

„Molekulare Mechanismen der Stickstoffmangel- induzierten Blattseneszenz“

Dissertation

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

vorgelegt der

**Naturwissenschaftlichen Fakultät I -Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

von Diplom-Biochemiker Jörg Schildhauer
geb. am 06. August 1981
in Lutherstadt Wittenberg

Gutachter

1. Prof. Dr. Klaus Humbeck, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. Sacha Baginsky, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
3. Prof. Dr. Bernd Müller-Röber, Max-Planck-Institut für Molekulare
Pflanzenphysiologie

Tag der öffentlichen Verteidigung: 31. Januar 2012

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis..... | 4 |
| 1 Einleitung..... | 5 |
| 1.1 Blattseneszenz ist die letzte Phase der Blattentwicklung..... | 5 |
| 1.2 Reprogrammierung der Genexpression in der Entwicklungs-induzierten Blattseneszenz..... | 6 |
| 1.3 Schlüsselfaktoren des seneszenzabhängigen N-Recycling..... | 7 |
| 1.4 N-Mangel induzierte Blattseneszenz..... | 8 |
| 1.5 Weitere Formen der Streß-induzierten Blattseneszenz..... | 9 |
| 1.6 Zielsetzung..... | 10 |
| 2 Material / Methoden..... | 11 |
| 2.1 Hypochlorid-Oberflächensterilisation..... | 11 |
| 2.2 Erdkultur..... | 11 |
| 2.3 Hydrokultur..... | 11 |
| 2.4 Photosystem II-Effizienz-Messungen..... | 12 |
| 2.5 Messung des Blatt-Chlorophyllgehalt..... | 13 |
| 2.6 RNA-Extraktion..... | 13 |
| 2.7 DNaseI Behandlung..... | 14 |
| 2.8 cDNA-Synthese..... | 15 |
| 2.9 Quantitative-Real-Time PCR (qPCR) | 17 |
| 2.10 Affymetrix ATH1 Microarray-Methoden..... | 18 |
| 2.11 ATH1-Datensätze..... | 18 |
| 2.12 Metabolit-Messungen..... | 20 |
| 2.13 Phytohormon-Messungen..... | 20 |
| 3 Ergebnisse..... | 21 |
| 3.1 Stickstoff-abhängige Regulation der Blattseneszenz in Gerste | 21 |
| 3.1.1 Zusätzliche Nitratgaben hemmen Gersten – Fahnenblattseneszenz..... | 21 |
| 3.1.2 Transkriptlevel der plastidären GS2 und LKR/SDH in Gersten-Fahnenblättern..... | 22 |
| 3.1.3 N-Mangel induzierte Primärblatt-Seneszenz der Gerste..... | 23 |
| 3.1.4 Hemmung der N-Mangel induzierten Primärblatt-Seneszenz der Gerste..... | 24 |
| 3.2 N-Mangel induzierte Blattseneszenz in Ackerschmalwand (<i>Arabidopsis thaliana</i>)..... | 25 |
| 3.2.1 N-Mangel induzierte Seneszenz in Blättern von <i>Arabidopsis thaliana</i> wird durch N-Zugabe gehemmt..... | 25 |
| 3.2.2 <i>Arabidopsis thaliana</i> -Transkript-Profilierung der N-Mangel induzierten Blattseneszenz..... | 26 |
| 3.2.2.1 Modul 1..... | 27 |
| 3.2.2.1.1 Hierarchisches-Clustering der ATH1-Expressionsprofile..... | 28 |
| 3.2.2.1.2 Identifikation von N-Mangel regulierten Genen..... | 29 |
| 3.2.2.1.3 Identifikation von N-Zugabe regulierten Genen..... | 31 |
| 3.2.2.1.4 Vergleich von N-Mangel und N-Zugabe regulierten Genen..... | 34 |
| 3.2.2.1.5 PageMan-Analyse N-regulierter Gene..... | 35 |
| 3.2.2.2 Modul 2..... | 37 |
| 3.2.2.2.1 Definition von N-Signalkanälen..... | 37 |
| 3.2.2.2.2 Identifikation zusätzlicher ATH1-Datensätze zur N-Datenfilterung..... | 37 |
| 3.2.2.2.3 Auswahl der N-Datensätze zur N-Datenfilterung..... | 38 |
| 3.2.2.3 Modul 3..... | 40 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.2.3.1 N-Datenfilterung..... | 41 |
| 3.2.2.3.2 Identifikation von N-Markergenen..... | 42 |
| 3.2.2.4 Modul 4..... | 45 |
| 3.2.2.4.1 Identifikation von Wegweiser-Datensätzen..... | 45 |
| 3.2.2.4.2 N-Zugabe regulierte Gene in den Wegweiser-Datensätzen..... | 48 |
| 3.2.3 Vergleich der N-Zugabe-Regulationsmuster mit Daten aus AG Scheible..... | 50 |
| 3.2.4 Vergleich qPCR und Affymetrix-Werte..... | 53 |
| 3.2.5 Kleine regulatorische RNA-sRNA..... | 54 |
| 3.2.5.1 Level von sRNA in der Entwicklungs-induzierten Blattseneszenz..... | 54 |
| 3.2.5.2 Level von sRNA in der N-Mangel-induzierten Blattseneszenz..... | 54 |
| 3.2.6 Metabolit-Level der N-Mangel-induzierten Blattseneszenz..... | 56 |
| 3.2.6.1 Aminosäuren..... | 56 |
| 3.2.6.2 Kohlenhydrate..... | 57 |
| 3.2.6.3 Organische Säuren..... | 57 |
| 3.2.6.4 Weitere Metabolite..... | 57 |
| 3.2.7 Phytohormon-Level der N-Mangel-induzierten Blattseneszenz..... | 58 |
| 4 Diskussion..... | 61 |
| 4.1 Entwicklung von Hydrokultur-Systemen zur Charakterisierung der N-Mangel induzierten Blattseneszenz in Gerste (<i>Hordeum vulgare</i>) und <i>Arabidopsis thaliana</i> | 61 |
| 4.2. Transkript-Profilung der N-Mangel induzierten Blattseneszenz in <i>Arabidopsis thaliana</i> | 62 |
| 4.2.1 Modul 1..... | 62 |
| 4.2.2 Modul 2 und 3..... | 65 |
| 4.2.3 Funktionelle Betrachtung der Markergene..... | 66 |
| 4.2.4 Modul 4..... | 70 |
| 4.2.5 Das Signalkanal-Modell..... | 72 |
| 4.2.6 Vergleich der N-Zugabe-Regulationsmuster mit Daten aus AG Scheible..... | 75 |
| 4.2.7 Vergleich qPCR und Affymetrix-Werte..... | 75 |
| 4.3 Kleine regulatorische RNA..... | 76 |
| 4.4 Metabolite..... | 77 |
| 4.5 Phytohormone..... | 78 |
| 4.6 Abschließende Betrachtungen..... | 79 |
| 5 Zusammenfassung..... | 81 |
| 6 Literaturverzeichnis..... | 82 |
| Abbildungsverzeichnis..... | 91 |
| Tabellenverzeichnis..... | 91 |
| Anhang..... | 92 |
| A1. Inhaltsangabe der Daten-CD..... | 92 |
| A2. Tabelle 1 bis 4..... | 92 |
| A3. Primersequenzen..... | 98 |
| A4. Venn-Diagramme zu Abbildung 15..... | 99 |
| Lebenslauf..... | 104 |
| Danksagung..... | 105 |
| Erklärung..... | 106 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|---|
| ABA | Abscisinsäure |
| AS | Aminosäure |
| ANAC | <i>Arabidopsis thaliana</i> - NAC-Transkriptionsfaktor |
| <i>A.thaliana</i> | <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| ATH1 | <i>Arabidopsis thaliana</i> -Microarray der Firma Affymetrix |
| Bc | <i>Botrytis cinerea</i> |
| BIN | Genfunktions-Zuordnung von MapMan (siehe Thimm et al. 2004) |
| cDNA | complementary Desoxyribonukleinsäure |
| C-Signal | Kohlenstoff-abhängiges Signal |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| DAS | Tage nach Aussaat |
| d | Tag |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| E-S | Entwicklungs-induzierte Blattseneszenz |
| FB | Fahnenblatt |
| GS2 | plastidäre Glutaminsynthetase |
| h | Stunde |
| HCL | Hierarchisches Clustering |
| HR | hypersensitive response |
| HEDTA | Hydroxyl- Ethylendiamintetraessigsäure |
| HBED | Hydroxybenzyl-Ethylendiamin |
| JA | Jasmonsäure |
| KH | Kohlenhydrat |
| KO | Knock-Out |
| LKR/SDH | Lysin-Ketoglutarat-Reductase/Saccharopin-Dehydrogenase |
| MapMan | Bioinformatisches Programm (siehe Thimm et al. 2004) |
| miR | micro RNA |
| mRNA | messenger RNA |
| N | Stickstoff |
| NAC | (NAM, ATAF1, -2 und CUC2)-Domäne- enthaltender Transkriptionsfaktor |
| OS | organische Säure |
| PH | Phytohormon |
| PSII | Photosystem-II |
| PageMan | Bioinformatisches Programm (siehe Usadel et al. 2006) |
| Ps | <i>Pseudomonas syringae</i> |
| qPCR | quantitative Polymerase-Kettenreaktion |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| Robin | Bioinformatisches Programm (siehe Lohse et al. 2010) |
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies |
| SAG | senescence associated gene |
| SDG | senescence downregulated gene |
| SA | Salicylsäure |
| sRNA | kleine regulatorische Ribonukleinsäure |
| TF | Transkriptionsfaktor |
| TS | Trockenstress |
| Z | Zeatin |
| ZR | Zeatin-Ribosid |

1. Einleitung

1.1 Blattseneszenz ist die letzte Phase der Blattentwicklung

Blätter sind transiente Oberflächenvergrößerungen der Pflanzen. Durch die flache Struktur der Blätter wird die lichtabsorbierende Fläche des Organismus vergrößert und eine hohe Photosynthese-Leistung ermöglicht. Blätter sind für den Lebenszyklus des Organismus nicht essentiell. Die Blattlosigkeit vieler stammsukkulenter Kakteengewächse ist dafür ein Beispiel. Die Blattentwicklung läßt sich in 3 Phasen unterteilen (Abb.1). In der Wachstums- und Etablierungsphase kommt es unter Verbrauch von molekularen und energetischen Ressourcen zu einer starken Biomassezunahme und zum Aufbau der Photosynthesekapazität des Blattes. In der Reifephase ist das Blatt in seinen inneren Strukturen voll ausdifferenziert, besitzt seine maximale Photosynthesekapazität und exportiert Photoassimilate. Die Blattseneszenz ist die letzte Phase der Blattentwicklung und ist charakterisiert durch Abbau- und Remobilisierungs-Prozesse. Die Blattseneszenz ist ein fester Bestandteil des Entwicklungsprogramms der Pflanze und ist ein geordneter, energieabhängiger, stufenweiser Prozeß (Breeze et al. 2011).

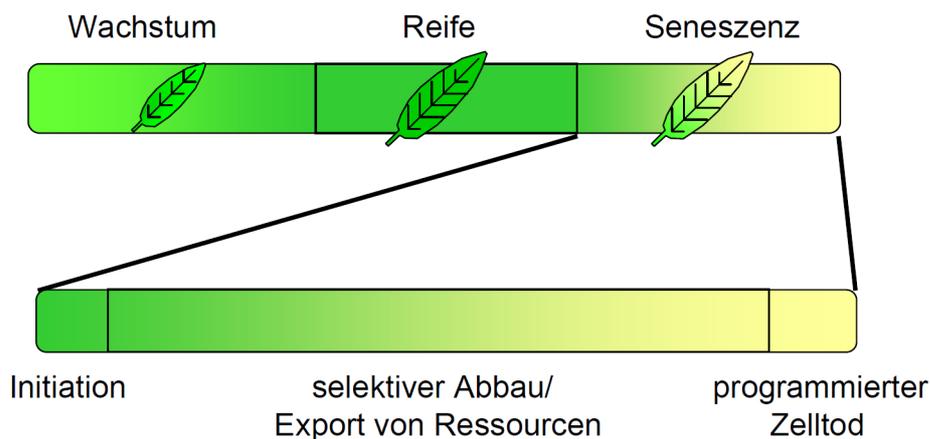


Abbildung 1: Phasen-Modell der Blattentwicklung und der Blattseneszenz

Die Blattseneszenz läßt sich in 3 Phasen unterteilen (Abb.1). Über komplexe, nur teilweise bekannte regulatorische Prozesse wird die Blattseneszenz in der Initiationsphase induziert. In der anschließenden Reorganisationsphase werden wertvolle molekulare Ressourcen wie z.B. Stickstoff mobilisiert (Himmelblau und Amasino 2001). Die Chloroplasten, die teilweise mehr als 75% des Blattstickstoffs enthalten gehören zu den Hauptzielen dieser Ressourcenmobilisierung. Der Abbau der Chloroplasten beginnt in der frühen Phase der Blattseneszenz, was durch ein Absinken des Blattchlorophyllgehaltes und der Photosystem II-Effizienz meßbar ist (Matile 2000, Humbeck und Krupinska 2003). Der Zellkern und die Mitochondrien bleiben dagegen bis in die späte Phase der Blattseneszenz intakt und treiben die Blattseneszenz voran (Lim et al. 2007).

Die wertvolle Ressource N ist in Chloroplasten in Form von Photosynthese-Proteinkomplexen in den Thylakoidmembranen und im Stroma immobilisiert. Nach

selektivem Abbau der makromolekularen Proteine in mobile, niedermolekulare Aminosäuren können die N-Ressourcen zu Wachstums- oder Speichergeweben der Pflanze exportiert werden (Masclaux et al. 2000). Die Ressourcen werden recycled und die Pflanze muss im Lauf ihrer Entwicklung weniger Nährstoffe aus der Umwelt aufnehmen. Am Ende der Blattseneszenz sterben die Blattzellen durch programmierten Zelltod ab. Es ist mir keine höhere Pflanze bekannt, bei der es keine Blattseneszenz gibt. (Blattlose Pflanzen sind an dieser Stelle ausgeschlossen.) Diese Tatsache verdeutlicht die enorme Bedeutung der Blattseneszenz für die Pflanze, um in einer komplexen, dynamischen Umwelt zu überleben. Die Blattseneszenz wird durch viele endogene und exogene Parameter beeinflusst. Endogene Parameter, wie die Phytohormonspiegel kommunizieren Entwicklungsprozesse in der Pflanze und können die Blattseneszenz induzieren und reprimieren. Das Phytohormon ABA induziert z.B. die Blattseneszenz und wirkt damit antagonistisch zu den Seneszenzhemmenden Cytokinin (Lim et al. 2007). Neben endogenen, rein entwicklungsabhängigen Faktoren können auch exogene Parameter wie zum Beispiel abiotischer Stress durch N-Mangel (Gombert et al. 2006), Trockenheit (Rivero et al. 2007) oder biotischer Stress durch Infektion mit Pilzen oder Bakterien (Pontier et al. 1999, Swartzberg et al. 2008) die Blattseneszenz induzieren .

1.2 Reprogrammierung der Genexpression in der Entwicklungs-induzierten Blattseneszenz

Teil der Blattseneszenz ist eine umfangreiche Reprogrammierung der Genexpression. Bei der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* werden in der Entwicklungs-induzierten Blattseneszenz (E-S) auf Transkriptionsebene mehr als 6000 Gene reguliert (Breeze et al. 2011) Man unterscheidet dabei zwischen Seneszenz-induzierten Genen (senescence associated genes: SAG) und Seneszenz-reprimierten Genen (senescence downregulated genes: SDG). Die Funktion dieser regulierten Gene steht im Zusammenhang mit zellulären und biochemischen Veränderungen, die den Blatt-Seneszenzprozess bewirken. Zu den SDG gehören zum Beispiel eine große Zahl von Photosynthese-Genen. Ihre Expression wird parallel zum Abbau der Chloroplasten unterdrückt. Aus diesem Grund kann man davon ausgehen, dass molekulare Mechanismen der transkriptionellen Kontrolle eine Schlüsselfunktion in der Koordination der Blatt-Seneszenz haben. Neben solchen Genen, die für den seneszenzbedingten enzymatischen Abbau von Ressourcen und deren Recycling wichtig sind, werden auch eine Reihe von Genen induziert oder reprimiert, die regulatorische Proteine kodieren.

In verschiedenen Experimenten in denen Entwicklungs- oder Stress-induzierte seneszenzabhängige Veränderungen im Transkriptom charakterisiert wurden, machten Transkriptionsfaktoren einen wesentlichen Teil der SAG und SDG aus (Chen et al. 2002; Guo et al. 2004; Lin und Wu 2004; Buchanan-Wollaston et al. 2005; Balazadeh et al. 2008). Transkriptionsfaktoren sind regulatorische Proteine der transkriptionellen Kontrolle. Für einige wenige der seneszenzregulierten Transkriptionsfaktoren (TF) konnte durch Untersuchung von knock out-oder Überexpressions-Mutanten eine funktionelle Einbindung in regulatorische Mechanismen der Blattseneszenz nachgewiesen werden. Zu diesen TF mit Seneszenzfunktion gehören Mitglieder der Genfamilien der NAC-, WRKY-, ARF- und ARR-Transkriptionsfaktoren (Balazadeh et al. 2008). Etwa 20 TF der NAC-Familie sind seneszenzinduzierte Gene und für ANAC029 (Guo et al. 2006) und ANAC092 (Kim et al. 2009) wurde eine seneszenzinduzierende Funktion bereits nachgewiesen. Für ANAC092

konnte neben einer seneszenzinduzierenden Funktion in der E-S auch eine Funktion in der Salzstress-induzierten Blattseneszenz nachgewiesen werden (Balazadeh et al. 2010). Dieses Gen hat eine zentrale regulatorische Funktion bei der Induktion von stressabhängigen Seneszenzprozessen und beeinflusst somit umweltabhängige Ressourcen-Verteilungsprozesse innerhalb der Pflanze. Bei einem NAC-TF aus Weizen (NAM-B1) wurde konsequenterweise nachgewiesen, dass von diesem NAC-TF die Nährstoffqualität der Weizenernte abhängt (Uauy et al. 2006).

Neben den NAC-TF sind Mitglieder der WRKY-TF, besonders WRKY 53 aus *Arabidopsis thaliana*, besonders gut charakterisierte Seneszenzfaktoren. WRKY 53 hat eine seneszenzinduzierende Funktion (Miao et al. 2004), wird epigenetisch reguliert (Ay et al. 2009) und interagiert mit einem Jasmonsäure-induzierten Seneszenzregulator (ESR/ESP) (Miao und Zentgraf 2007). Ein weiterer WRKY TF mit Seneszenzfunktion ist WRKY70. WRKY 70 hat einen Seneszenz-verzögernden Effekt und ist ein Schlüsselfaktor bei Pathogen-induzierten Signalprozessen (Ülker et al. 2007).

1.3 Schlüsselfaktoren des seneszenzabhängigen N-Recycling

Die Blattseneszenz ist ein Schlüsselprozess der internen N-Ressourcenverteilung der Pflanze (Himmelblau und Amasino 2001). Eine effiziente Blattseneszenz erhöht die Nährstoff-bzw. Stickstoff-Nutzungseffizienz der Pflanze (Masclaux-Daubresse et al. 2008). Die wichtigen Teilprozesse sind dabei die N-Mobilisierung und der N-Transport. Die N-Mobilisierung beruht auf einer effektiven und geordneten Proteolyse und einer Umwandlung von Proteinabbau-Produkten in die Transportformen Glutamin und Asparagin. Die Assimilation von N und der N-Metabolismus sind dabei eng mit dem Kohlenstoff (C)-Metabolismus verknüpft. Beim Übergang vom reifen zum seneszenten Blatt verlagert sich die N-Assimilation vom Chloroplasten zum Cytosol und Mitochondrium (Abb. 2, Masclaux-Daubresse et al. 2008). In der jungen Pflanze erfolgt die N-Assimilation im Chloroplasten durch die plastidäre Glutaminsynthetase GS2 und die Fd-GOGAT (Ferredoxin-abhängige Glutamatsynthase). Im seneszenten Blatt gewinnen dann die Isoformen der cytosolische Glutaminsynthetase (GS1) und die mitochondrial lokalisierte Glutamatdehydrogenase (GDH) an Bedeutung und ersetzen die Funktion von GS2 und Fd-GOGAT. In der Blattseneszenz sind neben GS1 und GDH auch Asparagin-Synthetasen und Transaminasen von Bedeutung (Masclaux-Daubresse et al. 2008). Der Transport von mobilisiertem N in Form von freien Aminosäuren zu den N-absorbierenden Wachstums- und Speichergeweben ist ein essentieller Prozess in der N-Ressourcenverteilung der Pflanze. Mit der Blattseneszenz werden zahlreiche N-Transporter induziert, die Transportprozesse N-haltiger Moleküle über Zellmembran-Barrieren verstärken bzw. ermöglichen. Dazu gehören Transporter wie Aminosäurepermeasen und Lysin/Histidin-Transporter, und Transporter die anorganische N-Verbindungen transportieren wie Amt1.1 und NRT2.5 (Masclaux-Daubresse et al. 2008). In *Arabidopsis* existieren allein 67 putative Aminosäuretransporter (Rentsch et al. 2007). Man kann davon ausgehen, dass es aufgrund der funktionellen Bedeutung dieser Transporter zur Entwicklung von funktioneller Diversität und Redundanz dieser Genfamilien kam.

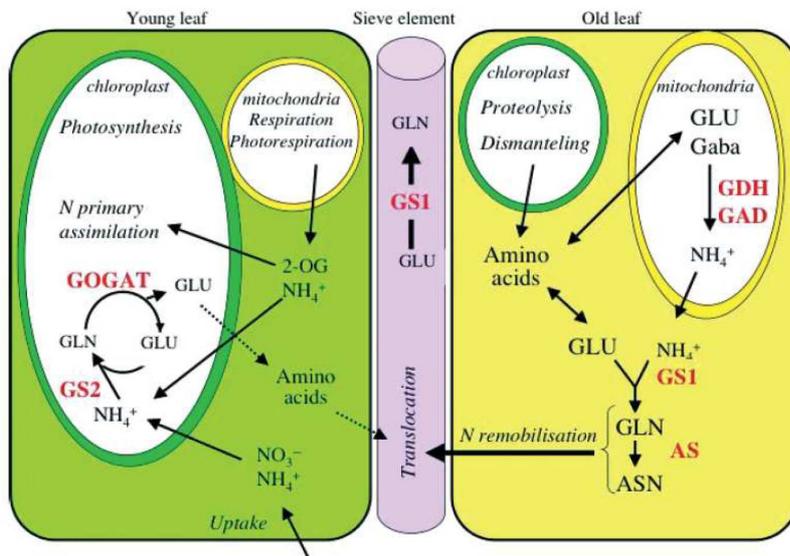


Abbildung 2: N- Stoffwechsel-Modell Haupt-N-Stoffwechselwege in Mesophyll- und Begleitzellen in jungen (links) und alten (rechts) seneszierenden Blättern. GDH, Glutamatdehydrogenase; GAD, Glutamat-decarboxylase; GS1 cytosolische Glutaminsynthetase; GS2, plastidäre Glutaminsynthetase; GOGAT, Glutamat-synthase; AS, Asparaginsynthetase; GLN, Glutamin; GLU, Glutamat (aus Masclaux-Daubresse et al. 2008)

1.4 N-Mangel induzierte Blattseneszenz

Besonders die Verfügbarkeit von N-haltigen Nährstoffen wie Nitrat und Ammonium hat einen starken Einfluß auf die Blattseneszenz und damit auf N-Verteilungsprozesse in der Pflanze. Eine optimale Stickstoffversorgung unterdrückt die Blattseneszenz, während es unter N-Mangel zur verfrühten Induktion von Blattseneszenz-Prozessen kommt (Gombert et al. 2006). Die Stickstoffversorgung hat demnach einen starken Einfluß auf die Photosynthesekapazität und Biomassebildung der Pflanze. N-Mangel induzierte Blattseneszenz reduziert den landwirtschaftlichen Ertrag und ist auch unter Anwendung moderner Düngemethoden nicht immer vermeidbar. Das Ziel ist die effiziente Nutzung des N-Dünger, denn er stellt auf der einen Seite einen teuren, wachstumsbegrenzenden Faktor dar und ist auf der anderen Seite durch Boden-Auswaschungseffekte eine Gefahr für Ökosysteme und die Trinkwasserversorgung.

N-Mangel induziert Blattseneszenz. Dieses Phänomen ist lange bekannt und wurde wissenschaftlich untersucht (Wingler et al. 2005, Gombert et al. 2006, Criado et al. 2007). Die Anzahl der Publikationen ist relativ gering und auf die Frage: „Wie induziert N-Mangel Blattseneszenz-Prozesse?“ gibt es bisher wenige Antworten. Unter N-Mangel sinken z.B. die Level an freiem Nitrat, freien Aminosäuren (Scheible et al. 2004) und Cytokinen (Takei et al. 2004) und es steigen die Level von Kohlenhydraten (Scheible et al. 2004) und ROS-Produktion (Kovacic und Backor 2007, Criado et al. 2007). Bewirkt ein niedriger Level an freiem Nitrat, Ammonium oder freien Aminosäuren eine Induktion der Blattseneszenz? Es sind Sensorprozesse von Enzymen bekannt, die z.B. den Gehalt an freien Aminosäuren messen. Über allosterische-Regulation wird die Enzymaktivität der Aspartat-Kinase und Threonin-Synthase reguliert (Mas-Droux et al. 2006, Liu et al. 2008). Beispiele für nitratbindende Transporter mit Signalfunktion sind die Nitrattransporter NRT1.1 und NRT2.1 aus *Arabidopsis thaliana* (Vidal et al. 2010) Eine Seneszenz-regulatorische Funktion solcher N-Sensorsprozesse ist meines Wissens nach noch nicht nachgewiesen. Induziert ein niedriger Cytokinin-Level unter N-Mangel die Blattseneszenz? Das könnte sein. Eine künstliche Steigerung der Cytokininproduktion hemmt die N-Mangel induzierte Blattseneszenz (Wingler et al. 2005). Die Blattseneszenz-hemmende Wirkung der

Cytokinine beruht auf einer veränderten Verteilung der Kohlenhydrat-Ressourcen innerhalb der Pflanze (Lara et al. 2004). Ein hoher Level an Kohlenhydraten induziert Blattseneszenz und Signalproteine wie HXK1 spielen dabei eine Rolle (Pourtau et al. 2006). Unter N-Mangel steigt in Blättern die ROS-Produktion (Kovacic und Backor 2007, Criado et al. 2007) und es ist bekannt, dass ROS die Blattseneszenz induzieren können (Woo et al. 2004). Ob die N-Mangel induzierten ROS einen Blattseneszenz-induzierenden Effekt haben, bleibt noch aufzuklären. N-Mangel hat also Sekundäreffekte wie niedrige Cytokinin-Level und hohe Kohlenhydrat- und ROS-Level, die einen Effekt auf regulatorische Mechanismen der Blattseneszenz haben könnten. Gibt es auch N-spezifische Signale die mit der Blattseneszenz-Regulation in Verbindung stehen? Ein Beispiel dafür könnten die Transkriptionsfaktoren LBD37, LBD38 und LBD39 aus *Arabidopsis thaliana* sein (Rubin et al. 2009). Diese 3 Transkriptionsfaktoren werden N-spezifisch reguliert und unter den LBD-abhängig regulierten Genen befinden sich auch Blattseneszenz-regulierte Gene (z.B. PAP2 und GLN1.4, Pourtau et al. 2006). Ob der Verlauf der Blattseneszenz von LBD37, LBD38 und LBD39 Knock-out oder Überexpressionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp verändert ist, wurde noch nicht veröffentlicht.

N-Mangel induziert Blattseneszenz. Die Suche nach konkreten molekularen Mechanismen der N-Mangel induzierten Blattseneszenz ist aber noch ein relativ wenig bearbeitetes Feld.

1.5 Weitere Formen der Streß-induzierten Blattseneszenz

Neben Stickstoff ist Wasser einer der wichtigsten limitierenden Wachstumsfaktoren für Wild- und Kulturpflanzen. Durch Trockenstress sinkt das Wasserpotential des Blattgewebes und es produziert mehr ROS. Diese ROS scheinen ein wesentlicher Faktor zu sein, der die Blattseneszenz unter Trockenstress induziert (Rivero et al. 2007).

Die Blattseneszenz kann durch abiotischen Stress und biotischen Stress induziert werden. Biotischer Stress wird zum Beispiel durch Mikroorganismen ausgelöst, die die Pflanze kolonisieren. Ein Abwehrmechanismus gegen diese Kolonisierung ist eine Reaktion die hypersensitive response, kurz HR, genannt wird. ROS sind ein wichtiger Signalgeber für die Etablierung der HR (Govrin und Levine 2000). In folge der HR sterben die Blattzellen ab, die an der initialen Infektionsstelle liegen. Dieser Vorgang ist innerhalb von 24 h abgeschlossen und räumlich stark eingegrenzt. Die HR bewirkt außerdem die Induktion von Seneszenzprozessen in dem Blattgewebe, das an die HR-Zone angrenzt. Es kommt zum Chlorophyllabbau und zur Induktion von Seneszenzmarkergenen wie SAG12, aber nicht zur Induktion von HR-spezifischen Markern wie HIN1 (Pontier et al. 1999, Mur et al. 2010).

Die HR und das Seneszenzsyndrom werden als zwei unterschiedliche Formen des programmierten Zelltods (PCD) definiert (Pontier et al. 1999). Die HR ist ein Verteidigungsmechanismus, durch den das betroffene Blattgewebe innerhalb von Stunden durch Chloroplasten-abhängige Mechanismen ausbleicht und abstirbt (Mur et al. 2010) Die Blattseneszenz dagegen ist ein relativ langsamer, hochgradig regulierter, stufenweiser Prozess in dessen Verlauf wertvolle Ressourcen unter Erhaltung der Zellfunktionen mobilisiert und recycled werden (Breeze et al. 2011).

1.6 Zielsetzung

Dass das Angebot an N den Verlauf der Blattseneszenz wesentlich beeinflusst, ist schon seit langem bekannt. Eine genaue regulatorische Verbindung zwischen der Wahrnehmung N-haltiger Metabolite und der Blattseneszenz-Regulation ist noch weitgehend unbekannt. Die Frage auf die ich eine Antwort suche lautet: Wie induziert N-Mangel Blattseneszenz? Ich beginne meine Arbeit damit, dass ich in einem eigenen experimentellen System bestätige, daß eine hohe N-Verfügbarkeit die Blattseneszenz hemmt. Ich lasse die ökonomisch relevanten Kulturpflanze Gerste (*Hordeum vulgare*) auf Erde wachsen und untersuche ob eine zusätzliche Gabe Nitrat zum Zeitpunkt der Blüte, die Seneszenz des für den Ertrag wichtigen Fahnenblattes verzögert. Dazu messe ich zwei Parameter die in der Blattseneszenz absinken. Das ist der Chlorophyllgehalt und die PSII-Effizienz des Fahnenblattes. Anschließend bestätige ich mit Gerstenpflanzen in einer N-Mangel Zeitkinetik, in einem von mir etablierten Hydrokultursystem am Primärblatt der Gerste ob: 1.) N-Mangel Blattseneszenz induziert. 2.) N-Zugabe zu N-Mangel-Pflanzen Blattseneszenz hemmt. Das charakterisiere ich in einem engen Zeitraster mit Messungen des Chlorophyllgehalt und der PSII-Effizienz des Primärblattes. Gerste ist eine wichtige Modellpflanze, hat aber relativ lange Generationszyklen und das Genom ist noch nicht komplett sequenziert. Wie bekomme ich möglichst schnell und effektiv Hinweise, auf welche molekularen Prozesse man fokussieren sollte, um die zugrunde liegenden molekularen Steuermechanismen zwischen der Wahrnehmung N-haltiger Metabolite und der Blattseneszenz-Regulation zu finden? Dazu nutze ich die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, für die ich ebenfalls ein Hydrokultursystem mit kontrollierter N-Versorgung etabliere. Mit *A. thaliana* untersuche ich, ähnlich zur Gerste, an definierten Blättern in einer N-Mangel Zeitkinetik ob: 1.) N-Mangel Blattseneszenz induziert. 2.) N-Zugabe zu N-Mangel-Pflanzen Blattseneszenz hemmt. Ist das für Gerste und *Arabidopsis* ähnlich, kann ich *A. thaliana* als ein molekularbiologisches Modell für die Gerste nutzen. In Voruntersuchungen werde ich mit *A. thaliana* mittels qPCR-Messungen in einer engen Zeitkinetik N-abhängige Veränderungen in den Transkriptleveln eines ausgewählten Sets an Markergenen untersuchen. Die entsprechende RNA wird dann in Affymetrix ATH1-Messungen eingesetzt, um transkriptomweit die N-Mangel und N-Zugabe-abhängige Genexpression in den definierten Blättern zu messen. Ich werde anhand der ATH1-Daten feststellen welche Gene durch N-Mangel und N-Zugabe reguliert werden und wie groß die Übereinstimmungen der Regulationsmuster zur Entwicklungs-induzierten Blattseneszenz sind. Dabei werde ich charakterisieren wie N-Zugabe zu N-Mangel Pflanzen nach wenigen Stunden und nach einigen Tagen auf das Transkriptom der definierten Blätter wirkt. Ich werde eine Datenfilterung etablieren, die mir aus diesen globalen Transkriptomdaten relativ wenige N-Markergene herausfiltert. Mit diesen Markergenen werde ich Datenbank-Recherchen durchführen die mir Hinweise auf die Verbindung zwischen der Wahrnehmung N-haltiger Metabolite und der Blattseneszenz-Regulation geben sollen. Parallel zu diesen Transkriptom-Untersuchungen werden sRNA-Level, Metabolit-Level und Phytohormon-Level gemessen, um so ein komplexeres Bild der molekularen Prozesse der N-Mangel induzierten Blattseneszenz zu bekommen. Außerdem könnte ich so neue molekulare Marker der N-Mangel induzierten Blattseneszenz finden und es ergeben sich eventuell Hinweise auf regulatorische Vernetzungen der verschiedenen gemessenen Molekül-Spezies.

2 Material / Methoden

2.1 Hypochlorid-Oberflächensterilisation

Die Samen wurden für 2 min mit 70% (v/v) Ethanol und anschließend 10 min mit Tween-haltiger 6% Natrium-Hypochloridlösung oberflächensterilisiert. Danach wurden die Samen 5 mal mit reichlich sterilem destilliertem Wasser gespült.

2.2 Erdkultur

Gerste Fahnenblatt-Seneszenz

Die Gerste (*Hordeum vulgare* L. cv. Steffi) wurde unter Gewächshausbedingungen ab Anfang März in Mitscherlich-Gefäßen ohne zusätzliche Beleuchtung angezogen. Je Gefäß wuchsen 20 Pflanzen auf einer Mischung aus 5 kg Lehmerde und 2 kg Quarz-Sand. Jeder Topf wurde mit 0,3 g elementarem Stickstoff in Form von KNO_3 gedüngt. Die Gefäße wurden täglich mit de-ionisiertem Wasser gegossen, bis 50% der maximalen Wasserkapazität des Substrates erreicht wurde. Für weitere molekulare Analysen wurden ganze Fahnenblätter unmittelbar nach der Probennahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und danach bei -80°C gelagert.

Arabidopsis thaliana Entwicklungs-induzierte Blattseneszenz

Die *A.thaliana*-Pflanzen wurden wie in Ay et al. (2009) beschrieben, angezogen. Nach der Oberflächensterilisation der Samen von *Arabidopsis thaliana* (L.) Ökotyp Columbia, wurden diese mit Hilfe einer Pipette auf Saccharose-Platten vereinzelt und danach einer Stratifizierung unterzogen. Anschließend wurden die Platten ins Gewächshaus gestellt, wo die Samen unter Langtagbedingungen, d.h. 16h Licht bei $22-24^\circ\text{C}$ und 8h Dunkelheit bei $16-19^\circ\text{C}$ keimten. Nach einer Woche wurden die Keimlinge auf Erde ausgebracht und weiter unter den genannten Bedingungen angezogen. Als Probenmaterial dienten die Blätter 5-8, wobei die Kotyledonen als Blatt 1 und 2 definiert wurden. Es wurden Pflanzen verschiedener Entwicklungsstadien untersucht. Zur Abgrenzung dieser Stadien diente die PSII-Effizienz. Die sogenannte „mature“ Phase ist durch eine hohe PSII-Effizienz mit Werten über 0,77 gekennzeichnet. Weiterhin wurden Pflanzen im frühen Seneszenzstadium (S1) untersucht. Kennzeichnend für diese Phase ist eine Abnahme der PSII-Effizienz von etwa 10%. Das Blattmaterial wurde nach der Probennahme sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und danach bei -80°C gelagert.

2.3 Hydrokultur

Gerste-Primärblatt-Seneszenz

Die Gerste (*Hordeum vulgare* L. cv. Steffi) wurde unter kontrollierten Gewächshausbedingungen mit einem Tag/Nacht Rhythmus von 16/8h und $23/18^\circ\text{C}$, bei einer relativen Luftfeuchte von 60% angezogen. Nach der Oberflächensterilisation wurden die Samen für 48h im Dunkeln bei 6°C auf feuchtem Filterpapier gelagert. Danach wurden die Samen für 24

h unter Gewächshausbedingungen im Licht gekeimt und dann auf Agarose-gefüllte 1,5ml Plastik-Reaktionsgefäße gesetzt. Die Agarose wurde in 1:1 mit Wasser verdünntem Hoagland-Medium gelöst und bestand aus einer 0,3% oberen Schicht und einer 0,7% unteren Schicht. Die Spitzen der Plastik-Reaktionsgefäße waren abgeschnitten und tauchten in das belüftete Hoagland-Medium. Das ganze System ist eine größere, belüftete Version des Arabidopsis-Hydrokultur Systems, in dem Balkonkästen als Behälter benutzt wurden. Das Hoagland-Medium setzte sich (ähnlich zu Finkemeier et al. 2003) wie folgt zusammen 6 mM KNO₃, 2,8 mM Ca(NO₃)₂, 2mM MgSO₄, 1 mM (NH₄)H₂PO₄, 10 µM FeCl₃, 25 µM Fe-HEDTA, 1,5 µM H₃BO₃, 1,25 µM ZnSO₄, 0,075 µM CuSO₄, 0,025 µM Na₂MoO₄, 3 µM MnCl₂, 0,1 mM K₂SiO₃, 2 mM MES (2-(N-Morpholino)Ethansulfonsäure) mit einem pH-Wert von 5,7. Unter N-Mangel-Bedingungen ersetzen Chlorsalze die Nitratsalze und Na₂HPO₄ ersetzt(NH₄)H₂PO₄.

Arabidopsis Blatt-Seneszenz

Arabidopsis thaliana cv. Columbia wuchsen bei einer Lichtintensität von etwa 120 µE (mikro Einstein) in einer York Klimakammer (Johnson Controls GmbH, Berlin, Deutschland) unter kontrollierten Bedingungen, bei einem Tag/Nacht Rhythmus von 16/8h und 23/18 °C, bei einer relativen Luftfeuchte von 75%. Nach der Oberflächensterilisation wurden die Samen für 48h im Dunkeln bei 6°C auf feuchtem Filterpapier gelagert. Danach wurden die Samen ohne Vorkeimung auf Agarose-gefüllte 0,2 ml Plastik-Reaktionsgefäße gesetzt. Die Agarose wurde in 1:1 mit Wasser verdünntem Hoagland-Medium gelöst und bestand aus einer 0,3% oberen Schicht und einer 0,5% unteren Schicht. Die Spitzen der Plastik-Reaktionsgefäße waren abgeschnitten und tauchten wie in Tocquin et al. (2003) beschrieben in das Hoagland-Medium. Das Hoagland-Medium setzte sich wie folgt zusammen: 5 mM KNO₃, 1 mM Ca(NO₃)₂, 0,5 mM MgSO₄, 0,15 mM (NH₄)₂HPO₄, 10 µM Fe-HBED, 9,6 µM H₃BO₃, 0,3 µM ZnSO₄, 0,2 µM CuSO₄, 0,14 µM Na₂MoO₄, 2 µM MnCl₂, 0,1 mM K₂SiO₃, 2 mM MES (2-(N-Morpholino)Ethansulfonsäure) mit einem pH-Wert von 5,7. Unter N-Mangel-Bedingungen ersetzen Chlorsalze die Nitratsalze und Na₂HPO₄ ersetzt(NH₄)H₂PO₄.

2.4 Photosystem II-Effizienz-Messungen

Gerste

Die Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen nach Dunkeladaptation wurden wie in Humbeck et al. (1996) beschrieben mit einem Chlorophyll Fluorometer (Mini-PAM, Walz, Effeltrich, Deutschland) durchgeführt. Die Messungen wurden in der Mitte intakter Blätter durchgeführt. Die Mittelwerte des Verhältnis variable Fluoreszenz/maximale Fluoreszenz (Fv/Fm) basieren auf je 10 unabhängigen Messungen.

Arabidopsis

Die Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen nach Dunkeladaptation wurden mit einem Chlorophyll Fluorometer (IMAGING PAM, Walz, Effeltrich, Deutschland) nach Baker (1991) nach der Sättigungs-Puls-Methode durchgeführt (Genty et al. 1989). Die Messungen wurden über die ganze Blattfläche intakter Blätter durchgeführt. Die Mittelwerte des Verhältnis

variable Fluoreszenz/maximale Fluoreszenz (Fv/Fm) basieren auf unabhängigen Messungen von 20 Blättern von 10 Pflanzen.

2.5 Messung des Blatt-Chlorophyllgehalt

Gerste

Der relative Blatt-Chlorophyllgehalt der Gerstenblätter wurde mit einem SPAD-502-Gerät (Soil Plant Analysis Development) gemessen (Minolta, Hydro Agri, Dülmen, Deutschland). Das SPAD mißt an intakten Blättern die Transmission von zwei Wellenlängen (650 und 940 nm, Messfläche = 6 mm²)(Humbeck und Krupinska 2003). Kalibrierungs-Kurven zeigen, dass die SPAD-Werte über einen weiten linearen Bereich von den Blatt-Chlorophyllmengen abhängen. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert von je 10 unabhängigen Messungen.

Arabidopsis

Gefrorene Blätter wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und im Dunkeln mit Chlorophyll-Extraktionspuffer im Untraschallbad bis zum ausbleichen behandelt. Der Chlorophyll-Extraktionspuffer enthält 80% (v/v) Aceton, 19,5% (v/v) destilliertes Wasser und 0,5% (v/v) konzentrierte [25% w/v] NH₃-Lösung. Die spektrophotometrische Chlorophyll-Bestimmung des zentrifugierten Überstandes wurde mit einem HP8452A (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) bei zwei Wellenlängen (652 nm und 750 nm) durchgeführt. Die Chlorophyll-Konzentration wurde nach folgender Gleichung berechnet: $C_{\text{Chla+b}} = 27,8 (E_{652} - E_{750}) [\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}]$ (Schopfer 1989). Jeder Datenpunkt repräsentiert jeweils den Mittelwert von 20 Blättern von 10 Pflanzen.

2.6 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion im kleinem Masstab (50-100mg Blattmaterial) erfolgte nach der TRIZOL-Methode, ähnlich zu Chomczynski & Sacchi (1987).

Zusammensetzung des TRIZOL:

- 0,8M Guanidiniumthiocyanat,
- 0,4M Ammoniumthiocyanat,
- 0,1M NaAcetat (pH 5)
- 5% (v/v) Glycerol (99,8%) steril,
- 38% (v/v) Phenol (TE gesättigt pH 5)

Gefrorene Blätter wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und in 1,5ml Plastik-Reaktionsgefäße überführt. Das gefrorene Pflanzenmaterial wurde mit 1 ml, 60°C warmer TRIZOL-Reagenz gründlich gevortext und dann für 10 Minuten bei 60°C inkubiert. Danach wurden die Zellbestandteile in einer Tischzentrifuge bei 4°C und 13000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 200 µl Chloroform gründlich gevortext, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach in einer Tischzentrifuge bei 4°C und

13000 rpm für 15 min zentrifugiert. Die obere, RNA-haltige Phase wurde abgenommen und in einem neuen 1,5ml Plastik-Reaktionsgefäße mit 500 µl eiskaltem Isopropanol gründlich gevortext. Die Fällung der Gesamt-RNA erfolgte für 3 bis 16 Stunden bei -20°C. Die RNA wurde anschließend in einer Tischzentrifuge bei 4°C und 13000 rpm für 10 min pelletiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 70% (v/v) Ethanol gewaschen und für 8 Minuten unter der Sterilbank Luft-getrocknet. Das Pellet wurde in etwa 40 µl sterilem DEPC-Wasser für 10 min bei 60 °C geschüttelt, gründlich gevortext und dann für 30 Minuten bei 4°C und 20.000rpm (Allegra™ 64R Zentrifuge; Beckman Coulter™) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5ml Plastik-Reaktionsgefäße überführt, die RNA-Konzentration spektrophotometrisch mittels Nanodrop ND-1000 bei 280nm und 230nm bestimmt und 0,5 µg RNA auf einem nicht denaturierendem 1% TAE-Gel (pH 8,0) aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

50x TAE-Puffer (pH 8,0):

2 M Tris-Base

50 mM Na-EDTA

pH 8,0 mit Essigsäure einstellen, autoklavieren

(RNA-Extraktionen aus N-Mangel Blättern enthalten in der Regel große Mengen an Verunreinigungen. Aus diesem Grund werden alle Proben ein zweites mal gefällt und sind danach weitgehend frei von Verunreinigungen.) Intakte RNA-Proben eines Messpunktes, die scharfe ribosomale RNA-Banden zeigen, wurden vereinigt und mit 2 Volumen 100% (v/v) Ethanol und 4M NaCl (2,5µl auf 100µl Endvolumen) versetzt, gründlich gevortext und für 3 bis 16 Stunden bei -20°C gefällt. Die anschließenden Schritte: Zentrifugation, Waschen des Pellets mit 70% (v/v) Ethanol, Trocknen des Pellets, Resuspendieren der RNA in 40µl DEPC, Quantifizierung und Kontrolle mittels TAE-Gel wurden wie oben beschrieben wiederholt. Extrahierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.7 DNase I-Behandlung

Die DNase I Behandlung wird durchgeführt um die extrahierte Gesamt-RNA von co-extrahierter genomischer DNA zu reinigen. Es wurden 3,3 µg der isolierten Gesamt-RNA mit DNase I recombinant, RNase-free (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) behandelt. Die Reaktion erfolgte im Thermocycler (Biometra, Personal Cycler). Vor der Zugabe von EDTA und MgCl₂ werden die Proben auf 4 °C abgekühlt. Die DNase I behandelte RNA wird bei -80°C gelagert.

| Komponenten DNase I- Behandlung | Menge |
|----------------------------------|-----------------------|
| RNA | 3,3 µg |
| DEPC- behandeltes Wasser, steril | 24,80 µl - x µl (RNA) |
| 10x DNase I - Inkubationspuffer | 3 µl |
| RNaseOUT (Invitrogen) | 0,5 µl (20U) |
| 15 min, 37 °C | |
| EDTA (280 mM) | 0,7 µl |
| 10 min, 75 °C | |
| MgCl ₂ (50 mM) | 1 µl |
| Lagerung bei - 80 °C | |

2.8 cDNA-Synthese

Gerste

Die cDNA-Synthese aus Gersten-RNA wurde in Schildhauer et al. (2008) beschrieben.

