** (1992) Jasmonic acid promotes germination and lipase activity in non-stratified apple embryos. *Physiol. Plant.* 86: 335-339
- Raskin, I.** (1992) Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 439-463

- Reinbothe, S., Machmudova, A., Wasternack, C., Reinbothe, C., Parthier B.** (1992a) Jasmonate-induced proteins in cotton: Immunological relationship to the respective barley proteins and homology of transcripts to late embryogenesis abundant (Lea) mRNAs. *J. Plant Growth Regul.* 11: 7-14
- Reinbothe, S., Mollenhauer, B., Reinbothe, C.** (1994a) JIPs and RIPs: The regulation of plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens. *Plant Cell* 6: 1197-1209.
- Reinbothe, C., Parthier, B., Reinbothe, S.** (1997) Temporal pattern of jasmonate-induced alterations in gene expression of barley leaves. *Planta* 201: 281-287
- Reinbothe, S., Reinbothe, C., Heintzen, C., Seidenbecher, C., Parthier, B.** (1993a) A methyl jasmonate-induced shift in the length of the 5' untranslated region impairs translation of the plastid *rbcL* transcript in barley. *EMBO J.* 12: 1505-1512.
- Reinbothe, S., Reinbothe, C., Lehmann, J., Becker, W., Apel, K., Parthier, B.** (1994b) JIP60, a methyl jasmonate-induced ribosome-inactivating protein involved in plant stress reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7012-7016.
- Reinbothe, S., Reinbothe, C., Lehmann, J., Parthier, B.** (1992b) Differential accumulation of methyl jasmonate-induced mRNAs in response to abscisic acid and desiccation in barley (*Hordeum vulgare*). *Physiol. Plant.* 86: 49-56
- Reinbothe, S., Reinbothe, C., Parthier, B.** (1993b) Methyl jasmonate represses translation initiation of a specific set of mRNAs in barley. *Plant J.* 4: 459-467.
- Reinbothe, S., Reinbothe, C., Parthier, B.** (1993c) Methyl jasmonate-regulated translation of nuclear-encoded chloroplast proteins in barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Salome). *J. Biol. Chem.* 268: 10606-10611.
- Richwien, M.** (1993) *In situ* hybridisierung Jasmonat-induzierter Transkripte in *Hordeum vulgare* cv, Salome. Diplomarbeit, Martin.Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Robertson, E.F., Dannelly, H.K., Malloy, P.J. and Reeves, H.C.** (1987) Rapid isoelectric focusing in a vertikale polyacrylamide minigel system. *Anal. Biochem.* 167: 290-294
- Roloff, A., Parthier, B., Wasternack, C.** (1994) Relationship between degradation of ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase and synthesis of an abundant protein of 23 kDa of barley leaves (*Hordeum vulgare* cv. Salome) induced by jasmonates. *J. Plant Physiol.* 143: 39-46
- Rosahl, S.** (1996) Lipoxygenases in plants - Their role in development and stress response. *Z. Naturforsch.* 51: 123-138.
- Rouster, J., Leah, R., Mundy, J., Cameron-Mills, V.** (1997) Identification of a methyl jasmonate-responsive region in the promoter of a lipoxygenase 1 gene expressed in barley grain. *Plant J.* 11: 513-523



- Royo, J., Vancanneyt, G., Perez, A.G., Sanz, C., Störmann, K., Rosahl, S., Sanchez-Serrano, J.J.** (1996) Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. *J. Biol. Chem.* 271: 21012-21019
- Ryan, C.A.** (1992) The search for the proteinase inhibitor inducing factor, PIIF. *Plant Mol. Biol.* 19: 123-133
- Saalbach, G., Jung, R., Kunze, G., Saalbach, I., Adler, K., Müntz, K.** (1991) Different legumin protein domains act as vacuolar targeting signals. *Plant Cell* 3: 697-708
- Saniewski, M., Czapski, J.** (1983) The effect of methyl jasmonate on lycopene and  $\beta$ -carotene accumulation in ripening red tomato. *Experientia* 39: 1373-1374
- Satler, S.O., Thimann, K.V.** (1981) Le jasmonate de methyle: nouveau et puissant promoteur de la senescence des feuilles. *C.R.Acad. Sci. Paris Ser. III* 293: 735-740
- Schaller, A., Ryan, C.A.** (1995) Systemin – a polypeptide defense signal in plants. *Bioassays* 18: 27-33
- Schlenstedt, G.** (1996) Protein import into the nucleus. *FEBS letters* 389:75-79
- Schweizer, P., Buchala, A., Silverman, P., Seskar, M., Raskin, I., Metraux, J.-P.** (1997) Jasmonate-inducible genes are activated in rice by pathogen attack without a concomitant increase in endogenous jasmonic acid levels. *Plant Physiol.* 114: 79-88
- Sembdner, G., Atzorn, R., Schneider, G.** (1994) Plant hormone conjugation. *Plant Mol. Biol.* 26: 1459-1481
- Sembdner, G., Gross, D.** (1986) Plant growth substances of plant and microbial origin. In: *Plant growth substances.* (1985) M. Bopp (ed.) pp. 139-147, Berlin/Heidelberg/New York/Tokyo:Springer-Verlag
- Sembdner, G., Parthier, B.** (1993) The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 569-589
- Serghini, M.A., Ritzenthaler, C., Pinck, L.** (1989) A rapid and efficient „miniprep“ for isolation of plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 17: 3604
- Staswick, P.E.** (1992) Jasmonate, genes, and fragrant signals. *Plant Physiol.* 99: 804-807.
- Staswick, P.E.** (1989) Preferential loss of an abundant storage protein from soybean pods during seed development. *Plant Physiol.* 90: 1252-1255
- Staswick, P.E.** (1994) Storage proteins of vegetative plant tissues. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 303-322
- Stelmach, B.A., Müller, A., Hennig, P., Laudert, D., Andert, L., Weiler, E.W.** (1998) Quantitation of the octadecanoid 12-oxo-phytodienoic, a signalling compound in plant mechanotransduction. *Phytochemistry* 47: 539-546