Arabidopsis thaliana

Die cDNA-Synthese aus Arabidopsis-RNA wurde mit dem RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) durchgeführt. Die Protokolle sind den folgenden Beschreibungen zu entnehmen.

Reverse Transkription für mRNA-Quantifizierung

| Komponenten cDNA - Synthese | Menge |
|--|------------------------|
| RNA (aus DNase I- Behandlung) | 9 µl (entspricht 1 µg) |
| DEPC- behandeltes Wasser, steril | 2,5 µl |
| Hexa Random Primer (100 µM) | 1 µl |
| Oligo(dT) ₁₈ Primer (100 µM) | 0,5 µl |
| 5 min bei 65 °C, danach 2 min auf Eis | |
| 5x Reaktionspuffer | 4 µl |
| RiboLock | 0,5 µl (20U) |
| dNTP Mix (10 mM) | 2 µl |
| reverse Transkriptase (200 U/µl) | 0,5 µl |
| 5 min bei 25 °C, 60 min bei 45 °C, 5 min bei 70 °C | |
| Lagerung bei 3 °C | |

Reverse Transkription für sRNA-Quantifizierung

| Komponenten cDNA - Synthese | Menge |
|---|------------------------|
| RNA (aus DNase I- Behandlung) | 9 µl (entspricht 1 µg) |
| DEPC- behandeltes Wasser, steril | 3 µl |
| Stem- loop- Primer Mix | 1 µl |
| 5 min bei 65 °C, danach 2 min auf Eis | |
| 5x Reaktionspuffer | 4 µl |
| RiboLock | 0,5 µl (20U) |
| dNTP Mix (10 mM) | 2 µl |
| reverse Transkriptase (200 U/µl) | 0,5 µl |
| 30 min bei 16 °C, 30 min bei 45 °C, 5 min bei 70 °C | |
| Lagerung bei 3 °C | |

Der Stem-loop Primer Mix enthält 2µM eines sRNA-spezifischen Stem-loop RT-Primer. Die Sequenzen der einzelnen stem loop-Primer sind im Anhang (A3) aufgelistet.

2.9 Quantitative-Real-Time PCR (qPCR)

Die Quantitative PCR wurde mit einem BioRad i-Cycler durchgeführt (BioRad, München, Deutschland). Die qPCR Reaktionen liefen in 96 Well-Platten, die mit transparenter PCR-Film-Folie (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) versiegelt wurden. Die Protokolle sind den folgenden Beschreibungen zu entnehmen. Das ältere Protokoll der Gersten-qPCR ist in Schildhauer et al. (2008) beschrieben. Die Methode zur Arabidopsis-qPCR wurde von Czechowski et al. (2004) modifiziert und an den BioRad i-Cycler angepaßt. Die Primer-Sequenzen des mRNA-Referenzgens At2g28390 (SAND) wurde aus der Veröffentlichung von Czechowski et al. (2005) ausgesucht und getestet. Das Referenzgen der sRNA-qPCR war At2g01020 (5sRNA). Zur Quantifizierung enthielt jede qPCR Reaktion 10 µl Platinum_SYBR_Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Nach dem Befüllen wurde jede qPCR-Platte für 5 Minuten bei 4°C und 5.000rpm (Hettich Zentrifugen, Universal 320R) zentrifugiert, um das PCR-Volumen am Boden der Reaktionsgefäße zu sammeln und Luftblasen zu entfernen.

Die Qualität jeder qPCR-Reaktion wurde anhand der Real-Time-Amplifikationskurve und der spezifischen Schmelzkurve kontrolliert (Czechowski et al. 2004). Die qPCR-Messungen wurden mit mindestens 2 biologischen Replikaten und je 2 technischen Replikaten durchgeführt.

Programm für mRNA-qPCR

| Reaktionsschritt | Zeit | Temperatur |
|--------------------------------|-------|---------------|
| UDG- Verdau | 2 min | 50 °C |
| Polymerase Aktivierung | 2 min | 95 °C |
| Denaturierung | 15 s | 95 °C |
| Anlagerung und Verlängerung | 30 s | 60 °C |
| Schmelzkurve (0,5 °C Schritte) | 7 s | 55 °C - 95 °C |
| | | 4 °C |

40 x

Programm für sRNA-qPCR

| Reaktionsschritt | Zeit | Temperatur |
|--------------------------------|-------|---------------|
| UDG- Verdau | 2 min | 50 °C |
| Polymerase Aktivierung | 2 min | 95 °C |
| Denaturierung | 15 s | 95 °C |
| Anlagerung | 10 s | 55 °C |
| Verlängerung | 20 s | 60 °C |
| Schmelzkurve (0,5 °C Schritte) | 7 s | 55 °C - 95 °C |
| | | 4 °C |

40 x

Die qPCR-Primersequenzen wurden mit dem Programm „PrimerSelect“ (DNASTAR™) erstellt. Die qPCR-Primersequenzen sind im Anhang (A3) aufgelistet. Die Primersequenzen zur Quantifizierung von LBD37, LBD38 und LBD39 wurden von Rubin et al. (2009) übernommen. Die RT-Primersequenzen zur reversen Transkription der sRNA und die Sequenz des „miRNA RTQ-PRC rev“ Primer wurden nach dem Vorbildern in Chen et al. (2005) erstellt. Die Auswertung der qPCR-Signale erfolgte mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Czechowski et al. 2004).

Die Messung der Transkriptlevel der Gene GS2, LKR/SDH und 18sRNA in Gerste-Fahnenblättern wurde, wie in Schildhauer et al. (2008) beschrieben, durchgeführt.

2.10 Affymetrix ATH1 Microarray- Methoden

Die cRNA-Synthese und die Affymetrix ATH1-Hybridisierungen wurden durch Atlas Biolabs (<http://www.atlas-biolabs.com/>) durchgeführt. Die ATH1-Messungen wurden mit mindestens 2 biologischen Replikaten durchgeführt. Die Expressionsdaten wurden mittels Robin 1.1.5 mit den eingestellten Standardbedingungen durchgeführt (Lohse et al. 2010).

Die Venn-Diagramme und die PageMan-Analyse wurden mit dem Programm MapMan3.5.1 durchgeführt (Thimm et al. 2004).

2.11 ATH1-Datensätze

Im folgenden sind die Internet-Plattformen und die Bezeichnungen der einzelnen ATH1-Datensätze aufgeführt, die in den Modulen 1 bis 4 zur Interpretation der N-ATH1-Daten genutzt wurden.

NASC Arrays (<http://affymetrix.arabidopsis.info/narrays/experimentbrowse.pl>)

| Referenzprobe | Messprobe |
|--------------------------------|---------------------------|
| Pseudomonas syringae Infektion | |
| Kontrolle 24 Stunden | Infektion 24 Stunden |
| A61-ATGEN-35-1_24H_MGCL2 | A13-ATGEN-23-1_24H_DC3000 |
| A62-ATGEN-35-2_24H_MGCL2 | A14-ATGEN-23-2_24H_DC3000 |
| A64-ATGEN-35-4_24H_MGCL2 | A16-ATGEN-23-4_24H_DC3000 |

ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>)

| Referenzprobe | Messprobe |
|--------------------|----------------------|
| ABA Behandlung | |
| E-MEXP-2378 | |
| Kontrolle | ABA, 4 Stunden |
| GDR_090824_cfcont1 | GDR_090824_cfaba4h-1 |
| GDR_090824_cfcont2 | GDR_090824_cfaba4h-2 |
| GDR_090824_cfcont3 | GDR_090824_cfaba4h-3 |

GEO Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)

| Referenzprobe | Messprobe | Referenzprobe | Messprobe |
|---------------------------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|
| Entwicklungs-induzierte Blatteneszenz | | CO2 Mangel | |
| reifes Blatt | seneszentenes Blatt | Kontrolle Licht | CO2 MangelLicht |
| GSM133730 | GSM133731 | GSM77176 | GSM77175 |
| GSM133729 | GSM133732 | GSM77179 | GSM77178 |
| Trockenstress | | CO2 Mangel Dunkelheit | |
| gewässerte Pflanzen | Trockenstress | | GSM77177 |
| GSM596131 | GSM596133 | | GSM77180 |
| GSM596132 | GSM596134 | DOR-Mutation | |
| Botrytis cinerea Infektion | | Wildtyp gewässert | dor-Mutante gewässert |
| Kontrolle 48 Stunden | Infektion 48 Stunden | GSM268248 | GSM268246 |
| GSM133034 | GSM133028 | GSM268252 | GSM268250 |
| GSM133035 | GSM133029 | Wildtyp Trockenstress | |
| GSM133036 | GSM133030 | GSM268247 | dor-Mutante Trockenstress |
| Norflurazon | | GSM268251 | GSM268245 |
| Wildtyp | Wildtyp mit Norflurazon | FLU-Mutation | |
| GSM323075 | GSM323078 | Wildtyp | flu-Mutante |
| GSM323076 | GSM323079 | GSM272985 | GSM272987 |
| GSM323077 | GSM323080 | GSM272986 | GSM272988 |
| gun1 / gun5-Mutationen | | flu / tAPX eo -Mutante | |
| Wildtyp mit Norflurazon | gun1 mit Norflurazon | GSM272991 | GSM272992 |
| GSM323078 | GSM323084 | Ozon Behandlung | |
| GSM323079 | GSM323085 | Kontrolle | Ozon Behandlung |
| GSM323080 | GSM323086 | GSM133706 | GSM133705 |
| tans-Zeatin Behandlung | | GSM133709 | GSM133707 |
| DMSO Kontrolle | trans-Zeatin | GSM133710 | GSM133708 |
| GSM157388 | GSM157382 | | |
| GSM157389 | GSM157383 | | |
| GSM157390 | GSM157384 | | |

2.12 Metabolit-Messungen

Die Blattproben (60 bis 90 mg) wurden in 1,5 ml Plastik-Reaktionsgefäßen zu den entsprechenden Zeitpunkten abgewogen und unverzüglich in flüssigem Stickstoff eingefrohren und bei -80 °C gelagert. Anschließend wurden die Blattproben unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff mit einem Mikropistill gründlich gemörsert und auf Trockeneis an das Max Planck Institut für molekulare Pflanzenphysiologie (MPI-MP) geschickt.

Die relativen Mengen der Metabolite wurden von Wagner Luiz Araujo, AG Fernie am MPI-MP in Golm quantifiziert. Die Extraktions- und Quantifizierungsmethode ist in Araujo et al. (2011) beschrieben. Die Metabolit-Messungen wurden mit 3 biologischen Replikaten und je 2 technischen Replikaten durchgeführt.

2.13 Phytohormon-Messungen

Die Blattproben (95 bis 105 mg) wurden in 1,5 ml Plastik-Reaktionsgefäßen zu den entsprechenden Zeitpunkten abgewogen und unverzüglich in flüssigem Stickstoff eingefrohren und bei -80 °C gelagert. Anschließend wurden die Blattproben auf Trockeneis an die Universität Barcelona versendet. Die Mengen der Phytohormone wurden von Maria Amparo Asensi-Fabado, AG Munne-Bosch an der Universität Barcelona quantifiziert. Die Extraktions- und Quantifizierungsmethode ist in Abreu und Munne-Bosch (2009) beschrieben. Die Phytohormon-Messungen wurden mit 3 biologischen Replikaten und je 2 technischen Replikaten durchgeführt.

3 Ergebnisse

Wie induziert N-Mangel Blattseneszenz? Um Antworten auf diese Frage zu finden, untersuche ich mit der Kulturpflanze Gerste (*Hordeum vulgare*) und der Modellpflanze Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) wie N-Mangel und N-Zugabe nach N-Mangel die Blattseneszenz in definierten Blättern dieser Pflanzen beeinflusst. Ich charakterisiere den Verlauf der Blattseneszenz in einer engen Zeitkinetik anhand der physiologischen Photosynthese-Marker Blattchlorophyllgehalt und PSII-Effizienz. Zu definierten Zeitpunkten der N-Mangel induzierten Blattseneszenz werden in *A. thaliana* parallel Transkript-Level, Metabolit-Level und Hormon-Level gemessen. Die Informationen aus diesen Messungen sollen in Kombination mit Ergebnissen aus Datenbank-Recherchen molekulare Marker und experimentelle Konzepte liefern. Diese Marker und Konzepte können dann in weiterführenden Experimenten als Werkzeuge zur Analyse der regulatorischen Mechanismen der N-Mangel induzierten Blattseneszenz genutzt werden.

3.1 Stickstoff-abhängige Regulation der Blattseneszenz in Gerste (*Hordeum vulgare*)

3.1.1 Zusätzliche Nitratgaben hemmen Gersten-Fahnenblattseneszenz

Die Blattseneszenz ist die finale Phase der Blattentwicklung und ist durch ein Absinken des Chlorophyllgehaltes und der Photosystem II-Effizienz gekennzeichnet (Matile 2000, Humbeck und Krupinska 2003). Aus diesem Grund habe ich diese beiden Parameter zur physiologischen Charakterisierung des Blattseneszenzverlaufs genutzt. Der Gesamtchlorophyllgehalt ist ein Indikator für den seneszenzabhängigen Abbau des Photosyntheseapparates (Matile 2000). In (Abb. 3A) ist zu sehen, wie der Fahnenblatt-Chlorophyllgehalt (der Kontrollpflanzen) auf Erde wachsender Gerstenpflanzen bis 79 DAS (DAS = Tage nach Aussaat) stetig ansteigt und dann innerhalb von 20 Tagen sehr schnell auf fast 0 absinkt. Jeder Topf wurde vor Aussaat der Gerste mit 0,3 g elementarem Stickstoff in Form von KNO_3 gedüngt. Bei den Pflanzen die nach 79 DAS zusätzlich mit 0,3 g elementarem Stickstoff in Form Nitrat versorgt wurden (+), wurde das seneszenzspezifische Absinken im Chlorophyllgehalt gehemmt. Der Fahnenblatt-Chlorophyllgehalt stieg zunächst sogar als Reaktion auf die zusätzliche Nitratgabe und das Absinken des Chlorophyllgehaltes wurde um etwa 7 Tage verzögert. Das Absinken des Chlorophyllgehaltes fällt zeitlich mit dem Absinken der Photosynthese – Effizienz zusammen. Abbildung 1B zeigt die Veränderung in der Photosystem II Effizienz (PSII-Effizienz) in diesen Fahnenblättern. Die PSII-Effizienz ist ein weiterer, oft genutzter Parameter der Blattseneszenz (Humbeck und Krupinska 2003), und wurde mittels Chlorophyll-Fluorometrie gemessen. Die PSII-Effizienz reflektiert die funktionelle Organisation (Quanteneffizienz) des Photosyntheseapparates. Dieser Parameter sinkt während der Seneszenz als Folge des Abbaus von Photosyntheseproteinen innerhalb der Chloroplasten. Die Ergebnisse zeigen eine unverzügliche und drastische Verzögerung des seneszenzabhängigen Abbaus der Photosynthese-Mechanismen in den Fahnenblättern als Reaktion auf die zusätzliche Nitratgabe. Das bedeutet auch, dass die Pflanzen, die nur ein mal vor der Aussaat mit 0,3 g elementarem Stickstoff in Form von KNO_3 gedüngt wurden, gegen Ende der Wachstumsphase N-unterversorgt waren.

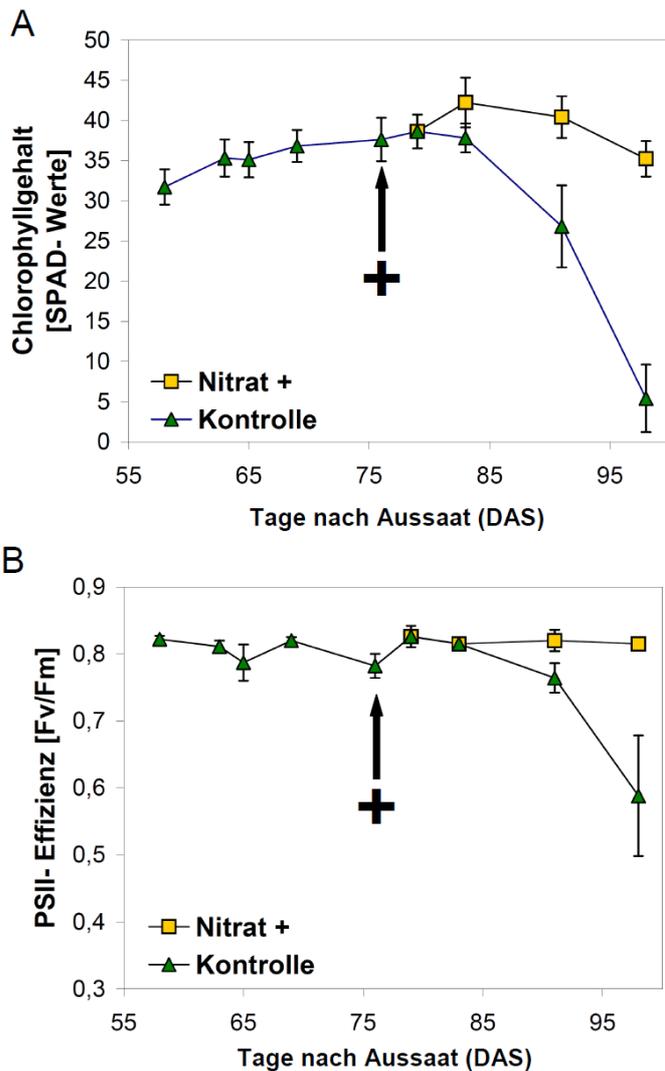


Abbildung 3: Gerste (*Hordeum vulgare*) Fahnenblatt-Physiologie. A) Eine zusätzliche Nitrat-Zugabe bewirkt eine Verzögerung des seneszenzspezifischen Absinkens des Chlorophyllgehaltes in Fahnenblättern der Gerste. Der Chlorophyllgehalt wurde wie in Material/Methoden-Teil beschrieben mittels SPAD-Meßgerät ermittelt. B) Eine zusätzliche Nitrat-Zugabe bewirkt eine Verzögerung des seneszenzspezifischen Absinkens der Photosystem II-Effizienz (Fv/Fm) in Fahnenblättern der Gerste. Die Chlorophyll-Fluoreszenz wurde nach Dunkeladaptation mittels Chlorophyll Fluorometer gemessen (Mini PAM, Walz, Effeltrich, Deutschland). Die Messungen wurden in der Blattmitte intakter Blätter durchgeführt. Die Pflanzen wurden in Mitscherlich-Töpfen angezogen. Die Erde wurde kurz vor der Aussaat mit 0,3g N pro Gefäß gedüngt (siehe Material/Methoden). 79 Tage nach Aussaat (DAS) wurden die Pflanzen entweder ohne zusätzlichen Dünger belassen (Kontrolle) oder zusätzlich mit 0,3g N (Nitrat+) pro Topf gedüngt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (n ≥ 10 Pflanzen).

3.1.2 Transkriptlevel der plastidären GS2 und LKR/SDH in Gersten-Fahnenblättern

Der Verlauf der Blattseneszenz ist auch auf Transkriptebene messbar. Eine starke Änderung des Transkriptprofils seneszierender Gersten-Blätter weist darauf hin, dass der Blattseneszenzverlauf wahrscheinlich von der Transkriptionsaktivität einzelner Gene beeinflusst wird (Jukanti et al. 2008). Mittels quantitativer Real Time-PCR (qPCR) wurden die Veränderungen der Transkriptlevel von zwei Enzymen des N-Stoffwechsels gemessen. Untersucht wurden die RNA-Extrakte von Gersten-Fahnenblättern mit zusätzlicher Nitratgabe zu Beginn der Blattseneszenz nach 79 DAS (+) und ohne zusätzliche Nitratgabe (Kontrolle). Die plastidäre Glutaminsynthetase (GS2) wurde ausgewählt, weil sie ein wichtiges Enzym der Assimilation von reduziertem Stickstoff darstellt (Baron et al. 1994). Das andere untersuchte Gen kodiert die LKR/SDH (Lysin-Ketoglutarat-Reduktase/Saccharopin-Dehydrogenase), das ein limitierendes Enzym des Lysinabbaus ist (Zhu und Galili 2004). Diese beiden Enzyme spielen eine Rolle in N-Verteilungsprozessen innerhalb der Pflanze (Masclaux et al. 2000, Zhu und Galili 2004). Um zu untersuchen, wie eine zusätzliche Nitratgabe die Fahnenblattseneszenz beeinflusst, wurden die entsprechenden Transkriptlevel mittels qPCR zu verschiedenen Zeitpunkten der

Fahnenblatt-Entwicklung bestimmt. Der Transkriptlevel am Tag 63 nach Aussaat wurde als 1 definiert und die Level an den späteren Tagen darauf bezogen. Der Transkriptlevel der GS2 sank bereits zwischen 63 und 76 DAS ab, während die Werte für Chlorophyllgehalt und die PSII-Effizienz noch hoch waren (Abb. 4A). Das drastische Absinken des GS2-Transkriptlevels bis 91 DAS wurde als Antwort auf eine zusätzliche Nitratgabe (+) am 79. Tag nach Aussaat deutlich verzögert. Interessanter weise geht der Rückgang des GS2 Transkriptlevels dem Anstieg des LKR/SDH Transkriptlevels deutlich voraus (Abb. 4B): Während der GS2-Transkriptlevel in Fahnenblättern von 63 DAS bis 76 DAS schon um etwa 40% abgesunken war und dann bis 91 DAS über 90% zurück ging, stieg das LKR/SDH-Transkriptlevel zwischen 63 DAS und 76 DAS kaum. Erst zwischen 76 und 98 DAS stieg der LKR/SDH Transkriptlevel stark an. Im Gegensatz zum verzögerten Absinken des GS2-Transkriptlevels, wurde der Anstieg des LKR/SDH-Transkriptlevels durch eine zusätzliche Nitratgabe deutlich verzögert.

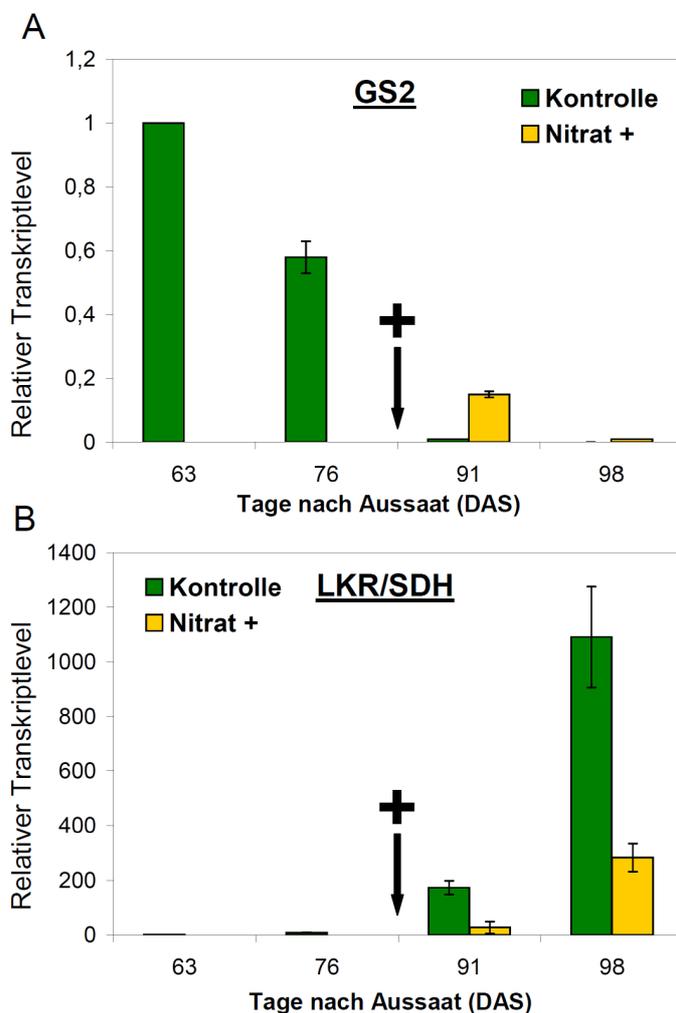


Abbildung 4: Gerste (*Hordeum vulgare*) Fahnenblatt-Transkriptlevel.

A) Veränderungen des relativen Transkriptlevel von GS2 (Glutaminsynthetase, plastidäre Isoform) in Fahnenblättern der Gerste in Abhängigkeit einer zusätzlichen Nitratgabe.

B) Veränderungen des relativen Transkriptlevel von LKR/SDH (Lysin-Ketoglutarat Reduktase/Saccharopin Dehydrogenase) in Fahnenblättern der Gerste in Abhängigkeit einer zusätzlichen Nitratgabe. Die Pflanzen wurden in Mitscherlich-Töpfen angezogen. Die Erde wurde kurz vor der Aussaat mit 0,3g N pro Gefäß gedüngt (siehe Material/Methoden). 79 Tage nach Aussaat (DAS) wurden die Pflanzen entweder ohne zusätzlichen Dünger belassen (Kontrolle) oder zusätzlich mit 0,3g N (Nitrat+) pro Topf gedüngt. Veränderungen de Transkriptlevel relativ zum Referenzgen (18sRNA) wurden mittels qPCR ermittelt. Die Transkriptlevel wurden auf den Transkriptwert von reifen Fahnenblättern der Pflanzen 63 Tage nach Aussaat (DAS) normalisiert. Die relativen Transkriptlevel wurden wie in Schildhauer et al. (2008) beschrieben,berechnet. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standartabweichung (n ≥ 6 Pflanzen).

3.1.3 N-Mangel induzierte Primärblatt-Seneszenz der Gerste

Eine zusätzliche Nitratgabe bewirkte eine Verzögerung im Seneszenz-spezifischen Absinken des Chlorophyll-Levels und der PSII-Effizienz in Fahnenblättern von auf Erde angezogenen Gerstenpflanzen (Abb. 3A, 3B). Ergänzend dazu habe ich ein Hydrokultursystem etabliert, in dem man die Reaktion der Gerstenpflanzen auf die N-Verfügbarkeit direkt verfolgen kann.

Die N-Verfügbarkeit läßt sich im Hydrokultursystem durch gezielte Veränderung der Zusammensetzung des Nährmediums steuern. Ich habe den Effekt von N-Mangel und N-Düngung an den Primärblättern der Pflanzen untersucht. Ich habe diese Methode genutzt, um zu testen ob ich die N-Zugabe-Effekte der Versuche mit den Fahnenblättern, die eine besondere Rolle bei der Kornfüllung spielen (Jukanti et al. 2008), auch an den Primärblättern der Gerstenpflanzen beobachtet werden kann.

Ich habe die Veränderungen im Chlorophyllgehalt und der PSII-Effizienz an Primärblättern junger Gerstenpflanzen untersucht, die für 22 Tage in Hydrokultur angezogen wurden (Abb. 5 A). Das wöchentlich erneuerte Hydrokultur-Medium enthielt entweder 11,6 mM Nitrat und 1 mM Ammonium (Vollmedium), oder es wurde 10 Tage nach Aussaat (10 DAS) gegen N-freies Medium getauscht (-N). Der Chlorophyllgehalt der Kontrollpflanzen (+N), die durchgehend in N-haltigem Vollmedium wuchsen, war im untersuchten Zeitraum stabil (Abb. 5 B). N-Mangel verursachte ab dem 3. Tag nach N-Entzug eine stetige Abnahme im Chlorophyllgehalt. Ähnliche Muster zeigten sich bei der PSII-Effizienz (Abb. 5 C), die in den Kontrollen stabil war, und unter N-Mangel abnahm. Die sinkenden Werte von Chlorophyllgehalt und PSII-Effizienz zeigen, dass in den Gerste-Primärblättern unter N-Mangel, eine N-Mangel induzierte Blattseneszenz ausgelöst wird.

3.1.4 Hemmung der N-Mangel induzierten Primärblatt-Seneszenz der Gerste

Nitrat und Ammonium sind die Haupt-N Quellen in vielen Ökosystemen und Hauptbestandteile von Düngern. Eine andere Form der N- Dünger ist Harnstoff. Ich habe die drei Stickstoffquellen auf ihre Wirkung untersucht, ob sie die N-Mangel induzierte Blattseneszenz hemmen. Dazu habe ich Chlorophyllgehalt und PSII-Effizienz in Primärblättern junger Gerstenpflanzen in Hydrokultur untersucht (Abb. 5B und 5C). Die Pflanzen wuchsen ab 10 DAS auf N-Mangelmedium und wurden am 17. Tag nach Aussaat in Medium gesetzt, das 2 mM Nitrat, 2mM Ammonium oder 1 mM Harnstoff enthielt. Einige Pflanzen wuchsen weiter unter N-Mangel. Parallel dazu wuchsen zusätzlich Kontrollpflanzen auf wöchentlich erneuertem Vollmedium (enthielt 11,6 mM Nitrat und 1 mM Ammonium).

Der Chlorophyllgehalt der kontinuierlich auf Vollmedium wachsenden Pflanzen war zwischen 10 DAS und 22 DAS mit SPAD-Werten von etwa 35 auf hohem Niveau stabil. Das bedeutet, dass die Blattseneszenz in den Kontrollpflanzen noch nicht begonnen hat. N-Mangel ab 10 DAS verursachte ab dem 3. Tag nach N-Entzug eine stetige Abnahme des Chlorophylls. Die Zugabe von Nitrat und Ammonium nach 17 DAS ließ den Chlorophyllgehalt der Primärblätter bis 22 DAS wieder auf Kontrollniveau ansteigen (Abb. 5 B). Im Gegensatz dazu bewirkte eine Zugabe von Harnstoff nach 17 DAS keinen Anstieg des Chlorophyllgehaltes. Der Chlorophyllgehalt sank weiter ab, wenn auch etwas langsamer als in den N-Mangel Pflanzen.

Ähnliche Muster sind in den PSII-Werten zu finden (Abb. 5 C), die in der Kontrollgruppe stabil hoch blieben und in den N-Mangel Pflanzen stetig sanken. Die Zugabe von Nitrat und Ammonium nach 17 DAS bewirkten bis 22 DAS einen Anstieg auf Kontrollniveau, während die PSII-Werte unter Harnstoff-Zugabe weiter sanken.

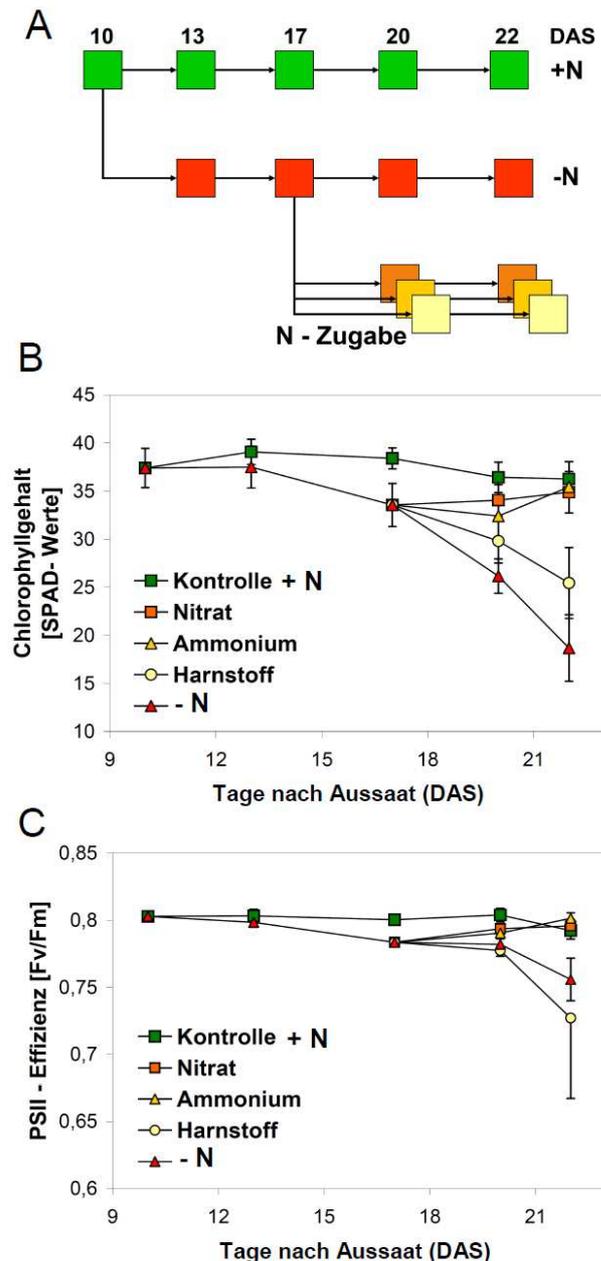


Abbildung 5: Gerste (*Hordeum vulgare*) Primärblatt-Physiologie. A) Verlaufsdiagramm der Gersten-Hydrokultur Kinetik (Tage nach Aussaat = DAS). Die Pflanzen wuchsen auf Vollmedium (+N), auf N-freiem Medium (-N) oder auf Medium mit spezifischer Stickstoffquelle (N-Zugabe).

B) Der Chlorophyll-Effekt der Zugabe verschiedener Stickstoffquellen (Nitrat, Ammonium, Harnstoff) auf Gersten Primärblätter nach Wachstum unter N-Mangel. Veränderungen des Chlorophyllgehalts wurden wie in Material/Methoden-Teil beschrieben mittels SPAD-Meßgerät ermittelt.

C) Der Photosystem II-Effekt (Fv/Fm) der Zugabe verschiedener Stickstoffquellen (Nitrat, Ammonium, Harnstoff) auf Gersten Primärblätter nach Wachstum unter N-Mangel. Die Chlorophyll-Fluoreszenz wurde nach Dunkeladaptation mittels Chlorophyll Fluorometer gemessen (Mini PAM, Walz, Effeltrich, Deutschland).

Die Messungen wurden in der Blattmitte intakter Blätter durchgeführt. Die Gerstenpflanzen wurden bis 22 Tage nach Aussaat (DAS) auf Hydrokultur angezogen und wuchsen auf Vollmedium (+N) oder wurden 10 DAS auf N-freies Medium (-N) gesetzt. 17 Tage nach Aussaat wurden ein Teil der N-Mangel Pflanzen auf Medium umgesetzt, das entweder 2 mM Nitrat, 2 mM Ammonium oder 1 mM Harnstoff als einzige Stickstoffquelle enthielt (Nitrat, Ammonium, Harnstoff). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung ($n \geq 10$ Pflanzen).

3.2 N-Mangel induzierte Blattseneszenz im Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*)

3.2.1 Hemmung der N-Mangel induzierten Blattseneszenz in *A. thaliana*

Ich konnte mit Gerstenpflanzen zeigen, dass eine Stickstoffgabe während der N-Mangel induzierten Blattseneszenz, einen Anstieg des Chlorophyllgehaltes und der PSII-Effizienz bewirkt. Die N-Mangel-induzierte Blattseneszenz kann demnach durch Zugabe von Nitrat und Ammonium gehemmt werden und die Blätter können ihre Photosyntheseprozesse wieder regenerieren. Gerste ist eine wichtige Nutzpflanze und eine bedeutende Modellpflanze für Getreidearten der gemäßigten Zone. Dennoch ist *Arabidopsis thaliana* die bis jetzt wichtigste höhere Modellpflanze in der molekularen Analyse der Stickstoffernährung und der Blattseneszenz. Aufgrund der größeren methodischen Möglichkeiten, wollte ich

A.thaliana für meine Arbeit nutzen. Als erstes stellten sich mir die Fragen: „Induziert N-Mangel in *A.thaliana* ähnlich stark Blattseneszenz wie in Gerste? Wenn ja, läßt sich diese N-Mangel induzierte Blattseneszenz durch N-Zugabe hemmen?“ Dazu habe ich *A. thaliana*-Pflanzen in Hydrokultur bis 29 DAS in wöchentlich erneuertem Vollmedium auf 7 mM Nitrat und 0,3 mM Ammonium angezogen (+N, Abb. 6 A). Ein Teil der Pflanzen habe ich 19 Tage nach Aussaat (DAS) auf stickstoffreies Mangelmedium (-N) gesetzt. Stickstoffmangel zeigt bis 4 Tage nach N-Entzug keinen Effekt und bewirkt später ein stetiges und sichtbares Absinken im Chlorophyllgehalt der Blätter 1 und 2 nach den Kotyledonen (Abb. 6D). Dieses Absinken konnte durch Umsetzen in Vollmedium (N-Zugabe) nach 26 DAS gestoppt werden. Ähnliche Muster konnte ich in den PSII-Werten erkennen, die ich mittels bildgebender Chlorophyll-Fluorometrie gemessen habe (Abb. 6C und 6D). In den Kontrollpflanzen blieben diese Werte nahe am Maximalwert von etwa 0,8 (Fv/Fm), sanken ab 4 Tage nach N-Entzug in den N-Mangel-Pflanzen und stiegen nach N-Zugabe wieder an. N-Mangel hatte demnach bis 4 Tage nach N-Entzug keine Auswirkung auf Blattchlorophyllgehalt und PSII-Effizienz. Aus diesem Grund habe ich diese Parameter bei der früheren N-Zugabe nach 4 Tagen N-Mangel, 3 Stunden nach N-Zugabe nicht bestimmt (Abb. 6A, 6B, 6C)

3.2.2 *Arabidopsis thaliana*-Transkript-Profiling der N-Mangel induzierten Blattseneszenz

Zum Transkript-Profiling der N-Mangel induzierten Blattseneszenz von *Arabidopsis thaliana* wurden Affymetrix ATH1 Arrays genutzt (Redman et al. 2004). Zur Berechnung der Transkriptlevel-Regulationsprofile habe ich das Programm Robin 1.1.5 genutzt (Lohse et al. 2010)

Das Thema meiner Arbeit lautet: „Molekulare Mechanismen der Stickstoffmangel-induzierten Blattseneszenz“ oder: Wie reguliert N-Verfügbarkeit den Beginn der Blattseneszenz?

Mir stehen ATH1 Datensätze zur Verfügung in denen Informationen über Transkriptlevel aus meinem N-Hydrokultur-System stecken und die ich zur Beantwortung der Frage: „Wie reguliert N-Verfügbarkeit den Beginn der Blattseneszenz?“ nutzen werde. Bevor ich beschreibe welche Methoden und welche Strategie ich dabei genutzt habe, werde ich diese Frage erweitern und auf diese ATH1-Datensätze ausrichten. Die Hauptfrage, um die sich dieser Teil meiner Arbeit dreht, lautet: „Wie bekomme ich aus ATH1-Daten Hinweise ob und wie N-abhängige Signalprozesse im Signalsystem der Zelle „geleitet“ werden und so einen Einfluß auf den Entwicklungsverlauf der Zelle bzw. des Blattes bekommen.“ Meine Datenauswertung hat sich von dieser Frage aus entwickelt. Ich habe das Ergebnis in 4 Teile gegliedert, die ich Module nenne. Die Module bauen schrittweise aufeinander auf. Jedes Modul enthält eine neue Perspektive, neue Fragen und Ideen, die ich in jedem Modul erläutere und bis zu einem Ergebnis bearbeite.

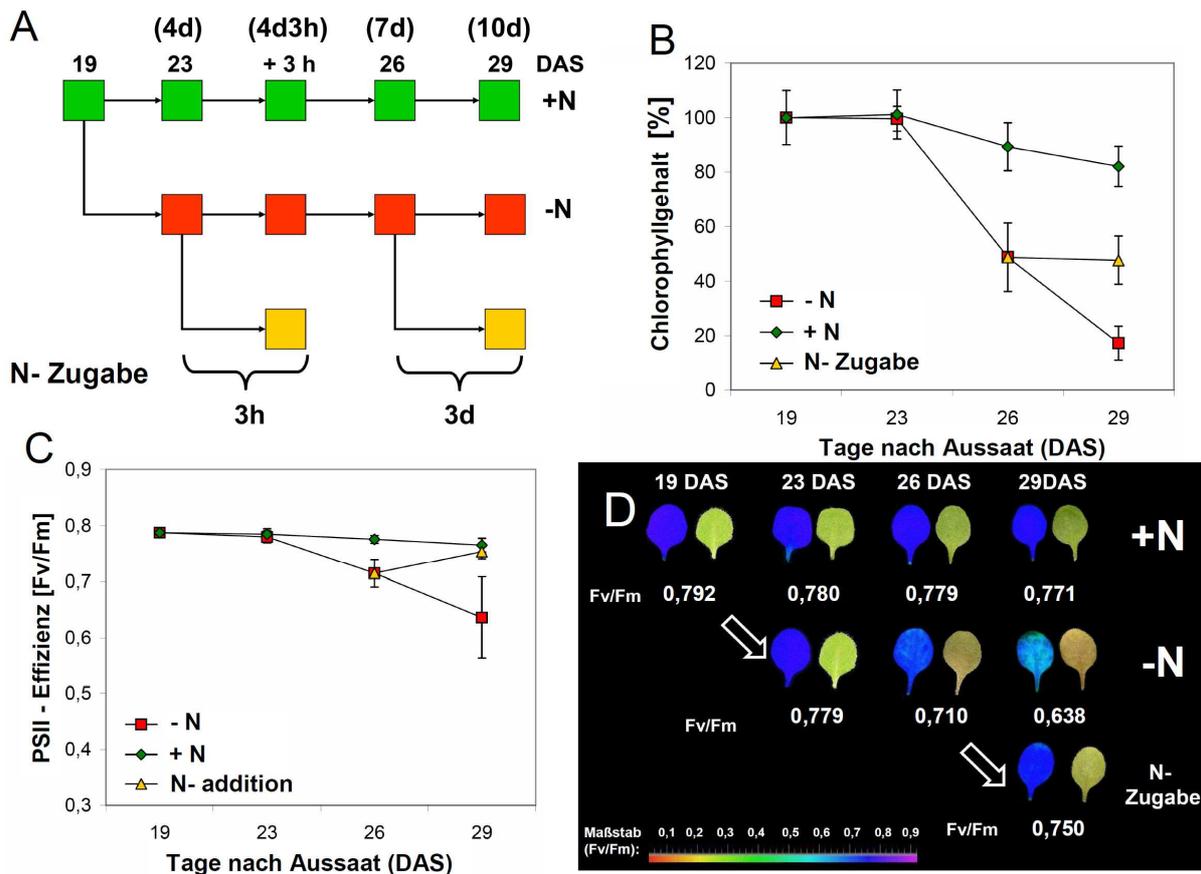


Abbildung 6: *Arabidopsis thaliana* N- Mangel Physiologie. **A)** Verlaufsdiagramm der *Arabidopsis*-Hydrokultur Kinetik (Tage nach Aussaat = DAS). Die *A.thaliana* wurden bis 29 Tage nach Aussaat (DAS) auf Hydrokultur angezogen und wuchsen auf Vollmedium (+N) oder wurden 19 DAS auf N-freies Medium (-N) gesetzt. 23 und 26 Tage nach Aussaat wurden ein Teil der N-Mangel Pflanzen auf Vollmedium umgesetzt (N-Zugabe).

B) Der Chlorophyll-Effekt in *Arabidopsis thaliana* nach Zugabe von Stickstoff (Nitrat und Ammonium) auf die den Kotyledonen folgenden Blätter 1 und 2 nach Wachstum unter N-Mangel. Veränderungen des relativen Chlorophyllgehalts wurden wie in Material/Methoden-Teil beschrieben spektrophotometrisch ermittelt. Der Chlorophyllgehalt am TAG 19 nach Aussaat ist als 100% definiert.

C) Der Photosystem II-Effekt (Fv/Fm) in *Arabidopsis thaliana* nach Zugabe von Stickstoff (Nitrat und Ammonium) auf die den Kotyledonen folgenden Blätter 1 und 2 nach Wachstum unter N-Mangel. Die Chlorophyll-Fluoreszenz wurde nach Dunkeladaptation mittels Chlorophyll Fluorometer gemessen (IMAGING PAM, Walz, Effeltrich, Deutschland).

D) Exemplarische Darstellung einzelner Blätter und ihrer Photosystem II-Effizienz (Fv/Fm). Auf der linken Seite befindet sich je Blatt mit repräsentativer PSII-Effizienz ein Chlorophyll-Fluoreszenz-Falschfarbenbild und rechts daneben ein Lichtbild des jeweiligen Blattes. Das Falschfarbenbild repräsentiert die Photosystem II-Effizienz der Blattfläche (siehe Maßstab zur Farbskalierung). Die Mittelwerte der Photosystem II-Effizienz der verschiedenen Messpunkte sind unterhalb der Bilder aufgetragen

Die Messungen wurden über die gesamte Blattfläche intakter Blätter durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung ($n \geq 10$ Pflanzen).

3.2.2.1 Modul 1

In Modul 1 werde ich herausarbeiten welchen Effekt N-Verfügbarkeit auf das Transkriptprofil von *A. thaliana* Blättern hat. Mit diesen Ergebnissen werde ich später versuchen zu klären, welchen Effekt N-Signalprozesse auf das Transkriptprofil dieser Blätter haben.

In Modul 1 sollen folgende Teilfragen beantwortet werden:

1. Welche Regulationsmuster treten in der N-Mangel-induzierten Blattseneszenz auf?
2. Welche Regulationsmuster treten in Blättern nach N-Zugabe zu N-Mangel-Pflanzen auf?
3. Wie sehen die Gemeinsamkeiten und Unterschiede des N-Effekts zu Regulationsmustern der Entwicklungs-induzierten Blattseneszenz (E-S) aus?

3.2.2.1.1 Hierarchisches-Clustering der ATH1-Expressionsprofile

Um sichtbar zu machen, wie ähnlich sich die Transkriptprofile der einzelnen Messpunkte und biologischen Replikate sind, habe ich mittels Robin 1.1.5 ein Hierarchisches Clustering (HCL) der einzelnen Messpunkte durchgeführt.

Es ergaben sich 4 getrennte Gruppen in der Auftragung als Baumdiagramm (Abb. 7 A). Die Länge der Verbindungslinien ist proportional zur Ähnlichkeit der einzelnen Datensätze untereinander.

Die Werte der Kontrollen (+N) befinden sich in Gruppe B und C, die Werte der N-Mangelpflanzen (-N) in Gruppe A und D. Ein geringer Abstand besteht zwischen den Kontrollen untereinander. Der größte Abstand zeigt sich zwischen den späten N-Mangelproben Gruppe A (-N 7d und -N 10d) und den anderen Messwerten. Die Werte der frühen N-Mangelproben (-N 4d, -N 4d3h Gruppe D) liegen relativ nah bei den Kontrollproben (Gruppe B und C). Die Transkriptprofile der N-Mangelpflanzen unterscheiden sich demnach von den Kontrollpflanzen mit zunehmender N-Mangeldauer immer stärker.

Die Werte nach 3 Stunden N-Zugabe (N-Zugabe 3h) liegen in der gleichen Gruppe (D) wie die dazugehörigen N-Mangelproben (-N 4d3h). Das bedeutet, dass es nach 3h N-Zugabe relativ wenige Veränderungen des Transkriptprofils gab. Anders verhält es sich bei Messwerten 3 Tage nach N-Zugabe (N-Zugabe 3d). Die Ausgangswerte der N-Mangelpflanzen (-N 7d) liegen in Gruppe A und die N-Zugabe bewirkt eine Eingliederung der Transkriptprofile in Gruppe C, was einer relativ starken Veränderung des Transkriptprofils entspricht. Das bedeutet, dass die Transkriptprofile 3 Tage nach N-Zugabe den biologisch jüngsten Kontrollpflanzen am ähnlichsten sind (Abb. 7 B).

7 A

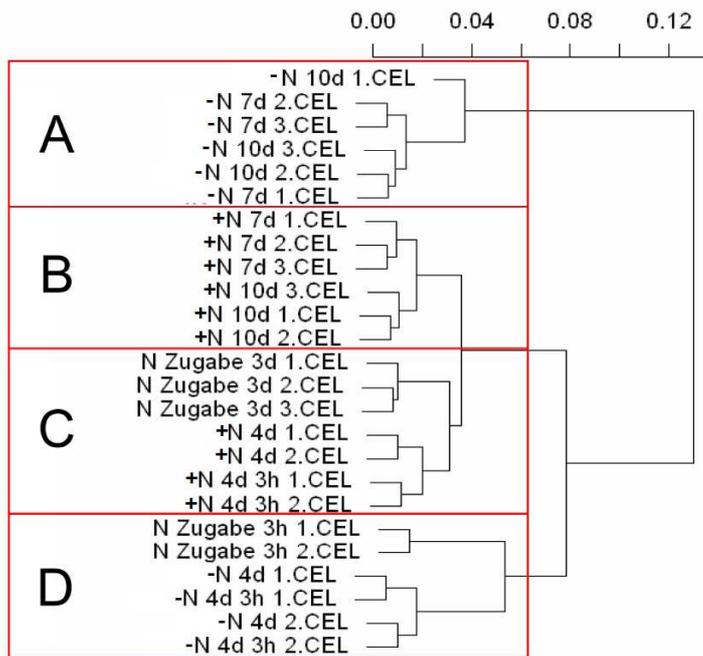
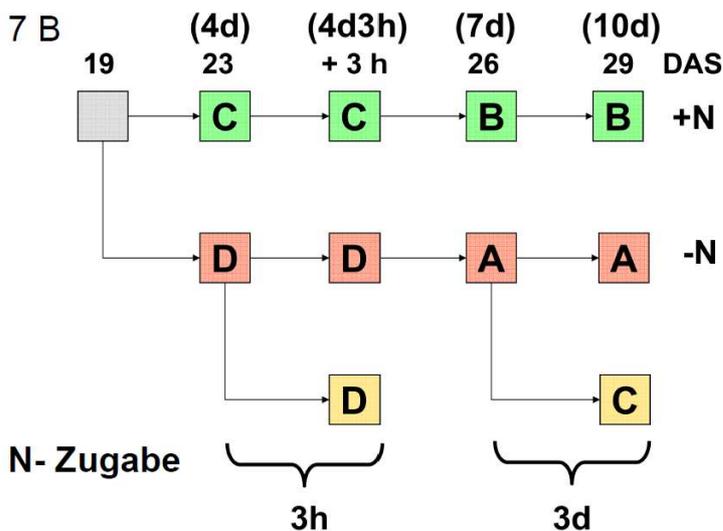


Abbildung 7: Hierarchisches Clustering der N-ATH1-Datensätze.

A) Hierarchisches Clustering mittels Pearson-Verhältnis Analyse wurde mit dem ganzen Datensatz des ATH1 Chip durchgeführt. Das dazu genutzte Programm war Robin (Lohse et al. 2010). Die Zahlen 1, 2 und 3 kennzeichnen die biologischen Replikate.

B) Verlaufsdiagramm der Arabidopsis-Hydrokultur Kinetik (Tage nach Aussaat = DAS). Die Pflanzen wuchsen auf Vollmedium (+N), auf N-freiem Medium (-N) oder wurden nach Wachstum auf N-freiem Medium wieder auf Vollmedium umgesetzt (N-Zugabe). Die Buchstaben repräsentieren die Ergebnis-Gruppen des Hierarchischen Clustering aus Abbildung 7A.



3.2.2.1.2 Identifikation von N-Mangel regulierten Genen

Dazu habe ich *A. thaliana* bis 29 DAS in wöchentlich erneuertem Vollmedium auf 7 mM Nitrat und 0,3 mM Ammonium angezogen (+N, Abb. 8 A). Ein Teil der Pflanzen habe ich 19 DAS auf stickstofffreies Mangelmedium (-N) gesetzt. Die Transkriptmengen der N-Mangel-Gruppe (-N) wurden 4d (23 DAS), 7d (26 DAS) und 10d (29 DAS) nach Stressbeginn mit den Transkriptmengen der zeitgleichen Kontrollgruppe (+N) verglichen. Ich habe damit Gene der N-Mangel-Gruppe identifiziert, die im Vergleich zur Kontrollgruppe mindestens 3-fach (\log_2 -Verhältnis: $\pm 1,585$) induziert bzw. reprimiert vorlagen. Es wurden die Transkriptprofile aus mindestens 2 biologischen Replikaten gemessen.

N-Mangel induzierte Gene

Wie viele Gene wurden durch N-Mangel mindestens 3-fach induziert? Durch den N-Mangel wurden in den 3 gemessenen Zeitpunkten über 200 Gene mindestens 3-fach (\log_2 Wert: 1,585) induziert (Abb. 8 B). Die Auftragung in einem Venn-Diagramm zeigt, dass davon 81 ($81 = 54 + 27$) Gene durchgehend von der frühen (-N 4d) bis zur späten (-N 10d) N-Mangel induzierten Blattseneszenz induziert waren (Abb. 8 C).

Wieviele von diesen N-Mangel induzierten Genen sind SAG? Etwa die Hälfte der induzierten Gene sind in den Daten der Entwicklungs-induzierten Blattseneszenz (E-S) (Buchanan - Wollaston et al. 2005) ebenfalls mindestens 3-fach induziert (Abb. 8 B). Bei Analyse dieser Gene in der Venn-Auftragung zeigt sich, dass 54 dieser SAG durchgehend induziert waren ((SAG) Abb. 8 C).

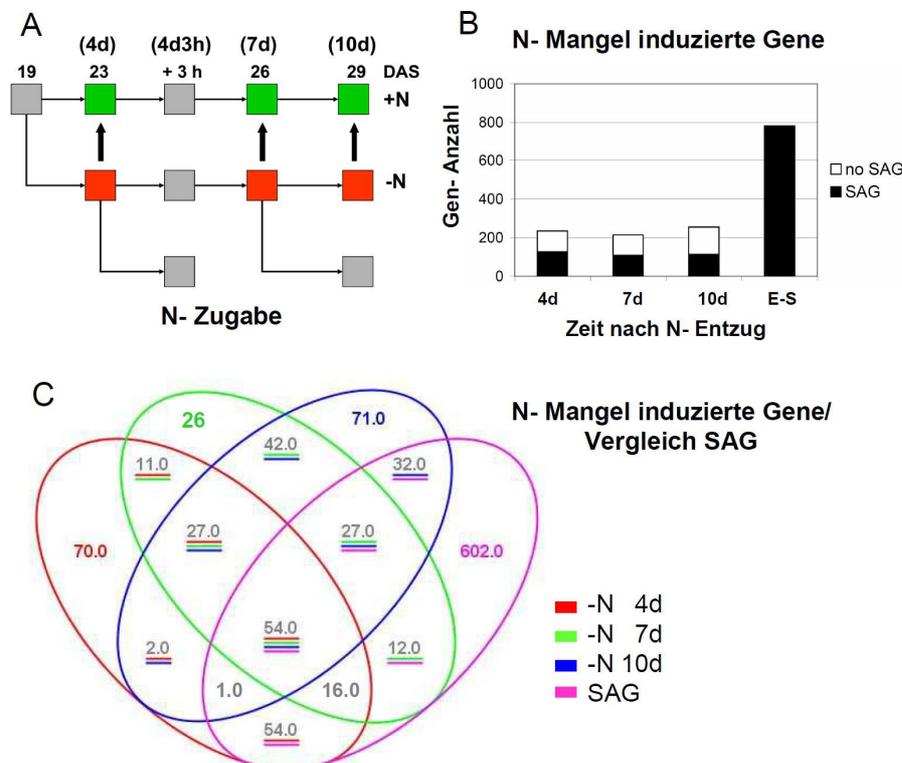


Abbildung 8: N-Mangel induzierte Gene.

A) Verlaufdiagramm der Arabidopsis-Hydrokultur Kinetik (Tage nach Aussaat = DAS). Die Pflanzen wuchsen auf Vollmedium (+N), auf N-freiem Medium (-N) oder wurden nach Wachstum auf N-freiem Medium wieder auf Vollmedium umgesetzt (N-Zugabe). Die farbig markierten Felder repräsentieren die Datenpunkte, die in der folgenden Transkriptanalyse ausgewertet wurden. Die Pfeile repräsentieren die zwei aufeinander bezogenen Datenpunkte.

B) Säulendiagramm der

unter N-Mangel mindestens 3-fach induzierten Gene (4d, 7d, 10d). Vergleichend dazu ist rechts daneben die Zahl der mindestens 3-fach Seneszenz-induzierten Gene (SAG) aus dem Datensatz von Buchanan-Wollaston et al. (2005) aufgetragen (E-S). Die jeweilige Anzahl der SAG wurde schwarz markiert. Die Anzahl der Gene ohne SAG-Identität wurde weiß markiert (no SAG). **C)** Venn-Diagramm der unter N-Mangel und E-S (SAG) mindestens 3-fach induzierten Gene als Zahlen. Die Zahlen in den Feldern repräsentieren die Gene, die in einem oder mehreren Datenpunkten als mindestens 3-fach induziert gemessen wurden.

N-Mangel reprimierte Gene

Wie viele Gene wurden durch N-Mangel mindestens 3-fach reprimiert? Durch den N-Mangel wurden nach 4d N-Mangel (23 DAS) 315 Gene mindestens 3-fach reprimiert (\log_2 Wert: -1,585) (Abb. 9B). Diese Zahl steigt bis 10d N-Mangel auf 623 an. Die Auftragung in einem Venn-Diagramm zeigt, dass davon 183 ($183 = 104 + 79$) Gene durchgehend von der frühen

(-N 4d) bis zur späten (-N 10d) N-Mangel induzierten Blattseneszenz reprimiert waren (Abb. 9 C). Wieviele von diesen reprimierten Genen sind SDG? Etwa die Hälfte der 4d N-Mangel reprimierten Gene sind in den Daten der entwicklungsinduzierten Seneszenz (E-S) (Buchanan-Wollaston et al. 2005) ebenfalls mindestens 3-fach reprimiert (Abb. 9B). Bis 10d N-Mangel nimmt der Anteil von Genen die keine SDG sind (no SDG) deutlich zu (Abb. 9 B). Bei Analyse in der Venn-Auftragung zeigt sich, dass 104 der SDG durchgehend reprimiert waren ((SDG) Abb. 9 C).

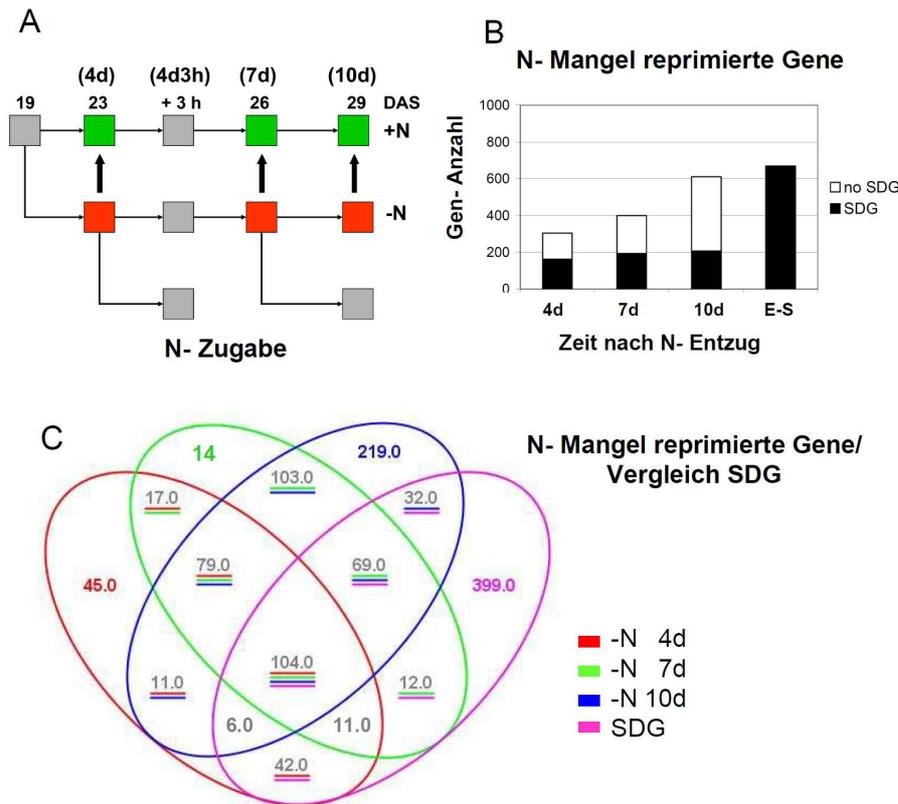


Abbildung 9: N-Mangel reprimierte Gene.

A) Verlaufsdiagramm der Arabidopsis-Hydrokultur Kinetik (Tage nach Aussaat = DAS). Die Pflanzen wuchsen auf Vollmedium (+N), auf N-freiem Medium (-N) oder wurden nach Wachstum auf N-freiem Medium wieder auf Vollmedium umgesetzt (N-Zugabe). Die farbig markierten Felder repräsentieren die Datenpunkte, die in der folgenden Transkriptanalyse ausgewertet wurden. Die Pfeile repräsentieren die zwei aufeinander bezogenen Datenpunkte.

B) Säulendiagramm der unter N-Mangel reprimierten Gene.

mindestens 3-fach reprimierten Gene (4d, 7d, 10d). Vergleichend dazu ist rechts daneben die Zahl der mindestens 3-fach Seneszenz-reprimierten Gene (SDG) aus dem Datensatz von Buchanan-Wollaston et al. (2005) aufgetragen (E-Se). Die jeweilige Anzahl der SDG wurde schwarz markiert. Die Anzahl der Gene ohne SDG-Identität wurde weiß markiert (no SDG). **C)** Venn-Diagramm der unter N-Mangel mindestens 3-fach reprimierten Gene als Zahlen. Die Zahlen in den Feldern repräsentieren die Gene, die in einem oder mehreren Datenpunkten als mindestens 3-fach reprimiert gemessen wurden

3.2.2.1.3 Identifikation von N-Zugabe regulierten Genen

Zusätzlich zu den Änderungen in den Transkriptprofilen der Blätter, die durch den N-Mangel hervorgerufen wurden, wurde die molekulare Antwort der N-Mangel-Blätter auf eine N-Zugabe gemessen. Die N-Zugabe habe ich nach zwei verschiedenen N-Mangelperioden (4d und 7d N-Mangel) durchgeführt. Außerdem habe ich die Blattproben nach zwei unterschiedlichen Zeitspannen (3h und 3d) nach N-Zugabe gemessen (Abb. 10A).

N-Zugabe induzierte Gene

Wie viele Gene werden 3h bzw. 3d nach N-Zugabe induziert?

Wie viele von diesen Genen sind SDG?

3 Stunden (h) nach N-Zugabe zu den N-Mangel Pflanzen waren 267 Gene mindestens 3-fach induziert (\log_2 Wert: 1,585) (Abb. 10 B). Von diesen 267 3h N-Zugabe-induzierten Gene sind 57 Gene in den Daten der Entwicklungs-induzierten Seneszenz (E-S) (Buchanan - Wollaston et al. 2005) mindestens 3-fach reprimiert (SDG).

3 Tage (d) nach N-Zugabe zu den N-Mangel Pflanzen waren 949 Gene mindestens 3-fach induziert (\log_2 Wert: 1,585) (Abb. 10B). Von diesen 949 3d N-Zugabe-induzierten Genen sind 369 Gene in den Daten der Entwicklungs-induzierten Seneszenz (E-S) (Buchanan - Wollaston et al. 2005) mindestens 3-fach reprimiert (SDG).

Wie groß ist bei diesen Genen die Übereinstimmung zwischen 3h und 3d N-Zugabe?

Vergleicht man die N-Zugabe induzierten Gene beider Zeitpunkte in der Venn-Auftragung miteinander, zeigen sich 78 Gene in beiden Gruppen als induziert (Abb. 10D).

Von diesen 78 Genen sind 47 Gene SDG, und in den Daten der Entwicklungs-induzierten Seneszenz (E-S) (Buchanan-Wollaston et al. 2005) mindestens 3-fach reprimiert (SDG).

N-Zugabe reprimierte Gene

Wie viele Gene werden 3h bzw. 3d nach N-Zugabe reprimiert?

Wieviele von diesen Genen sind SAG?

3 Stunden (h) nach N-Zugabe zu den N-Mangel Pflanzen waren 189 Gene mindestens 3-fach reprimiert (\log_2 Wert: -1,585) (Abb. 10 C). Von diesen 189 3h N-Zugabe-reprimierten Genen sind 95 Gene in den Daten der Entwicklungs-induzierten Seneszenz (E-S) (Buchanan -Wollaston et al. 2005) mindestens 3-fach induziert (SAG).

3 Tage (d) nach N-Zugabe an die N-Mangel Pflanzen waren 687 Gene mindestens 3-fach reprimiert (\log_2 Wert: -1,585) (Abb. 10 C). Von diesen 687 3d N-Zugabe-reprimierten Genen sind 321 Gene in den Daten Entwicklungs-induzierten Seneszenz (E-S) (Buchanan - Wollaston et al. 2005) mindestens 3-fach induziert (SAG).

Wie groß ist bei diesen Genen die Übereinstimmung zwischen 3h und 3d N-Zugabe?

Vergleicht man die reprimierten Gene beider Zeitpunkte in der Venn-Auftragung miteinander, zeigen sich 93 Gene in beiden Gruppen als reprimiert (Abb. 10 E). Von diesen 93 Genen sind 66 Gene SAG, und in den Daten der Entwicklungs-induzierten Seneszenz (E-S) (Buchanan -Wollaston et al. 2005) mindestens 3-fach induziert (SAG).

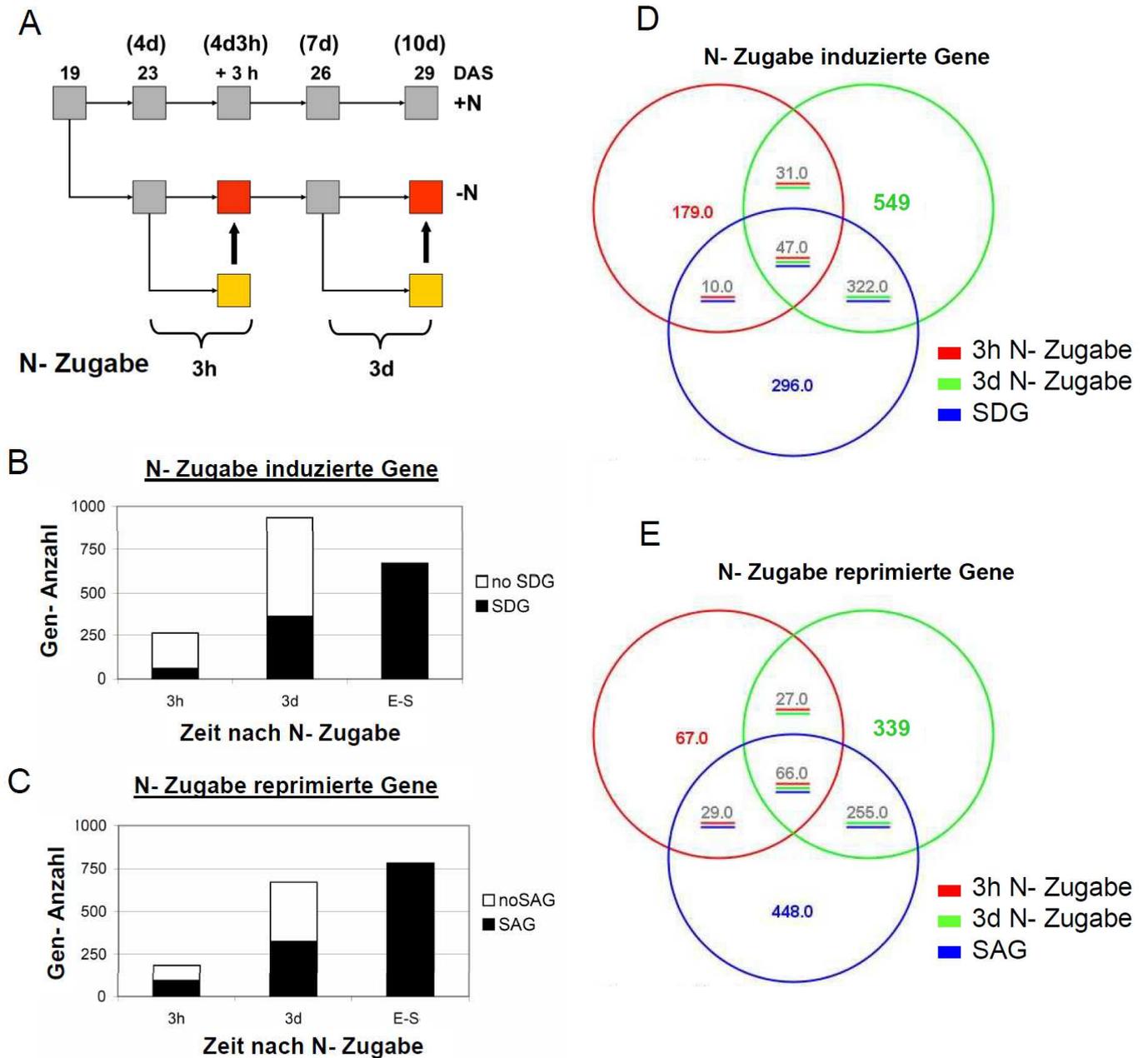


Abbildung 10: N-Zugabe regulierte Gene. **A)** Verlaufsdigramm der Arabidopsis-Hydrokultur Kinetik (Tage nach Aussaat = DAS). Die Pflanzen wuchsen auf Vollmedium (+N), auf N-freiem Medium (-N) oder wurden nach Wachstum auf N-freiem Medium wieder auf Vollmedium umgesetzt (N-Zugabe). Die farbig markierten Felder repräsentieren die Datenpunkte, die in der folgenden Transkriptanalyse ausgewertet wurden. Die Pfeile repräsentieren die zwei aufeinander bezogenen Datenpunkte.

B) Säulendiagramm der unter N-Zugabe mindestens 3-fach induzierten Gene (3h, 3d). Vergleichend dazu ist rechts daneben die Zahl der mindestens 3-fach Seneszenz-reprimierten Gene (SDG) aus dem Datensatz von Buchanan-Wollaston et al. (2005) aufgetragen (E-S). Die jeweilige Anzahl der SDG wurde schwarz markiert. Die Anzahl der Gene ohne SDG- Identität wurde weiß markiert (no SDG).

C) Säulendiagramm der unter N-Zugabe mindestens 3-fach reprimierten Gene (3h, 3d). Vergleichend dazu ist rechts daneben die Zahl der mindestens 3-fach Seneszenz-induzierten Gene (SAG) aus dem Datensatz von Buchanan-Wollaston et al. (2005) aufgetragen (E-S). Die jeweilige Anzahl der SAG wurde schwarz markiert. Die Anzahl der Gene ohne SAG- Identität wurde weiß markiert (no SAG). **D)** Venn-Diagramm der unter N-Zugabe mindestens 3-fach induzierten Gene (3h Zugabe, 3d Zugabe) und der mindestens 3-fach Seneszenz-reprimierten Gene (SDG) aus dem Datensatz von Buchanan-Wollaston et al. (2005).

E) Venn-Diagramm der unter N-Zugabe mindestens 3-fach reprimierten Gene (3h Zugabe, 3d Zugabe) und der mindestens 3-fach Seneszenz-induzierten Gene (SAG) aus dem Datensatz von Buchanan-Wollaston et al. (2005).

3.2.2.1.4 Vergleich von N-Mangel und N-Zugabe regulierten Genen

Erzeugt N-Zugabe zu N-Mangel-Pflanzen in den untersuchten Blättern eine einfache Umkehrung der N-Mangel induzierten Regulationsmuster? In Abbildung 11 sind die mindestens 3-fach unter N-Mangel regulierten Gene mit mindestens 3-fach N-Zugabe regulierten Genen verglichen. Es zeigt sich, daß es keine einfache Umkehrung der N-Mangel induzierten Regulationsmuster gibt. Viele Gene sind eher Zeitpunkt-spezifisch reguliert (-N 4d, -N 10d, 3h N-Zugabe, 3d N-Zugabe). Nur die wenigsten Gene zeigen in ihrem Expressionsmuster eine einfache Umkehrung zwischen N-Mangel und N-Zugabe. Das sind 53 N-Zugabe induzierte und 35 N-Zugabe reprimierte Gene.

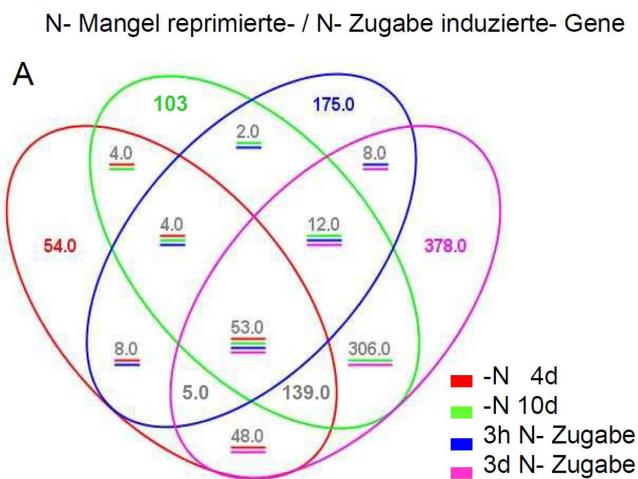
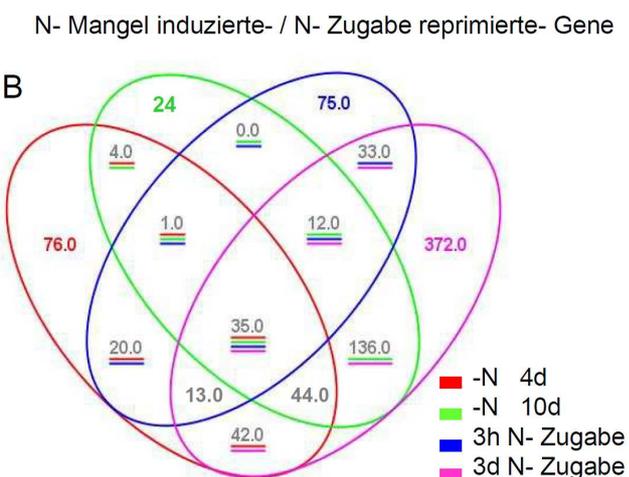


Abbildung 11: Vergleich von N-Mangel und N-Zugabe regulierten Genen.

A) Venn-Diagramm von N-Mangel reprimierten Genen (-N 4d, -N 10d) und von N-Zugabe induzierten Genen (3h N-Zugabe, 3d N-Zugabe). Die Gene sind mindestens 3-fach reguliert. **B)** Venn Diagramm von N-Mangel induzierten Genen (-N 4d, -N 10d) und von N-Zugabe reprimierten Genen (3h N-Zugabe, 3d N-Zugabe). Die Gene sind mindestens 3-fach reguliert. -N 4d: 4 Tage nach N-Entzug; -N 10d: 10 Tage nach N-Entzug; 3h N-Zugabe: 3 Stunden nach N-Zugabe; 3d N-Zugabe: 3 Tage nach N-Zugabe;



3.2.2.1.5 PageMan-Analyse N-regulierter Gene

Eine PageMan-Analyse zeigt, ob in dem MapMan Funktionszuordnungen (BIN) über- oder unterdurchschnittlich viele Gene auf Transkriptebene reguliert sind (Usadel et al. 2006). Das ist ein Hinweis darauf, welche Zellfunktionen durch N-Mangel oder N-Zugabe besonders stark oder wenig reguliert werden.

Ich fokussiere bei der Auswertung der PageMan Ergebnisse auf die Effekte, die entweder in allen 3 N-Mangel Zeitpunkten (4d, 7d, 10d) oder zu beiden N-Zugabe Zeitpunkten (3h, 3d) überrepräsentiert sind (Abb. 12). Überrepräsentiert induziert: Unter N-Mangel sind das Gene des Flavonoid-Stoffwechsels. Unter N-Zugabe sind es Glutaredoxine. Überrepräsentiert reprimiert: Unter N-Mangel sind es Gene der Photosynthese, des Auxin-Stoffwechsels, der Tetrapyrrol-Synthese (Chlorophyll-Synthese), Glutaredoxine, Gene aus der Gruppe der Gluco-, Galacto- und Mannosidasen und Gene die ribosomale Proteine der Plastide kodieren. Unter N-Zugabe sind es Gene des Flavonoid-Stoffwechsels, Gene von Calcium-Signalprozessen und Gene der Entwicklung (development).

Die Ausgangsfrage war: „Wie bekomme ich aus ATH1-Daten Hinweise ob und wie N-abhängige Signalprozesse im Signalsystem der Zelle „geleitet“ werden und so einen Einfluß auf den Entwicklungsverlauf der Zelle bzw. des Blattes bekommen.“

Ich kann diese Frage jetzt teilweise beantworten. Das „ob“ wird beantwortet. „Wie“ bleibt noch zu klären. Ja, anhand der globalen Regulationsmuster kann ich bestätigen, dass der Nährstoff N einen Effekt auf den Entwicklungsverlauf der Zelle bzw. des Blattes hat. N-Mangel induziert Blattseneszenzmuster auf Transkriptebene (Abb. 8, 9) und N-Zugabe zu N-Mangel-Pflanzen hemmt Blattseneszenzmuster auf Transkriptebene (Abb. 10). Das stimmt mit den physiologischen Ergebnissen der Chlorophyllgehalt- und PSII-Effizienz-Messungen dieser Blätter überein (Abb. 6).

In Modul 1 habe ich festgestellt, dass durch N-Mangel und N-Zugabe Gene reguliert werden, die N-unabhängig auch in der E-S reguliert werden. Dazu gehören global vor allem Gene die für die Funktion des Chloroplasten wichtig sind. Das sind Gene der Photosynthese, der Chlorophyllsynthese und ribosomale Proteine der Chloroplasten (Abb. 12)

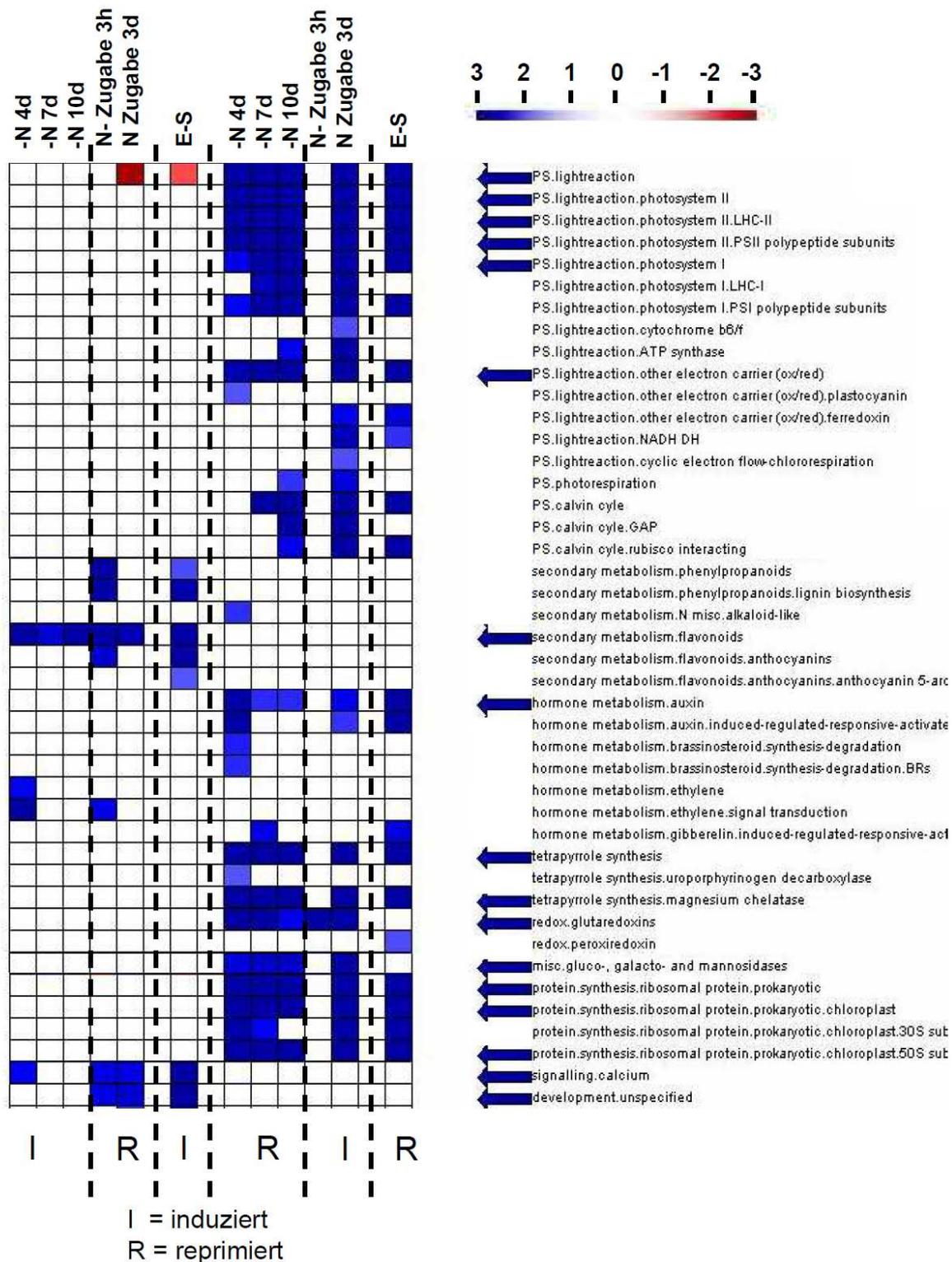


Abbildung 12: PageMan Analyse der N-Mangel Zeitkinetik. N-Mangel (-N 4d, -N 7d, -N 10d), N-Zugabe (N-Zugabe 3h, N-Zugabe 3d) und Entwicklungs-induzierte Blattseneszenz (E-S) (Buchanan-Wollaston et al. 2005). Es wurden die \log_2 -Wert Veränderungen dargestellt. Die Überrepräsentationsanalyse wurde mit folgenden Parametern durchgeführt - Summary Statistics Type: ORA Fisher; Multiple testing Correction: Benjamini-Hochberg, ORA Cutoff value: 1.0. Farbe symbolisiert das Ausmaß der Über- bzw. Unterrepräsentation. I und R kennzeichnen die induzierten (I) oder reprimierten (R) Gene. -N 4d: 4 Tage nach N-Entzug; -N 7d: 7 Tage nach N-Entzug; -N 10d: 10 Tage nach N-Entzug; N-Zugabe 3h: 3 Stunden nach N-Zugabe; N-Zugabe 3d: 3 Tage nach N-Zugabe; E-S: Entwicklungs-induzierte-Blattseneszenz;

3.2.2.2 Modul 2

In Modul 1 habe ich festgestellt, dass der Nährstoff N auf Transkript-Ebene einen Effekt auf den Entwicklungsverlauf der Zelle bzw. des Blattes hat. Es bleibt zu klären: „Wie?“.

Ich werde in Modul 2 beschreiben wie ich Hinweise auf dieses „Wie?“ bekommen will und welche Überlegungen hinter meiner Strategie stehen.

3.2.2.2.1 Definition von N-Signalkanälen

Grundsätzlich stelle ich mir 2 verschiedene Wege vor, wie das Signal „N“ mit der Steuerung der Blattseneszenz in Verbindung steht. Diese Wege nenne ich „Signalkanäle“ und unterscheide dabei zwischen 2 verschiedenen Typen. Der erste Typ ist eine Art Signalkanal über den sich spezifisch die Information „N-haltige Metabolite sind in der Zelle viel oder wenig vorhanden“ auf die Expression von Genen auswirkt.

Am Anfang steht ein Sensor, der z.B. die Menge an Nitrat, Ammonium oder einer Aminosäure in der Zelle messen kann. Ein N-Sensor kann vom Prinzip her jedes Protein sein, das spezifisch N-haltige Metabolite binden kann und über Änderungen der Proteinfaltung ein Signal erzeugt. Beispiele dafür sind die Nitrattransporter NRT1.1 und NRT2.1 (Vidal et al. 2010), Aspartat-Kinase (Liu et al. 2008) und Threonin-Synthase (Mas-Droux et al. 2006). Dieses Signal könnte z.B. über Phosphorylierungskaskaden oder Protein-Protein Interaktion funktionieren. Genau dieses Signal hat weitgehend unbeeinflusst durch andere innere Parameter der Zelle, einen Einfluß auf den Transkriptlevel eines oder vieler Zielgene und verändert so den zellulären Level des jeweiligen kodierten Proteins. Steht dieser Signalkanal mit der Blattseneszenz in Zusammenhang, hat die Veränderung des Zielgen-Proteinlevels einen Einfluß auf den Beginn der Blattseneszenz. Ein Beispiel für solche scheinbar N-spezifisch regulierten Zielgene sind die 3 LBD-Transkriptionsfaktoren die von Rubin et al. (2008) untersucht wurden.

Der zweite Typ Signalkanal, den ich mir vorstelle, ist eine Art Signaltrichter. Am Anfang steht wieder ein Sensor, der den Level eines N-haltigen Metabolits mißt und dadurch ein Signal erzeugt. Der Prozeß oder Weg, wie dieses Signal sich auf den Transkriptlevel von Zielgenen auswirkt, hat aber eine andere Struktur. Es ist kein einfacher Tunnel, sondern ein verzweigtes Tunnelsystem. Signale, die von anderen Sensoren kommen, werden in diesen Signalkanal integriert. Diese anderen Sensoren messen z.B. den Redox-Status der Zelle, oder die Level von Kohlenhydraten oder organischen Säuren. Diese Signale können sich in ihrer Wirkung auf die Transkript- und Proteinlevel ihrer Zielgene gegenseitig hemmen oder fördern. Signale die in diesem Signalkanalsystem integriert werden, stehen nicht alle mit den Leveln N-haltiger Metabolite in Zusammenhang, haben aber in ihren Zielgenen eine Wirkung auf die Blattseneszenz. In diesem putativen Signalsystem könnte es integrierende molekulare Knoten geben, die in ihrer Funktion der Kinase Kin10 (Baena-Gonzalez et al. 2007) ähneln.

3.2.2.2.2 Identifikation zusätzlicher ATH1-Datensätze zur N-Datenfilterung

Wie finde ich heraus welche der Gene, die ich in meinen N-Experimenten als reguliert gefunden habe, putative Zielgene von N-spezifischen oder Signal-integrierenden Signalkanälen sind? Ich muss filtern und nutze dazu zusätzliche, öffentlich zugängliche ATH1-Datensätze aus dem Internet. Ein Ideengeber für dieses Vorgehen waren die Arbeiten

von Buchanan-Wollaston et al. (2005), in denen Transkriptprofile verschiedener Experimente verglichen wurden, in denen verschiedene Formen des programmierten Zelltodes ausgelöst wurden.

Meine Auswertungen zielen darauf, Hinweise zu bekommen, wie N als zellulärer Parameter auf die Blattseneszenz-Regulation wirken kann. Das bedeutet, dass ich zusätzliche ATH1-Datensätze brauche, in denen gemessen wurde wie in *A. thaliana* Blattseneszenz ausgelöst wird, und zwar anders als durch N-Mangel und durch Alter.

Aus der Seneszenzforschung ist bekannt, dass Blattseneszenz durch Trockenheit und Infektionskrankheiten ausgelöst werden kann (Rivero et al. 2007, Pontier et al. 1999, Mur et al. 2010). Ich habe in Internet-Datenbanken 3 Datensätze gefunden, die sehr deutliche Transkriptlevel-Blattseneszenz-Muster zeigen, wie ich sie ähnlich auch in der E-S gefunden habe (Abb. 13). Das sind Datensätze über die Auswirkung von Trockenstress (TS) (Harb et al. 2010), *Botrytis cinerea*-Infektion (Bc) und *Pseudomonas syringae*-Infektion (Ps). Die auffällige Gemeinsamkeit dieser Datensätze ist die Repression von Photosynthese-Genen. Das ist eine charakteristische Gemeinsamkeit mit der E-S und stellt für mich den Transkriptlevel-Fingerabdruck der Blattseneszenz dar (Abb. 12C).

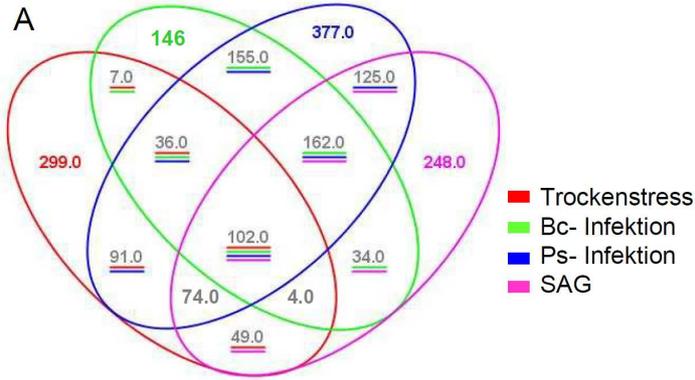
Genau diese charakteristische Repression von Photosynthese-Genen (Abb. 12C N-Mangel 10 Tage) wird in meinem N-System durch N-Zugabe zu N-Mangel-Pflanzen aufgehoben (Abb. 12C N-Zugabe 3 Tage). Das bedeutet für mich, dass es regulatorische, molekulare Zusammenhänge geben muss, die ich zur Interpretation meiner N-Daten nutzen kann.

3.2.2.2.3 Auswahl der N-Datensätze zur N-Datenfilterung

Bisher habe ich in Modul 2 gezeigt warum ich *A. thaliana*-TS-, Bc- und Ps- Datensätzen mit meinen N-Datensätzen vergleichen will und welche Hinweise ich davon erwarte (putative Zielgene von N-spezifischen und Signal-integrierenden Signalkanälen). Die Frage die sich jetzt stellt ist: Welcher Teil meiner N-Daten soll mit den TS-, Bc- und Ps-Datensätzen gefiltert werden?

An diesem Punkt bin ich wieder zu meiner ursprünglichen Frage zurückgegangen: „Wie bekomme ich aus ATH1-Daten Hinweise ob und wie N-abhängige Signalprozesse im Signalsystem der Zelle „geleitet“ werden und so einen Einfluß auf den Entwicklungsverlauf der Zelle bzw. des Blattes bekommen.“ Ich sehe an meinen Daten, dass in meinem N-Versuchssystem viele Gene reguliert werden (Abb. 8C, 9C, 10D, 10E). Sind diese Gene alle direkt durch N reguliert? Wahrscheinlich nicht. Wie grenze ich dann möglichst genau die N-regulierten Gene ein? Die molekulare Wahrnehmung der Zelle erfolgt über Sensorsysteme, die den molekularen Status der Zelle messen. N-haltige Moleküle sind Teil des molekularen Systems, nicht das ganze System. Entziehe ich der Pflanze den Nährstoff N, verändert sich zunehmend die Zusammensetzung der Metabolite in den Blättern, deren Transkriptprofil vermessen wurde. Schon nach 4 Tagen N-Mangel sind gegenüber den Kontrollpflanzen die Level von N-haltigen (Aminosäuren) und N-freien Metaboliten (Kohlenhydrate, organische Säuren) verändert (Tab. 14 Metabolite). Ich bin deshalb der Meinung, dass ich anhand der Transkript-Regulationsprofile der N-Mangel-Kinetik eher schlecht abschätzen kann, ob sich ein Regulationseffekt auf Transkriptebene aus der zellulären Wahrnehmung eines N-haltigen oder N-freien Metaboliten ableitet.