- Swinkels, B.W., Gould, S.J., Bodnar, A.G., Rachubinski, R.A., Subramani, S.** (1991) A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *EMBO J.* 10: 3255-3262
- Takahashi, K., Fujino, K., Kikuta, Y., Koda, Y.** (1994) Expansion of potato cells in response to jasmonic acid. *Plant Sci.* 100: 3-8
- Thipyapong, P., Steffens, J.C.** (1997) Tomato polyphenol oxidase: Differential response of the polyphenol oxidase F promoter to injuries and wound signals. *Plant Physiol.* 115: 409-418
- Thiry, M.** (1995) Behavior of interchromatin granules during the cell cycle. *European J. Cell Biol.* 38: 14-24
- Ueda, J., Kato, J.** (1982) Inhibition of cytokinin-induced plant growth by jasmonic acid and its methyl ester. *Physiol. Plant.* 52: 305-309
- Ueda J., Kato J.** (1980) Isolation and identification of a senescence-promoting substance from wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Plant Physiol.* 66: 246-249.
- Ueda, J., Miyamoto, K., Aoki, M., Hirata, T., Sato, T., Momotani, Y.** (1991a) Identification of jasmonic acid in *Chlorella* and *Spirulina*. *Bull. Univ. Osaka Pref., Ser. B.* 23: 103-108
- Ueda, J., Miyamoto, K., Aoki, M.** (1995) Jasmonic acid inhibits the IAA-induced elongation of oat coleoptile segments: A possible mechanism involving the metabolism of cell wall polysaccharides. *Plant Cell Physiol.* 35: 1065-1070
- Ueda, J., Miyamoto, K., Sato, T., Momotani, Y.** (1991b) Identification of jasmonic acid from *Euglena gracilis* Z. as a plant growth regulator. *Agric. Biol. Chem.* 55: 275-276
- Ueda, J., Mizumoto, T., Kato, J.** (1991c) Quantitative changes of abscisic acid and methyl jasmonate correlates with vernal leaf abscission of *Ficus superba* var. *japonica*. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 187: 203-210
- Vick, B.A., Zimmerman, D.C.** (1984) Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiol.* 75: 458-461.
- Vick, B.A., Zimmerman, D.C.** (1987) Pathways of fatty acid hydroperoxide metabolism in spinach leaf chloroplasts. *Plant Physiol.* 85: 1073-1078.
- Vörös, K., Feussner, I., Kühn, H., Lee, J., Graner, A., Löbler, M., Parthier, B., Wasternack, C.** (1998) Characterisation of a methyljasmonate-inducible lipoxygenase from barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome) leaves. *Eur. J. Biochem.* 251: 36-44
- Waring, G.L., Alus, C.D. and Mahowald, A.-P.** (1978) Isolation of polar granules and the identification of polar granule-specific protein. *Dev. Biol.* 66: 197-206