Stress induzierte- / Seneszenz induzierte- Gene



Stress reprimierte- / Seneszenz reprimierte- Gene

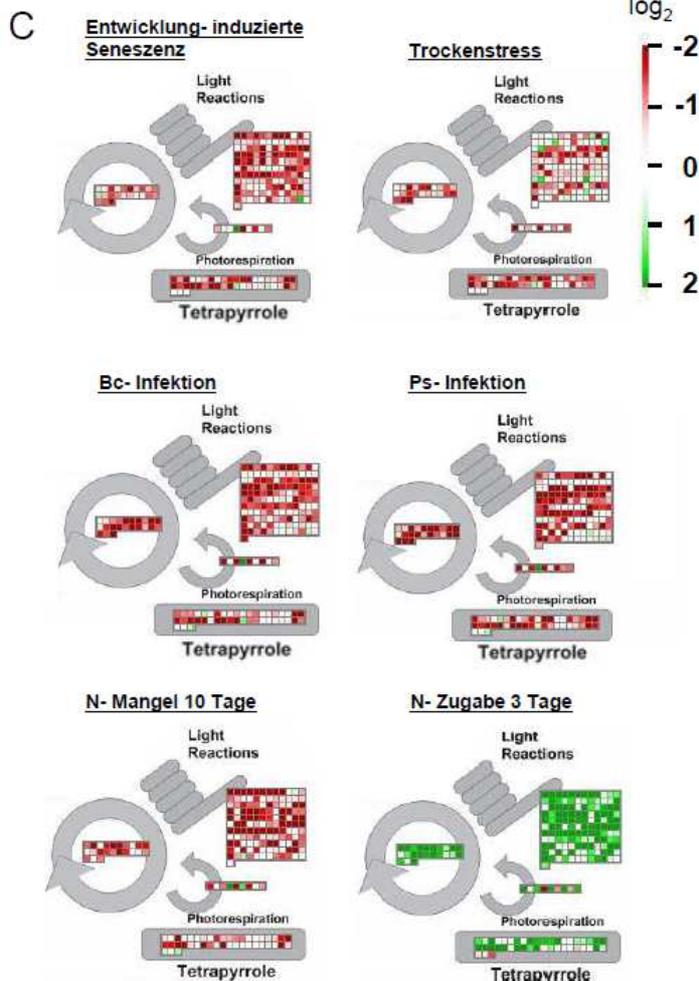
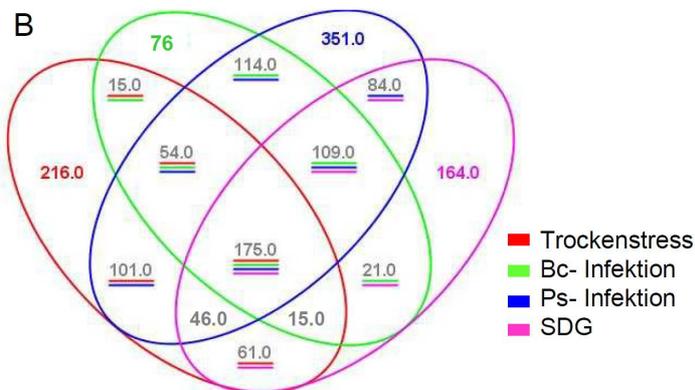


Abbildung 13: Regulationsmuster der Filterdatensätze Modul 3.

A) Venndiagramm der unter Trockenstress, 48 Stunden nach Inokulation mit *Botrytis cinerea* (Bc-Infektion), 24 Stunden nach Inokulation mit *Pseudomonas syringae* (Ps-Infektion) und unter Entwicklungs-induzierter Blattseneszenz (SAG) mindestens 3-fach induzierten Gene (Datensätze siehe Material und Methoden).

B) Venndiagramm der unter Trockenstress, 48 Stunden nach Inokulation mit *Botrytis cinerea* (Bc-Infektion), 24 Stunden nach Inokulation mit *Pseudomonas syringae* (Ps-Infektion) und unter Entwicklungs-induzierter Blattseneszenz (SDG) mindestens 3-fach reprimierten Gene (Datensätze siehe Material und Methoden). **C)** MapMan-Darstellung der Regulationswerte der Photosynthese-relevanten Gene in den jeweiligen Datensätzen (Thimm et al. 2004). Die Regulationswerte sind als log₂-Verhältnisse dargestellt. N-Mangel 10 Tage: Abb. 8A, N-Zugabe 3 Tage: Abb. 10A

Ich suche nach N-abhängigen Signalprozessen. Sind die N-Zugabe Daten besser zur Beantwortung dieser Suche geeignet? Wenn ich die N-Zugabe Metabolit-Profile mit den dazugehörigen N-Mangel Metabolit-Profilen vergleiche, finde ich 3 Tage nach N-Zugabe ebenfalls Veränderungen der Level N-freier Metabolite (Tab. 14). Die ATH1 – Daten 3 Tage nach N-Zugabe sind aus den für die N-Mangel Kinetik aufgeführten Gründen für mich nicht als primärer Filterdatensatz geeignet. Dann bleiben nur noch die Daten für 3h N-Zugabe übrig. Was zeigt das dazugehörige Metabolit-Profil? Einen Anstieg im Level von Alanin, Glycin und Serin und einen leichten Absinken im Level von Tyrosin. Das sind 4 N-haltige Metabolite. Es gibt in den untersuchten Metaboliten keine deutlichen Änderungen in den Leveln N-freier Metabolite.

Das Metabolit-Profil von 45 Metaboliten (Tab. 14) ist ein kleiner Ausschnitt aus dem Metabolom der Pflanzenzelle, das über 1000 Metabolit-Spezies enthält (Fiehn 2002). Es ist dennoch wahrscheinlich, dass die meßbaren Veränderungen der Transkriptlevel 3h nach N-Zugabe direkter mit Signalprozessen verbunden sind, die unmittelbar von den Leveln N-haltiger Metabolite der Zelle abhängen.

Das bedeutet, dass ich die ATH1-Regulationsprofile 3h nach N-Zugabe mit den Regulationsprofilen des Trockenstress und der Bc- und Ps-Infektion vergleichen werde, um putative Zielgene von N-spezifischen und Signal-integrierenden Signalkanälen zu finden. Die transienten Regulations-Effekte auf Transkriptebene stellen an diesem Punkt jedoch ein weiteres Problem dar. Ich suche nach den Regulationseffekten bei denen es wahrscheinlich ist, dass die Veränderung des Transkriptlevels eines Gens eine gleichgerichtete Veränderung im Level des kodierten Proteins und seiner biochemischen Wirkung widerspiegelt. Wie in Abbildung 10 D und 10 E zu sehen ist, sind viele Regulationseffekte 3 Stunden (h) nach N-Zugabe nicht 3 Tage (d) nach N-Zugabe zu finden. Das bedeutet für mich, diese Effekte sind transient und ein gleichgerichteter Effekt auf Proteinebene ist eher unwahrscheinlich. Diese Annahme gründet auf Messungen, in denen gezeigt wurde, dass Transkriptlevel und Proteinlevel meist in einem direkten Verhältnis zueinander stehen (Baerenfaller et al. 2008). Aus diesem Grund fokussiere ich bei meinen Vergleichen „N-Wirkung versus Trockenstress- und Pathogenwirkung“ auf die Gene, die sowohl nach 3h als auch nach 3 Tagen nach N-Zugabe induziert bzw. reprimiert sind.

Nachdem ich erläutert habe, wie ich mir vorstelle, durch Vergleich meiner N-Daten mit Trockenstress- und Pathogen-Daten Hinweise auf die Verbindung von N-Wirkung und Seneszenzregulation zu bekommen, beschreibe ich in Modul 3 die eigentliche Datenfilterung und die dazugehörigen Ergebnisse.

3.2.2.3 Modul 3

In Modul 2 habe ich erläutert, dass ich N-spezifische und Signal-integrierende Signalkanäle voraussetze, durch die ein N-Signal auf die Blattseneszenz-Regulation wirkt. Außerdem habe ich in Modul 2 erläutert wie ich mit Hilfe von Trockenstress- und Pathogen Daten putative Zielgene dieser 2 Typen von Signalkanälen finden will. In Modul 3 werde ich erläutern, wie ich die Filterung durchgeführt habe, und wie ich aus dem resultierenden Set an Genen die Markergene für Modul 4 auswähle.

3.2.2.3.1 N-Datenfilterung

Ich habe festgelegt, dass ich für die Filterung die N-Zugabe Werte als „N-Datensatz“ benutze. Und ich definiere einen relativen Transkriptlevel als „reguliert“, wenn der Transkriptlevel im Vergleich zur jeweiligen N-Mangel Kontrolle nach 3 h N-Zugabe mindestens 2-fach induziert ($\log_2 = +1$), und nach 3 d N-Zugabe mindestens 3-fach induziert ($\log_2 = +1,585$) vorliegt. Für die „N-reprimierten“ Gene gilt das gleiche mit negativem Vorzeichen. Den Grenzwert für die 3h N-Zugabe habe ich niedriger gesetzt, um für Modul 4 ein größeres Set an Markergenen zu erhalten.

Ich filtere im nächsten Schritt die Gene aus diesem „N-regulierten“ Set heraus, die ich aufgrund ihres Regulationsprofils unter Trockenstress und Pathogen-Infektion als putative Zielgene von N-spezifischen und Signal-integrierenden Signalkanälen festlege.

N-spezifisch regulierte Gene, sind Gene deren Transkriptlevel stark auf N-Zugabe aber wenig auf TS, Bc und Ps reagieren.

N-spezifisch induzierte Gene:

- sind 3h N-Zugabe mindestens 2-fach induziert ($\geq +2$; $\log_2 \geq +1$)
- sind 3d N-Zugabe mindestens 3-fach induziert ($\geq +3$; $\log_2 \geq +1,585$)
- sind unter TS, Bc und Ps weniger als 3-fach reprimiert (> -3 ; $\log_2 > -1,585$)

Warum die entgegengesetzten Vorzeichen? Weil ich damit die Wirkung der experimentellen Behandlung definiere: Wenn Seneszenz-hemmende N-Zugabe ein positives Vorzeichen (+3) bekommt, muss die Seneszenz-induzierende Behandlung (TS, Bc, Ps) ein negatives Vorzeichen bekommen (-3). Dieses Prinzip gilt auch für die weiteren Filterungen in diesem Modul.

N-spezifisch reprimierte Gene:

- sind 3h N-Zugabe mindestens 2-fach reprimiert (≤ -2 ; $\log_2 \leq -1$)
- sind 3d N-Zugabe mindestens 3-fach reprimiert (≤ -3 ; $\log_2 \leq -1,585$)
- sind unter TS, Bc und Ps weniger als 3-fach induziert ($< +3$; $\log_2 < 1,585$)

Im Gegensatz dazu definiere ich putative Zielgene Signal-integrierender Signalkanäle, als durch N-Zugabe und durch TS, Bc und Ps stark regulierte Gene.

Signal-integriert N-induzierte Gene:

- sind 3h N-Zugabe mindestens 2-fach induziert ($\geq +2$; $\log_2 \geq +1$)
- sind 3d N-Zugabe mindestens 3-fach induziert ($\geq +3$; $\log_2 \geq +1,585$)
- sind unter TS, Bc und Ps mindestens 3-fach reprimiert (≤ -3 ; $\log_2 \leq -1,585$)

Signal-integriert N-reprimierte Gene:

- sind 3h N-Zugabe mindestens 2-fach reprimiert (≤ -2 ; $\log_2 \leq -1$)
- sind 3d N-Zugabe mindestens 3-fach reprimiert (≤ -3 ; $\log_2 \leq -1,585$)
- sind unter TS, Bc und Ps mindestens 3-fach induziert ($\geq +3$; $\log_2 \geq +1,585$)

Durch die Filterungen ergeben sich 4 Listen mit putativen Zielgenen (Tabelle 1 bis 4, siehe Anhang A1).

3.2.2.3.2 Identifikation von N-Markergenen

Die Filterungen in Modul 3 haben sich bisher nach den Parametern N-Zugabe, TS, Bc und Ps gerichtet. Ich ergänze das mit einer Filterung die aus den putativen Zielgenen Markergene herausfiltert. Dabei starte ich wieder bei der Ausgangsfrage: „Wie bekomme ich aus ATH1-Daten Hinweise ob und wie N-abhängige Signalprozesse im Signalsystem der Zelle „geleitet“ werden und so einen Einfluß auf den Entwicklungsverlauf der Zelle bzw. des Blattes bekommen.“

Ich suche Gene deren Transkriptlevel durch N-Zugabe reguliert werden. Jetzt kommt eine Ergänzung dazu: ... und die auf den N-Haushalt der Zelle wirken. Warum? Weil es, wie in der Einleitung beschrieben, eine funktionelle Kopplung zwischen N-Verfügbarkeit und N-Mobilisierung (Blattseneszenz) gibt. N-Mangel induziert die N-mobilisierende Blattseneszenz. Ich will die Gene für Modul 4 nutzen, die bei dieser Kopplung wahrscheinlich eine Rolle spielen. Das sind für mich 3 verschiedene Gen-Gruppen.

Gruppe 1: Diese Gene kodieren Proteine die an der biochemischen Umwandlung von N-haltigen Metaboliten wie Nitrat oder Aminosäuren beteiligt sind, oder diese N-haltigen Metaboliten über Membranbarrieren hinweg transportieren.

Gruppe 2: Diese Gene kodieren Proteine die für die Funktion des Chloroplasten als Haupt-N-fixierendes Zellorganell wichtig sind. Das sind Proteine der Photosynthese, der Chlorophyllsynthese oder ribosomale Proteine des Chloroplasten.

Gruppe 3: Diese Gene kodieren regulatorische Proteine wie Transkriptionsfaktoren und Chromatin-Faktoren, die an der Regulation der Transkription der Gene aus Gruppe 1 und 2 beteiligt sein können.

Zum Auffinden dieser Gen-Gruppen habe ich die Genfunktions-Annotation von MapMan (Thimm et al. 2004) benutzt. Die Gene von *A. thaliana* werden nach zellulärer Funktion in Gruppen eingeteilt. Diese Gruppen werden BIN genannt. Für meine definierten Gen-Gruppen habe ich folgende BIN gefunden:

Gruppe1: 12 (N-Metabolismus), 13 (Aminosäure-Metabolismus), 29 (Protein), 34 (Transport; 3: Aminosäuren, 4: Nitrat, 5: Ammonium, 13: Peptide und Oligopeptide)

Gruppe 2: 01 (Photosynthese), 19 (Tetrapyrrol-Synthese)

Gruppe 3: 27 (RNA), 28 (DNA), 33 (Entwicklung: enthält NAC-Transkriptionsfaktoren)

In den Tabellen 1 bis 4 habe ich dadurch folgende Anzahl von Markergenen gefunden

N-spezifisch induzierte Markergene aus Tabelle 1: 16

Diese Liste (Tab. 5) enthält 7 Transkriptionsfaktoren. Unter den ermittelten Genen sind nur drei Gene (LBD37, at5g10540 und SNG1) in der E-S reprimiert. SNZ zeigt auch eine Induktion unter Trockenstress und at4g37180, RVE2, at3g19030 und at1g03220/30 sind unter Pathogenbefall induziert.

N-spezifisch reprimierte Markergene aus Tabelle 2: 18

Diese Liste (Tab. 6) enthält 8 Transkriptionsfaktoren. Unter den ermittelten Transkriptionsfaktoren ist keiner in der E-S reguliert. 5 Gene (GLN1.1, GLN1.4, ACR7, AAP4 und NRT2.5) sind in der E-S induziert.

Signal-integriert N-induzierte Markergene aus Tabelle 3: 21

Diese Liste (Tab. 7) enthält 6 Transkriptionsfaktoren. 17 dieser 21 Gene sind SDG.

Signal-integriert N-reprimierte Markergene aus Tabelle 4: 11

Diese Liste (Tab. 8) enthält 7 Transkriptionsfaktoren. Alle ermittelten Gene sind SAG. Von den 7 Transkriptionsfaktoren gehören 5 zur Familie der NAC- Transkriptionsfaktoren (Olsen et al. 2005).

Mit diesen Markergenen werde ich in Modul 4 arbeiten.

Tabelle 5; N- spezifisch induzierte Markergene

| BIN | Funktion | ATH1- ID | AGI | Name | 4d noN | 7d noN | 10d noN | 3h N | 3d N | E-S | TS | Bc | Ps |
|-----|---------------------------|-------------|-----------|--------|--------|--------|---------|------|------|-------|-------|-------|-------|
| 27 | Transkriptionsfaktor | 255734_at | at1g25550 | | -1,42 | -1,18 | -2,43 | 1,55 | 2,31 | -0,58 | -0,32 | -0,30 | 1,30 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 246215_at | at4g37180 | | -1,93 | -1,80 | -2,49 | 1,43 | 1,59 | 0,85 | 1,19 | 0,78 | 1,72 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 249606_at | at5g37260 | RVE2 | -0,25 | -0,56 | -0,98 | 2,05 | 1,83 | 0,68 | 0,63 | -1,30 | 1,78 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 267010_at | at2g39250 | SNZ | -1,59 | -1,95 | -2,41 | 1,66 | 2,24 | -0,83 | 1,86 | -0,36 | -0,77 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 246996_at | at5g67420 | LBD37 | -1,68 | -1,78 | -3,10 | 2,02 | 2,57 | -1,65 | -1,13 | -0,70 | -0,75 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 253043_at | at4g37540 | LBD39 | -3,57 | -3,29 | -3,90 | 2,96 | 3,22 | -1,14 | -0,94 | -1,12 | 0,48 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 247921_at | at5g57660 | ATCOL5 | -1,13 | -1,30 | -2,33 | 1,69 | 1,59 | -0,30 | -0,60 | -0,40 | 0,24 |
| 12 | Glutamat Synthase | 248267_at | at5g53460 | GLT1 | -3,58 | -3,21 | -3,64 | 2,75 | 3,25 | -0,25 | -0,46 | 0,07 | -0,12 |
| 13 | AS Synthase | 256891_at | at3g19030 | | -0,99 | -2,07 | -3,21 | 1,62 | 3,20 | 0,47 | 1,16 | -0,43 | 2,27 |
| 29 | posttransl. Modifizierung | 266313_at | at2g26980 | CIPK3 | -1,82 | -1,23 | -2,89 | 2,33 | 2,39 | -1,22 | -1,07 | 0,27 | 0,95 |
| 29 | posttransl. Modifizierung | 258437_at | at3g16560 | PP2C | -1,70 | -1,53 | -1,96 | 2,41 | 1,92 | -0,57 | -0,86 | -0,63 | 0,09 |
| 29 | posttransl. Modifizierung | 260771_at | at1g49160 | WNK7 | -1,89 | -2,17 | -2,85 | 3,40 | 2,10 | 0,05 | 0,24 | 0,52 | 0,60 |
| 29 | Protein Abbau | 250441_at | at5g10540 | | -1,68 | -1,48 | -1,57 | 1,49 | 1,65 | -1,97 | -0,25 | -0,31 | -0,42 |
| 29 | Protein Abbau | 261927_at | at1g22500 | | -1,83 | -1,93 | -3,29 | 1,21 | 3,36 | -0,05 | -0,75 | -0,31 | -0,86 |
| 29 | Protein Abbau | 264365_s_at | at1g03220 | | -2,03 | -2,61 | -3,64 | 1,13 | 2,11 | 0,56 | 1,10 | 1,98 | 2,93 |
| 29 | Protein Abbau | 267262_at | at2g22990 | SNG1 | -4,07 | -5,43 | -6,85 | 2,56 | 7,67 | -4,56 | -0,70 | -1,27 | -0,20 |

Tabelle 6; N- spezifisch reprimierte Markergene

| BIN | Funktion | ATH1- ID | AGI | Name | 4d noN | 7d noN | 10d noN | 3h N | 3d N | E-S | TS | Bc | Ps |
|-----|------------------------|-----------|-----------|----------|--------|--------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 27 | Transkriptionsfaktor | 250688_at | at5g06510 | NF-YA10 | 1,45 | 2,46 | 2,37 | -1,51 | -2,00 | 1,56 | 0,41 | -0,05 | -0,24 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 267141_at | at2g38090 | | 2,01 | 2,00 | 2,45 | -2,10 | -2,26 | 0,49 | -0,04 | 0,00 | -0,06 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 245861_at | at5g28300 | | 1,02 | 1,34 | 1,10 | -1,14 | -1,59 | -0,55 | 0,86 | 0,18 | -0,84 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 265954_at | at2g37260 | TTG2 | 1,68 | 1,51 | 0,84 | -1,64 | -1,63 | 0,55 | 0,11 | -0,11 | -0,05 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 255056_at | at4g09820 | TT8 | 2,21 | 2,43 | 2,05 | -1,34 | -2,47 | 0,93 | 0,47 | -0,07 | -0,01 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 258021_at | at3g19380 | PUB25 | 1,27 | 1,04 | 1,75 | -1,33 | -2,70 | 1,10 | -0,05 | -0,56 | 1,35 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 254274_at | at4g22770 | | 1,32 | 1,39 | 1,53 | -1,16 | -1,66 | 0,99 | 0,15 | 0,03 | 0,28 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 250446_at | at5g10770 | | 1,40 | 1,22 | 1,63 | -1,69 | -3,19 | 0,54 | -0,22 | 0,09 | 0,18 |
| 12 | Glutamin Synthase | 250100_at | at5g37600 | GLN1;1 | 1,94 | 2,00 | 1,74 | -1,16 | -2,86 | 2,45 | -0,25 | 0,33 | 0,28 |
| 12 | Glutamin Synthase | 249581_at | at5g16570 | GLN1;4 | 4,08 | 4,63 | 4,50 | -2,20 | -5,64 | 4,10 | -0,56 | -0,64 | -0,31 |
| 12 | Glutamat Dehydrogenase | 259346_at | at3g03910 | GDH3 | 1,17 | 2,45 | 3,51 | -1,04 | -3,33 | 1,08 | -0,24 | -1,08 | -0,14 |
| 13 | AS Synthase | 262582_at | at1g15410 | | 2,04 | 1,83 | 1,80 | -2,26 | -2,48 | 1,40 | -0,23 | -1,24 | -1,38 |
| 29 | Protein Synthase | 254300_at | at4g22780 | ACR7 | 0,84 | 1,03 | 1,10 | -1,22 | -2,52 | 2,20 | 1,32 | 0,54 | 0,36 |
| 29 | Protein Abbau | 249306_at | at5g41400 | | 0,64 | 0,52 | 2,09 | -1,10 | -2,02 | 0,97 | 1,42 | 0,31 | 0,91 |
| 34 | Peptide Transport | 257789_at | at3g27020 | YSL6 | 0,07 | 0,48 | 0,68 | -1,15 | -1,59 | 1,21 | 0,49 | 0,13 | 0,73 |
| 34 | AS Transport | 256650_at | at3g13620 | | 1,09 | 1,80 | 2,08 | -1,28 | -1,63 | 0,83 | 0,12 | 0,52 | 0,48 |
| 34 | AS Transport | 247304_at | at5g63850 | AAP4 | 1,56 | 1,36 | 0,76 | -1,63 | -2,81 | 1,91 | -0,52 | 0,46 | 1,29 |
| 34 | Nitrat Transport | 261198_at | at1g12940 | ATNRT2.5 | 2,57 | 3,38 | 3,36 | -1,62 | -3,08 | 2,12 | 0,09 | -0,07 | -0,28 |

Tabelle 7; Signal- integriert- N- induzierte Markergene

| BIN | Funktion | ATH1- ID | AGI | Name | 4d noN | 7d noN | 10d noN | 3h N | 3d N | E-S | TS | Bc | Ps |
|-----|-----------------------|-----------|-----------|----------|--------|--------|---------|------|------|-------|-------|-------|-------|
| 27 | Transkriptionsfaktor | 245362_at | at4g17460 | HAT1 | -0,90 | 0,03 | -1,60 | 1,25 | 1,59 | -0,07 | -2,14 | -2,35 | -2,47 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 265342_at | at2g18300 | | -4,10 | -3,94 | -4,42 | 4,95 | 4,70 | -4,01 | -4,31 | -3,52 | -4,03 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 246275_at | at4g36540 | BEE2 | -3,00 | -1,89 | -2,44 | 3,04 | 3,75 | -4,12 | -3,41 | -3,25 | -3,82 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 261782_at | at1g76110 | | -0,70 | -0,96 | -2,18 | 1,33 | 2,31 | -0,98 | -1,63 | -2,40 | -2,06 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 253028_at | at4g38160 | pde19 | -0,57 | -0,61 | -1,32 | 1,10 | 2,06 | -1,40 | -1,80 | -1,67 | -1,85 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 264672_at | at1g09750 | | -1,93 | -0,30 | 0,02 | 1,63 | 1,80 | -5,05 | -3,25 | -3,55 | -4,52 |
| 1 | Photosystem II | 258956_at | at3g01440 | PsbQ | -0,92 | -1,49 | -1,65 | 1,00 | 2,84 | -1,06 | -2,35 | -2,33 | -3,59 |
| 1 | Photosystem II | 256979_at | at3g21055 | PSBTN | -2,10 | -4,54 | -5,50 | 1,18 | 6,79 | -3,20 | -1,61 | -1,89 | -2,99 |
| 1 | Photosystem I | 256015_at | at1g19150 | LHCA6 | -3,68 | -4,66 | -4,24 | 1,15 | 6,44 | -3,69 | -2,33 | -3,40 | -4,53 |
| 1 | Ferredoxin | 258055_at | at3g16250 | NDF4 | -3,28 | -3,08 | -2,69 | 1,60 | 5,89 | -3,43 | -3,18 | -3,64 | -5,39 |
| 1 | Calvinzyklus | 265076_at | at1g55490 | CPN60B | -1,14 | -0,82 | -1,19 | 1,45 | 2,27 | -2,12 | -2,12 | -2,23 | -3,93 |
| 13 | AS Synthase | 248402_at | at5g52100 | orr1 | -1,95 | -1,89 | -1,81 | 1,31 | 2,87 | -2,94 | -1,95 | -2,33 | -2,63 |
| 19 | Tetrapyrrolsynthese | 254623_at | at5g45930 | CHLI2 | -1,33 | -1,56 | -1,78 | 1,02 | 3,05 | -2,40 | -3,05 | -2,21 | -2,83 |
| 19 | Tetrapyrrolsynthese | 248920_at | at4g18480 | CHLI1 | -1,35 | -1,61 | -1,76 | 1,57 | 3,08 | -2,50 | -2,28 | -2,03 | -2,64 |
| 19 | Tetrapyrrolsynthese | 254105_at | at4g25080 | CHLM | -1,93 | -2,59 | -3,27 | 1,04 | 4,05 | -2,52 | -2,11 | -2,35 | -3,22 |
| 19 | Tetrapyrrolsynthese | 253871_at | at4g27440 | PORB | -1,70 | -2,97 | -3,70 | 1,24 | 4,53 | -3,95 | -1,64 | -1,86 | -3,38 |
| 29 | Protein Synthase | 262283_at | at1g68590 | PSRP-3 | -1,21 | -1,05 | -1,35 | 1,08 | 2,81 | -2,36 | -2,69 | -1,70 | -2,91 |
| 29 | Protein Synthase | 261078_at | at1g07320 | RPL4 | -1,78 | -1,82 | -2,14 | 1,31 | 3,44 | -2,20 | -1,74 | -2,31 | -3,32 |
| 29 | Protein Synthase | 266575_at | at2g24060 | IF-3 | -0,78 | -0,62 | -0,80 | 1,26 | 2,07 | -1,81 | -2,06 | -1,75 | -2,60 |
| 29 | Protein Abbau | 247347_at | at5g63780 | SHA1 | -2,56 | -2,44 | -2,03 | 1,49 | 3,33 | -2,33 | -2,37 | -2,32 | -3,96 |
| 29 | Protein Assemblierung | 248962_at | at5g45680 | ATFKBP13 | -2,02 | -1,97 | -1,59 | 1,01 | 3,34 | -2,66 | -2,01 | -2,34 | -2,56 |

Tabelle 8; Signal- integriert- N- reprimierte Markergene

| BIN | Funktion | ATH1- ID | AGI | Name | 4d noN | 7d noN | 10d noN | 3h N | 3d N | E-S | TS | Bc | Ps |
|-----|---------------------------|-------------|-----------|----------|--------|--------|---------|-------|-------|------|------|------|------|
| 27 | Transkriptionsfaktor | 259618_at | at1g48000 | MYB112 | 1,25 | 0,60 | 0,17 | -1,14 | -1,66 | 2,42 | 2,46 | 2,56 | 1,95 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 258809_at | at3g04070 | ANAC047 | 0,96 | 2,07 | 1,19 | -1,62 | -3,53 | 4,77 | 2,94 | 3,55 | 4,61 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 250287_at | at5g13330 | Rap2.6L | 1,32 | 1,52 | 1,08 | -1,34 | -2,47 | 2,19 | 1,73 | 3,86 | 4,99 |
| 33 | Transkriptionsfaktor | 259705_at | at1g77450 | ANAC032 | 1,52 | 2,58 | 2,02 | -1,47 | -2,02 | 2,60 | 4,45 | 2,69 | 3,42 |
| 33 | Transkriptionsfaktor | 249467_at | at5g39610 | ANAC092 | 0,43 | 0,84 | 0,15 | -2,29 | -2,84 | 2,63 | 4,00 | 4,14 | 4,93 |
| 33 | Transkriptionsfaktor | 260203_at | at1g52890 | ANAC019 | 0,82 | 2,22 | 0,33 | -2,89 | -2,64 | 4,16 | 3,84 | 5,18 | 5,70 |
| 33 | Transkriptionsfaktor | 256300_at | at1g69490 | ANAC029 | 1,16 | 1,99 | 1,16 | -3,49 | -3,70 | 3,39 | 3,91 | 1,82 | 3,40 |
| 13 | AS Synthase | 264524_at | at1g10070 | ATBCAT-2 | 2,59 | 1,98 | 1,17 | -1,84 | -2,47 | 2,59 | 2,93 | 3,05 | 2,25 |
| 13 | AS Abbau | 260900_s_at | at5g34780 | | 0,60 | 1,04 | 0,77 | -2,17 | -1,61 | 2,24 | 3,48 | 1,71 | 2,97 |
| 29 | posttransl. Modifizierung | 253473_at | at4g32250 | | 0,37 | 1,04 | 0,93 | -1,05 | -2,47 | 2,79 | 2,12 | 2,21 | 3,04 |
| 29 | Protein Abbau | 260327_at | at1g63840 | | 1,28 | 1,26 | 1,96 | -1,28 | -3,30 | 3,09 | 2,15 | 3,16 | 3,11 |

Tabelle 5. N-spezifisch induzierte Markergene. 3h N-Zugabe $\geq +1$; 3d N-Zugabe $\geq +1,585$; TS, Bc und Ps $> -1,585$. **Tabelle 6. N-spezifisch reprimierte Markergene.** 3h N-Zugabe ≤ -1 ; 3d N-Zugabe $\leq -1,585$; TS, Bc und Ps $< +1,585$. **Tabelle 7. Signal-integriert-N-induzierte Markergene.** 3h N-Zugabe $\geq +1$; 3d N-Zugabe $\geq +1,585$; TS, Bc und Ps $\leq -1,585$. **Tabelle 8. Signal-integriert-N-reprimierte Markergene.** 3h N-Zugabe ≤ -1 ; 3d N-Zugabe $\leq -1,585$; TS, Bc und Ps $\geq +1,585$.

BIN: MapMan-Genfunktions-Annotation (Thimm et al. 2004); Funktion: aus dem Namen der MapMan-BIN abgeleitete Funktionsbeschreibung des Gens; ATH1-ID: Bezeichnung des Sonden-Set auf den ATH1-Microarray (Redman et al. 2004); AGI: spezifische Bezeichnung eines Gens im Genom von *Arabidopsis thaliana*; Name: in Veröffentlichungen genutzter alternativer Name; 4d noN: 4 Tage nach N-Entzug; 7d noN: 7 Tage nach N-Entzug; 10d noN: 10 Tage nach N-Entzug; 3h N: 3 Stunden nach N-Zugabe; 3d N: 3 Tage nach N-Zugabe; E-S: Entwicklungs-induzierte-Blattseneszenz; TS: Trockenstress; Bc: *Botrytis cinerea*-Infektion; Ps: *Pseudomonas syringae*-Infektion. Die Regulationswerte sind als \log_2 -Verhältnisse dargestellt.

3.2.2.4 Modul 4

Zurück zur Ausgangsfrage: „Wie bekomme ich aus ATH1-Daten Hinweise ob und wie N-abhängige Signalprozesse im Signalsystem der Zelle „geleitet“ werden und so einen Einfluß auf den Entwicklungsverlauf der Zelle bzw. des Blattes bekommen.“

Den Aspekt der Frage „ob“ habe ich in Modul 1 mit ja, beantwortet. In Modul 4 sollen jetzt Hinweise auf das „wie“ gefunden werden.

3.2.2.4.1 Identifikation von Wegweiser-Datensätzen

Im Vergleich zu Modul 2 ist das verbindende Element zwischen den Datensätzen nicht das Seneszenzmuster (Abb. 13 A, B und C) sondern die ausgewählten Markergene (Modul 3). Ich arbeite demzufolge mit einem hohen Maß an Abstraktion, woraus eine relativ hohe theoretische Unsicherheit resultiert. Warum habe ich diese Filterungen trotzdem durchgeführt? Für mich ist Modul 4 an sich ein Experiment. Ich starte in Modul 1 von meinen Ergebnissen, die auf meinem N-Hydrokultursystem beruhen und gehe in Modul 4 mit meiner Strategie über die Grenzen von N und Blattseneszenz hinaus. Es soll mir ein Wegweiser zu experimentellen Fragestellungen sein, die mir vom N-System heraus theoretische Verbindungen zu molekularen Aspekten der Zellbiologie aufzeigt. Aus diesen theoretischen Verbindungen kann ich dann experimentelle Fragestellungen ableiten. Diese Fragestellungen beziehen sich auf das „wie“ meiner Ausgangsfrage. Wie induziert N-Mangel Blattseneszenz und wie wirkt N-Zugabe als „Bremse“ auf die Blattseneszenz? Ideengeber waren Vergleiche von Regulationsmustern zwischen ATH1 – Datensätzen die in Bläsing et al. (2005) und Baena-Gonzalez et al. (2007) durchgeführt wurden.

Ich habe 2 Sets an Markergenen die als putative Zielgene von N-spezifischen (Set 1 = Tabelle 5 und 6) und Signal-integrierenden Signalkanälen stehen (Set 2 = Tabelle 7 und 8). Für die einzelnen Gene der Sets habe ich mir die Regulationsprofile angesehen, die ich über den Link der Seite TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) zu den Genevestigator Daten (<https://www.genevestigator.com>) bekomme. Ich habe in den Genevestigator Daten nach experimentellen Bedingungen „conditions“ und Mutationen „genotypes“ gesucht, in denen ich eine co-Regulation der Gene eines Sets von Markergenen finde. Die ATH1-Datensätze in denen ich diese co-Regulation gefunden habe, nenne ich „Wegweiser-Datensätze“. Zur Auswahl der Wegweiser-Datensätze habe ich folgende Kriterien angewand:

1. In einem Wegweiser-Datensatz sind mehrere Gene eines Markergen-Sets gleichgerichtet reguliert.
2. Ich vermeide Datensätze in denen Messungen an verwundeten Pflanzenteilen durchgeführt wurden.
3. Ich fokussiere auf Datensätze in denen Blatt- bzw. Sproß-Material vermessen wurde.

Diesen Auswahlprozess habe ich sozusagen per Hand ausgeführt und bin dabei zu folgendem Ergebnis gekommen:

Für Set 1 (N-spezifisch regulierte Gene) habe ich keine Wegweiser-Datensätze gefunden.

Für Set 2 (Signal-integriert regulierte Genen) habe ich folgende Wegweiser-Datensätze gefunden:

ABA (Mizoguchi et al. 2010): Die Pflanzen wurden für 4 Stunden einer 100 µM ABA-Lösung ausgesetzt.

low CO₂ (Bläsing et al. 2005): Die Pflanzen wuchsen für 4 Stunden in Dunkelheit oder unter Belichtung in einer Atmosphäre, die weniger als 50ppm CO₂ enthielt.

flu-Mutation (Laloi et al. 2007): Die flu-Mutation bewirkt die Freisetzung von Singulett-Sauerstoff in den Chloroplasten der Arabidopsis-Pflanzen. Die Kombination der flu-Mutation mit einer Überexpression einer Thylakoid-gebundenen Ascorbat-Peroxidase (tAPX) verstärkt die Singulett-Sauerstoff Signaleffekte auf das Transkript-Profil der Pflanzen.

Norflurazon- Behandlung und gun1- und gun5-KO-Mutation (Koussevitzky et al. 2007): Norflurazon inhibiert die Carotenoid-Biosynthese und bewirkt dadurch Photo-oxidative Schäden und die Akkumulation von Mg-Protoporphyrin IX. Mg-Protoporphyrin IX ist ein Intermediat der Chlorophyllsynthese. Die Genprodukte von GUN1 und GUN5 haben eine Signalfunktion in der Kommunikation zwischen Chloroplast und Zellkern.

Ozon (Short et al. 2005): Die Pflanzen wurden für 1 Stunde 200 ppb Ozon ausgesetzt und 3 Stunden nach Ende der Ozonbegasung wurden die Proben für die ATH1-Messungen genommen.

dor- Mutation (Zhang et al. 2008): Das DOR-Gen kodiert ein putatives F-Box Protein, ein Mitglied der S-locus F-box-like Familie ähnlich zu AhSLF-S2 und interagiert spezifisch mit ASK14 und CUL1. Ein Knock-out des DOR-Gen bewirkt eine ABA-Hypersensitivität der Spaltöffnungen und bewirkt eine Steigerung der Trockentoleranz der Pflanze. DOR wird in den Schließzellen der Spaltöffnungen stark exprimiert und wird durch ABA reprimiert.

Die genauen Bezeichnungen der Datensätze finden sich im Material und Methoden-Teil (2.11 ATH1-Datensätze).

Die Signal- integriert N- induzierten Gene werden mehrheitlich reprimiert durch ABA, Ozon, Norflurazon, in der flu und flu/tAPX Mutante und in der dor- Mutante unter Trockenstress (Abb. 14 A). Die gleichen Gene sind mehrheitlich induziert in der gun1 und gun5 Mutante unter Norflurazon- Behandlung. Durch CO₂ Mangel und in der dor- Mutante unter Kontrollbedingungen sind diese Gene wenig reguliert. Die Signal-integriert N-reprimierten

Gene sind mehrheitlich induziert durch CO₂-Mangel, Ozon, ABA, in der flu und flu/tAPX Mutante und in der dor-Mutante unter Trockenstress und Kontrollbedingungen (Abb. 14 A). Durch Norflurazonbehandlung und in der gun1 und gun5 Mutante sind diese Gene wenig reguliert. Die N-spezifisch-regulierten Markergene zeigen in den Wegweiser-Datensätzen deutlich weniger co-Regulationsmuster (Abb. 14 B) als die Signal-integriert-N-regulierten Markergene (Abb. 14A). Die einzelnen Regulationswerte der Abbildung 14 sind auf der Daten-CD in der Datei „Regulationswerte Abbildung 14“ aufgelistet

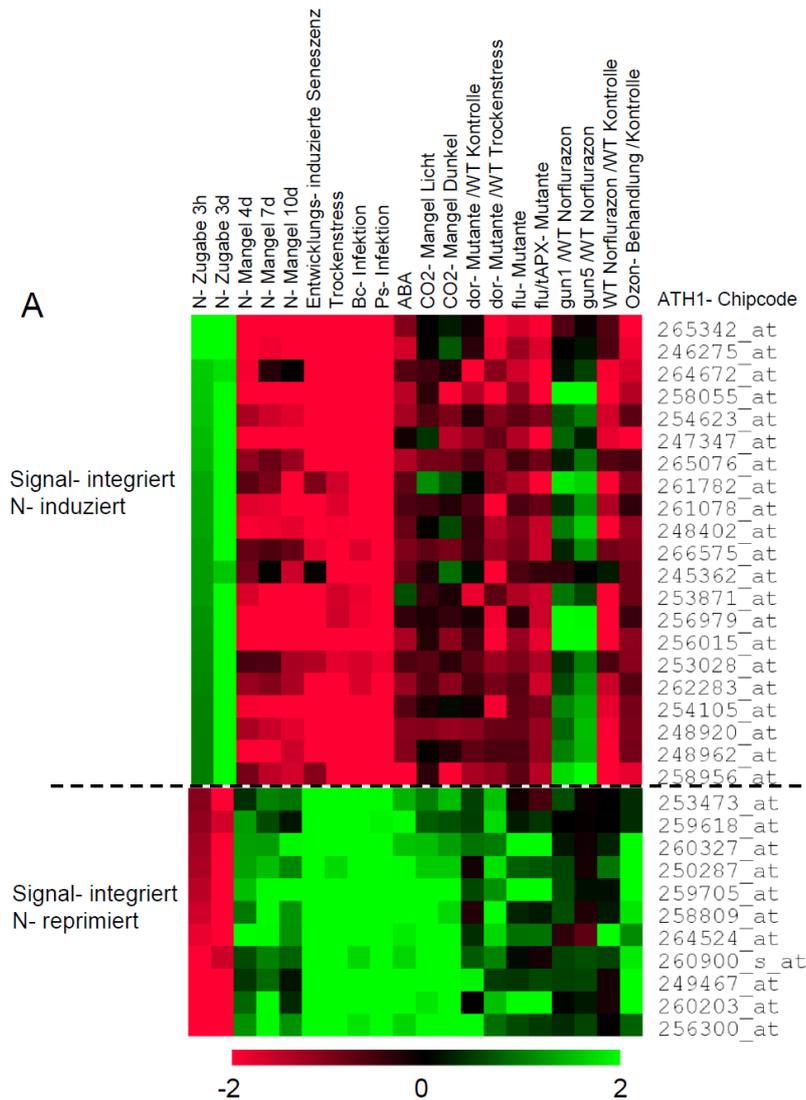


Abbildung 14: Regulationsmuster der Markergene in den Wegweiser-Datensätzen. A) Regulationsmuster der Signal-integriert-N-regulierten Markergene (Tab.7 und 8) die in Modul 3 aus den ATH1-Datensätzen gefiltert wurden. Die Signal-integriert-N-regulierten Markergene zeigen co-Regulationsmuster in den Wegweiser-Datensätzen. Die Farbskalierung stellt \log_2 -Verhältnisse der Transkriptlevel dar. ATH1-Chipcode: Bezeichnung des Sonden-Set auf den ATH1-Microarray (Redman et al. 2004).

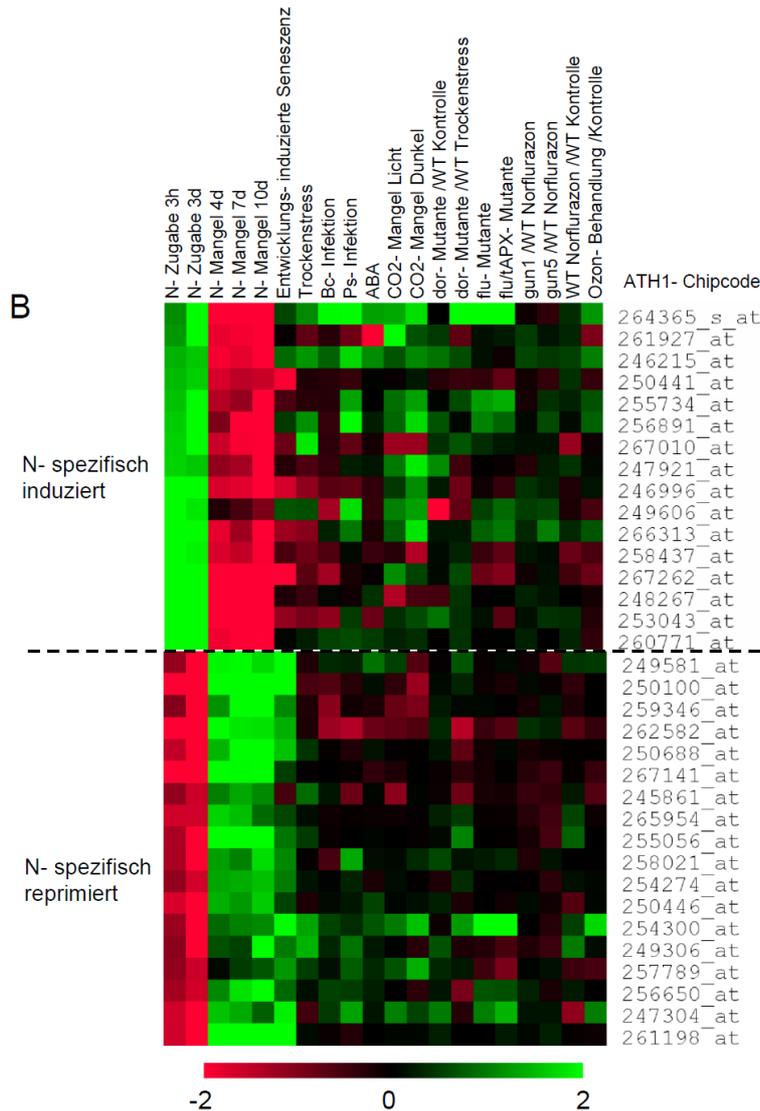


Abbildung 14: Regulationsmuster der Markergene in den Wegweiser-Datensätzen. B) Regulationsmuster der N-spezifisch-regulierten Markergene (Tab.5 und 6) die in Modul 3 aus den ATH1-Datensätzen gefiltert wurden. Die N-spezifisch -regulierten Markergene zeigen in den den Wegweiser-Datensätzen deutlich weniger co- Regulationsmuster als die Signal-integriert-N-regulierten Markergene in Abbildung 14A. Die Farbskalierung stellt \log_2 -Verhältnisse der Transkriptlevel dar. ATH1-Chipcode: Bezeichnung des Sonden-Set auf den ATH1-Microarray (Redman et al. 2004).

3.2.2.4.2 N-Zugabe regulierte Gene in den Wegweiser-Datensätzen

Im nächsten Abschnitt werde ich durch Venn Analysen feststellen, wie viele der regulierten Gene der Wegweiser- Datensätze auch durch N-Zugabe und in der E-S reguliert werden. Ich habe dafür den Filtergrenzwert ± 2 -fach ($\log_2 = \pm 1$) reguliert gewählt, weil ich hier Daten aus sehr unterschiedlichen experimentellen Systemen vergleiche, die nicht mit N-Ernährung oder mit Blattseneszenz in Verbindung stehen. Ich habe 6 Datensätze ausgewählt, mit denen ich diesen Vergleich durchführe (Abb. 15 A bis D). Ich lasse die anderen Datensätze weg, weil ich der Meinung bin, dass ich dadurch keine wesentlichen Informationen verliere und die Auswertung so übersichtlicher bleibt. Ich stelle den Wegweiser-Datensätzen einen weiteren Datensatz gegenüber. In diesem Datensatz sind die Informationen wie sich eine trans-Zeatin

Behandlung auf Transkriptlevel in *A. thaliana* auswirkt. Trans-Zeatin ist ein Cytokinin und Cytokinin-Level werden N-abhängig reguliert (Takei et al. 2004). Cytokinine wirken außerdem Seneszenz-hemmend (Wingler et al. 2005).

Wie bin ich bei der Bestimmung der co-Regulations-Übereinstimmungen vorgegangen? Die Venn-Vergleiche erfasse nur Gene die in den zu vergleichenden Datensätzen entweder induziert oder reprimiert sind. Deshalb habe ich die Regulationswerte der N-Zugabe, gun5 + Norflurazon und trans-Zeatin-Daten mit -1 multipliziert, denn diese Werte sind in ihren Transkriptlevel-Regulationsmustern denen der Blattseneszenz entgegengesetzt. Dadurch werden diese verschiedenen Datensätze „Venn-kompatibel“. In den Venn-Auftragungen habe ich mich auf die regulierten Gene des Wegweiser-Datensatz konzentriert (Abb. 15 A und 15 B). Die Venn-Diagramme befinden sich im Anhang (A4). Ich habe ausgezählt wie viele Gene der Bedingung X (z.B. ABA – Behandlung) nicht durch N-Zugabe reguliert werden (ohne N), wie viele Gene der Bedingung X in der E-S und durch N-Zugabe reguliert werden (N/E-S) und wie viele Gene der Bedingung X durch N-Zugabe aber nicht in der E-S reguliert werden (nur N). Bei den N-Zugabe-Werten habe ich die Anzahl der Gene von 3h und 3d addiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 A und 15 B dargestellt. In Abbildung 15 C und 15 D sind die Verhältnisse der regulierten Gene aus Abb. 15 A und 15 B in %-Anteilen dargestellt. 100% entsprechen den total regulierten Genen des jeweiligen Wegweiser-Datensatzes und des Zeatin-Datensatzes. Die Anteile der N-Zugabe regulierten Gene sind in allen Wegweiser Datensätzen höher als im Zeatin-Datensatz. Von diesen N-Zugabe regulierten Genen sind über die Hälfte in der Entwicklungs-induzierten Seneszenz reguliert.

A

| N- Zugabe reprimiert | | | | |
|----------------------|-------|---------|-------|--------|
| | total | N / E-S | nur N | ohne N |
| ABA | 1186 | 370 | 108 | 708 |
| low CO2 | 1200 | 319 | 71 | 810 |
| dor TS | 808 | 283 | 55 | 470 |
| flu/tAPX | 1277 | 338 | 129 | 810 |
| gun5/Norfl. | 163 | 32 | 8 | 123 |
| Ozon | 1348 | 403 | 121 | 824 |
| trans-Zeatin | 1585 | 205 | 201 | 1179 |

B

| N- Zugabe induziert | | | | |
|---------------------|-------|---------|-------|--------|
| | total | N / E-S | nur N | ohne N |
| ABA | 906 | 164 | 144 | 598 |
| low CO2 | 1276 | 104 | 379 | 793 |
| dor TS | 1006 | 370 | 200 | 436 |
| flu/tAPX | 1403 | 448 | 244 | 711 |
| gun5/Norfl. | 800 | 351 | 176 | 273 |
| Ozon | 538 | 203 | 98 | 237 |
| trans-Zeatin | 639 | 48 | 28 | 563 |

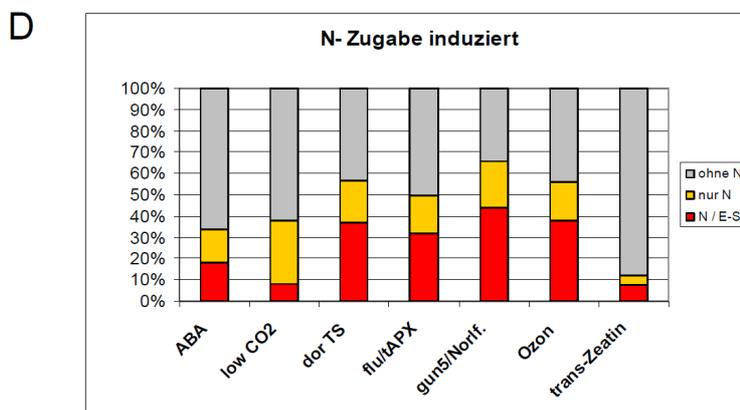
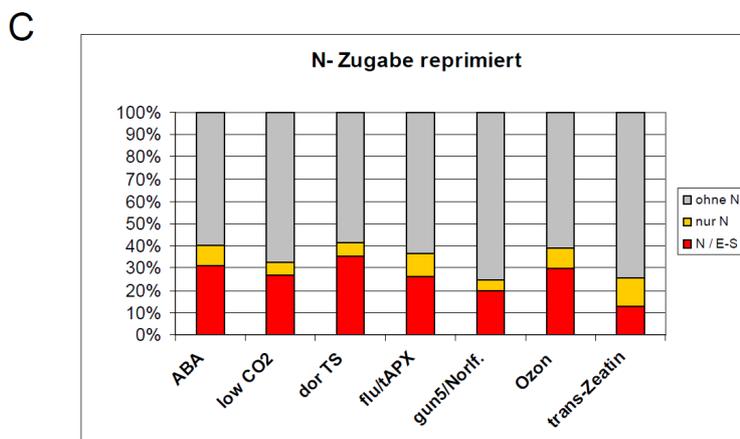


Abbildung 15: N-Zugabe regulierte Gene in den Wegweiser-Datensätzen (WWD). **A)** total: Anzahl der Gene deren Transkriptlevel im WWD mindestens 2-fach induziert ist; N/E-S: Anzahl der Gene deren Transkriptlevel im WWD mindestens 2-fach induziert ist, unter N-Zugabe mindestens 2-fach reprimiert ist und in der E-S mindestens 2-fach induziert ist; nur N: Anzahl der Gene deren Transkriptlevel im WWD mindestens 2-fach induziert ist, unter N-Zugabe mindestens 2-fach reprimiert ist und in der E-S weniger als 2-fach induziert ist; ohne N: Anzahl der Gene deren Transkriptlevel im WWD mindestens 2-fach induziert ist und unter N-Zugabe weniger als 2-fach reprimiert ist. **B)** total: Anzahl der Gene deren Transkriptlevel im WWD mindestens 2-fach reprimiert ist; N/E-S: Anzahl der Gene deren Transkriptlevel im WWD mindestens 2-fach reprimiert ist, unter N-Zugabe mindestens 2-fach induziert ist und in der E-S mindestens 2-fach reprimiert ist; nur N: Anzahl der Gene deren Transkriptlevel im WWD mindestens 2-fach reprimiert ist, unter N-Zugabe mindestens 2-fach induziert ist und in der E-S weniger als 2-fach reprimiert ist; ohne N: Anzahl der Gene deren Transkriptlevel im WWD mindestens 2-fach reprimiert ist und unter N-Zugabe weniger als 2-fach induziert ist. **C)** Verhältnisse der in Abbildung 15 A dargestellten Zahlenwerte. Die Verhältnisse der regulierten Gene sind in %-Anteilen dargestellt. 100% entsprechen den total-regulierten Genen der WWD und des Zeatin-Datensatzes. **D)** Verhältnisse der in Abbildung 15 B dargestellten Zahlenwerte. Die Verhältnisse der regulierten Gene sind in %-Anteilen dargestellt. 100% entsprechen den total-regulierten Genen der WWD und des Zeatin-Datensatzes. ABA: Abscisinsäure-Behandlung; low CO2: 4 Stunden CO₂-Mangel im Licht; dor TS: dor-KO-Mutanten unter Trockenstress; flu/tAPX: flu-tAPX-Doppelmutante; gun5/Norfl.: gun5-KO-Mutante unter Norflurazonbehandlung; Ozon: Ozon-Behandlung; trans-Zeatin: trans-Zeatin Behandlung.

KO-Mutanten unter Trockenstress; flu/tAPX: flu-tAPX-Doppelmutante; gun5/Norfl.: gun5-KO-Mutante unter Norflurazonbehandlung; Ozon: Ozon-Behandlung; trans-Zeatin: trans-Zeatin Behandlung.

3.2.3 Vergleich der N-Zugabe-Regulationsmuster mit Daten aus AG Scheible

In den Modulen 1 bis 4 habe ich dargestellt, wie ich aus meinen N-Datensätzen Markergene gefiltert und sie dann für Datenbank-Recherchen genutzt habe. Sind diese Ergebnisse wirklich neu, oder hätte ich die gleichen Ergebnisse auch unter Nutzung bereits veröffentlichter ATH1-N-Zugabe Daten bekommen können? Ich habe dazu die N-Zugabe Regulationsmuster meiner Experimente mit den N-Zugabe Regulationsmustern aus Daten

von Scheible et al. 2004 verglichen. Die ATH1-Datensätze wurden freundlicherweise von AG Scheible bereitgestellt. In Abbildung 16A und 16B sind die mindestens 2-fach N-Zugabe-regulierten Gene der beiden experimentellen Systeme miteinander verglichen. Viele Gene sind Experiment- und Zeitpunkt-spezifisch reguliert. Ich sehe in diesen Auftragungen auch, daß ich mit meinem experimentellen System viele neue Gene finde, die N-abhängig reguliert werden. Es zeigen sich aber in den 3h-N-Zugabe Werten auch viele Gemeinsamkeiten in den Regulationsmustern zwischen den beiden experimentellen Systemen. Welche Auswirkung hat das experimentelle Design auf die Regulationsmuster der in Modul 4 isolierten Markergene? Es zeigen sich große Übereinstimmungen in den N-Spezifisch induzierten Markergenen (Tab. 9). Fast alle N-spezifisch induzierten Markergene sind auch im Scheible-System 30 Minuten und 3 Stunden nach N-Zugabe mindestens 2-fach ($\log_2 \geq 1$) induziert. Von den Markergenen in Tabelle 10, 11 und 12 sind etwa die Hälfte im Scheible-System 3 Stunden nach N-Zugabe, aber nur wenige 30 min nach N-Zugabe mindestens 2-fach ($\log_2 \geq 1$) co-reguliert. In den Regulationswerten der Markergene zeigt sich deutlich, dass das experimentelle Design einen großen Einfluss darauf hat, welche N-Zugabe Regulationsmuster man in den Datensätzen findet.

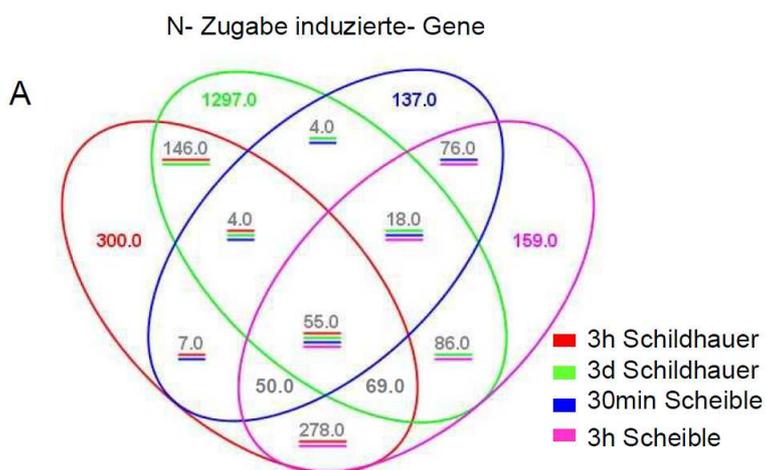


Abbildung 16: Vergleich der N-Zugabe Regulationsmuster mit Daten aus AG Scheible.

A) Venn-Diagramm der Anzahl der mindestens 2-fach N-Zugabe-induzierten Gene des experimentellen Systems Schildhauer und Scheible.

B) Venn-Diagramm der Anzahl der mindestens 2-fach N-Zugabe-reprimierten Gene des experimentellen Systems Schildhauer und Scheible. 3h: 3 Stunden nach N-Zugabe, 3d: 3 Tage nach N-Zugabe, 30 min: 30 Minuten nach N-Zugabe.

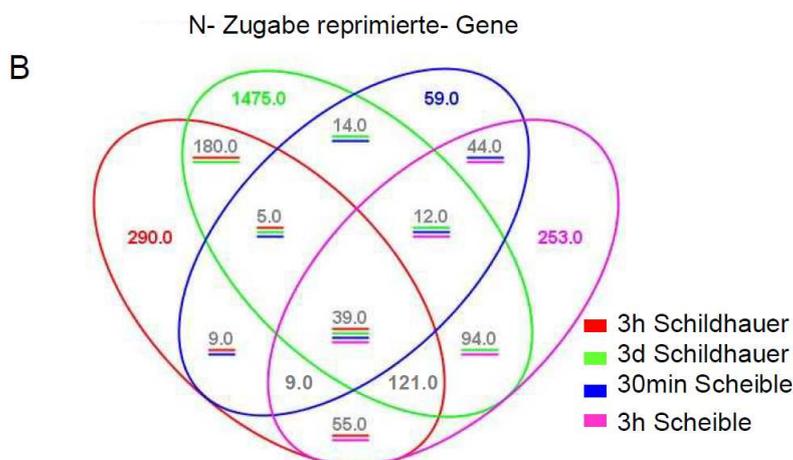


Tabelle 9; N- spezifisch induzierte Markergene-Scheible Daten

| BIN | Funktion | ATH1- ID | AGI | Name | Schildhauer | | Scheible | |
|-----|---------------------------|-------------|-----------|--------|-------------|------|----------|------|
| | | | | | 3h N | 3d N | 30 min N | 3h N |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 255734_at | at1g25550 | | 1,55 | 2,31 | 3,12 | 2,42 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 246215_at | at4g37180 | | 1,43 | 1,59 | 1,00 | 1,95 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 249606_at | at5g37260 | RVE2 | 2,05 | 1,83 | 1,87 | 2,70 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 267010_at | at2g39250 | SNZ | 1,66 | 2,24 | 1,53 | 1,20 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 246996_at | at5g67420 | LBD37 | 2,02 | 2,57 | 5,21 | 4,37 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 253043_at | at4g37540 | LBD39 | 2,96 | 3,22 | 4,12 | 4,03 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 247921_at | at5g57660 | ATCOL5 | 1,69 | 1,59 | 1,54 | 1,35 |
| 12 | Glutamat Synthase | 248267_at | at5g53460 | GLT1 | 2,75 | 3,25 | 2,46 | 2,52 |
| 13 | AS Synthese | 256891_at | at3g19030 | | 1,62 | 3,20 | 3,16 | 3,06 |
| 29 | posttransl. Modifizierung | 266313_at | at2g26980 | CIPK3 | 2,33 | 2,39 | 2,60 | 2,92 |
| 29 | posttransl. Modifizierung | 258437_at | at3g16560 | PP2C | 2,41 | 1,92 | 3,27 | 3,24 |
| 29 | posttransl. Modifizierung | 260771_at | at1g49160 | WNK7 | 3,40 | 2,10 | 2,08 | 1,82 |
| 29 | Protein Abbau | 250441_at | at5g10540 | | 1,49 | 1,65 | 0,08 | 0,41 |
| 29 | Protein Abbau | 261927_at | at1g22500 | | 1,21 | 3,36 | 1,84 | 2,88 |
| 29 | Protein Abbau | 264365_s_at | at1g03220 | | 1,13 | 2,11 | 0,37 | 2,22 |
| 29 | Protein Abbau | 267262_at | at2g22990 | SNG1 | 2,56 | 7,67 | 0,04 | 0,75 |

Tabelle 10; N- spezifisch reprimierte Markergene-Scheible Daten

| BIN | Funktion | ATH1- ID | AGI | Name | Schildhauer | | Scheible | |
|-----|------------------------|-----------|-----------|----------|-------------|-------|----------|-------|
| | | | | | 3h N | 3d N | 30 min N | 3h N |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 250688_at | at5g06510 | NF-YA10 | -1,51 | -2,00 | -1,36 | -2,25 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 267141_at | at2g38090 | | -2,10 | -2,26 | -0,49 | -1,36 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 245861_at | at5g28300 | | -1,14 | -1,59 | -0,19 | 0,07 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 265954_at | at2g37260 | TTG2 | -1,64 | -1,63 | 0,12 | -0,21 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 255056_at | at4g09820 | TT8 | -1,34 | -2,47 | -0,14 | -0,47 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 258021_at | at3g19380 | PUB25 | -1,33 | -2,70 | -0,85 | -0,43 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 254274_at | at4g22770 | | -1,16 | -1,66 | -0,51 | -0,09 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 250446_at | at5g10770 | | -1,69 | -3,19 | -0,24 | -0,91 |
| 12 | Glutamin Synthase | 250100_at | at5g37600 | GLN1;1 | -1,16 | -2,86 | -0,18 | -1,25 |
| 12 | Glutamin Synthase | 249581_at | at5g16570 | GLN1;4 | -2,20 | -5,64 | -0,34 | -3,40 |
| 12 | Glutamat Dehydrogenase | 259346_at | at3g03910 | GDH3 | -1,04 | -3,33 | -0,52 | -2,10 |
| 13 | AS Synthese | 262582_at | at1g15410 | | -2,26 | -2,48 | -0,89 | -1,76 |
| 29 | Protein Synthese | 254300_at | at4g22780 | ACR7 | -1,22 | -2,52 | -0,43 | -0,67 |
| 29 | Protein Abbau | 249306_at | at5g41400 | | -1,10 | -2,02 | -0,43 | -0,13 |
| 34 | Peptide Transport | 257789_at | at3g27020 | YSL6 | -1,15 | -1,59 | -0,20 | -0,61 |
| 34 | AS Transport | 256650_at | at3g13620 | | -1,28 | -1,63 | -0,78 | -1,11 |
| 34 | AS Transport | 247304_at | at5g63850 | AAP4 | -1,63 | -2,81 | -0,17 | -1,07 |
| 29 | Nitrat Transport | 261198_at | at1g12940 | ATNRT2.5 | -1,62 | -3,08 | 0,59 | -3,37 |

Tabelle 11; Signal- integriert- N- induzierte Markergene-Scheible Daten

| BIN | Funktion | ATH1- ID | AGI | Name | Schildhauer | | Scheible | |
|-----|-----------------------|-----------|-----------|----------|-------------|------|----------|-------|
| | | | | | 3h N | 3d N | 30 min N | 3h N |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 245362_at | at4g17460 | HAT1 | 1,25 | 1,59 | 1,08 | -0,13 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 265342_at | at2g18300 | | 4,95 | 4,70 | 2,76 | 3,52 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 246275_at | at4g36540 | BEE2 | 3,04 | 3,75 | 2,00 | 2,42 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 261782_at | at1g76110 | | 1,33 | 2,31 | 0,02 | 0,14 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 253028_at | at4g38160 | pde19 | 1,10 | 2,06 | 0,22 | 1,41 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 264672_at | at1g09750 | | 1,63 | 1,80 | -0,04 | 0,61 |
| 1 | Photosystem II | 258956_at | at3g01440 | PsbQ | 1,00 | 2,84 | 0,18 | 0,16 |
| 1 | Photosystem II | 256979_at | at3g21055 | PSBTN | 1,18 | 6,79 | 0,14 | 1,15 |
| 1 | Photosystem I | 256015_at | at1g19150 | LHCA6 | 1,15 | 6,44 | -0,23 | 0,35 |
| 1 | Ferredoxin | 258055_at | at3g16250 | NDF4 | 1,60 | 5,89 | -0,02 | 0,37 |
| 1 | Calvinzyklus | 265076_at | at1g55490 | CPN60B | 1,45 | 2,27 | 0,15 | 1,75 |
| 13 | AS Synthese | 248402_at | at5g52100 | crr1 | 1,31 | 2,87 | 0,23 | 0,52 |
| 19 | Tetrapyrrolsynthese | 254623_at | at5g45930 | CHL12 | 1,02 | 3,05 | -0,13 | 0,26 |
| 19 | Tetrapyrrolsynthese | 248920_at | at4g18480 | CHL11 | 1,57 | 3,08 | 0,12 | 1,33 |
| 19 | Tetrapyrrolsynthese | 254105_at | at4g25080 | CHLM | 1,04 | 4,05 | -0,07 | 0,77 |
| 19 | Tetrapyrrolsynthese | 253871_at | at4g27440 | PORB | 1,24 | 4,53 | 0,10 | 0,95 |
| 29 | Protein Synthese | 262283_at | at1g68590 | PSRP-3 | 1,08 | 2,81 | 1,11 | 1,86 |
| 29 | Protein Synthese | 261078_at | at1g07320 | RPL4 | 1,31 | 3,44 | 0,18 | 1,19 |
| 29 | Protein Synthese | 266575_at | at2g24060 | IF-3 | 1,26 | 2,07 | 0,30 | 0,94 |
| 29 | Protein Abbau | 247347_at | at5g63780 | SHA1 | 1,49 | 3,33 | 0,46 | 1,00 |
| 29 | Protein Assemblierung | 248962_at | at5g45680 | ATFKBP13 | 1,01 | 3,34 | 0,25 | 0,53 |

Tabelle 12; Signal- integriert- N- reprimierte Markergene-Scheible Daten

| BIN | Funktion | ATH1- ID | AGI | Name | Schildhauer | | Scheible | |
|-----|---------------------------|-------------|-----------|----------|-------------|-------|----------|-------|
| | | | | | 3h N | 3d N | 30 min N | 3h N |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 259618_at | at1g48000 | MYB112 | -1,14 | -1,66 | -0,42 | -0,53 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 258809_at | at3g04070 | ANAC047 | -1,62 | -3,53 | -0,73 | -0,47 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | 250287_at | at5g13330 | Rap2.6L | -1,34 | -2,47 | -0,31 | -0,28 |
| 33 | Transkriptionsfaktor | 259705_at | at1g77450 | ANAC032 | -1,47 | -2,02 | -0,93 | -1,93 |
| 33 | Transkriptionsfaktor | 249467_at | at5g39610 | ANAC092 | -2,29 | -2,84 | -2,40 | -1,83 |
| 33 | Transkriptionsfaktor | 260203_at | at1g52890 | ANAC019 | -2,89 | -2,64 | -0,91 | -1,13 |
| 33 | Transkriptionsfaktor | 256300_at | at1g69490 | ANAC029 | -3,49 | -3,70 | -2,56 | -2,83 |
| 13 | AS Synthese | 264524_at | at1g10070 | ATBCAT-2 | -1,84 | -2,47 | -0,32 | -1,95 |
| 13 | AS Abbau | 260900_s_at | at5g34780 | | -2,17 | -1,61 | -0,83 | -2,60 |
| 29 | posttransl. Modifizierung | 253473_at | at4g32250 | | -1,05 | -2,47 | -0,59 | -1,22 |
| 29 | Protein Abbau | 260327_at | at1g63840 | | -1,28 | -3,30 | -0,82 | -1,13 |

Tabelle 9. N-spezifisch induzierte Markergene-Scheible Daten. siehe Tabelle 4 . **Tabelle 10. N-spezifisch reprimierte Markergene-Scheible Daten.** siehe Tabelle 5. **Tabelle 11. Signal-integriert-N-induzierte Markergene-Scheible Daten.** siehe Tabelle 6. **Tabelle 12. Signal-integriert-N-reprimierte Markergene-Scheible Daten.** siehe Tabelle 7. BIN: MapMan Genfunktions-Annotation (Thimm et al. 2004); Funktion: aus dem Namen der MapMan-BIN abgeleitete Funktionsbeschreibung des Gens; ATH1-ID: Bezeichnung des Sonden-Set auf den ATH1-Microarray (Redman et al. 2004); AGI: spezifische Bezeichnung eines Gens im Genom von *Arabidopsis thaliana*; Name: in Veröffentlichungen genutzter alternativer Name; Schildhauer: ;Scheible: ;3h N: 3 Stunden nach N-Zugabe; 3d N: 3 Tage nach N-Zugabe; 30 min N: 30 Minuten nach N-Zugabe; 3h N: 3 Stunden nach N-Zugabe. Die Regulationswerte sind als \log_2 -Verhältnisse dargestellt.

3.2.4 Vergleich qPCR und Affymetrix – Werte

Bevor die extrahierte RNA für Affymetrix ATH1-Messungen benutzt wurde, habe ich mittels qPCR überprüft, ob die Transkriptlevel einzelner N- bzw. Seneszenz-regulierter Markergene in den biologischen Replikaten reproduzierbare Muster zeigen. Ich habe damit sichergestellt, dass nur RNA aus biologischen Replikaten benutzt wird, die keine Abweichungen aufgrund mir unbekannter technischer Störungen der Klimakammern zeigen. Die 3 LBD-Transkriptionsfaktoren LBD37, LBD38 und LBD39 sind N-spezifische Markergene (Rubin et al. 2009). Die Transkriptionsfaktoren PAP2 (Pourtau et al. 2006), ABI5 (Pourtau et al. 2004) und ANAC029 (Guo et al. 2006) sind Blattseneszenz-induzierte Markergene. GS2 ist ein Schlüsselenzym des N-Metabolismus und ein SDG (Masclaux et al. 2000), und FRK1 ist eine Seneszenz-induzierte Rezeptorkinase (Robatzek und Somsich 2002). Ich habe dadurch einen direkten Vergleich von Transkriptlevel-Regulationsmustern aus ATH1- und qPCR Messungen (Tabelle 13). Bei allen Genen zeigen sich in der qPCR höhere Regulationswerte der relativen Transkriptlevel. Von den 8 untersuchten Genen gab es für 6 Gene (LBD37, LBD38, LBD39, PAP2, ANAC029, GS2) relativ gute Übereinstimmungen für beide Messtechnologien.

Deutliche Abweichungen der Ergebnisse gab es bei ABI5 und FRK1. Bei diesen Genen lieferten die qPCR Messungen den Nachweis, dass die Transkriptlevel beider Gene durch Variation der N-Verfügbarkeit mehr als 3-fach reguliert vorlagen (Tabelle 13). Die ATH1 Ergebnisse dagegen zeigten keine N-abhängige Regulation der Transkriptlevel.

| BIN | Funktion | AGI | Name | ATH1 chip | | | qPCR | | |
|-----|----------------------|-----------|---------|-----------|-----------|-------|--------|-----------|-------|
| | | | | 4d noN | 4d 3h noN | 3h N | 4d noN | 4d 3h noN | 3h N |
| 27 | Transkriptionsfaktor | at5g67420 | LBD37 | -1,68 | -2,07 | 2,02 | -2,59 | -2,14 | 3,00 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | at3g49940 | LBD38 | -1,68 | -1,56 | 2,26 | -2,12 | -2,50 | 4,05 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | at4g37540 | LBD39 | -3,57 | -3,63 | 2,96 | -6,30 | -6,90 | 6,83 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | at1g66390 | PAP2 | 5,91 | 6,27 | -4,32 | 11,45 | 11,90 | -5,41 |
| 27 | Transkriptionsfaktor | at2g36270 | ABI5 | 0,69 | 0,68 | -0,15 | 2,80 | 3,13 | -1,82 |
| 33 | Transkriptionsfaktor | at1g69490 | ANAC029 | 1,16 | 1,32 | -3,49 | 0,96 | 1,76 | -4,69 |
| 12 | Gln-Synthetase | at5g35630 | GS2 | -0,57 | -0,60 | 0,40 | -1,64 | -1,11 | 0,85 |
| 30 | Rezeptor Kinase | at2g19190 | FRK1 | 0,45 | 0,51 | -0,23 | 2,03 | 3,45 | -0,80 |

Tabelle 13: Vergleich von Transkriptlevel-Regulationsmustern aus ATH1- und qPCR-Messungen. Die Werte sind als \log_2 -Verhältnisse dargestellt. Alle Werte die eine mindestens 3-fache (\log_2 Grenzwert: +/- 1,585) Regulation zeigen, habe wurden farbig markiert. 4d noN: 4 Tage nach N-Entzug, 4d 3h no N: 4 Tage und 3 Stunden nach N-Entzug (siehe Abb.8A). 3h N: 3 Stunden nach N-Zugabe zu N-Mangel-Pflanzen (siehe Abb.10A). Die Berechnung der Transkriptlevel-Regulationsmuster erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben.

3.2.5 Kleine regulatorischer RNA – sRNA

Kleine RNAs (sRNA) sind kurze RNA Moleküle mit einer Länge von etwa 21 bis 28 Nukleotiden. Es gibt unterschiedliche Funktionen und Entstehungswege dieser heterogenen Molekülgruppe. Sie können über sequenzspezifische Anlagerung an mRNA-Moleküle die Expression ihrer Zielgene unterdrücken (Voinnet 2009). Aus diesem Grund sind sRNA potentielle Regulatoren der N-Mangel induzierten Blattseneszenz. Eine Auswahl an 6 sRNAs wurden mittels stem-loop RT-qPCR in Blatt-RNA Extrakten von Pflanzen gemessen, die entweder eine Entwicklungs- oder eine N-Mangel-induzierte Seneszenz durchliefen. MiR164 hat eine regulatorische Funktion in der E-S (Kim et al. 2009). Der Level von miR164 sinkt mit zunehmendem Blattalter. MiR166 hat einen Einfluß auf die Blattendwicklung, speziell die Morphogenese (Williams et al. 2005). Eine Regulation von mir166 in der Blattseneszenz oder unter N-Mangel wurde noch nicht beschrieben. MiR169 wurde als N-Mangel-reprimiert beschrieben (Zao et al. 2011). Eine Überexpression von miR169 bewirkt im Vergleich zum Wildtyp einen niedrigeren Chlorophylllevel unter N-Mangel. Das könnte ein Blattseneszenz-Effekt sein. MiR319 besitzt eine regulatorische Funktion in der Dunkelheit-induzierten Blattseneszenz (Schommer et al. 2008). Wird miR319 überexprimiert, seneszierern die Blätter in Dunkelheit langsamer als beim Wildtyp. MiR828 und TAS4 werden durch N-Mangel induziert (Hsieh et al. 2009). Diese beiden sRNA sind funktionell aneinander gekoppelt und regulieren die Anthocyan-Biosynthese. Eine Blattseneszenz-Funktion wurde für miR828 und TAS4 bisher nicht nachgewiesen.

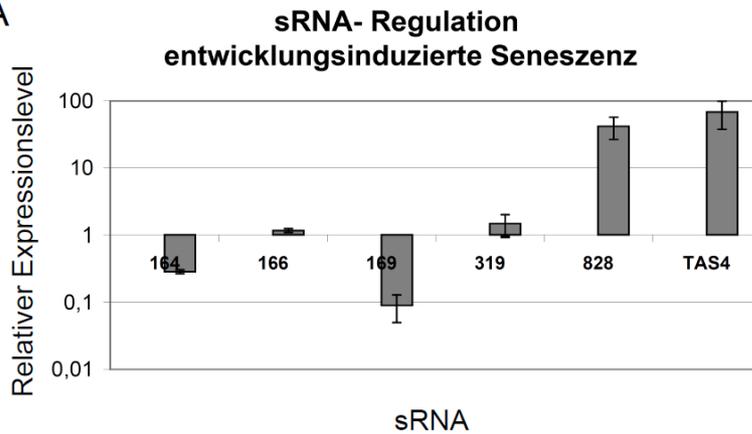
3.2.5.1 Level von sRNA in der Entwicklungs-induzierten Blattseneszenz

Die RNA-Extrakte stammen von Blattmaterial, das freundlicherweise von Nicole Ay zur Verfügung gestellt wurde. Ich habe die sRNA-Level aus reifem Blatt (mature leaf) und seneszenten Blättern (senescent leaf, S1) verglichen. Die physiologische Bestimmung von reifem und seneszentem Blatt wurde wie in Ay et al. (2009) beschrieben, durchgeführt. 4 der 6 gemessenen sRNAs zeigten eine deutliche Regulation in der entwicklungsinduzierten Seneszenz (Lineare Werte in Abb. 16 A). Die beiden miRNA 164 und 169 sind deutlich reprimiert während miR828 und TAS4 deutlich induziert sind. Die Repression von miR164 in der Entwicklungs-induzierten Blattseneszenz stimmt mit den Ergebnissen von Kim et al. (2009) überein.

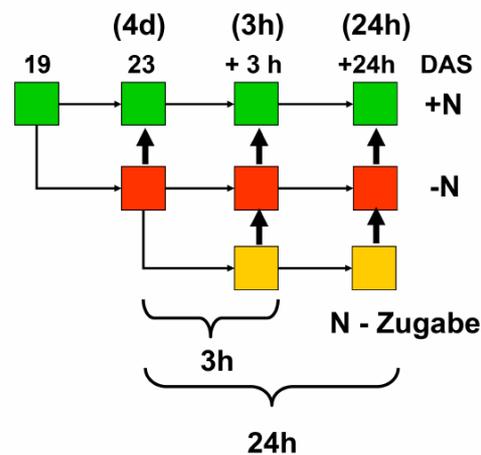
3.2.5.2 Level von sRNA in der N-Mangel -induzierten Blattseneszenz

Ich habe die Pflanzen nach 4d N-Mangel wieder in Vollmedium umgesetzt (Abb. 16 B). Nach dieser N-Zugabe wurde nach 3h und nach 24 Stunden Proben genommen und in den entsprechenden RNA-Extrakten die sRNA vermessen. Von den 6 gemessenen sRNA waren miR828 und TAS4 unter N-Mangel deutlich induziert (\log_2 Werte; Abb. 16 C). Nach N-Zugabe zeigte sich nach 24 Stunden eine deutliche Repression der sRNA – Level von miR828 und TAS4. Die Regulationsstärken und -muster der beiden funktionell verbundenen sRNA sind sich sehr ähnlich, was auf gemeinsame Regulationswege hindeutet. Im Gegensatz zur Entwicklungs-induzierten Seneszenz sind miR164 und miR169 durch N-Mangel und N-Zugabe nicht deutlich reguliert (Abb.16 C).

A



B



C

| Name | 4d no N | 3h no N | 24h no N | 3h N | 24 h N |
|------|---------|---------|----------|-------|--------|
| 164 | -1,10 | 0,01 | -0,23 | -0,82 | -0,37 |
| 166 | 0,86 | 0,38 | 0,73 | -0,08 | -0,69 |
| 169 | -0,87 | -1,12 | -1,14 | -0,05 | 0,30 |
| 319 | 0,91 | 0,92 | 0,85 | -0,23 | -0,82 |
| 828 | 8,35 | 10,02 | 11,82 | -0,10 | -2,26 |
| TAS4 | 8,03 | 10,05 | 11,47 | -0,21 | -2,91 |

Datenpunkte. Analysiert wurden Transkriptwerte unter N-Mangel (-N) bezogen auf die jeweilige Kontrolle (+N) (4d no N, 3h no N, 24 no N). Analysiert wurden Transkriptwerte unter N-Zugabe nach N-Mangel (3h N, 3d N) bezogen auf die jeweilige N-Mangel Kontrolle (-N). **C**) Tabellarische Darstellung der in Abb. 12 B erklärten N-Werte. Die Werte sind als \log_2 -Verhältnisse aufgetragen. Die sRNA-Level wurden auf 5sRNA normalisiert. Der sRNA-Level der jeweiligen Kontrollblätter wurden als 1 definiert und der sRNA-Level der zu messenden Proben (-N bzw. N-Zugabe) darauf bezogen und dargestellt. Werte die mindestens eine 3-fache Regulation ($\log_2 = \pm 1,585$) der sRNA-Menge zeigen, wurden farbig markiert. Dazu wurde $\Delta\Delta CT$ Methode benutzt (siehe Pant et al. 2008). 4d noN: 4 Tage nach N-Entzug; 3h noN: 4 Tage und 3 Stunden nach N-Entzug; 24h noN: 4 Tage und 24 Stunden nach N-Entzug; 3h N: 3 Stunden nach N-Zugabe; 24h N: 24 Stunden nach N-Zugabe. Die sRNA-Level der E-S wurden in 2 biologischen Replikaten gemessen. Die sRNA-Level unter N-Einfluss wurden in 3 biologischen Replikaten gemessen.

Abbildung 17: sRNA-Level.

A) Seneszenzspezifische Veränderungen der relativen sRNA-Level (miR164, miR166, miR169, miR319, miR828, TAS4) in Rosettenblättern (Blatt 5-8) von *Arabidopsis thaliana* in Abhängigkeit von Blattalter. Die RNA wurde aus definierten Blättern von Pflanzen unterschiedlichen Alter extrahiert (reifes Blatt = 16 Tage nach Aussaat, senescentes Blatt S1 Stadium siehe Ay et al. (2009)). Die sRNA-Level wurden auf 5sRNA normalisiert. Der jeweilige sRNA-Level des reifen Blattes wurde als 1 definiert und der sRNA-Level des seneszenten Blattes darauf bezogen und dargestellt. Dazu wurde $\Delta\Delta CT$ Methode benutzt (siehe Pant et al. 2008). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung ($n \geq 10$ Pflanzen). Die Skalierung der Y-Achse ist logarithmisch.

B) Verlaufsdiagramm der *Arabidopsis*-Hydrokultur Kinetik (Tage nach Aussaat = DAS). Die Pflanzen wuchsen auf Vollmedium (+N), auf N-freiem Medium (-N) oder wurden nach Wachstum auf N-freiem Medium wieder auf Vollmedium umgesetzt (N-Zugabe). Die Pfeile repräsentieren die zwei aufeinander bezogenen

3.2.6 Metabolit-Level der N-Mangel-induzierten Blattsenesenz

Die Blattsenesenz ist durch N-Ressourcenmobilisierung und N-Translokation gekennzeichnet. Die N-haltigen makromolekularen Strukturen der Proteine (vor allem die im Chloroplasten) werden abgebaut und in niedermolekulare, transportable Aminosäuren- und deren Derivate umgewandelt (Masclaux-Daubresse et al. 2008). Das seneszierende Blatt steht dabei über die Transportnetzwerke des Phloems und Xylems im kontinuierlichen Stoff- und Energieaustausch mit dem Rest der Pflanze. Das bedeutet, dass abgebaute N-Ressourcen nicht zwangsläufig im Blatt akkumulieren, sondern unverzüglich zu N-absorbierenden Wachstums- oder Speicherzonen der Pflanze umverteilt werden können. Die N-relevanten Stoffwechselwege sind Teil des komplexen Netzwerks des Gesamtstoffwechsels und eng mit Prozessen des Kohlenstoff-Stoffwechsels verbunden (Nunes-Nesi et al. 2010).

Ergänzend zu den ATH1-Transkriptprofilen der N-Mangel induzierten Blattsenesenz (Abb. 8A und 10A) wurden die Metabolit-Profile der entsprechenden Blattgewebe bestimmt. Es wurden die Regulationsprofile von 23 Aminosäuren, 4 Kohlenhydraten, 12 organischen Säuren und 6 weiteren Metaboliten bestimmt. Die relativen Mengen der Metabolite wurden von Wagner Luiz Araujo, AG Fernie am MPI-MP in Golm quantifiziert.

Die linearen Regulationswerte wurden in Tabelle 14 aufgetragen. Ich habe einen relativen Metabolit-Level ab einer Verdopplung (≥ 2) oder Halbierung ($\leq 0,5$) als reguliert definiert.

3.2.6.1 Aminosäuren

Unter N-Mangel zeigten sich 14 Aminosäuren (AS) in ihrer relativen Menge reprimiert und 4 AS induziert (Tab. 14). Die Mehrzahl der regulierten N-haltigen Metabolite lag also reprimiert vor. Generell verstärkte sich die Abnahme der AS mit längerem N-Mangel. Das war zu erwarten, denn ohne exogene N-Zufuhr wird die Synthese N-haltiger Metabolite gebremst. Ab 4 Tage N-Mangel lagen Alanin, Alanin-beta, Norleucin, Prolin und Serin kontinuierlich in deutlich reduzierter Menge vor. Zusätzlich dazu waren Glycin und Homoserin nach 7d N-Mangel besonders stark in ihrem Level abgesunken.

Die induzierten AS Glutamat, Pyroglutamat, Threonin und Tyrosin sind in den frühen N-Mangel Proben vorübergehend induziert. Diese Induktion nimmt mit zunehmender Stressdauer wieder ab.

Nach 3 Stunden N-Zugabe waren 3 AS reguliert. Die Level an Alanin und Glycin hatte sich etwas mehr als verdoppelt, während die Level an Tyrosin vorübergehend halbiert war. Auch der Level an Serin war 3 Stunden nach N-Zugabe fast 2-fach verdoppelt und ist 3 Tage nach N-Zugabe noch stärker induziert. 3 Tage nach N-Zugabe waren 12 AS induziert, und alle waren zu mindestens einem früheren Zeitpunkt unter N-Mangel reprimiert. Eine mehr als 10 fache N-Zugabe abhängige Steigerung zeigte sich bei Alanin, Alanin-beta, Glycin, Homoserin, Prolin und Serin.

3.2.6.2 Kohlenhydrate

Unter N-Mangel zeigte sich keines der 4 gemessenen Kohlenhydrate (KH) in seinem relativen Level reprimiert, aber Fructose ab 4d und Galactose ab 7d N-Mangel induziert (Tab. 14). Die relativen Level von Fructose und Galactose steigerten sich mit längerem N-Mangel. Erythrose und Glucose zeigten keine Regulation.

Nach 3h N-Zugabe war keines der KH reguliert. 3d nach N-Zugabe waren Fructose- und Galactose-Level gesunken.

3.2.6.3 Organische Säuren

Unter N-Mangel zeigten sich 5 der 12 gemessenen organischen Säuren (OS) in ihren relativen Leveln reprimiert und 1 OS induziert (Tab. 14). Die Mehrzahl der regulierten OS lag also reprimiert vor. Ab 4d N-Mangel lagen Fumarat, Malat und Pyruvat kontinuierlich in deutlich reduzierten Leveln vor.

Succinat war in den frühen N-Mangel Proben vorübergehend induziert. Der gesteigerte Succinat-Level nimmt mit zunehmender N-Mangeldauer wieder ab.

Nach 3h N-Zugabe waren keine der OS reguliert. 3d nach N-Zugabe waren Fumarat und Malat deutlich induziert, beide OS waren unter N-Mangel kontinuierlich reprimiert.

3.2.6.4 Weitere Metabolite

Es wurden 6 weitere Metabolite gemessen (Tab. 14). Die Level der N-haltigen Metabolite Spermin und Harnstoff waren in den späteren N-Mangelproben reprimiert. Nach 3 h N-Zugabe war keines dieser Metabolite reguliert. 3d nach N-Zugabe waren Spermin und Harnstoff-Level deutlich induziert. Zusätzlich waren die Level der unter N-Mangel nicht regulierten Metabolite Glycerin und Putrescin 3d nach N-Zugabe induziert.

| Stoffklasse | Name | 4d no N | 4d 3h no N | 7d no N | 10 d no N | 3h N-Zugabe | 3d N-Zugabe |
|-------------------|----------------------|---------|------------|---------|-----------|-------------|-------------|
| Aminosäuren | Alanin | 0,05 | 0,03 | 0,13 | 0,08 | 2,59 | 18,62 |
| | Alanin,beta | 0,30 | 0,23 | 0,01 | 0,01 | 1,02 | 157,59 |
| | 4 Amino- Buttersäure | 0,69 | 0,82 | 1,30 | 1,21 | 1,02 | 0,69 |
| | Asparagin | 1,38 | 1,58 | 0,38 | 0,51 | 1,65 | 2,23 |
| | Cystein | 0,31 | 1,31 | 0,38 | 0,14 | 1,09 | 6,83 |
| | Glutamat | 1,18 | 2,90 | 1,85 | 0,92 | 0,86 | 1,96 |
| | Glycin | 0,53 | 0,49 | 0,04 | 0,02 | 2,08 | 40,62 |
| | Homoserin | 0,76 | 0,84 | 0,02 | 0,01 | 0,93 | 108,16 |
| | Isoleucin | 0,89 | 0,86 | 1,03 | 0,85 | 0,85 | 0,87 |
| | Leucin | 1,47 | 1,03 | 1,26 | 1,18 | 1,00 | 0,93 |
| | Norleucin | 0,13 | 0,21 | 0,31 | 0,31 | 0,56 | 1,62 |
| | Ornithin | 0,76 | 1,14 | 0,12 | 0,18 | 0,62 | 2,29 |
| | Phenylalanin | 0,77 | 1,19 | 0,74 | 0,75 | 0,54 | 1,20 |
| | Prolin | 0,16 | 0,22 | 0,06 | 0,03 | 0,60 | 20,52 |
| | 4-Hydroxy-Prolin | 0,64 | 0,81 | 0,80 | 0,67 | 1,05 | 1,31 |
| | Pyroglutamat | 1,15 | 2,61 | 1,01 | 1,10 | 0,87 | 1,11 |
| | Serin | 0,27 | 0,28 | 0,13 | 0,08 | 1,91 | 16,21 |
| | O-Acetyl-Serin | 0,86 | 0,85 | 0,26 | 0,31 | 1,06 | 2,33 |
| | Threonin | 2,89 | 2,87 | 3,30 | 1,39 | 1,06 | 0,56 |
| | Tryptophan | 1,20 | 1,32 | 1,11 | 1,45 | 0,91 | 1,04 |
| | Tyramin | 0,90 | 1,15 | 0,68 | 0,63 | 0,94 | 1,19 |
| Tyrosin | 1,95 | 3,03 | 0,52 | 0,57 | 0,46 | 1,01 | |
| Valin | 0,71 | 0,68 | 0,41 | 0,29 | 0,94 | 3,19 | |
| Kohlenhydrate | Erythrose | 0,85 | 0,92 | 1,03 | 0,85 | 0,96 | 1,00 |
| | Fructose | 11,64 | 9,39 | 16,08 | 20,38 | 0,97 | 0,06 |
| | Galactose | 1,26 | 1,24 | 2,11 | 2,95 | 0,95 | 0,34 |
| | Glucose | 1,22 | 1,83 | 1,07 | 1,11 | 0,84 | 0,94 |
| organische Säuren | Ascorbinsäure | 1,44 | 1,50 | 1,53 | 1,58 | 0,98 | 1,00 |
| | Benzoat | 0,70 | 0,77 | 0,74 | 0,62 | 1,07 | 1,51 |
| | Fumarat | 0,00 | 0,00 | 0,12 | 0,06 | 1,00 | 16,79 |
| | Glycerat | 0,71 | 0,65 | 0,37 | 0,81 | 0,78 | 1,14 |
| | Isocitrat | 0,55 | 1,85 | 0,50 | 0,60 | 1,20 | 1,53 |
| | Lactat | 0,85 | 0,92 | 1,03 | 0,84 | 0,96 | 0,92 |
| | Malat | 0,01 | 0,01 | 0,16 | 0,11 | 0,91 | 4,71 |
| | 2 Oxo-Glutarat | 0,71 | 0,31 | 0,72 | 1,08 | 1,80 | 3,07 |
| | Picolinat | 0,58 | 0,55 | 0,69 | 0,77 | 0,94 | 1,17 |
| | Pyruvat | 0,18 | 0,15 | 0,20 | 0,30 | 1,05 | 1,80 |
| Succinat | 4,43 | 5,17 | 1,81 | 1,44 | 0,85 | 1,03 | |
| Valeriansäure | 0,90 | 0,92 | 0,91 | 0,91 | 0,91 | 1,13 | |
| andere | Glycerin | 0,64 | 0,77 | 0,65 | 0,62 | 1,03 | 2,61 |
| | Guanidin | 1,31 | 1,33 | 0,72 | 0,73 | 1,30 | 1,00 |
| | Putrescin | 0,72 | 1,10 | 0,70 | 0,55 | 0,89 | 2,53 |
| | Spermin | 0,76 | 0,77 | 0,53 | 0,47 | 0,98 | 2,50 |
| | Threitol | 0,97 | 0,81 | 0,86 | 0,63 | 0,95 | 1,01 |
| | Harnstoff | 0,73 | 0,83 | 0,35 | 0,38 | 1,01 | 2,49 |

Tabelle 14: Metabolit-Level.