- Wasternack, C.** (1998) Functions of jasmonate-altered gene expression in stress responses and development. In: Mechanism of action of plant hormones. eds.: K.Palme, R.Walden, J.Schell, Springer Verlag (in press)
- Wasternack, C., Atzorn, R., Blume, B., Leopold, J., Parthier, B.** (1994) Ursolic acid inhibits synthesis of jasmonate-induced proteins in barley leaves. *Phytochem.* 35: 49-54.
- Wasternack, C., Atzorn, R., Leopold, J., Rademacher, W., Parthier, B.** (1995) Synthesis of jasmonate-induced proteins of barley (*Hordeum vulgare*) is inhibited by the growth retardant tetcyclacis. *Physiologia Plantarum* 94: 335-341
- Wasternack, C., Atzorn, R., Pena-Cortes, H., Parthier, B.** (1996) Alteration of gene expression by jasmonate and ABA in tobacco and tomato. *J. Plant Physiol.* 147: 503-510
- Wasternack, C., Parthier, B.** (1997) Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends in Plant Science* 2: 302-307
- Weidhase, R.A., Kramell, H.-M., Lehmann, J., Liebisch, H.-W., Lerbs, W., Parthier, B.** (1987a) Methyljasmonate-induced changes in the polypeptide pattern of senescing barley leaf segments. *Plant Sci.* 51: 177-186.
- Weidhase, R.A., Lehmann, J., Kramell, H.-M., Sembdner, G., Parthier, B.** (1987b) Degradation of ribulose-1,5 biphosphate carboxylase and chlorophyll in senescing barley leaf segments triggered by jasmonic acid methyl ester, and counteraction by cytokinin. *Physiol. Plant* 69: 161-166
- Weiler, E.W.** (1986) Plant hormone immunoassays based on monoclonal and polyclonal antibodies. In: Modern methods of plant analysis, vol.4: Immunology in plant sciences, pp. 1-17, Linskens, H.F., Jackson, J.F., eds. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo
- Weiler, E.W., Albrecht, T., Groth, B., Xia, Z.-Q., Luxem, M., Liss, H., Andert, I., Spengler, P.** (1993) Evidence for the involvement of jasmonates and their octadecanoid precursors in the tendril coiling response of *Bryonia dioica*. *Phytochemistry* 32: 591-600
- Weiler, E.W., Kutchan, T.M., Gorba, T., Brodschelm, W., Niesel, U., Bublitz, F.** (1994) The *Pseudomonas* phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signalling molecules of higher plants. *FEBS letters* 345: 9-13
- Weis, K.** (1998) Importins and exportins: how to get in and out of the nucleus. *TIBS* 23: 185-189
- Westermeier, R.** (1990) Elektrophorese-Praktikum. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1. Aufl..
- Willmitzer, L., Wagner, K.G.** (1981) The isolation of nuclei from tissue-cultured plant cells. *Exp. Cell Res.* 135: 69-77
- Wienand, U., Feix, G.** (1980) Zein-specific restriction enzyme fragments of maize DNA. *FEBS letters* 116: 14-16

**Wilens, R.W., Vanrooijen, G.J.H., Pearce, D.W., Pharis, R.P., Holbrook, L.A., Moloney, M.M.** (1991) Effects of jasmonic acid on embryo-specific processes in *Brassica* and *Linum* oilseeds. *Plant Physiol.* 95: 399-405.

**Wolins, N.E., Donaldson, R.P.** (1997) Binding of the peroxisomal targeting sequence SKL is specified by a low-affinity site in castor bean glyoxysomal membranes. *Plant Physiol.* 113: 943-949

**Yamane, H., Takagi, H., Abe, H., Yokota, T., Takahashi, N.** (1981) Identification of jasmonic acid in three species of higher plants and its biological activities. *Plant Cell Physiol.* 22: 689-697.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Benno Parthier für die Möglichkeit danken, daß ich in der von ihm geleiteten Abteilung Hormonforschung am Institut für Pflanzenbiochemie Halle die praktischen Arbeiten zur Promotion durchführen konnte

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Claus Wasternack. Ihm danke ich für die Überlassung des Themas zur Promotion die ständige Bereitschaft zur Diskussion, die kritischen Anmerkungen und nicht zuletzt dafür, daß diese Arbeit nun doch noch zustande gekommen ist.

Desweiteren möchte ich Frau Dr. Bettina Hause für ihre Hilfe beim Einarbeiten in die zytologische Arbeitsweise genauso wie beim kritischen Lesen des Manuskriptes herzlich danken.

Frau Sylvia Krüger und Birgit Ortel möchte ich für die Unterstützung bei der praktischen Arbeit danken.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe sei für die ständige Hilfsbereitschaft und freundliche Arbeitsatmosphäre gedankt.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorgelegte Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt habe. Andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel habe ich nicht benutzt. Die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde nur an der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität eingereicht.

Halle (Saale), den 14.06.1999

## Lebenslauf

Name: Uta Demus  
Geburtstag: 23.08.1968  
Geburtsort: Halle (Saale)  
Familienstand: Lebensgemeinschaft, 1 Kind

Schulbildung: 1975-1985 Besuch der Grundschule  
1985-1987 Besuch der Erweiterten Oberschule  
mit Ablegung des Abiturs in Halle (Saale)

Berufsausbildung: -1987-1989 Grundstudium der Biologie, MLU Halle-Wittenberg  
-1989-1992 Spezialisierungsrichtung Genetik  
-Sommer 1990 siebenwöchiges Praktikum am Institut für Genetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben in der Arbeitsgruppe „Tierische Entwicklungsgenetik“  
-Juli/August 1991 Ablegen der Diplom-Hauptprüfungen in den Fächern Zellphysiologie (Note 1), Allgemeine Genetik (Note 1) und Gentechnologie (Note 1)  
-02.11.1992 Abschluß des Studiums mit dem Diplom „Ansätze zur molekularen Analyse des *marmorata*-Gens von *Antirrhinum majus* L. unter Verwendung transponibler Elemente“, Gesamtnote: sehr gut  
-bis Juli 1993 Fortführung des Diplomthemas  
-ab August 1993 Promotionsstelle am Institut für Pflanzenbiochemie in Halle; Arbeitsgruppe: Hormonforschung  
-ab September 1997 Erziehungsurlaub