N-abhängige, relative Metabolit-Level der Blätter 1 und 2 nach den Kotyledonen (*A. thaliana* N-Kinetik siehe Abb. 6A). Die Metabolit-Level wurden wie in Araujo et al. (2011) bestimmt. 4d noN: 4 Tage nach N-Entzug; 4d 3h noN: 4 Tage und 3 Stunden nach N-Entzug; 7d noN: 7 Tage nach N-Entzug; 10d noN: 10 Tage nach N-Entzug; 3h N-Zugabe: 3 Stunden nach N-Zugabe; 3d N-Zugabe: 3 Tage nach N-Zugabe. Eine Verdopplung oder Halbierung der Metabolitlevel im Vergleich zur entsprechenden Referenzprobe ist farbig markiert.

3.2.7 Phytohormon-Level der N-Mangel -induzierten Blattseneszenz

Phytohormone (PH) sind Metabolite des Sekundärstoffwechsels mit Signalfunktion. Es gibt Phytohormone mit Blatt-Seneszenz-fördernder Wirkung (z.B.: ABA – Abscisinsäure, SA-Salicylsäure, JA- Jasmonsäure) und Hormone mit Seneszenz- hemmender Wirkung (z.B.: Z- Zeatin und ZR- Zeatin-Riboside) (Lim et al. 2007). Parallel zu den ATH1- Transkriptprofilen der N- Mangel induzierten Blattseneszenz (Abb. 7 B) wurden 6 PH - Profile der entsprechenden Blattgewebe bestimmt. ABA, SA, JA Z, ZR und GA4: Gibberellinsäure 4

wurden von Maria Amparo Asensi-Fabado, AG Munne-Bosch an der Universität Barcelona quantifiziert.

Die absoluten PH – Mengen wurden in Abb. 18 B, und die linearen Regulationswerte in Abb. 18 C aufgetragen.

Bei der absoluten Quantifizierung der PH – Mengen zeigen sich große Unterschiede zwischen den einzelnen PH (Abb. 18 B). Mit Werten von über 50 ng/g Frischmasse (FM) zeigten JA und SA die mit Abstand höchsten Werte. Im Mittelfeld liegt ABA mit Werten um 10 ng/g Frischmasse. Die Absolutmengen von Zeatin, Zeatin-Riboside und GA4 lagen teilweise unterhalb der Detektionsgrenze und ergaben keine verlässlichen Messwerte. Aus diesem Grund wird ich Z, ZR und GA4 in der weiteren Beschreibung nicht berücksichtigen.

Die Absolutmengen von ABA und SA waren in den Kontrollen, unter N-Mangel und 3h nach N-Zugabe relativ stabil (Abb. 18 B). ABA hatte in den N-Mangel Blättern einen durchweg erhöhten Wert über 1,5 und war 7d nach N-Entzug transient mehr als 3-fach induziert (Abb. 18 C). 3 d nach N-Zugabe vervierfachte sich der Gehalt von SA im Vergleich zu Kontrolle und N-Mangel. Der Gehalt an JA war in den frühen Kontrollen am höchsten und halbierte sich im Lauf der Kinetiken (Abb. 18 B). Dieser Rückgang von JA wurde durch N-Mangel etwas verstärkt. So war der Gehalt an JA 10d nach N-Entzug im Vergleich zur Kontrolle mehr als halbiert (Abb. 18 C). 3h nach N-Zugabe war der JA Gehalt im Vergleich zum N-Mangel stabil. 3 d nach N-Zugabe hat sich der Gehalt von JA im Vergleich zu N-Mangel mehr als vervierfacht.

SA und JA lagen mit Abstand in der höchsten Menge in den Blättern vor und zeigten auch die stärksten, messbaren Reaktionen auf N-Zugabe. Es ergibt sich das Muster, dass in den jungen Kontrollblättern das Verhältnis von ABA, SA, und JA am stärksten auf der Seite von JA liegt (relative PH-Mengen: JA >> SA > ABA). Während der Blattentwicklung und verstärkt unter N-Mangel verschiebt sich das Verhältnis zugunsten von ABA und SA (relative PH-Mengen: JA ~ SA > ABA). Eine N-Gabe hat nach 3d die Wirkung, dass der ABA Gehalt weitgehend unverändert bleibt. Das Verhältnis von SA und JA zu ABA ähnelt dann eher dem der jungen Kontrollpflanzen, und verschiebt sich dazu noch mehr in Richtung SA (relative PH-Mengen: JA ~ SA >> ABA).

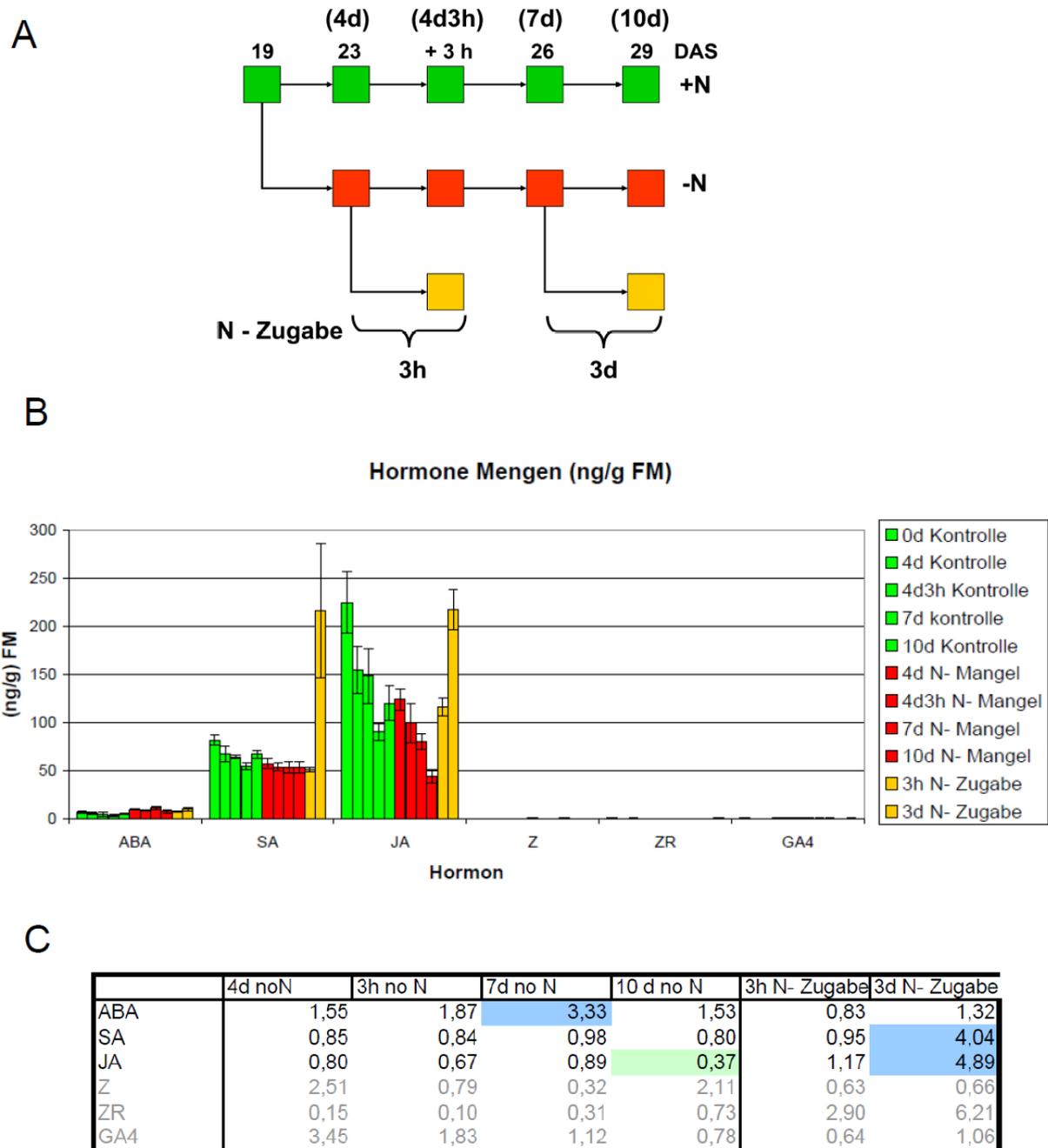


Abbildung 18: Phytohormon-Level.

A) Verlaufdiagramm der Arabidopsis-Hydrokultur Kinetik (Tage nach Aussaat = DAS). Die Pflanzen wuchsen auf Vollmedium (+N), auf N-freiem Medium (-N) oder wurden nach Wachstum auf N-freiem Medium wieder auf Vollmedium umgesetzt (N-Zugabe). **B**) Stickstoffabhängige, endogene Konzentrationen von Abscisinsäure (ABA), Salicylsäure (SA), Jasmonsäure (JA), Zeatin (Z), Zeatin-Riboside (ZR), Giberellin 4 (GA4) der Blätter 1 und 2 nach den Kotyledonen. Die einzelnen Meßwerte stammen von Blattproben die zu den in Abbildung 18A dargestellten Zeitpunkten der N-Zeitkinetik genommen wurden. Die Werte repräsentieren Messungen aus 3 biologischen Replikaten mit je zwei technischen Replikaten. ng: Nanogramm, g: Gramm, FM: Frischmasse **C**) Tabellarische Darstellung relativer Hormonmengen der in Abb. 18 C gezeigten Werte. Werte die mindestens eine relative Verdopplung oder Halbierung der Hormonmenge zeigen, wurden farbig markiert. 4d noN: 4 Tage nach N-Entzug; 3h noN: 4 Tage und 3 Stunden nach N-Entzug; 7d noN: 7 Tage nach N-Entzug; 10d noN: 10 Tage nach N-Entzug; 3h N-Zugabe: 3 Stunden nach N-Zugabe; 3d N-Zugabe: 3 Tage nach N-Zugabe.

4 Diskussion

4.1 Entwicklung von Hydrokultur-Systemen zur Charakterisierung der N-Mangel induzierten Blattseneszenz in Gerste (*Hordeum vulgare*) und *Arabidopsis thaliana*

Die Gabe einer zusätzlichen Menge Nitrat kann das seneszenzspezifische Absinken von Chlorophyllgehalt und Photosystem II-Effizienz in Fahnenblättern (FB) von auf Erde wachsenden Gerstenpflanzen deutlich verzögern (Abb. 3A, 3B) (Schildhauer et al. 2008). Diese Verzögerung der Blattseneszenz war auch auf molekularer Ebene meßbar, was ich durch Expressionsanalyse von LKR/SDH und GS2 nachweisen konnte (Abb. 4A, 4B). Der Blattseneszenz-spezifische Anstieg des LKR/SDH-Transkript-Levels und das Absinken des GS2 Transkript-Levels wurde durch die Gabe einer zusätzlichen Menge Nitrat deutlich verzögert (Abb. 4A, 4B). Die N-Verfügbarkeit hat demnach einen Einfluß auf regulatorische Mechanismen der Fahnenblatt-Seneszenz der Gerste. Eine hohe Verfügbarkeit an N unterdrückt die Fahnenblatt-Seneszenzprozesse auf physiologischer und molekularer Ebene und verlängert die Photosynthese-Aktivität des FB .

Um diesen N-abhängigen Zusammenhang zu bestätigen, habe ich ein standardisiertes Hydrokultur-System für Gerstenpflanzen entwickelt. In diesem Anzuchtssystem wurde die Primäblattseneszenz durch Austausch des Vollmediums gegen N-Mangelmedium induziert. Diese Seneszenz-Induktion war durch einen stetig sinkenden Chlorophyllgehalt und PSII-Effizienz in den Primärblättern der N-Mangel Pflanzen deutlich messbar (Abb. 5B, 5C). Die Zugabe von Nitrat oder Ammonium zu dieser N-Mangelgerste hemmte die Primäblattseneszenz und führte zu einem Anstieg im Chlorophyllgehalt und der PSII-Effizienz.

Die Seneszenz des Fahnenblattes und des Primärblattes der Gerste wird durch eine hohe N-Verfügbarkeit gehemmt. Diese Seneszenzhemmung durch N ist also kein FB-spezifischer Effekt, der zudem auch relativ unabhängig vom Entwicklungsstadium der ganzen Pflanze ist. Eine hohe N-Versorgung hemmt die Blattseneszenz bei jungen Gerstenpflanzen (17 Tage nach Aussaat in Hydrokultur) und bei älteren Gerstenpflanzen (76 Tage nach Aussaat auf Erde). Das bedeutet umgekehrt auch, dass die Gerstenpflanze ihren N-Status kontinuierlich wahrnimmt und N-Mangel zu jedem Zeitpunkt der Wachstumsphase der Gerste Seneszenzprozesse in Blättern auslösen kann. Die N-Verfügbarkeit hat wahrscheinlich zu jedem Zeitpunkt der Wachstumsphase der Gerste einen Einfluß auf regulatorische Mechanismen der Blattseneszenz.

Gerste ist eine wichtige Nutzpflanze und Modellpflanze für Getreide der gemäßigten Zone. Allerdings ist die Charakterisierung des Transkriptprofils dieser Pflanze durch die Unvollständigkeit der öffentlich zugänglichen Genomsequenzen begrenzt. Ausgehend von diesen Ergebnissen habe ich ein standardisiertes Hydrokultursystem für *Arabidopsis thaliana* entwickelt, das ich als molekulares Werkzeug zur Charakterisierung der N-Mangel induzierten Blattseneszenz nutze (Schildhauer et al. 2008).

Arabidopsis zeigt in Hydrokultur ähnlich wie Gerste eine Induktion der Blattseneszenz nach N-Entzug vom Nährmedium mit stetig absinkenden Blattchlorophyll und PSII-Effizienz (Abb. 6B, 6C, 6D). Diese N-Mangel induzierte Blattseneszenz in *A.thaliana* wurde durch Umsetzen der Pflanzen auf Nitrat- und Ammonium-haltiges Vollmedium gehemmt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die zugrundeliegenden, regulatorischen Mechanismen der Seneszenz-Induktion in Abhängigkeit vom Stickstoffangebot in Gerste und *A.thaliana*

zumindest teilweise konserviert sein könnten. Es ist deshalb sinnvoll den Seneszenz-hemmenden Effekt einer hohen N-Verfügbarkeit in der Modellpflanze *A. thaliana* zu untersuchen. Die Ergebnisse aus den *A. thaliana*-Versuchen sollen nutzbare Hinweise darauf geben, wie eine hohe N-Verfügbarkeit in der Nutzpflanze Gerste die Blattseneszenz unterdrückt und die Photosynthesekapazität dadurch erhöht.

4.2. Transkript-Profiling der N-Mangel induzierten Blattseneszenz in *Arabidopsis thaliana*

Die Frage, auf die ich mit meinen Auswertungen eine Antwort suche, lautet: Wie induziert N-Mangel Blattseneszenz und wie wird dieser Prozeß durch N-Zugabe wieder gehemmt?

4.2.1 Modul 1

Das hierarchische Clustering stellt eine Art Qualitätskontrolle der biologischen Replikate dar (Abb. 7). Die Transkriptprofile von Pflanzenblättern die das gleiche Alter haben und unter standardisierten Umweltbedingungen wachsen, sollten zueinander am ähnlichsten sein und in der Cluster-Gruppierung nah beieinander angeordnet sein. Das war bei den untersuchten Profilen der Fall und bestätigt, dass mit dem standardisierten Hydrokultursystem reproduzierbare Ergebnisse erzielt wurden. Das hierarchische Clustering der globalen Transkriptprofile mit dem Programm Robin 1.1.5 offenbart einen zunehmenden Unterschied in den Blattproben der N-versorgten Kontrollen (+N) und der N-Mangel Pflanzen (-N, Abb. 7A). Dieser zunehmende Unterschied im Transkriptprofil zwischen N-Mangel (-N) und Kontrollen (+N) findet sich komplementär auch im Chlorophyllgehalt (Abb. 6B), PSII-Effizienz (Abb. 6C) und Metabolit-Leveln (Tabelle 14, Glycin, Prolin, Serin, Fructose und Galactose). Es ist für mich ein Zeichen dafür, dass die N-Mangel induzierte Blattseneszenz ähnlich wie die Entwicklungs-induzierte Blattseneszenz (Breeze et al. 2001) ein koordinierter, regulierter, fortschreitender Prozeß ist, in dem die Integrität des Stoffwechsels erhalten bleibt, die Zellen vor einem plötzlichen Kollaps geschützt werden und die Nährstoffmobilisierung dadurch gewährleistet wird. Der Effekt der N-Zugabe zu N-Mangelpflanzen wurde 3 Stunden (h) und 3 Tage (d) nach N-Zugabe gemessen. Die N-Zugabe erfolgte nach 4d N-Mangel und nach 7d N-Mangel. Es sind nicht einfach 2 Zeitpunkte einer N-Zugabe- Kinetik und deshalb 2 relativ unabhängige Informationen aus ein und demselben Versuchssystem. Eine N-Zugabe zu N-Mangel Pflanzen bewirkt mit längerer Zugabe-Dauer einen stärkeren Effekt auf das Transkriptprofil der definierten Blätter. Das stimmt mit den Daten von Scheible et al. (2004) überein. Dort zeigte sich in *A. thaliana*-Keimlingen nach 3h N-Zugabe ein stärkerer Effekt auf das Transkriptprofil als nach 30 min N-Zugabe. Die Seneszenz-Hemmung ist in meinem System nach 3 Tagen N-Zugabe sehr deutlich, denn die Transkriptprofile dieser Blätter (N-Zugabe 3d) gruppieren sich zu denen der jüngsten Kontrollpflanzen. Diese Veränderung des Transkriptprofils hin zu einem „jungen“ Profil paßt zu einem höheren Chlorophyllgehalt (Abb. 6B) und PSII-Effizienz (Abb. 6C) der N-Zugabe 3d-Blätter im Vergleich zur zeitgleichen N-Mangel-Kontrollgruppe (-N 10d).

Auch der Gehalt an einigen Metaboliten ändert sich umgekehrt zum N-Mangel-Zustand. Das ist z.B. für Alanin, Glycin, Prolin und Fructose sehr deutlich (Tab. 14). Durch N-Zugabe kommt es also zu globalen, koordinierten und regulierten Veränderungen auf Transkriptebene, die eine Unterdrückung der Blattseneszenz anzeigen. Koordiniert mit den metabolischen Veränderungen bewirkt das eine physiologische „Verjüngung“ im Vergleich

zur gleichaltrigen N-Mangel Gruppe (10d -N). Transkriptom, Metabolom und Physiologie stehen wahrscheinlich über regulatorische Mechanismen in einem Ursache-Wirkungs Zusammenhang der unter N-Mangel eine Induktion der Blattseneszenz bewirkt. Dieses Prinzip gilt für Arabidopsis wahrscheinlich genauso wie für Gerste.

In der N-Mangel Kinetik waren in den 3 untersuchten Zeitpunkten (4d, 7d, 10d nach N-Entzug) eine relativ konstante Anzahl von Genen mindestens 3-fach induziert (Abb. 8B). Auf Transkriptebene zeigt sich eine deutliche Regulation, bevor es bedingt durch den N-Mangel zu einer Abnahme des Chlorophyllgehaltes und der PSII-Effizienz kommt (Abb. 6B, 6C, 6D). Im Vergleich mit den Daten aus dem von Buchanan-Wollaston et al. (2005) durchgeführten Transkriptom-Profiling der Entwicklungs-induzierten Blattseneszenz (E-S) sind nur weniger als 25% der in diesem Datensatz mindestens 3-fach induzierten SAG unter N-Mangel deutlich induziert. Das ist angesichts des deutlichen physiologischen Effekts auf Chlorophyllgehalt und PSII-Effizienz ein relativ schwacher Einfluss auf Transkriptebene. Wo liegen die Gründe dafür? Ein Aspekt der die Interpretation dieses Unterschieds schwierig macht ist, dass die Regulationsprofile von Pflanzen aus unterschiedlichen experimentellen Systemen stammen. Ich vergleiche Daten aus unterschiedlichen Gewächshausbedingungen und Erde/Hydrokultur-Anzucht. Außerdem wurden Transkriptprofile unterschiedlicher Blätter gemessen -Blatt 1 und 2 in meinem System und wahrscheinlich spätere (nicht genauer beschriebene) Blätter in Buchanan-Wollaston et al. (2005). Vergleicht man die induzierten Gene der 3 Zeitpunkte untereinander, zeigt sich eine starke Dynamik innerhalb der induzierten Gene (Abb. 8C). Nur eine Minderheit von 81 Genen ist kontinuierlich induziert. Darunter befinden sich 54 SAG.

Eine relativ schwache Induktion von SAG durch N-Mangel auf der einen Seite und starke Effekte auf Chlorophyllgehalt und PSII-Effizienz auf der anderen Seite. Wie paßt das zusammen? Die Blattseneszenz ist ein energieabhängiger, aktiver Prozeß der mit einer Veränderung von Transkriptleveln verbunden ist. Teil dieser Veränderungen ist die Induktion von SAG, die in der N-Mangel induzierten Blattseneszenz deutlich schwächer ausfällt als in der E-S. Bei Buchanan-Wollaston et al. (2005) wurde der Entwicklungs / Alterungs-Effekt auf das Transkriptom vermessen. Das Transkriptprofil von jungen Blättern wurde mit den Transkriptprofil älterer Blätter verglichen. Im N-Mangel-System werden Blätter gleichen, fortschreitenden Alters miteinander verglichen. Dabei wird der N-Effekt gemessen, der zusätzlich zur fortlaufenden Blattalterung dazu kommt. Das ist ein wichtiger Unterschied.

Was bisher noch nicht quantifiziert werden konnte ist, ob und wie stark eine Induktion von SAG auf Transkriptebene die Blattseneszenz beschleunigt. Dazu bräuchte man eine Pflanze, z.B. eine *A. thaliana*-Mutante, die keine Induktion von SAG zeigt – ein Gedankenexperiment. Reflektieren die Transkriptlevel auch unter N-Mangel im gleichen Verhältnis die dazugehörigen Proteinlevel wie in Baerenfaller et al. (2008) beschrieben? Oder gibt es in den Zellen vielleicht eine Art Spar-Programm in dem unter N-Mangel auch N-haltige mRNA-Moleküle rationiert werden? Messe ich deshalb eine relativ schwache Induktion von SAG? Um diese Fragen zu beantworten müßte man Transkriptlevel und Protein-Level von SAG wie in Baerenfaller et al. (2008) beschrieben unter N-Mangel, miteinander vergleichen.

Auch eine Überrepräsentationsanalyse mittels PageMan gibt wenig Aufschluss (Abb. 12). Durch N-Mangel werden Gene des Flavonoid-Stoffwechsels induziert. Dieser N-Mangel Effekt wurde auch in Scheible et al. (2004) beschrieben und ist eher kein Effekt der einen starken Einfluss auf den Verlauf der Blattseneszenz hat. Diaz et al. (2006) konnten durch Vererbungsanalysen keinen starken Zusammenhang zwischen den Flavonoid-abhängig Produzierten Schutzpigmenten und der Blattseneszenz aufzeigen. Sonst zeigen sich keine

kontinuierlichen, starken Effekte auf eine funktionelle Kategorie (MapMan BIN, Thimm et al. 2004). In der N-Mangel Kinetik waren in den 3 untersuchten Zeitpunkten (4d, 7d, 10d nach N-Entzug) eine ansteigende Anzahl von Genen mindestens 3-fach reprimiert (Abb. 9B). Die Anzahl der SDG blieb dagegen relativ konstant. Auch hier sind nur etwa ein Drittel der SDG aus den Daten der E-S (Buchanan-Wollaston et al. 2005) im Vergleich zur Kontrolle (+N) deutlich reprimiert. Auf Transkriptebene zeigt sich ebenfalls eine deutliche Regulation bevor es zu einer Reaktion des Chlorophyllgehaltes und der PSII-Effizienz kommt (Abb. 6B, 6C). Anders als bei der konstanten Anzahl der N-Mangel induzierten Gene (Abb. 8B), spiegeln sich die fortschreitenden physiologischen Veränderungen in der zunehmenden Anzahl der reprimierten Gene wieder (Abb. 9B). Der Vergleich der N-Mangel reprimierten Gene der 3 untersuchten Zeitpunkte zeigt, wie bei den N-Mangel induzierten Genen, eine starke Dynamik innerhalb der N-Mangel Kinetik (Abb. 9C). Unter den 183 durchgehend N-Mangel reprimierten Genen befinden sich 104 SDG. Im Wesentlichen lassen sich auch hier die Betrachtungen aufführen, die ich zu den N-Mangel induzierten Genen gemacht habe. Auch hier gilt das Problem bei der Interpretation, dass die Daten aus verschiedenen Kultursystemen und Blättern stammen. Auch hier wird der zusätzliche N-Mangel-Effekt gemessen, der parallel zur Entwicklung/ Alterung der Blätter wirkt. Ebenso wenig ist bekannt, wie stark eine Repression von SDG auf Transkriptebene die Blattseneszenz beschleunigt. Reflektiert der Transkriptlevel von SDG unter N-Mangel im gleichen Verhältnis den dazugehörigen Proteinlevel? Das bleibt aufzuklären.

Eine Überrepräsentationsanalyse der N-Mangel reprimierten Gene mittels PageMan zeigt, dass es im Regulationseffekt viele Ähnlichkeiten zur E-S gibt (Abb. 12). Es gibt nur wenige funktionelle Gengruppen (BIN), in denen sich konsequente Unterschiede zeigen. Dazu gehören Glutaredoxine und misc. Gluco-, Galacto- und Mannosidasen, die nur unter N-Mangel überrepräsentiert sind. Der Blattseneszenz-induzierende Effekt durch N-Mangel zeigt sich in der PageMan-Analyse deutlich in der Repression von Genen, die auch in der E-S reprimiert sind. Dazu gehören viele Gene die für die Funktion der Chloroplasten wichtig sind (Photosynthese, Chlorophyllsynthese und plastidäre ribosomale Proteine). Chloroplastenfunktionen werden unter N-Mangel transkriptionell unterdrückt, was die Seneszenz-assoziierte N-Mobilisierung wahrscheinlich fördert. Das ist für mich ein deutliches Zeichen, dass N-abhängige Signalprozesse Signalwege induzieren, die auch in der E-S wirken. Das bedeutet, dass der Seneszenz-Prozess unter N-Mangel wahrscheinlich eine modifizierte Form der E-S darstellt (und umgekehrt) und dass N-Mangel-Signale wahrscheinlich über regulatorische Faktoren wirken, die auch in der E-S wirken.

Die N-Zugabe zeigt nach 3 Stunden und noch stärker nach 3 Tagen deutliche Effekte auf das Transkriptprofil der untersuchten Blätter (Abb. 10B, 10C). Mit zunehmender Dauer nach N-Zugabe ist eine zunehmende Anzahl seneszenzregulierter Gene (SAG, SDG) und nicht seneszenzregulierter Gene (no SAG, no SDG) in ihrer Expression verändert. Vergleicht man die induzierten und reprimierten Gene der zwei Messpunkte miteinander, zeigt sich analog zum N-Mangel Effekt ebenfalls eine starke Dynamik (Abb. 10D, 10E). Von den N-Zugabe induzierten Genen sind nur 78 Gene (Abb. 10D) in beiden Datensätzen induziert. Eine nur geringfügig größere Übereinstimmung zeigt sich bei den N-Zugabe reprimierten Genen. Dort sind von den N-Zugabe reprimierten Genen 93 Gene, (Abb. 10D) in beiden Datensätzen reprimiert. Diese, in beiden Gruppen gleichsinnig regulierten Genen, zählen zu über 50% zu den seneszenzregulierten Genen (SAG bzw. SDG) (Buchanan-Wollaston et al. 2005). N-abhängige Signale bewirken also eine schnelle und anhaltende Repression bestimmter SAG

und eine Induktion bestimmter SDG. Das ist für mich ein konkreter Hinweis auf Verbindungen zwischen N-Signalwegen und Blattseneszenz-Signalwegen.

Die Überrepräsentationsanalyse der N-Zugabe induzierten Gene mittels PageMan zeigt, dass Glutaredoxine nach 3h und 3d N-Zugabe überrepräsentiert sind. Das scheint ein N-spezifischer Effekt zu sein, da Glutaredoxine in der E-S nicht überrepräsentiert sind. Das gleiche trifft auch für die Gene der Gluco-, Galacto- und Mannosidasen zu. Interessant ist das globale Überrepräsentations-Muster nach 3d N-Zugabe. Es ist im wesentlichen ein Spiegelbild des Zustandes unter N-Mangel Bedingungen und betrifft vor allem Gene, die für die Photosynthese bzw. für die Funktion des Chloroplasten wichtig sind (ribosomale Proteine der Chloroplasten). Viele dieser Gene sind dazu noch in der E-S reprimiert. Hier zeigt sich wieder der Effekt der N-Zugabe auf Blattseneszenz-regulierte Prozesse. Für mich ist das ein weiterer Hinweis, dass es eine Verbindung von N-Signalen in Blattseneszenz-Signalwege gibt.

Eine Überrepräsentationsanalyse der N-Zugabe reprimierten Gene mittels PageMan zeigt, in 3 funktionellen Genklassen (BIN) Übereinstimmungen zwischen 3h und 3d N-Zugabe. Gene der Flavonoidmetabolismus werden schnell und nachhaltig durch N-Zugabe reprimiert. Genau diese Gene waren vorher unter N-Mangel induziert. Weitere Übereinstimmungen zeigen sich in Calcium-Signalprozessen und der BIN „development bzw. development unspecified“, die unter N-Mangel nicht überproportional induziert waren. Die Regulation von Calcium-Signalprozessen und Genen der BIN „development“ sind Muster, die sich speziell unter N-Zugabe zeigen.

Die Venn-Analysen der N-Mangelkinetik (Abb. 8C, 9C) und N-Zugabe (Abb. 10 D, E) zeigen, dass es viele transiente, Zeitpunkt-spezifische Regulationsmuster gibt. Warum ist das so? Und warum erzeugt N-Zugabe zu N-Mangel-Pflanzen in den untersuchten Blättern keine einfache Umkehrung der Regulationsmuster (Abb. 11)? Blätter sind keine einfachen Systeme wie ein Metronom, die zwischen den Zuständen „N-Mangel“ und „Nicht-N-Mangel“ hin und her schwingen. Die zugrundeliegenden regulatorischen Mechanismen, die die N-abhängigen Regulationsmuster auf Transkriptebene erzeugen (Abb. 11) sind wahrscheinlich sehr komplex. Die regulatorischen Mechanismen werden wahrscheinlich auch von den Parametern Blattalter und Zeitspanne nach N-Entzug und N-Zugabe beeinflusst. Durch die Kombination dieser Parameter werden viele Zeitpunkt-spezifische N-abhängige Regulationsmuster erzeugt.

4.2.2 Modul 2 und 3

Die Analysen der Transkriptprofile in Modul 1 filterten Gene heraus, deren Transkriptlevel unter N-Mangel und/oder N-Zugabe Reaktionen zeigten (Abb. 8B, 9B, 10B, 10C). Die Übereinstimmungen mit den von Buchanon-Wollaston et al. (2005) publizierten Transkript-Profilen zur Entwicklungs-induzierten Blattseneszenz (E-S) (SAG und SDG) bestätigen physiologische Daten (Abb. 6B, 6C, 6D), dass N-Mangel zur Induktion von Blattseneszenz führt, und diese Induktion durch N-Zugabe wieder gehemmt werden kann.

Die Frage die sich dann stellt ist: Wie passiert das? Eine Hilfe zur Beantwortung dieser Frage sind die öffentlich Zugänglichen Datenbanken in denen viele ATH1 Datensätze gespeichert sind (z.B. GEO gene expression omnibus) und mit denen man die eigenen Daten abgleichen kann, um Muster zu finden. Diese Hilfe ist auch eine Herausforderung, denn die Datenmassen sind sehr groß und meine bioinformatischen Möglichkeiten begrenzt. Ich brauche also gute Marker, die mir bei der Auswahl geeigneter ATH1-Datensätze helfen.

Um diese Marker zu finden, bin ich wieder zu meinem Ausgangspunkt gegangen und habe mich gefragt: Wie reguliert N-Verfügbarkeit die Blattseneszenz? Es sind zwei Wege denkbar: 1. Weg: N-Verfügbarkeit reguliert Blattseneszenz über N-spezifische Signalprozesse. 2. Weg: N-Verfügbarkeit reguliert Blattseneszenz über Integration von N-Signalen in nicht N-spezifische Entwicklungs-Signalwege; als Bild so etwas wie ein „Signaltrichter“. Ich bin an dem Punkt noch einen Schritt zurück gegangen, um zu sehen durch welche Parameter außer Alter und Stickstoff die Blattseneszenz außerdem beeinflusst wird.

Die Entwicklung der Pflanze und ihrer Blätter findet in einer komplexen, sich dynamisch ändernden Umwelt statt, an der sich der pflanzliche Organismus kontinuierlich anpasst, und so am Leben bleibt. Die Blattseneszenz als letzter Schritt der Blattentwicklung, wird durch diverse endogene und exogene Parameter beeinflusst (Lim et al. 2007). Zu den wichtigen, auch landwirtschaftlich bedeutsamen Umweltgrößen gehören Wasserverfügbarkeit und Infektionskrankheiten. Ein drastischer Mangel an Wasser (abiotischer Streß, Rivero et al. 2007) und eine fortschreitende Infektion durch Pilze oder Bakterien (biotischer Streß, Swartzberg et al. 2008, Pontier et al. 1999) induziert, ähnlich zum N-Mangel (abiotischer Streß, Wingler et al. 2005, Gombert et al. 2006), ebenfalls Blattseneszenz. Dieser Trockenstress und Pathogen – induzierten Blattseneszenz liegen ebenfalls molekulare Prozesse zugrunde, die sich auf Transkriptionsebene widerspiegeln. Die zur Filterung genutzten Datensätze zum Trockenstress (TS) (Harb et al. 2010) und zur Infektion durch den Pilz *Botrytis cinerea* (Bc) und das Bakterium *Pseudomonas syringae* (Ps) (AtGenexpress-Projekt) habe ich aufgrund von Übereinstimmungen des Regulationsprofils zur Entwicklungs-induzierten Seneszenz (Buchanan-Wollaston et al. 2005) ausgewählt (Abb. 13A, 13B). In dem entsprechenden Blattmaterial wurden mehr als 200 SAG induziert bzw. SDG reprimiert (Abb.13A,13B). Das sind deutliche molekulare Seneszenzphänotypen. Die Regulationsprofile genau dieser Datensätzen zeigen außerdem eine Blattseneszenz-typische Repression von Photosynthese-Genen unter Trockenstress, 48 Stunden Inokulation mit Bc und 24 Stunden Inokulation mit Ps (Abb.13C).

In Modul 2 und 3 habe ich eine Strategie entworfen, wie ich aus meinen ATH1 Daten Hinweise herausfiltern will, die mir erklären, wie N-Zugabe abhängige Signale auf die Regulation der Blattseneszenz wirken. Ich habe dadurch 2 Sets an Zielgenen herausgefiltert. Ein Set putativer Zielgene N-spezifischer Signalkanäle (Tab. 1, 2) und ein Set putativer Zielgene Signal-integrierender Signalkanäle (Tab. 3, 4). Aus diesen Zielgenen habe ich Markergene bestimmt (Tab. 5, 6, 7, 8), die ich später in Modul 4 für weiterführende Datenbank-Recherchen eingesetzt habe.

4.2.3 Funktionelle Betrachtung der Markergene

Nachdem ich in Modul 3 aus den globalen Daten die einzelnen Markergene gefiltert habe, habe ich die öffentlich zugänglichen Datenbanken nach Informationen zur funktionellen Bedeutung der einzelnen Gene durchsucht. Ich habe dabei vor allem die Informationen auf TAIR (www.arabidopsis.org) und PUBMED (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) gesichtet.

Im folgenden werden Markergene diskutiert, die eine N-Zugabe spezifische Regulation zeigen. Es sind deshalb putative Zielgene N-spezifischer Signalkanäle.

Unter den 7 N-spezifisch induzierten TF befinden sich 5 Kandidaten, mit mehr oder weniger charakterisierter Funktion (Tabelle 5). LBD 37 und LBD39 sind N-spezifische Transkriptions-Repressoren mit regulatorischer Funktion in der Anthocyan-Biosynthese und N-Stoffwechselwegen (Rubin et al. 2009). Zu den Zielgenen dieser LBD TF gehören die in Tabelle 6 enthaltenen, N-spezifisch reprimierten Gene NF-YA 10, TTG2, TT8, GLN1.4 und ATNRT 2.5. Die Einordnung dieser Markergene in die Listen der N-spezifisch regulierten Gene (Tabelle 5 und 6) bestätigt für mich die Funktionalität des Filterkonzeptes und die Zuverlässigkeit der standardisierten Hydrokultur und der durchgeführten ATH1-Messungen. Ein weiteres N-spezifisches Markergen ist ATCOL5. Eine Überexpression von COL5 zeigt einen Blühphänotyp unter Kurztagsbedingungen (Hassidim et al. 2009). Eine Charakterisierung der Überexpressionslinie bezüglich eines Seneszenzphänotyps oder eines N-Stoffwechselphänotyps wurde nicht durchgeführt. So bleibt eine Funktion von COL5 für den N-Haushalt der Pflanze noch abzuklären. Für at1g25550 stehen noch keine Informationen über die Funktion des Gens zur Verfügung.

Drei der N-Zugabe induzierten TF (at4g37180, RVE2 und SNZ) sind zwar nicht wie von den Filterwerten begrenzt unter TS und Pathogenbefall reprimiert, allerdings sind at4g37180 und RVE2 unter Ps-Infektion induziert und SNZ unter TS induziert. Aufgrund dieser Abweichungen sind diese drei TF (at4g37180, RVE2 und SNZ) und auch die Gene at3g19030 und at1g03220 keine N-spezifischen Markergene.

Zu den N-spezifisch induzierten Markergenen gehört GLT1. Das im Gen GLT1 kodierte Enzym, die NADH-GOGAT, ist für die Chlorophyllsynthese von Bedeutung (Lancien et al. 2002). Zusätzlich zeigt eine glt1-KO Mutante bei gehemmter Photorespiration ein deutlich reduzierte Glutamin/Glutamat Umwandlung und einen Zwergphänotyp. CIPK3 wird als putativer Crosstalk Faktor von ABA-abhängigen und – unabhängigen Signalwegen beschrieben (Kim et al. 2003). Zur N- oder Seneszenz-Funktion von CIPK3 gibt es noch keine Informationen. PP2C, WNK7, at5g10540, at1g22500 zeigen eine N-spezifische Regulation, sind aber bisher nicht funktionell Charakterisiert worden. SNG1 ist eine Serin-Carboxypeptidase die an der Sinapoylmalat-Bildung beteiligt ist (Lehfeldt et al. 2000). Sinapoylmalat ist ein Sekundärmetabolit der eine Schutzfunktion vor UVB-Strahlung hat. LBD37, SNG1 und at5g10540 sind zusätzlich in der Entwicklungs-induzierten Seneszenz stark reprimiert. Diese 3 Gene zeigen mir, dass es in der Entwicklungs-induzierten Seneszenz auf Transkriptebeine zu einer selektiven Regulation bestimmter N-spezifischer Prozesse kommt.

Unter den diskutierten, spezifisch N-regulierten Markergenen befinden sich mit LBD 37, LBD39 und GLT1 Gene, bei denen eine Schlüsselfunktion im N-Haushalt nachgewiesen werden konnte. Diese Gene könnten deshalb auch eine Blattseneszenz-Funktion besitzen. Bei den weiteren Markergenen vermute ich aufgrund ihres Regulationsprofils deshalb ebenfalls eine Blattseneszenz-Funktion.

Unter den 8 N-spezifisch reprimierten TF befinden sich 3 TF (NF-YA10, TTG2 und TT8), die durch LBD 37 und LBD39 reprimiert werden (Tab. 6). Für TTG2 und TT8 ist bekannt, dass sie eine induzierende Funktion in der Anthocyan-Synthese haben (Johnson et al. 2002, Nesi et al. 2000). NF-YA10 ist ein Zielgen der microRNA 169 (Li et al. 2010). Eine N-relevante regulatorische Funktion von NF-YA10, at2g38090, at5g28300, at2g37260, at4g09820, at3g19380, at4g22770 und at5g10770 wurde noch nicht beschrieben.

Zu den Markergenen gehören GLN1.1 und GLN1.4. Beides sind cytosolische Isoformen der Glutaminsynthetase und katalysieren die Assimilation von anorganischem Stickstoff

(Ishiyama et al. 2004). Beide Gene sind unter N-Mangel und N-Zugabe stark reguliert und zeigen zusätzlich eine Induktion in der E-S. Für das Enzym GLN1.4 aus Mais wurde gezeigt, dass es wichtig für die Ertragsbildung ist (Martin et al. 2006). GDH-Enzyme haben eine wichtige Funktion im N-Recycling. GDH3 spielt wahrscheinlich eher eine untergeordnete Rolle, da eine Doppel KO Mutante von GDH1 und GDH2 kaum enzymatische Restaktivität ausweist (Miyashita und Good 2008). AAP4 ist eine Breitspektrum-Aminosäure-Permease, die vor allem kleine und neutrale Aminosäuren wie Alanin, Asparagin und Glutamin transportiert (Fischer et al. 2002). ATNRT2.5 ist ein schwach exprimierter Nitrattransporter, der wahrscheinlich bei der Umverteilung zellinterner Nitratressourcen eine Rolle spielt (Orsel et al. 2004). Über die Funktion von ACR7 (Hsieh und Goodman 2002) und YSL6 (Curie et al. 2009) gibt es Vermutungen über Vergleiche mit bereits charakterisierten Proteinen. Über die Funktion von at1g15410, at4g22780, at5g41400, at3g27020 und at3g13620 gibt es noch keine veröffentlichten Untersuchungen.

GLN1.1, GLN1.4, ACR7, AAP4 und ATNRT2.5 sind SAG und für mich weitere Beispiele dafür, dass in der Entwicklungs-induzierten Seneszenz auf Transkriptebene bestimmte N-spezifische Signalprozesse wirken.

Im folgenden werden Markergene diskutiert, die eine entgegengesetzte Regulation unter N-Zugabe, Trockenstress und Pathogeninfektion zeigen. Es sind deshalb putative Zielgene Signal-integrierender Signalkanäle.

Zu den Signal-integriert-N-induzierten Markergenen gehören 6 TF (Tab. 7). Zu BEE2 ist bekannt, dass es ein positiver Regulator von Brassinosteroid Signalwegen ist (Friedrichsen et al. 2002). Die bee1/bee2/bee3 Tripel-Mutante ist kleiner als der Wildtyp und weniger Brassinosteroid empfindlich. Zur Seneszenz- oder N-Funktion von BEE2, at4g17460, at2g18300, at4g36540, at1g76110, at4g38160 und at1g09750 existieren noch keine veröffentlichten Daten.

In der Gruppe der Signal-integriert-N-induzierten Markergene (Tab. 7) finden sich einige Gene mit einem starken Einfluß auf die Photosynthese und damit wichtiger Funktion für Blattseneszenz und N-Stoffwechsel der Pflanze. NDF4 (Takabayashi et al. 2009), LHCA6 (Peng et al. 2009) und PQL2 (Suorsa et al. 2010) sind kernlokalisierte Gene, die Untereinheiten des NDH-Komplexes in den Thylakoid-Membranen kodieren. Sie sind wichtig für den zyklischen Elektronentransport um Photosystem I und damit essentiell für eine effiziente Photosynthese (Munekage et al. 2004). CCR1 ist ein kernlokalisiertes Gen, das ein plastidäres Protein kodiert und ebenfalls ein wichtiger Faktor des zyklischen Elektronentransport ist. Ein Knock out des Gens CCR1 bewirkt eine starke Verringerung der Menge des NDH-Komplexes (Shimizu und Shikanai 2007).

CPN60B1 kodiert ein Chaperon und wichtig für die Chloroplastenentwicklung (Suzuki et al. 2009). CPN60B1-KO Mutanten (*len1*) haben einen Zwergphänotyp und zeigen unter Kurztagsbedingungen spontane Blattläsionen (Ishikawa 2005). CHL11 und CHL12 kodieren Untereinheiten der Magnesium Chelatase und sind essentiell für die Chlorophyllsynthese (Huang und Li 2009). CHL11 ist deutlich stärker exprimiert als CHL12. Eine Doppel-knock out der beiden Gene hat einen Albino-Phänotyp und zeigt einen genomes uncoupled, kurz gun - Phänotyp. Das bedeutet, dass bei dieser Mutante die Kommunikation zwischen Chloroplasten und Zellkern gestört ist (Ankele et al. 2007). Das Gen CHLM ist ebenfalls essentiell für die Chlorophyllsynthese und ein knock out des Gens bewirkt einen Albino-Phänotyp (Pontier et al. 2007). Durch Ausschalten des CHLM-Gens wird auch die Akkumulation der Thylakoidproteine stark unterdrückt. Das bedeutet, dass ein großer Teil

der zellulären N-Immobilisierung in Form von Enzymkomplexen der Thylakoidmembrane, direkt von der Expression von CHLM abhängig ist. Eine Repression von CHLM durch N-Mangel kann also eine Mobilisierung des Chloroplasten-N bewirken. Ein weiteres wichtiges Gen der Chlorophyllsynthese ist PORB. PORB ist funktionell redundant mit PORC und ein Doppel-knock out der beiden Gene erzeugt eine Albinomutation (Frick et al. 2003). Zur physiologischen Funktion der weiteren Kandidaten in der Liste (PSBTN, PSRP-3, RPL4, IF-3, SHA1 und ATFKBP13) gibt es noch keine veröffentlichten Daten.

Die Liste Signal-integriert-N-reprimierter Gene (Tab. 8) besteht komplett aus SAG (Buchanan-Wollaston et al. 2005) und enthält vor allem (Arabidopsis-) NAC-TF (ANAC-TF). Zu den TF at1g48000, ANAC047 und ANAC032 gibt es noch keine funktionellen Untersuchungen. ANAC019 ist bisher als Regulator des ABA-unabhängigen Systems der Trockenstress-Regulation beschrieben. Eine Überexpressionslinie zeigt eine erhöhte Trockenstress-Toleranz (Tran et al. 2004). Zu ANAC019 gibt noch keine Daten zur Seneszenz- oder N-Funktion. ANAC029 ist ein TF mit Seneszenzfunktion (Guo et al. 2006). Ein Knock out bewirkt eine verzögerte, eine Überexpression eine beschleunigte Seneszenz. Der Seneszenzeffekt wurde anhand des Blattchlorophylls, der PSII-Effizienz und molekular anhand der Expression von SAG12 und RBCS nachgewiesen. Daten zu weiteren ANAC029-Zielgenen oder zum Effekt auf den N-Stoffwechsel sind bisher nicht veröffentlicht. ANAC092 ist der bisher am besten untersuchte TF dieser Liste. ANAC092 besitzt wie ANAC029 eine seneszenzinduzierende Funktion, was anhand der Abnahme des Blattchlorophylls und der PSII-Effizienz nachgewiesen wurde (Kim et al. 2009, Balazadeh et al. 2010). Zu RAP2.6L ist bisher bekannt, dass eine Überexpression die Trockenstress-Toleranz der Pflanze erhöht und eine frühe Blüte bewirkt (Krishnaswamy et al. 2011). Zu RAP2.6L gibt noch keine Daten zur Seneszenz- oder N-Funktion. Zu den Signal-integriert-N-reprimierten Genen gehört ATBCAT2. Dieses Gen kodiert eine seneszenzinduzierte, plastidäre Aminotransferase, die eine Hefe Leu/iso-Leu/Val Auxotrophie-Mutante komplementieren kann (Diebold et al. 2002). Dieses Enzym könnte an der seneszenzinduzierten Stickstoff-Mobilisierung mitwirken. Zur physiologischen Funktion des Enzyms gibt es allerdings noch keine weiteren Informationen. Zur Funktion von at5g34780, at4g32250 und at1g63840 existieren noch keine veröffentlichten Daten.

Es stellte sich heraus, dass nur zu wenigen Genen der Tabellen 5,6,7 und 8 funktionelle Untersuchungen stattgefunden haben. Die Markergene wurden in Modul 4 für weiterführende Datenbank-Recherchen genutzt, können aber auch für Mutations-Experimente eingesetzt werden. Aufgrund der biochemische Funktion und Regulationsmuster der Markergene vermute ich, dass Knock-Out oder Überexpressions-Mutanten dieser Gene einen N-Mangel-Blattseneszenz-Phänotypen haben können. Die Frage, ob die einzelnen Markergene tatsächlich eine solche biochemische Bedeutung für die Blattseneszenz haben, lässt sich nur mit weiteren Experimenten klären. Die meisten Untersuchungen gab es bisher zu Proteinen der Photosynthese und zu Transkriptionsfaktoren. Bis auf CHLM gibt es bei keinem der untersuchten Gene durch Knock-Out eines einzelnen Gens einen extremen Phänotyp. Das liegt in einigen Fällen daran, dass es sich um Proteine mit untergeordneter Funktion handelt (ATNRT2.5: Orsel et al. 2007; GDH3: Miyashita und Good 2007) oder weil funktionell redundante Proteine existieren (PORB und PORC: Frick et al. 2003).

Während die Liste der Signal-integriert-N-reprimierte Markergene von den ANAC TF dominiert ist (Tab 8), sind in der Liste der Signal-integriert-N-induzierten Markergene (Tab. 7) vor allem Gene zu finden, die essentiell für die Funktionalität der Chloroplasten und für die

Photosynthese sind. Bis auf PQL2 sind alle Signal-integriert-N-induzierte Markergene in der E-S stark reprimiert. In den Chloroplasten sind über 75% des zellulären Stickstoff in Form der Proteine der Thylakoide und des Stroma immobilisiert. Dieser Zustand bleibt solange bestehen, wie durch permanente Zellkern-abhängige Proteinsynthese Abbau-Verluste der Chloroplasten ausgeglichen werden. Die Steuerung der kernkodierten Plastidenproteine stellt für mich einen zentralen, regulatorischen Mechanismus der Verteilung der zellulären N-Ressourcen dar. Über diesen Mechanismus wird in Abhängigkeit vom Blattalter (E-S), oder Stickstoffversorgung die Mobilisierung der zellulären N-Ressourcen gesteuert (Tab. 7). Die NAC-TF sind dazu mit ihrem entgegengesetzten regulatorischen Profil (Tab.8) Schlüsselfaktoren, die diese Blattseneszenz-abhängige Ressourcenverteilung beschleunigen (ANAC029: Guo et al. 2006 und ANAC092: Kim et al. 2009) und diesen Prozeß gleichzeitig durch Induktion von Schutzmechanismen absichern könnten (ANAC019: Tran et al. 2004). Eine direkte regulatorische Wirkung der ANAC-TF auf Photosynthesegene ist bisher nicht beschrieben. Eine methodische Strategie das nachzuweisen, wäre ein Blattseneszenz-Transkriptprofiling von Arabidopsis-Pflanzen unter N-Mangel mit einem gezielten, chemisch induzierbaren Knock-down einzelner oder mehrerer Markergene-ANAC-TF (Tab. 8).

4.2.4 Modul 4

In Modul 4 habe ich anhand von Markergenen nach Hinweisen gesucht, welche Signalprozesse verantwortlich sind, daß N-Mangel Blattseneszenz auslöst. Für putative Signal-integrierende Signalkanäle habe ich solche Hinweise in Form von Co-Expressionsmustern gefunden, für N-spezifische Signalkanäle nicht. Woran kann das liegen? Für N-Signalprozesse gibt es relativ wenige ATH1-Datensätze in den Datenbanken. Das verringert die Chance solche Co-Expressionsmuster zu finden von vornherein. Ich vermute, daß sich diese Tatsache in Zukunft ändert, wenn mehr Daten über N-Signale im Blattmaterial publiziert werden. Die putativen Zielgene Signal-integrierender Signalkanäle sind für mich auch die interessanteren Markergene, denn sie sind im Gegensatz zu den N-spezifischen Markergenen fast alle in der E-S reguliert und deuten deshalb auf Verbindungen zu regulatorischen Prozessen der Blattseneszenz. Die Regulation der Markergene in der E-S war in keinem Modul ein Filterkriterium, aber ich habe anhand meiner Filterung mittels Datensätzen der Trockenstress-und Pathogen-induzierten Blattseneszenz effektiv Entwicklungs-regulierte Gene isoliert (Tab. 7, 8). Mit den Signal-integriert-N-regulierten Markergenen habe ich also gute Blattseneszenz-Markergene die durch N-Zugabe induziert (SDG) oder reprimiert (SAG) werden. Mit diesen Markergenen habe ich Wegweiser-Datensätze gefunden. Der Effekt der Filterung der Signal-integriert-N-regulierten Markergene in Modul 3 findet sich in co-Expressionsmustern der Wegweiser-Datensätze wieder (Abb.14 A). Die N-spezifisch-regulierten Markergene zeigen in den Wegweiser Datensätzen keine ausgeprägten co-Regulationsmuster (Abb.14 B). Die Filterung in Modul 3 und die dadurch festgelegte Einteilung in putative Zielgene N-spezifischer und Signal-integrierender Signalkanäle bestätigt sich in den Wegweiser Datensätzen. Es zeigen sich vereinzelt Regulationsprozesse N-spezifischer Markergene in den Wegweiser-Datensätzen (Abb. 14B). Das könnte bedeuten, daß die experimentellen Bedingungen der Wegweiser-Datensätze Veränderungen des N-Metabolismus auslösen, die dann ihrerseits Signalgeber N-spezifischer Regulationsprozesse sind. Es könnte auch bedeuten, daß die Filterkriterien

für N-spezifisch regulierte Markergene zu schwach sind, um tatsächlich nur N-spezifisch regulierte Markergene zu isolieren.

Für einen Teil der Wegweiser-Datensätze habe ich überprüft wie hoch der Anteil von N-Zugabe/E-S regulierten Genen an den jeweiligen Regulationsprozessen ist und habe eine Übereinstimmung von mindestens 1/3 gefunden (Abb. 15C, 15D). Finde ich in dem von mir willkürlich ausgesuchten trans-Zeatin Datensatz gleich große Verhältnisse an N oder N/E-S regulierten Genen wie in den Wegweiser-Datensätzen? Wenn ja, dann ist meine Filter-Strategie nicht effektiv und die co-Regulations-Übereinstimmungen in den Wegweiser-Datensätzen eher zufällig. Das scheint nicht der Fall zu sein. Der Anteil der Übereinstimmungen von über 1/3 in den Wegweiser-Datensätzen war vor allem bei den N-Zugabe induzierten Genen höher als in dem von mir willkürlich ausgesuchten trans-Zeatin Datensatz (Abb. 15D).

Die Transkriptlevel sind ein Spiegelbild der zugrunde liegenden Regulationsprozesse. Sind die Übereinstimmungen der Transkript-Regulationsmuster in den Wegweiser- und N-Zugabe Datensätzen groß, schliesse ich daraus, daß es bei den zugrunde liegenden Regulationsprozessen Gemeinsamkeiten gibt. Ich habe durch die Wegweiser-Datensätze also Hinweise bekommen, daß das N-Zugabe Signal eine Wirkung auf E-S regulierte Gene über Signalprozesse bekommt, in die auch ROS-abhängige Signale (flu/tAPX und flu:Laloi et al. 2006; Ozon: Short et al. 2005; gun5/Norflurazon: Koussevitzky et al. 2007) integriert werden. Dass es einen Zusammenhang zwischen N-Mangel induzierter Blattseneszenz und ABA-Signalen gibt, konnte bereits anhand einer *abi5*-Mutante gezeigt werden (Pourtau et al. 2004). Einen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen N-Mangel induzierter Blattseneszenz und CO₂-Mangel (Bläsing et al. 2005) oder dem DOR-Gen (Zhang et al. 2008) ist bisher nicht veröffentlicht.

Das alles sind Hinweise und mein Anspruch daran ist, daß ich diese Hinweise nutzen kann, um neue Experimente zu entwerfen mit denen ich mehr Informationen über den Zusammenhang zwischen N-Signal und Blattseneszenz-Steuerung bekommen will. Wie könnten Experimente zur Bestätigung dieser Hinweise aussehen? N-Zugabe zeigt gemeinsame SDG-Zielgene mit *gun1*- und *gun5*-abhängigen Prozessen (Abb. 14A, 15D). Ich könnte also testen, ob *gun1*- oder *gun5*-KO-Mutanten eine verzögerte N-Mangel induzierte Blattseneszenz zeigen. Dann wüßte ich, ob N-Mangel über *gun1*- und *gun5*-abhängige Signalprozesse die Blattseneszenz beeinflusst.

Die Ergebnisse in Modul 4 weisen auf eine Verbindung zwischen N-Signalwegen und ROS-Signalwegen hin. Ist es wirklich Integration von ROS-Signalprozessen und nicht die Wirkung von ROS selbst? Es wurde gezeigt, daß unter N-Mangel mehr ROS produziert werden (Kovacic und Backor 2007, Criado et al. 2007). Es ist experimentell also nicht so einfach zwischen N-Zugabe-Wirkung, ROS-Signalwegen und ROS-Wirkung zu unterscheiden. Suche ich einen Weg Pflanzen robuster gegenüber N-Mangel induzierter Blattseneszenz zu machen, könnte es ohne Kenntnis der genauen Mechanismen gehen. Ich könnte versuchen in *A. thaliana* oder Gerste eine Mutation zu erzeugen, die unter N-Mangel einen erhöhten ROS-Abbau induziert, und so eventuell die N-Mangel-induzierte Blattseneszenz verzögern.

Ein weiterer Wegweiser-Datensatz zeigt Übereinstimmungen in Regulationsmustern zwischen N-Signalen und CO₂-Mangel (Abb. 14A). Diese Übereinstimmungen sind allerdings geringer als die zu ROS-Datensätzen (Abb. 15C, 15D) und über CO₂-Signaling ist sehr wenig bekannt (Hu et al. 2009). Ich könnte versuchen eine CO₂-Signaling Mutante auf einen N-Mangel-Blattseneszenz Phänotypen zu testen. CO₂-Mangel hat wahrscheinlich einen

Effekt auf die Kohlenhydrat-Synthese. Da bekannt ist, daß die N-Mangel induzierte Blattseneszenz auch vom C/N-Verhältnis der Metabolite abhängt, könnte ich unter kombiniertem CO₂-N-Mangel nicht zwischen C- und N-Effekt unterscheiden (Pourtau et al. 2006).

Die Ergebnisse in Modul 4 weisen auf einen Zusammenhang zwischen N-Mangel induzierter Blattseneszenz und dem DOR-Gen hin. Das DOR-Gen wird in den Schließzellen der Spaltöffnungen exprimiert (Zhang et al. 2008) und die Blattseneszenz ist ein Prozeß der besonders in den chloroplastenreichen Zellen des Schwamm- und Palisadenparenchym wirkt. Das ist eine konkrete räumliche Trennung. Wie passt das zusammen? Es weist auf eine neue Fragestellung: Wie wirkt die Regulation der nicht-seneszierenden Spaltöffnungen auf die Blattseneszenz? Hat der Verschluß der Spaltöffnungen eine Seneszenz-induzierende Wirkung? Es ist bekannt, daß sich die Spaltöffnungen in der Blattseneszenz (Wardle und Short 1983) und unter N-Mangel eher schließen (Guo et al. 2003). Ob es einen funktionellen Zusammenhang zwischen N-Mangel, Spaltöffnungen und Blattseneszenz-Regulation gibt, bleibt noch aufzuklären.

4.2.5 Das Signalkanal-Modell

Ich habe aus den Hinweisen die ich auf Transkriptebene gefunden habe, ein Modell konstruiert, das diese Ideen repräsentiert (Abb 19). Ich habe mich für das Modell einer Zelle entschieden, denn die Zelle ist praktisch die kleinste Einheit des Lebens und deshalb auch die kleinste Einheit der Blattseneszenz. Ein großer Teil der dynamischen molekularen Prozesse der Zelle ist noch unbekannt. Von diesem unbekanntem interessiert mich der Teil der Signalverarbeitung: Wie werden N-abhängige Signalprozesse weitergeleitet und bekommen so einen Einfluß auf den Entwicklungsverlauf der Zelle bzw. des Blattes? Das Signalnetzwerk der Zelle wird durch das Gitternetzwerk des Modells repräsentiert. In diesem Netzwerk gibt es Proteine die N-Sensoren sind und die zellulären Level z.B. von Nitrat, Ammonium und Aminosäuren detektieren. Wo und wie diese Detektion genau stattfindet ist bisher nur bruchstückhaft bekannt (Mas-Droux et al. 2006, Liu et al. 2008, Vidal et al. 2010). Ich setze voraus, dass es Signalprozesse gibt, die ausgehend von den Orten der N-Detektion einen Einfluß auf die Transkriptlevel von Zielgenen haben. Ich nenne diese Signalprozesse Signalkanäle. Die N-abhängigen Prozesse in diesen Signalkanälen werden durch den grünen Pfeil symbolisiert, der einen Teil des Signalnetzwerks der Zelle einschließt. Ich setze außerdem voraus, dass es N-spezifische Signalkanäle gibt. Alle Komponenten eines N-spezifischen Signalkanals befinden sich im Bereich des grünen Pfeils. Sie sind so etwas wie Informationstunnel zwischen dem Prozeß der N-Detektion und dem Regulations-Effekt auf den Transkriptlevel eines Zielgens. Diese Regulations-Effekte können über transkriptionelle oder post-transkriptionelle Regulation des Zielgens erfolgen. Eine zentrale Frage dieser Arbeit ist, ob diese Zielgene auch in der E-S reguliert sind. In Modul 2 und 3 habe ich durch die beschriebene Filterung 53 putative Zielgene als N-spezifisch induziert (Tab.1) und 80 putative Zielgene als N-spezifisch reprimiert (Tab. 2) identifiziert. Von diesen putativen Zielgenen sind weniger als 50% in der E-S reguliert (Abb. 19). Das ist auf der einen Seite ein Hinweis, dass es eine Verknüpfung von N-spezifischen Signalprozessen zu Entwicklungs-induzierten Signalprozessen gibt (N und SDG, N und SAG). Auf der anderen Seite scheint es Gene zu geben, die spezifisch durch Signalprozesse der N-induzierten Blattseneszenz reguliert werden (nur N). Die Regulation der Transkriptlevel von Zielgenen

kann in meinem Modell auch von einer zweiten Art Signalkanal reguliert werden. Diese zweite Art Signalkanal, die ich voraussetze sind Signal-integrierende Signalkanäle. In diese Kanäle werden N-abhängige Sensorsignale integriert. N-spezifische Signale stammen z.B. aus der Detektion von Nitrat, Ammonium und Aminosäuren und N-unspezifische Signale z.B. aus der Detektion von Kohlenhydraten, organischen Säuren und ROS. Diese Signale integrieren in gemeinsame Signalkanäle und bewirken eine Regulation der Transkriptlevel von N-abhängig regulierten Zielgenen. In Modul 2 und 3 habe ich durch die dort beschriebene Filterung 63 putative Zielgene als Signal-integriert-N-induziert (Tab. 3) und 31 putative Zielgene als Signal-integriert-N-reprimiert (Tab. 4) identifiziert. Von diesen Genen sind über 75% in der E-S reguliert (Abb. 19). Das ist zum einen ein Hinweis darauf, dass es eine starke Verknüpfung von Signal-integriert-N-regulierten Signalprozessen mit Regulationsprozessen der E-S geben könnte. Auf der anderen Seite könnte das auch erklären, warum eine Veränderung in den unterschiedlichen Umweltfaktoren N-Mangel, Trockenstress und Pathogen-Infektion (Modul 2 und 3) zu einer Induktion von Seneszenz-Prozessen im Blatt führt. Wie sind diese Signal-integrierenden Kanäle beschaffen? Darauf habe ich Hinweise aus den Venn Analysen in Modul 4. Diese Venn-Analysen weisen darauf hin, dass es integrierende molekulare Mechanismen geben könnte, über die N-abhängige Signale zusammen mit ROS-Signalen, Gun5-Signalen, ABA-Signalen und C-Signalen verarbeitet werden. Diese integrierten Signale haben wahrscheinlich einen Einfluß auf die Regulation der Blattseneszenz. Wie das im Detail funktioniert, bleibt aufzuklären. Wie wirkt eine Veränderung eines Transkriptlevel auf die Biochemie der Zelle und was hat das mit Seneszenz zu tun? Die Veränderung der Transkriptlevel von Zielgenen N-spezifischer und Signal-integrierender Signalkanäle bewirkt wahrscheinlich eine entsprechende Veränderung der Level der Proteine, die in den jeweilige Transkripten kodiert sind (Baerenfaller et al. 2008). Das bedeutet konkrete Veränderungen in der zellulären Proteinausstattung mit Veränderungen in Signal-, Enzym-, Transport- und Struktur-Funktion. Durch N-Mangel wird auf diesem Weg zelluläre Seneszenz und im Endeffekt Blattseneszenz ausgelöst. Eine Zugabe von N zu N-Mangel Pflanzen bewirkt wahrscheinlich eine weitgehende Umkehrung dieser Prozesse. Das wird besonders an den Transkriptleveln von Photosynthese-Genen deutlich. Zahlreiche Photosynthesegene werden durch N-Mangel reprimiert und durch N-Zugabe induziert (Abb. 12; Tab 7; Scheible et al.2004). Das hat sicher einen entscheidenden Einfluß ob und wie schnell die Chloroplasten, als Hauptziele des Seneszenzprozess in der einzelnen Zelle abgebaut werden. Hinter diesen N-abhängigen Regulationsprozesse stehen sicher komplexe, weitgehend unbekannte molekulare Mechanismen, die noch aufzuklären sind.

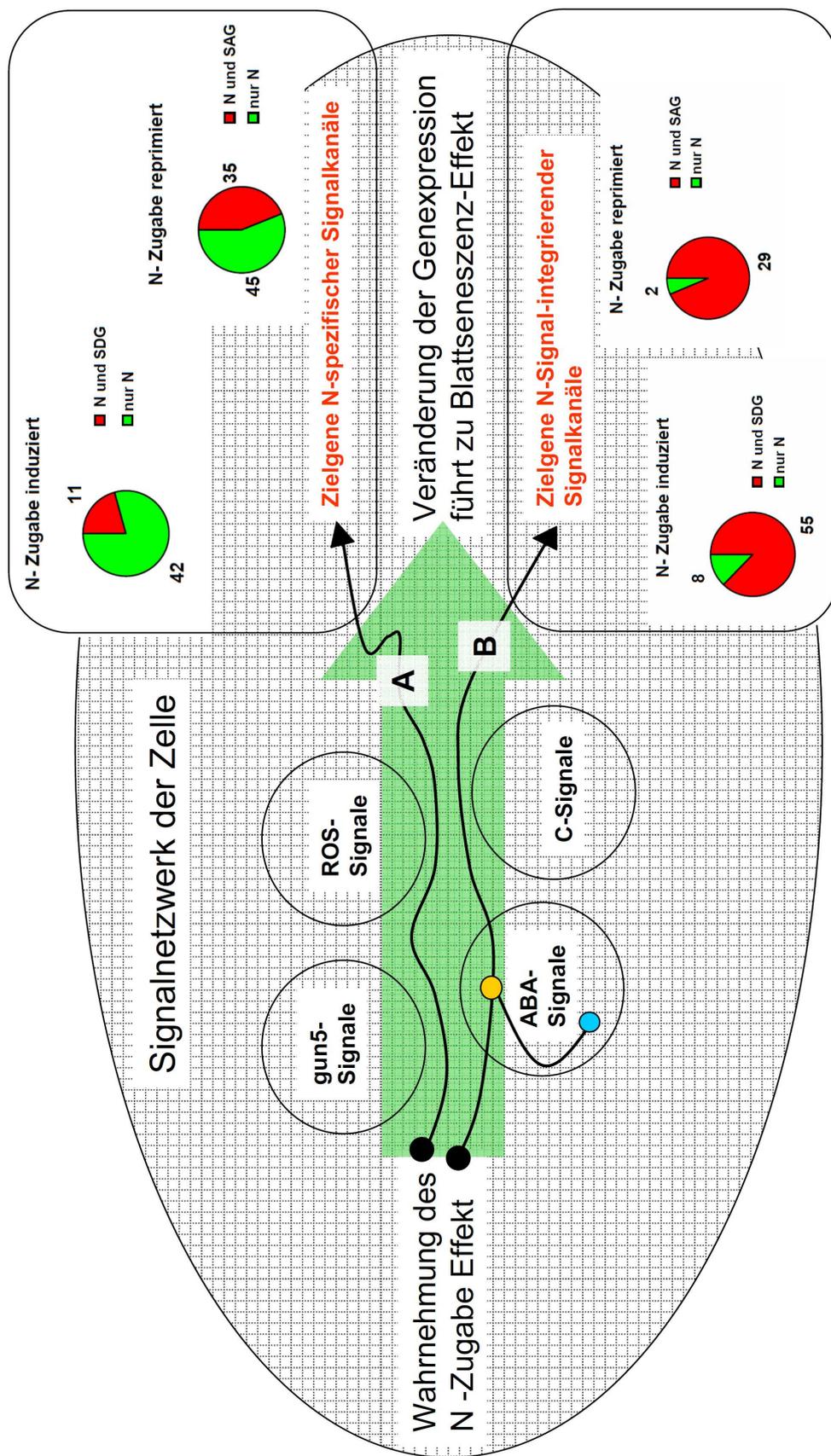


Abbildung 19: Signalkanal-Modell

putative Zielgene N-spezifischer Signalkanäle: N-Zugabe induzierte Gene aus Tabelle 1; N-Zugabe reprimierte Gene aus Tabelle 2. putative Zielgene N-Signal-integrierender Signalkanäle: N-Zugabe induzierte Gene aus Tabelle 3; N-Zugabe reprimierte Gene aus Tabelle 4. N und SDG bzw. N und SAG: Diese Gene werden durch N-Zugabe und in der Entwicklungs-induzierten Blattseneszenz gegensätzlich reguliert. nur N: Diese Gene werden durch N-Zugabe und in der Entwicklungs-induzierten Blattseneszenz nicht gegensätzlich reguliert.

● : N-Sensor ● : ABA-Sensor ● : Signal-integrierender Faktor ; **A**: N-spezifischer Signalkanal; **B**: N-Signal-integrierender Signalkanal

4.2.6 Vergleich der N-Zugabe-Regulationsmuster mit Daten aus AG Scheible

Ich habe in Modul 1 bis 4 gezeigt, welche Markergene ich aus meinen N-Daten herausgefiltert habe. Außerdem habe ich gezeigt welche Hinweise ich bekomme, wenn ich mit diesen Markergenen eine Datenbank-Recherche durchführe (Modul 4). Im Vergleich der N-Zugabe Regulationsmuster meines experimentellen Systems mit den N-Zugabe Regulationsmustern aus Scheible et al. (2004) zeigen sich Gemeinsamkeiten und deutliche Unterschiede (Abb. 16). Diese Unterschiede finden sich auch in den Regulationsmustern der Markergene (Tab.10, 11, 12). Diese Unterschiede erklären sich aus den verschiedenen Anzuchtsbedingungen, Zeitkinetiken und der Spezifität des untersuchten Blattmaterials. Ich untersuche Blattseneszenz und habe deshalb die RNA-Extrakte definierter Blätter untersucht (Schildhauer-System). Im Gegensatz dazu wird im Scheible-System die RNA aus ganzen Keimlingen isoliert. Dadurch gibt es keine Organ-Spezifität in den Regulationswerten. Aufgrund der Fokussierung auf das spezifische Blattmaterial in meinen Experimenten, finde ich ein Blatt-spezifisches Set an Markergenen (Tab. 5 bis 8). Mit diesem Set von Markergenen gibt es ein neues Werkzeug, das man nutzen kann, um in weiterführenden Experimenten regulatorische Mechanismen der N-Mangel-induzierten Blattseneszenz aufzuklären.

4.2.7 Vergleich qPCR und Affymetrix – Werte

Zum globalen Profiling der N-Mangel induzierten Blattseneszenz wurden Affymetrix ATH1 Microarrays genutzt. Affymetrix ATH1 Messungen liefern Werte für einen globalen Überblick über das Transkriptprofil in der N-Mangel induzierten Blattseneszenz. Bei dieser Hybridisierungs-basierten Technologie gibt es aber nicht zwingend ein lineares Verhältnis zwischen Signalintensität und Transkriptmenge für verschiedene Gene (Holland, 2002). Im Gegensatz dazu liefern qPCR Messungen ein lineares Verhältnis zwischen Signalintensität und Transkriptmenge für verschiedene Gene. Sie sind aber zu aufwendig, um globale Transkriptprofile zu messen.

Bevor die extrahierte RNA für Affymetrix ATH1 Messungen benutzt wurde, habe ich mittels qPCR überprüft, ob die Transkriptlevel einzelner N-regulierter Gene in den biologischen Replikaten reproduzierbare Muster zeigen. Bei den gemessenen regulatorischen Effekten gab es bei 6 der 8 Gene gute Übereinstimmungen zwischen ATH1-Chip und qPCR (Tab. 13). Für die zwei Gene ABI5 und FRK1 werden Unterschiede in den Transkriptleveln zwischen N-Mangel und Referenzprobe in den qPCR-Ergebnissen deutliche angezeigt, in den ATH1-Ergebnissen nicht. Die Signalinterpretation der ATH1 Ergebnisse habe ich mit dem am Max-Planck-Intitut für Molekulare Pflanzenphysiologie entwickelten Programm Robin 1.1.5 (Lohse et al. 2010) unter Anwendung der mathematischen Standarteinstellungen durchgeführt. Die bioinformatische Auswertung der ATH1 Datensätze ist ein eigenes Forschungsgebiet und es werden immer wieder methodische Neuerungen veröffentlicht, auf die ich im Rahmen meiner Arbeit nicht eingehen konnte. Ich habe für meine Auswertungen die vorgegebenen Einstellungen von Robin 1.1.5 benutzt und habe damit gute Ergebnisse erzielt. Ich kann aber nicht ausschließen, dass es andere bioinformatische Methoden gibt, die auch die Regulation von Genen wie ABI5 und FRK1 mittels ATH1-Chip deutlich erfassen können.

4.3 Kleine regulatorische RNA

Eine vor relativ kurzer Zeit entdeckte Klasse regulatorischer Moleküle sind die kleinen regulatorischen RNA (sRNA) (Voinnet 2009). Diese RNA-Oligonukleotide können die Expression ihrer Zielgene über sequenzspezifische Bindung an deren mRNA unterdrücken. Zu den Zielgenen dieser sRNA gehören unter anderem Transkriptionsfaktoren (TF) mit Entwicklungs-regulatorischer Funktion. Über diesen Mechanismus haben sRNA eine Schlüsselfunktion in der Entwicklungssteuerung der Pflanze (Liu und Chen 2009). Über die regulatorische Funktion von sRNA in der Blattseneszenz und im N-Stoffwechsel ist wenig bekannt. Eine Funktion in der entwicklungsinduzierten Blattseneszenz wurde bisher nur für miR164 nachgewiesen (Kim et al. 2009). Ich habe die Regulationsmuster von 6 sRNA in der Entwicklungs-induzierten Blattseneszenz mittels stem loop RT-qPCR gemessen (Chen et al. 2005). Dabei wird für jede sRNA ein möglichst sequenzspezifischer stem loop Primer eingesetzt, mit dem die sRNA in cDNA umgeschrieben wird. Die relative Menge dieses stem loop cDNA-Hybridmoleküls lässt sich spezifisch in der qPCR bestimmen. miR164 diente dabei als Positivkontrolle. Ich konnte ebenfalls eine Repression der miR164 in der Entwicklungs-induzierten Blattseneszenz nachweisen (Abb. 17 A). Das bestätigt zum einen die Ergebnisse von Kim et al. (2009) und bestätigt die Funktionalität der stem loop- Methode. Im Gegensatz zur Entwicklungs-induzierten Blattseneszenz bleibt der miR164 Level unter N-Mangel und N-Zugabe stabil (Abb. 17C). Demzufolge wirkt miR164 Blattseneszenz-hemmend unter N-Mangelbedingungen, denn es unterdrückt die Induktion des Zielgens ANAC092, das zu den Signal-integriert-N-reprimierten TF gehört (Tab. 8). Die anderen Zielgene von miR164 (CUC1, CUC2, NAC1, At5g07680 und At5g61430; Kim et al. 2009) tauchen nicht unter den Markergenen auf, denn sie zeigen in meinen Untersuchungen keine deutliche N-abhängige Regulation.

Neben miR164 ist auch miR169 in der Entwicklungs-induzierten Blattseneszenz deutlich reprimiert (Abb. 17 A). Zu den Zielgenen von miRNA 169 gehören NF-YA-TF (Li et al. 2010), z.B. NF-YA10 (at5g06510) aus Tabelle 6. Obwohl miR169 als N-Mangel reprimiert beschrieben ist und eine Überexpression einen geringeren Chlorophyllgehalt unter N-Mangel zeigt (Zhao et al. 2011), ist in meinem Modellsystem ähnlich zu miR164 keine deutliche Regulation unter N-Mangel oder N-Zugabe zu detektieren (Abb. 17 C). Das kann daran liegen, dass ich in meinem System nur die ältesten Blätter untersucht habe, während Zhao et al. (2011) den miR169-Level im ganzen Sproß gemessen haben. Meine Ergebnisse weisen eher auf eine Signalfunktion von miR169 hin, die in der Entwicklungs-induzierten Blattseneszenz wirksam wird. Zur Blattseneszenzfunktion der mir169 und der Zielgene ist bisher nichts veröffentlicht.

MiR166 und miR319 zeigen weder in der Entwicklungs-induzierten noch in der N-Mangel induzierten Blattseneszenz eine Regulation (Abb. 17 A, 17 C). Aus diesem Grund ist eine Regulatorische Funktion der beiden sRNA in diesen Prozessen eher unwahrscheinlich.

MiR828 und TAS4 zeigen eine deutliche Induktion in der Entwicklungs-induzierten Blattseneszenz und unter N-Mangel (Abb. 17 A). Eine N-Zugabe wirkt reprimierend auf die Level von miR828 und TAS 4 (Abb. 17 C). Diese Repression erfolgt allerdings erst später als 3 Stunden nach N-Zugabe und ist im Vergleich zur vorausgegangenen Induktion eher schwach. MiR828 und TAS4 sind funktionell und regulatorisch miteinander gekoppelt (Hsieh et al. 2009). Sie unterdrücken die TF PAP1 und PAP2 in ihrer Expression und wirken damit hemmend auf die Anthocyan-Biosynthese. Weder für miR828 und TAS4 noch für deren Zielgene PAP1 und PAP2 ist nachgewiesen worden, dass sie ein Schlüsselfunktion in der

Blattseneszenz oder in N-Stoffwechselprozessen haben. Dass die Bedeutung von miR828 und TAS4 über den Sekundärstoffwechsel hinaus geht, muss experimentell erst noch bewiesen werden. Gezeigt wurde bereits, dass Anthocyane eine Schutzfunktion vor überschüssiger Lichtenergie haben (Zuluaga et al. 2008). Anthocyane könnten in der Entwicklungs- und N-Mangel-induzierten Blattseneszenz bei starker Lichteinstrahlung die N-Remobilisierungsprozesse gegenüber schädigenden ROS-Effekten absichern.

4.4 Metabolite

Ziel meiner Arbeit war die molekulare Analyse der N-Mangel induzierten Blattseneszenz, die zu einem erweiterten Verständnis der zugrundeliegenden regulatorischen Mechanismen führen soll. Durch Filterung der globalen Transkriptomdaten habe ich ein Set von Markergenen isoliert, die putativen Zielgene N-spezifischer Signalkanäle (wie z.B. LBD37 und LBD39) (Tab. 5 und 6) oder putative Zielgene Signal-integrierender Signalkanäle darstellen (wie z.B. ANAC092 und ANAC019) (Tab. 7 und 8). Ergänzend zu diesen Transkriptomanalysen wurden in AG Fernie am MPI-MP in Golm parallel zu den ATH1 Messungen das Metabolit-Profil der entsprechenden Blätter gemessen. Dadurch sollen metabolische Marker mit möglicher regulatorischer Verknüpfung zu den isolierten Markergenen ermittelt werden. Hier gilt das Prinzip, dass sich hinter einer gleichzeitigen Regulation eines Metabolit-Levels und eines Transkript-Levels eine regulative Verknüpfung verbergen kann. Eine Einteilung der metabolischen Marker in N-spezifische und Signal-integrierte-Marker ist nicht möglich, da es zu den in der Datenfilterung genutzten ATH1 Datensätzen (Trockenstress und Pathogenbefall) (Module 2 und 3) keine parallelen Metabolitprofile gibt.

In Tabelle 14 ist zu sehen, dass viele der gemessenen Metabolite unter N-Mangel und nach N-Zugabe eine Veränderung der relativen Menge zeigen. Trotz des absoluten N-Mangels bleiben die Mengen der meisten N-haltigen Metabolite relativ stabil. Das lässt sich nur durch eine starke Kontrolle der N-Verteilungsprozesse erklären.

Brauchbare Marker der N-Mangel induzierten Blattseneszenz sind Alanin, Alanin beta, Glycin, Prolin, Serin, Fructose, Fumarat und Malat, denn nur diese Metabolite zeigen erst eine deutliche und konstante Regulation der Metabolit-Level unter N-Mangel und dann nach N-Zugabe eine entgegengesetzte Regulation.

Bis auf Fructose sind alle anderen Marker unter N-Mangel reprimiert. Fructose ist ein metabolischer Marker dessen Anstieg typisch für die Entwicklungs-induzierte (Diaz et al. 2005) und N-Mangel induzierte Blattsenszenz ist (Pourtau et al. 2004). In den betreffenden Veröffentlichungen ist Glucose und Fructose gleichzeitig induziert. In meinem System bleibt der Glucosespiegel unter N-Mangel und N-Zugabe unverändert. Der Unterschied zu den Pflanzen in meinem System ist, dass meine Pflanzen schon relativ früh unter absolutem N-Mangel gewachsen sind und die folgenden, großen Rosettenblätter noch in der Expansionsphase im Wachstum gestoppt wurden, bevor sie ihre Photosynthesekapazität aufbauen konnten. Dadurch produzierte der Sproß relativ wenig Kohlenhydrate die z.B. das Wurzelsystem absorbiert. Gleichzeitig hatte der Abbau der Kohlenstoff-Assimilation in Blatt 1 und 2 schon begonnen (Abb. 6B, 6C), so dass der Anstieg im Level der Glucose dadurch vielleicht gehemmt wurde. Ob diese Theorie zutrifft, muss noch mit zusätzlichen Experimenten überprüft werden.

Es zeigen sich recht große, N-abhängige Schwankungen in den Leveln der Aminosäuren Alanin, Alanin beta, Glycin, Prolin, Serin. Der Stoffwechsel scheint für die Level dieser

Metabolite sehr flexibel zu sein. Gleichzeitig könnten die Änderungen dieser Aminosäure-Level Signalgeber für Aminosäure-Sensorsysteme sein, die den N-Ernährungszustand der Pflanze kommunizieren. Nach 3 Stunden N-Zugabe steigen die Mengen von Alanin, Glycin und Serin an. Diese Aminosäuren scheinen damit gute Marker für schnelle Veränderungen der systemischen N-Verhältnisse unter N-Mangel zu sein.

Der Anstieg von Alanin, Glycin und Serin bedeutet auch, dass die zelluläre Assimilation von anorganischem N begonnen hat. Die N-Assimilation findet teilweise in Chloroplasten statt und ist an Redox-Prozesse der Photosynthese-Komplexe gebunden (Baron et al. 1994). Man müsste in weiteren Experimenten untersuchen ob sich von der N-Assimilation in den Chloroplasten Regulationseffekte auf E-S regulierte Gene ableiten. Dabei könnten sich Verbindungen zu Chloroplasten-abhängigen Signalkanälen zeigen, über die *gun1*-, *gun5*- und *flu*- abhängige Regulationseffekte auf E-S regulierte Gene wirken (Abb. 14 A) (Laloi et al. 2007, Koussevitzky et al. 2007).

Dass die Level der organischen Säuren Fumarat und Malat unter N-Mangel deutlich sinken, wurde bereits beschrieben (Tschoep et al. 2009). Es wird vermutet, dass Malat und Fumarat als Gegenionen zu Nitrat wirken und so den zellulären pH-Wert stabilisieren (Nunes-Nesi et al. 2010). Gleichzeitig könnten sie in Kombination mit Aminosäure-abhängigen Signalen, zellinterne Parameter für den N-Ernährungszustand der Pflanze sein.

Es bleibt aufzuklären ob einer dieser metabolischen Parameter ein Signalgeber für Prozesse der Blattseneszenz darstellt, oder ob es sich um passive Schwankungen in Metabolitprofil handelt.

4.5 Phytohormone

Phytohormone (PH) sind Metabolite des Sekundärstoffwechsels mit Signalfunktion. Es gibt Phytohormone mit Blattseneszenz-fördernder Wirkung (z.B.: ABA – Abscisinsäure, SA-Salicylsäure, JA-Jasmonsäure) und Hormone mit Seneszenz-hemmender Wirkung (z.B.: Z-Zeatin und ZR-Zeatin-Riboside) (Buchanan – Wollaston et al. 2005, Lim et al. 2007). In der Regel wurden Hormonantworten der Blattseneszenz durch Konfrontation der Pflanzen mit einzelnen Hormonen untersucht. In meinem System wird die Veränderung der Hormonlevel parallel mit den Veränderungen der Genexpression gemessen, ohne die Hormonsysteme der Pflanze zu verändern. Diese Art der Untersuchung wurde durch die Verbesserung der massenspektrometrischen Analyse möglich (Lopez-Carbonell und Jauregui 2005). Analog zu den Metabolit-Daten sollen die Phytohormon-Daten das Verständnis der N-Mangel induzierten Blattseneszenz erweitern und molekulare Marker für weiterführende, funktionelle Untersuchungen liefern. Parallel zu den ATH1 Messungen wurden die Mengen von ABA, SA und JA bestimmt (Abb18).

Die Mengen von Z, ZR und GA4 (Gibberellin A4) lagen unterhalb der Detektionsgrenze und können in die Diskussion nur insofern einbezogen werden, dass ihr Gehalt weit unter dem von ABA, SA und JA liegt. ABA, SA und JA gelten als seneszenzfördernde Phytohormone denn die Applikation dieser Hormone induziert Seneszenzprozesse in den jeweiligen Blättern (Lim et al. 2007). Intuitiv könnte man erwarten, dass ihr Gehalt in der N-Mangel induzierten Seneszenz ansteigt. Das ist nur für ABA bedingt der Fall, denn der ABA-Level zeigt 7 Tage nach N-Entzug eine transiente 3-fache Induktion (Abb18). Der Gehalt an ABA reagiert aber so gut wie nicht auf die erfolgte N-Zugabe. Es scheint also keinen direkten Zusammenhang zwischen N-Mangel induzierter Blattseneszenz und ABA-Gehalt der gemessenen Blätter zu geben.

Der Gehalt an SA ist in den Kontrollen (+N) und den N-Mangel Pflanzen relativ stabil und steigt dann 3 Tage nach N-Zugabe auf das 4fache an (Abb18). Das ist entgegen der Erwartung, denn nach den Clusteranalysen (Abb. 7 A und 7 B) ist der SA Gehalt in den Blättern am höchsten, die ein „junges“ Transkriptprofil zeigen. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei JA. Der Gehalt an JA sinkt sogar in den Kontrollen (+N) und etwas stärker noch in den N-Mangel Pflanzen. Analog zu SA ist der JA Gehalt 3 Tage nach N-Zugabe am höchsten. Das ist das Gegenteil von dem Effekt, den ich erwarten würde. Was hat das zu bedeuten? Das könnte bedeuten, dass der Anstieg der Menge an SA und JA in diesem physiologischen Bereich nicht zwangsläufig eine Seneszenz-induzierende Wirkung hat. Die Hemmung der N-Mangel induzierten Blattseneszenz durch Zugabe von pflanzenverfügbarem Stickstoff bewirkt wahrscheinlich eine neue Einstellung von Signalgleichgewichten. Das könnte molekulare Muster erzeugen, die einen Konzentrationsanstieg der Hormone SA und JA bewirkt und ein neues Gleichgewicht an Blattseneszenz-regulierenden Phytohormone im Verhältnis der Level von ABA, SA, JA und Cytokininen (Takei et al. 2004) etabliert.

Von den 3 gemessenen Hormonen scheint keines ein guter Marker für die N-Mangel-induzierte Blattseneszenz zu sein. Die Werte zeigen keine direkte Abhängigkeit zwischen N-Versorgung der Pflanze und Phytohormonmenge (Abb18). Die Mengen der Hormone SA und JA steigen erst später als 3 Stunden nach N-Zugabe an. Das deutet nicht auf eine direkte Verbindung zu N-Signalprozessen hin.

4.6 Abschließende Betrachtungen

Aus den Untersuchungen mit *Arabidopsis thaliana* hat sich gezeigt, daß N-abhängige Signale wahrscheinlich eher über Signal-integrierende Signalkanäle auf die Regulation der Blattseneszenz wirken (Tab. 5, 6, 7, 8, Abb. 19). Zu den Zielgenen dieser Signal-integrierenden Signalkanäle gehören NAC-TF und Photosynthesegene. NAC-TF induzieren Blattseneszenz und reprimieren Photosynthesegene somit direkt oder indirekt in verschiedenen höheren Pflanzen (Guo et al. 2006). Die Expression von Photosynthese-relevanten Genen wie CHLM (Tab. 7) ist dagegen Voraussetzung für die Funktion und N-Immobilisierung der Chloroplasten (Pontier et al. 2007) In *A. thaliana* werden NAC-TF durch N-Zugabe reprimiert und Photosynthesegene induziert (Tab. 7, Tab. 8, Abb. 20). Es ist nun interessant zu erfahren, ob diese Prozesse in Gerste konserviert sind und einen Einfluß auf die Ertragsqualität und Ertragsquantität haben. Für Weizen wurde bereits gezeigt, daß der NAC-TF NAMB-1 Blattseneszenz induziert, die Ressourcenmobilisierung fördert und so einen Effekt auf die Qualität des Ertrags hat (Uauy et al. 2006). Die regulatorische Wechselwirkung von N-Verfügbarkeit, Expression von NAC-TF und Photosynthesegenen könnte ein in höheren Pflanzen konservierter Mechanismus sein (Guo et al. 2006). Die schnelle N-Zugabe-abhängige Regulation von NAC-TF und Photosynthesegenen 3 Stunden nach N-Zugabe findet parallel zu einem Anstieg der Level von Alanin, Glycin und Serin statt (Tab. 14). Die N-Zugabe abhängige Assimilation von anorganischem N die mit dem Anstieg dieser Aminosäure-Level verbunden ist (Baron et al.1994), als auch die Aminosäure-Level an sich, könnten Signalgeber der regulatorischen Prozesse sein, die die Transkriptlevel der NAC-TF und Photosynthesegene regulieren (Tab. 7 und 8). Solche Hinweise auf regulatorische Vernetzungen haben sich aus den Messungen der sRNA-Level (Abb.17) und Phytohormon-Level (Abb.18) nicht ergeben.

Die Photosynthesegene und NAC-TF aus Tabelle 7 und 8 machen einen kleinen Teil der Gene aus, die N-abhängig reguliert werden (Abb. 11). Es ist wahrscheinlich, daß es noch

weitere, bisher in der Komplexität der Regulationmuster verborgene Hinweise auf regulatorische Wechselwirkungen zwischen N-Verfügbarkeit und Blattseneszenz-Regulation gibt. Wenn man diese Zusammenhänge besser versteht, kann das dazu beitragen N-effizientere Nutzpflanzen zu züchten und effizientere N-Düngungs-Strategien zu entwickeln. Das könnte die N-Düngung-bedingten Kosten und Umweltschäden verringern.

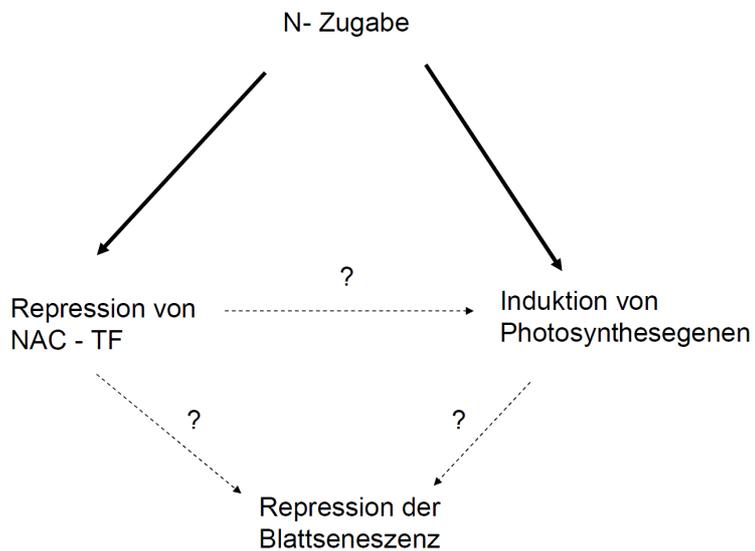


Abbildung 20: Seneszenz-Modell der N-Signal / NAC / Photosynthese-Kopplung. In *A. thaliana* werden NAC-TF durch N-Zugabe reprimiert und Photosynthesegene induziert.

5 Zusammenfassung

Mit physiologischen und molekularen Analysen und konnte ich zeigen, dass das N-Angebot bei der Kulturpflanze Gerste (*Hordeum vulgare*) den Verlauf der Blattseneszenz beeinflusst. Während N-Mangelbedingungen zu verfrühter Blattseneszenz führen, wird durch eine zusätzliche Gabe Nitrat die Seneszenz des ertragsrelevanten Fahnenblattes verzögert. Zur Untersuchung der N-abhängigen Regulation von Seneszenzprozessen bei Gerste habe ich ein Hydrokultursystem etabliert, bei dem an Primärblättern in einem engen Zeitraster der Einfluss von N-Mangel und N-Wiederversorgung analysiert wurde. Anhand physiologischer Parameter zur Photosyntheseleistung und über Analyse der Expression seneszenzrelevanter Gene konnte ich zeigen, daß: 1.) N-Mangel Blattseneszenz induziert. 2.) N-Zugabe zu N-Mangel-Pflanzen zu einer schnellen Hemmung der Blattseneszenz führt. Dieses Untersuchungssystem wurde auf die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* übertragen. Nach Voruntersuchungen mittels qPCR-Messungen von Markergenen wurde die RNA von Blättern von *Arabidopsis thaliana* zu definierten Zeitpunkten der Reaktionskinetik nach N-Mangel und N-Zugabe in globalen Transkriptom-Analysen mittels Affymetrix ATH1- Chips eingesetzt. Anhand der ATH1-Daten habe ich Gruppen von Genen identifiziert, die in schneller Zeitkinetik in Reaktion auf N-Mangel und auf N-Zugabe in den definierten Blättern reguliert werden. Die Datenanalyse und der Vergleich mit Datenbanken zeigte große Übereinstimmungen der Regulationsmuster zur Entwicklungs- induzierten Blattseneszenz. Diese Übereinstimmungen zeigten sich vor allem bei Photosynthese-relevanten Genen. Durch Datenfilterung konnten aus den globalen Transkriptomdaten putative Zielgene N-spezifischer oder N-Signal-integrierender Signalprozesse identifiziert werden. Mit diesen Markergenen habe ich weitere Datenbank-Recherchen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, daß N-abhängige Signale wahrscheinlich in Blattseneszenz-Signalprozesse integriert werden, die auch mit ABA-, ROS- und C-abhängigen Signalwegen verknüpft sind. Ergänzend zur den Transkriptom Messungen wurden sRNA-, Metabolit- und Phytohormon-Level gemessen. Die Messung der Metabolit- und Phytohormon Level wurden in Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen durchgeführt. Mit Alanin, Glycin und Serin wurden drei metabolische Marker der N-Mangel induzierten Blattseneszenz gefunden, die auf regulatorische Vernetzungen zwischen Aminosäure-Synthese und Blattseneszenz-Regulation der Markergene (z.B. Photosynthese-Gene und NAC-Transkriptionsfaktoren) hinweisen.

6 Literaturverzeichnis

Abreu, M. E., und Munne-Bosch, S. (2009). Salicylic acid deficiency in NahG transgenic lines and sid2 mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*. 60, 1261-1271.

Ankele, E., Kindgren, P. Pesquet, E., und Strand, A. (2007). In Vivo Visualization of Mg-ProtoporphyrinIX, a Coordinator of Photosynthetic Gene Expression in the Nucleus and the Chloroplast. *The Plant Cell*. 19, 1964-1979.

Araujo, W. L., Nunes-Nesi, A., Osorio, S., Usadel, B., Fuentes, D, Nagy, R., Balbo, I., Lehmann, M., Studart-Witkowski, C., Tohge, T., Martinoia, E., Jordana, X., DaMatta, F. M., und Fernie A. R. (2011). Antisense Inhibition of the Iron-Sulphur Subunit of Succinate Dehydrogenase Enhances Photosynthesis and Growth in Tomato via an Organic Acid-Mediated Effect on Stomatal Aperture. *The Plant Cell*. Web only data.

Ay, N., Irmeler, C., Fischer, A., Uhlemann, R., Reuter G., und Humbeck, K. (2009). Epigenetic programming via histone methylation at WRKY53 controls leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 58, 333-346.

Baena-Gonzalez, E., Rolland, F., Thevelein, J. M. und Sheen, J. (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*. 448, 938-943.

Baerenfaller, K., Grossmann, J., Grobei, M. A., Hull, R., Hirsch-Hoffmann, M., Yalovsky, S., Zimmermann, P., Grossniklaus, U., Gruissem, W. und Baginsky, S. (2008). Genome-Scale Proteomics Reveals *Arabidopsis thaliana* Gene Models and Proteome Dynamics. *Science*. 320, 938-941.

Baker, N.R. (1991). A possible role for photosystemII in environmental perturbations of photosynthesis. *Physiologia Plantarum*. 81, 563-570.

Balazadeh, S., Riano-Pachon, D. M. und Mueller-Roeber, B. (2008). Transcription factors regulating leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology*. 10, 63-75.

Balazadeh, S., Siddiqui, H., Allu, A. D., Matallana-Ramirez, L. P., Caldana, C., Mehrnia, M., Zanon, M. I., Köhler, B. und Mueller-Roeber, B. (2010). A gene regulatory network controlled by the NAC transcription factor ANAC092/AtNAC2/ORE1 during salt-promoted senescence. *The Plant Journal*. 62, 250-264.

Baron, A. C., Tobin, T. H., Wallsgrave, R. M. und Tobin A. K. (1994). A Metabolic Control Analysis of the Glutamine Synthetase / Glutamate Synthase Cycle in Isolated Barley (*Hordeum vulgare* L.) Chloroplasts. *Plant Physiology*. 105, 415-424.

Bläsing, O. E., Gibon, Y., Günther, M., Höhne, M., Morcuende, R., Osuna, D., Thimm, O., Usadel, B., Scheible, W. R. und Stitt M. (2005). Sugars and Circadian Regulation Make Major Contributions to the Global Regulation of Diurnal Gene Expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 17, 3257-3281.

Breeze, E., Harrison, E., McHattie, S., Hughes, L., Hickman, R., Hill, C., Kiddle, S., Kim, Y., Penfold, C. A., Jenkins, D., Zhang, C., Morris, K., Jenner, C., Jackson, S., Thomas, B., Tabrett, A., Legaie, R., Moore, J. D., Wild, D. L., Ott, S., Rand, D., Beynon, J., Denby, K., Mead, A. und Buchanan-Wollaston, V. (2011). High-Resolution Temporal Profiling of Transcripts during *Arabidopsis* Leaf Senescence Reveals a Distinct Chronology of Processes and Regulation. *The Plant Cell*. 23, 873-894.

- Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., Breeze, E., Lim, P. O., Nam, H. G., Lin, J. F., Wu, S. H., Swidzinski, J., Ishizaki, K. und Leaver, C. J.** (2005). Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 42, 567-585.
- Chen, W., Provart, N. J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H., Eulgem, T., Mauch, F., Luan, S., Zou, G., Whitham, S. A., Budworth, P. R., Tao, Y., Xie, Z., Chen, X., Lam, S., Kreps, J. A., Harper, J. F., Si-Ammour, A., Mauch-Mani, B., Heinlein, M., Kobayashi, K., Hohn, T., Dangl, J. L., Wang, X. und Zhu, T.** (2002). Expression Profile Matrix of *Arabidopsis* Transcription Factor Genes Suggests Their Putative Functions in Response to Environmental Stresses. *The Plant Cell*. 14, 559-574.
- Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., Barbisin, M., Xu, N. L., Mahuvakar, V. R., Andersen, M. R., Lao, K. Q., Livak, K. J. und Guegler, K. J.** (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 33, No. 20.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N.** (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*. 162, 156-159.
- Criado, M. V., Roberts, I. N., Echeverria, M. und Barneix, A. J.** (2007). Plant Growth Regulators and Induction of Leaf Senescence in Nitrogen-Deprived Wheat Plants. *Journal of Plant Growth Regulation*. 26, 301-307.
- Curie, C., Cassin, G., Couch, D., Divol, F., Higuchi, K., Le Jean, M., Misson, J., Schikora, A., Czernic, P. und Mari, S.** (2009). Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Annals of Botany*. 103, 1-11.
- Czechowski, T., Bari, R. P., Stitt, M., Scheible, W. R. und Udvardi, M. K.** (2004). Real-time RT-PCR profiling of over 1400 *Arabidopsis* transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *The Plant Journal*. 38, 366-379.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K. und Scheible, W. R.** (2005). Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 139, 5-17.
- Diaz, C., Purdy, S., Christ, A., Morot-Gaudry, J. F., Wingler, A. und Masclaux-Daubresse, C.** (2005). Characterization of Markers to Determine the Extent and Variability of Leaf Senescence in *Arabidopsis*. A Metabolic Profiling Approach. *Plant Physiology*. 138, 898-908.
- Diaz, C., Saliba-Colombani, V., Loudet, O., Belluomo, P., Moreau, L., Daniel-Vedele, F., Morot-Gaudry, J. F. und Masclaux-Daubresse, C.** (2006). Leaf Yellowing and Anthocyanin Accumulation are Two Genetically Independent Strategies in Response to Nitrogen Limitation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*. 47, 74-83.
- Diebold, R., Schuster, J., Däscher, K. und Binder, S.** (2002). The Branched-Chain Amino Acid Transaminase Gene Family in *Arabidopsis* Encodes Plastid and Mitochondrial Proteins. *Plant Physiology*. 129, 540-550.
- Fiehn, O.** (2002). Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*. 48, 155-171.

- Finkemeier, I., Kluge, C., Metwally, A., Georgi, M., Grotjohann, N. und Dietz, K. J.** (2003). Alterations in Cd-induced gene expression under nitrogen deficiency in *Hordeum vulgare*. *Plant, Cell and Environment*. 26, 821-833.
- Fischer, W. W., Loo, D. D. F., Koch, W., Ludewig, U., Boorer, K. J., Tegeder, M., Rentsch, D., Wright, E. M. und Frommer W. B.** (2002). Low and high affinity amino acid H⁺-cotransporters for cellular import of neutral and charged amino acids. *The Plant Journal*. 29, 717-731.
- Frick, G., Su, Q., Apel, K. und Armstrong, G. A.** (2003). An Arabidopsis porB porC double mutant lacking light-dependent NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases B and C is highly chlorophyll-deficient and developmentally arrested. *The Plant Journal*. 35, 141-153.
- Friedrichsen, D. M., Nemhauser, J., Muramitsu, T., Maloof, J. N., Alonso, J., Ecker, J. R., Furuya, M. und Chory, J.** (2002). Three Redundant Brassinosteroid Early Response Genes Encode Putative bHLH Transcription Factors Required for Normal Growth. *Genetics*. 162, 1445-1456.
- Genty, B., Briantais, J.M. und Baker, N.R.** (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*. 990, 87–92.
- Gombert, J., Etienne, P., Ourry, A. und Le Dily, F.** (2006). The expression patterns of SAG12/Cab genes reveal the spatial and temporal progression of leaf senescence in *Brassica napus* L. with sensitivity to the environment. *Journal of Experimental Botany*. 57, 1949-1956.
- Govrin, E. M., und Levine, A.** (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology*. 10, 751-757.
- Guo, F.Q., Young, J. und Crawford, N.** (2003). The Nitrate Transporter AtNRT1.1 (CHL1) Functions in Stomatal Opening and Contributes to Drought Susceptibility in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 15, 107-117.
- Guo, Y., Cai, Z. und Gan, S.** (2004). Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence. *Plant, Cell and Environment*. 27, 521-549.
- Guo, Y. und Gan, S.** (2006). AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *The Plant Journal*. 46, 601-612.
- Harb, A., Krishnan, A., Ambavaram, M. M. R. und Pereira, A.** (2010). Molecular and Physiological Analysis of Drought Stress in Arabidopsis Reveals Early Responses Leading to Acclimation in Plant Growth. *Plant Physiology*. 154, 1254-1271.
- Hassidim, M., Harir, Y., Yakir, E., Kron, I. und Green, R. M.** (2009). Over-expression of CONSTANS-LIKE 5 can induce flowering in short-day grown Arabidopsis. *Planta*. 230, 481-491.
- Himmelblau, E. und Amasino, R. M.** (2001). Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *Journal of Plant Physiology*. 158, 1317-1323.
- Holland, M. J.** (2002). Transcript Abundance in Yeast Varies over Six Orders of Magnitude. *The Journal of Biological Chemistry*. 277, 14363-14366.

Hsieh, L. C., Lin, S. I., Shih, A. C. C., Chen, J. W., Lin, W. Y., Tseng, C. Y., Li, W. H. und Chiou, T. J. (2009). Uncovering Small RNA-Mediated Responses to Phosphate Deficiency in Arabidopsis by Deep Sequencing. *Plant Physiology*. 151, 2120-2132.

Hsieh, M. H. und Goodman, H. M. (2002). Molecular Characterization of a Novel Gene Family Encoding ACT Domain Repeat Proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 130, 1797-1806.

Hu, H., Boisson-Dernier, A., Israelsson-Nordström, M., Böhmer, M., Xue, S., Ries, A., Godoski, J., Kuhn, J. M. und Schroeder, J. I. (2009). Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO₂-controlled stomatal movements in guard cells. *Nature Cell Biology*. 12, 87-93.

Huang, Y. S. und Li, H. M. (2009). Arabidopsis CHLI2 Can Substitute for CHLI1. *Plant Physiology*. 150, 636-645.

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

Humbeck, K. und Krupinska, K. (2003). The abundance of minor chlorophyll a/b-binding proteins CP29 and LHCl of barley (*Hordeum vulgare* L.) during leaf senescence is controlled by light. *Journal of Experimental Botany*. 54, 375–383.

Ishikawa, A. (2005). Tetrapyrrole Metabolism Is Involved in Lesion Formation, Cell Death, in the Arabidopsis lesion initiation 1 Mutant. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 69, 1929-1934.

Ishiyama, K., Inoue, E., Watanabe-Takahashi, A., Obara, M., Yamaya, T. und Takahashi, H. (2004). Kinetic Properties and Ammonium-dependent Regulation of Cytosolic Isoenzymes of Glutamine Synthetase in Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry*. 279, 16598 - 16605.

Johnson, C. S., Kolevski, B. und Smyth, D. R. (2002). TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a Trichome and Seed Coat Development Gene of Arabidopsis, Encodes a WRKY Transcription Factor. *The Plant Cell*. 14, 1359-1375.

Jukanti, A. K., Heidlebaugh, N. M., Parrott, D. L., Fischer, I. A., McInnerney, K. und Fischer, A. M. (2008). Comparative transcriptome profiling of near-isogenic barley (*Hordeum vulgare*) lines differing in the allelic state of a major grain protein content locus identifies genes with possible roles in leaf senescence and nitrogen reallocation. *New Phytologist*. 177, 333-349.

Kim, K. N., Cheong, Y. H., Grant, J. J., Pandey, G. K. und Luan, S. (2003). CIPK3, a Calcium Sensor–Associated Protein Kinase That Regulates Abscisic Acid and Cold Signal Transduction in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 15, 411-423.

Kim, J. H., Woo, H. R., Kim, J., Lim, P. O., Lee, I. C., Choi, S. H., Hwang, D. und Nam, H. G. (2009). Trifurcate Feed-Forward Regulation of Age-Dependent Cell Death Involving miR164 in Arabidopsis. *Science*. 323, 1053-1057.

Koussevitzky, S., Nott, A., Mockler, T. C., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M., Lim, J., Mittler, R. und Chory J. (2007). Signals from Chloroplasts Converge to Regulate Nuclear Gene Expression. *Science*. 316, 715-719.

- Kovacik, J. und Backor, M.** (2007). Changes of phenolic metabolism and oxidative status in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* plants. *Plant Soil*. 297, 255-265.
- Krishnaswamy, S., Verma, S., Rahman, M. H. und Kav, N. N. V.** (2011). Functional characterization of four APETALA2-family genes (RAP2.6, RAP2.6L, DREB19 and DREB26) in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*. 75, 107-127.
- Laloi, C., Stachowiak, M., Pers-Kamczyc, E., Warzych, E., Murgia, I. und Apel, K.** (2006). Cross-talk between singlet oxygen- and hydrogen peroxide-dependent signaling of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS*. 104, 672-677.
- Lancien, M., Martin, M., Hsieh, M. H., Leustek, T., Goodman, H. und Coruzzi, G. M.** (2002). *Arabidopsis* glt1-T mutant defines a role for NADH-GOGAT in the non-photorespiratory ammonium assimilatory pathway. *The Plant Journal*. 29, 347-358.
- Lara, M. E. B., Garcia, M. C. G., Fatima, T., Ehneß, R., Lee, T. K., Proels, R., Tanner, W. und Roitsch, T.** (2004). Extracellular Invertase Is an Essential Component of Cytokinin-Mediated Delay of Senescence. *The Plant Cell*. 16, 1276-1287.
- Lehfeldt, C., Shirley, A. M., Meyer, K., Ruegger, M. O., Cusumano, J. C., Viitanen, P. V., Strack, D. und Chapple, C.** (2000). Cloning of the SNG1 Gene of *Arabidopsis* Reveals a Role for a Serine Carboxypeptidase-like Protein as an Acyltransferase in Secondary Metabolism. *The Plant Cell*. 12, 1295-1306.
- Li, Y., Fu, Y., Ji, L., Wu, C. und Zheng, C.** (2010). Characterization and expression analysis of the *Arabidopsis* mir169 family. *Plant Science*. 178, 271-280.
- Lim, P. O., Kim, H. J. und Nam, H. G.** (2007). Leaf Senescence. *Annual Review of Plant Biology*. 58, 115-136.
- Lin, J. F. und Wu, S. H.** (2004). Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal*. 39, 612-628.
- Liu, X., Pavlovsky, A. G. und Viola, R. E.** (2008). The Structural Basis for Allosteric Inhibition of a Threonine-sensitive Aspartokinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 283, 16216-16225.
- Liu, Q. und Chen, Y. Q.** (2009). Insights into the mechanism of plant development: Interactions of miRNAs pathway with phytohormone response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 384, 1-5.
- Lohse, M., Nunes-Nesi, A., Krüger, P., Nagel, A., Hannemann, J., Giorgi, F. M., Childs, L., Osorio, S., Walther, D., Selbig, J., Sreenivasulu, N., Stitt, M., Fernie, A. R. und Usadel, B.** (2010). Robin: An Intuitive Wizard Application for R-Based Expression Microarray Quality Assessment and Analysis. *Plant Physiology*. 153, 642-651.
- Lopez-Carbonell, M. und Jauregui, O.** (2005). A rapid method for analysis of abscisic acid (ABA) in crude extracts of water stressed *Arabidopsis thaliana* plants by liquid chromatography-mass spectrometry in tandem mode. *Plant Physiology and Biochemistry*. 43, 407-411.

- Martin, A., Lee, J., Kichey, T., Gerentes, D., Zivy, M., Tatout, C., Dubois, F., Balliau, T., Valot, B., Davanture, M., Terce -Laforgue, T., Quillere, I., Coque, M., Gallais, A., Gonzalez-Moro, M. B., Bethencourt, L., Habash, D. Z., Lea, P. J., Charcosset, A., Perez, P., Murigneux, A., Sakakibara, H., Edwards, K. J. und Hirel B.** (2006). Two Cytosolic Glutamine Synthetase Isoforms of Maize Are Specifically Involved in the Control of Grain Production. *The Plant Cell*. 18, 3252–3274.
- Mas-Droux, C., Biou, V. und Dumas, R.** (2006). Allosteric Threonine Synthase-Reorganization Of The Pyridoxal Phosphate Site Upon Asymmetric Activation Through S-Adenosylmethionine Binding To A Novel Site. *The Journal of Biological Chemistry*. 281, 5188-5196.
- Masclaux, C., Valadier, M. H., Brugiere, N., Morot-Gaudry, J. F. und Hirel, B.** (2000). Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta*. 211, 510-518.
- Masclaux-Daubresse, C., Reisdorf-Cren, M. und Orsel, M.** (2008). Leaf nitrogen remobilisation for plant development and grain filling. *Plant Biology*. 10, 23-36.
- Matile, P.** (2000). Biochemistry of Indian summer: physiology of autumnal leaf coloration. *Experimental Gerontology*. 35, 145-158.
- Miao, Y., Laun, T., Zimmermann, P. und Zentgraf, U.** (2004). Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*. 55, 853-867.
- Miao, Y. und Zentgraf, U.** (2007). The Antagonist Function of *Arabidopsis* WRKY53 and ESR/ESP in Leaf Senescence Is Modulated by the Jasmonic and Salicylic Acid Equilibrium. *The Plant Cell*. 19, 819-830.
- Miyashita, Y. und Good, A. G.** (2008). NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase is essential for the survival of *Arabidopsis thaliana* during dark-induced carbon starvation. *Journal of Experimental Botany*. 59, 667–680.
- Mizoguchi, M., Umezawa, T., Nakashima, K., Kidokoro, S., Takasaki, H., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. und Shinozaki, K.** (2010). Two Closely Related Subclass II SnRK2 Protein Kinases Cooperatively Regulate Drought-Inducible Gene Expression. *Plant Cell Physiology*. 51, 842-847.
- Munekage, Y., Hashimoto, M., Miyake, C., Tomizawa, K. I., Endo, T., Tasaka, M. und Shikanai, T.** (2004). Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature*. 429, 579-582.
- Mur, L. A. J., Aubry, S., Mondhe, M., Kingston-Smith, A., Gallagher, J., Timms-Taravella, E., James, C., Papp, I., Hörtensteiner, S., Thomas, H. und Ougham, H.** (2010). Accumulation of chlorophyll catabolites photosensitizes the hypersensitive response elicited by *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *New Phytologist*. 188, 161-174.
- Nesi, N., Debeaujon, I., Jond, C., Pelletier, G., Caboche, M. und Lepiniec, L.** (2000). The TT8 Gene Encodes a Basic Helix-Loop-Helix Domain Protein Required for Expression of DFR and BAN Genes in *Arabidopsis* Siliques. *The Plant Cell*. 12, 1863-1878.
- Nunes-Nesi, A., Fernie, A. R. und Stitt, M.** (2010). Metabolic and Signaling Aspects Underpinning the Regulation of Plant Carbon Nitrogen Interactions. *Molecular Plant*. 3, 973-996.

- Olsen, A. N., Ernst, H. A., Leggio, L. L. und Skriver, K.** (2005). NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *TRENDS in Plant Science*. 10, 80-87.
- Orsel, M., Eulenburg, K., Krapp, A. und Daniel-Vedele, F.** (2004). Disruption of the nitrate transporter genes *AtNRT2.1* and *AtNRT2.2* restricts growth at low external nitrate concentration. *Planta*. 219, 714-721.
- Pant, B. D., Buhtz, A., Kehr, J. und Scheible, W. R.** (2008). MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *The Plant Journal*. 53, 731-738.
- Peng, L., Fukao, Y., Fujiwara, M., Takami, T. und Shikanaia, T.** (2009). Efficient Operation of NAD(P)H Dehydrogenase Requires Supercomplex Formation with Photosystem I via Minor LHCl in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 21, 3623–3640.
- Pontier, D., Gan, S., Amasino, R. M., Roby, D. und Lam, E.** (1999). Markers for hypersensitive response and senescence show distinct patterns of expression. *Plant Molecular Biology*. 39, 1243–1255.
- Pontier, D., Albrieux, C., Joyard, J., Lagrange, T. und Block, M. A.** (2007). Knock-out of the Magnesium Protoporphyrin IX Methyltransferase Gene in Arabidopsis - Effects On Chloroplast Development And On Chloroplast-To-Nucleus Signaling. *The Journal Of Biological Chemistry*. 282, 2297–2304.
- Pourtau, N., Mares, M., Purdy, S., Quentin, N., Ruel, A. und Wingler, A.** (2004). Interactions of abscisic acid and sugar signalling in the regulation of leaf senescence. *Planta*. 219, 765-772.
- Pourtau, N., Jennings, R., Pelzer, E., Pallas, J. und Wingler, A.** (2006). Effect of sugar-induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in Arabidopsis. *Planta*. 224, 556-568.
- Redman, J. C., Haas, B. J., Tanimoto, G. und Town, C. D.** (2004). Development and evaluation of an Arabidopsis whole genome Affymetrix probe array. *The Plant Journal*. 38, 545-561.
- Rentsch, D., Schmidt, S. und Tegeder, M.** (2007). Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. *FEBS Letters*. 581, 2281–2289.
- Rivero, R. M., Kojima, M., Gepstein, A., Sakakibara, H., Mittler, R., Gepstein, S. und Blumwald, E.** (2007). Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *PNAS*. 104, 19631–19636.
- Robatzek, S. und Somsich I. E.** (2002). Targets of *AtWRKY6* regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes & Development*. 16, 1139-1149.
- Rubin, G., Tohge, T., Matsuda, F., Saito, K. und Scheible W. R.** (2009). Members of the LBD Family of Transcription Factors Repress Anthocyanin Synthesis and Affect Additional Nitrogen Responses in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 21, 3567–3584.
- Scheible, W. R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., Schindelasch, D., Thimm, O., Udvardi, M. K. und Stitt, M.** (2004). Genome-Wide Reprogramming of Primary and Secondary Metabolism, Protein Synthesis, Cellular Growth Processes, and the Regulatory Infrastructure of Arabidopsis in Response to Nitrogen. *Plant Physiology*. 136, 2483–2499.

- Schildhauer, J., Wiedemuth, K. und Humbeck, K.** (2008). Supply of nitrogen can reverse senescence processes and affect expression of genes coding for plastidic glutamine synthetase and lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase. *Plant Biology*. 10, 76-84.
- Schommer, C. Palatnik, J. F., Aggarwal, P. Chetelat, A., Cubas, P., Farmer, E. E., Nath, U. und Weigel, D.** (2008). Control of Jasmonate Biosynthesis and Senescence by miR319 Targets. *PLoS Biology*. 6, 1991-2001.
- Schopfer, P.** (1989). *Experimentelle Pflanzenphysiologie*. Springer Verlag, Berlin.
- Shimizu, H. und Shikanai, T.** (2007). Dihydrodipicolinate reductase-like protein, CRR1, is essential for chloroplast NAD(P)H dehydrogenase in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 52, 539–547.
- Short, E., Shirras, A. D. und McAinsh, M.** (2005). Functional genomics of ozone stress in *Arabidopsis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 141, Online-Publikation.
- Suorsa, M., Sirpiö, S., Paakkanen, V., Kumari, N., Holmström, M. und Aro, E. M.** (2010). Two Proteins Homologous to PsbQ are Novel Subunits of the Chloroplast NAD(P)H Dehydrogenase. *Plant Cell Physiology*. 51, 877–883.
- Suzuki, K., Nakanishi, N., Bower, J., Yoder, D. Y., Osteryoung, K. W. und Miyagishima, S.** (2009). Plastid chaperonin proteins Cpn60 α and Cpn60 β are required for plastid division in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*. 9, keine Seitenangabe.
- Swartzberg, D., Kirshner, B., Rav-David, D., Elad, Y. und Granot, D.** (2008). *Botrytis cinerea* induces senescence and is inhibited by autoregulated expression of the IPT gene. *European Journal of Plant Pathology*. 120, 289–297.
- Takabayashi, A., Ishikawa, N., Obayashi, T., Ishida, S., Obokata, J., Endo, T. und Sato, F.** (2009). Three novel subunits of *Arabidopsis* chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase identified by bioinformatic and reverse genetic approaches. *The Plant Journal*. 57, 207–219.
- Takei, K., Ueda, N., Aoki, K., Kuromori, T., Hirayama, T., Shinozaki, K., Yamaya, T. und Sakakibara, H.** (2004). AtIPT3 is a Key Determinant of Nitrate-Dependent Cytokinin Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology*. 45, 1053–1062.
- Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L. A., Rhee, S. Y. und Stitt, M.** (2004). MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal*. 37, 914-939.
- Tocquin, P., Corbesier, L., Havelange, A., Pieltain, A., Kurtem, E., Bernier, G. und Perilleux, C.** (2003). A novel high efficiency, low maintenance, hydroponic system for synchronous growth and flowering of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*. doi:10.1186/1471-2229-3-2.
- Tran, L. S. P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S. D., Fujita, Y., Maruyama, K., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K. und Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2004). Isolation and Functional Analysis of *Arabidopsis* Stress-Inducible NAC Transcription Factors That Bind to a Drought-Responsive cis-Element in the early responsive to dehydration stress 1 Promoter. *The Plant Cell*. 16, 2481–2498.

Tschoep, H., Gibon, Y., Carillo, P., Armengaud, P., Szecowka, M., Nunes-Nesi, A., Fernie, A. R., Koehl, K. und Stitt, M. (2009). Adjustment of growth and central metabolism to a mild but sustained nitrogen-limitation in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment*. 32, 300-318.

Uauy, C., Distelfeld, A., Fahima, T., Blechl, A. und Dubcovsky, J. (2006). A NAC Gene Regulating Senescence Improves Grain Protein, Zinc, and Iron Content in Wheat. *Science*. 314, 1298-1301.

Ülker, B., Mukhtar, M. S. und Somssich, I. E. (2007). The WRKY70 transcription factor of *Arabidopsis* influences both the plant senescence and defense signaling pathways. *Planta*. 226, 125-137.

Usadel, B., Nagel, A., Steinhauser, D., Gibon, Y., Bläsing, O. E., Redestig, H., Sreenivaulu, N., Krall, L., Hannah, M. A., Poree, F., Fernie, A. R. und Stitt, M. (2006). PageMan: An interactive ontology tool to generate, display, and annotate overview graphs for profiling experiments. *BMC Bioinformatics*. 7, Online-Publikation.

Voinnet, O. (2009). Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. *Cell*. 136, 669-687.

Vidal, E. A., Tamayo, K. P. und Gutierrez, R. A. (2010). Gene networks for nitrogen sensing, signaling, and response in *Arabidopsis thaliana*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. 2, 683-693.

Wardle, K. und Short, K. C. (1983). Stomatal Responses and the Senescence of Leaves. *Annals of Botany*. 52, 411-412.

Williams, L., Grigg, S. P., Xie, M., Christensen, S. und Fletcher, J. C. (2005). Regulation of *Arabidopsis* shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA miR166g and its AtHD-ZIP target genes. *Development*. 132, 3657-3668.

Wingler, A., Brownhill, E. und Pourtau, N. (2005). Mechanisms of the light-dependent induction of cell death in tobacco plants with delayed senescence. *Journal of Experimental Botany*. 56, 2897-2905.

Woo, H. R., Kim, J. H., Nam, H. G. und Lim, P. O. (2004). The Delayed Leaf Senescence Mutants of *Arabidopsis*, *ore1*, *ore3*, and *ore9* are Tolerant to Oxidative Stress. *Plant Cell Physiology*. 45, 923-932.

Zhang, Y., Xu, W., Li, Z., Deng, X. W., Wu, W. und Xue, Y. (2008). F-Box Protein DOR Functions As a Novel Inhibitory Factor for Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure under Drought Stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 148, 2121-2133.

Zhao, M., Ding, H., Zhu, J. K., Zhang, F. und Li, W. X. (2011). Involvement of miR169 in the nitrogen-starvation responses in *Arabidopsis*. *New Phytologist*. Keine weiteren Angaben vorhanden.

Zhu, X. und Galili, G. (2004). Lysine Metabolism Is Concurrently Regulated by Synthesis and Catabolism in Both Reproductive and Vegetative Tissues. *Plant Physiology*. 135, 129-136.

Zuluaga, D. L., Gonzali, S., Loreti, E., Pucciariello, C., Degl'Innocenti, E., Guidi, L., Alpi, A. und Perata, P. (2008). *Arabidopsis thaliana* MYB75/PAP1 transcription factor induces anthocyanin production in transgenic tomato plants. *Functional Plant Biology*. 35, 606-618.

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|-------|
| Abbildung 1: Phasen-Modell der Blattentwicklung und der Blattseneszenz..... | 5 |
| Abbildung 2: N-Stoffwechsel-Modell..... | 8 |
| Abbildung 3: Gerste (<i>Hordeum vulgare</i>) Fahnenblatt-Physiologie..... | 22 |
| Abbildung 4: Gerste (<i>Hordeum vulgare</i>) Fahnenblatt-Transkriptlevel..... | 23 |
| Abbildung 5: Gerste (<i>Hordeum vulgare</i>) Primärblatt-Physiologie..... | 25 |
| Abbildung 6: <i>Arabidopsis thaliana</i> N-Mangel Physiologie..... | 27 |
| Abbildung 7: Hierarchisches Clustering der N-ATH1-Datensätze..... | 29 |
| Abbildung 8: N-Mangel induzierte Gene..... | 30 |
| Abbildung 9: N-Mangel reprimierte Gene..... | 31 |
| Abbildung 10: N-Zugabe regulierte..... | 33 |
| Abbildung 11: Vergleich von N-Mangel und N-Zugabe regulierten Genen..... | 34 |
| Abbildung 12: PageMan Analyse der N-Mangel Zeitkinetik..... | 36 |
| Abbildung 13: Regulationsmuster der Filterdatensätze Modul 3..... | 39 |
| Abbildung 14 : Regulationsmuster der Markergene in den Wegweiser-Datensätzen..... | 47,48 |
| Abbildung 15: N-Zugabe regulierte Gene in den Wegweiser-Datensätzen (WWD)..... | 50 |
| Abbildung 16: Vergleich der N-Zugabe Regulationsmuster mit Daten aus AG Scheible..... | 51 |
| Abbildung 17: sRNA-Level..... | 55 |
| Abbildung 18: Phytohormon-Level..... | 60 |
| Abbildung 19: Signalkanal-Modell..... | 74 |
| Abbildung 20: Seneszenz-Modell der N-Signal/ NAC/ Photosynthese-Kopplung..... | 80 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1. N-spezifisch induzierte Zielgene..... | 93 |
| Tabelle 2. N-spezifisch reprimierte Zielgene..... | 94 |
| Tabelle 3. Signal-integriert-N-induzierte Zielgene..... | 96 |
| Tabelle 4. Signal-integriert-N-reprimierte Zielgene | 97 |
| Tabelle 5. N-spezifisch induzierte Markergene | 44 |
| Tabelle 6. N-spezifisch reprimierte Markergene..... | 44 |
| Tabelle 7. Signal-integriert-N-induzierte Markergene..... | 44 |
| Tabelle 8. Signal-integriert-N-reprimierte Markergene | 44 |
| Tabelle 9. N-spezifisch induzierte Markergene-Scheible Daten..... | 52 |
| Tabelle 10. N-spezifisch reprimierte Markergene-Scheible Daten..... | 52 |
| Tabelle 11. Signal-integriert-N-induzierte Markergene-Scheible Daten..... | 52 |
| Tabelle 12. Signal-integriert-N-reprimierte Markergene-Scheible Daten..... | 52 |
| Tabelle 13. Vergleich von Transkriptlevel-Regulationsmustern aus ATH1-und qPCR-Messungen..... | 53 |
| Tabelle 14: Metabolit-Level..... | 58 |

6 Anhang

A1. Inhalt der Daten-CD

ATH1 Regulationsdaten: Diese Datei enthält alle Transkriptlevel-Regulationmuster aus ATH1 Daten die ich in meinen Auswertungen genutzt habe. Diese Datei enthält die Daten aus meinem N-Hydrokultursystem zur N-Mangel induzierten Blattseneszenz (Modul1), Daten zur Entwicklungs-induzierten Blattseneszenz (Buchanan-Wollaston et al. 2005), Daten der Filter-Datensätze die im Modul 3 zur Filterung der N-Hydrokultur-Daten benutzt wurden, Daten der Wegweiser-Datensätze (Modul 4), Zeatin-Daten zum Vergleich in der Venn-Analyse (Modul 4; Abb.15) und N-Zugabe Daten aus den Datensätzen von Scheible et al. (2004). Die Transkriptlevel-Regulationmuster der Affymetrix ATH1-Datensätzen wurden mit dem Programm Robin 1.1.5 mit den vorgegebenen Einstellungen durchgeführt. Die Regulations-werte sind als \log_2 -Verhältnisse dargestellt.

Regulationswerte Abbildung 14: Diese Datei enthält die Transkriptlevel-Regulationmuster der Markergene in Abbildung 14. Das beinhaltet die Regulationswerte der Markergene in den Tabellen 5 bis 8 und die Regulationswerte der Markergene in den Wegweiser-Datensätze (Modul 4). Die Transkriptlevel-Regulationmuster der Affymetrix ATH1-Datensätzen wurden mit dem Programm Robin 1.1.5 mit den vorgegebenen Einstellungen durchgeführt. Die Regulations-werte sind als \log_2 -Verhältnisse dargestellt.

A2. Tabelle 1 bis 4

Beschriftung Tabelle 1 bis 4

ATH1-ID: Bezeichnung des Sonden-Set auf den ATH1-Microarray (Redman et al. 2004); 4d noN: 4 Tage nach N-Entzug; 7d noN: 7 Tage nach N-Entzug; 10d noN: 10 Tage nach N-Entzug; 3h N: 3 Stunden nach N-Zugabe; 3d N: 3 Tage nach N-Zugabe; E-S: Entwicklungs-induzierte Blattseneszenz; TS: Trockenstress; Bc: *Botrytis cinerea*-Infektion; Ps: *Pseudomonas syringae*-Infektion. Die Regulationswerte sind als \log_2 -Verhältnisse dargestellt.

Tabelle 1. N-spezifisch induzierte Zielgene

| ATH1-ID | 4d noN | 7d noN | 10d noN | 3h N | 3d N | E-S | TS | Bc | Ps |
|-------------|--------|--------|---------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
| 267262_at | -4,073 | -5,432 | -6,852 | 2,557 | 7,668 | -4,564 | -0,700 | -1,266 | -0,199 |
| 245504_at | -4,438 | -2,390 | -3,029 | 3,657 | 3,692 | -2,937 | -1,520 | -0,665 | 2,492 |
| 249996_at | -1,754 | -1,048 | -2,619 | 1,557 | 2,486 | -2,932 | -0,710 | -0,838 | 0,154 |
| 264299_s_at | -3,924 | -4,760 | -5,520 | 2,483 | 4,855 | -2,692 | 1,621 | -0,199 | 0,224 |
| 264279_s_at | -1,346 | -3,379 | -5,743 | 1,415 | 5,274 | -2,614 | 0,013 | -0,480 | -0,491 |
| 245506_at | -3,584 | -2,475 | -3,754 | 3,157 | 2,942 | -2,444 | -0,995 | -0,478 | 2,342 |
| 249327_at | -4,580 | -4,071 | -5,131 | 2,252 | 4,694 | -2,034 | 0,098 | -0,142 | 0,999 |
| 250441_at | -1,683 | -1,484 | -1,573 | 1,489 | 1,648 | -1,971 | -0,246 | -0,306 | -0,422 |
| 245505_at | -3,127 | -2,312 | -3,353 | 3,229 | 2,104 | -1,769 | -0,762 | -0,439 | 0,997 |
| 253875_at | -2,609 | -3,240 | -3,413 | 1,471 | 4,286 | -1,673 | 1,571 | -0,299 | 0,192 |
| 246996_at | -1,682 | -1,780 | -3,097 | 2,020 | 2,569 | -1,651 | -1,128 | -0,697 | -0,750 |
| 262399_at | -5,297 | -6,630 | -7,041 | 2,928 | 6,837 | -1,539 | 0,400 | -0,570 | 0,365 |
| 254578_at | -1,537 | -1,198 | -1,781 | 1,317 | 2,755 | -1,536 | -0,717 | 0,374 | -0,714 |
| 266583_at | -2,774 | -3,833 | -5,337 | 1,631 | 5,184 | -1,429 | -0,180 | -0,611 | -1,032 |
| 249493_at | -2,026 | -2,191 | -2,331 | 1,473 | 2,862 | -1,392 | 0,176 | -0,591 | -0,927 |
| 259586_at | -1,541 | -1,259 | -1,008 | 1,248 | 2,037 | -1,387 | -1,122 | -1,087 | -1,086 |
| 252904_at | -1,224 | -0,821 | -0,758 | 1,231 | 1,617 | -1,365 | -1,556 | -0,949 | -1,148 |
| 259015_at | -5,194 | -3,799 | -4,056 | 1,571 | 3,673 | -1,314 | 1,723 | -0,744 | 1,508 |
| 261608_at | -1,285 | -1,235 | -1,850 | 1,212 | 2,515 | -1,266 | -0,415 | -0,618 | -0,682 |
| 261921_at | -1,455 | -0,889 | -0,725 | 1,624 | 1,826 | -1,242 | -0,734 | -0,134 | -1,021 |
| 266313_at | -1,819 | -1,233 | -2,894 | 2,329 | 2,387 | -1,223 | -1,069 | 0,272 | 0,952 |
| 260969_at | -2,074 | -2,070 | -3,465 | 1,332 | 3,435 | -1,139 | 0,015 | -0,189 | 1,657 |
| 253043_at | -3,572 | -3,290 | -3,902 | 2,964 | 3,218 | -1,139 | -0,943 | -1,122 | 0,476 |
| 248461_s_at | -2,056 | -2,010 | -1,580 | 1,630 | 1,694 | -1,008 | 0,250 | 0,352 | 0,308 |
| 247149_at | -2,661 | -2,175 | -3,722 | 1,957 | 3,779 | -1,007 | -1,441 | 0,020 | 2,096 |
| 262786_at | -1,617 | -0,971 | -1,312 | 1,047 | 1,735 | -1,000 | 0,794 | -0,833 | 0,490 |
| 267497_at | -1,472 | -1,183 | -1,058 | 2,135 | 1,813 | -0,999 | 1,985 | -0,247 | 0,340 |
| 252858_at | -1,266 | -1,192 | -1,969 | 1,237 | 2,174 | -0,952 | -0,861 | -1,097 | -0,940 |
| 252618_at | -1,389 | -2,606 | -3,653 | 1,177 | 3,707 | -0,911 | -0,479 | 0,743 | 0,982 |
| 245734_at | -2,096 | -2,199 | -2,705 | 1,109 | 2,239 | -0,909 | 1,434 | 1,944 | 2,006 |
| 252178_at | -0,734 | -1,411 | -2,520 | 1,069 | 1,654 | -0,862 | -1,078 | -1,095 | -0,922 |
| 267010_at | -1,594 | -1,951 | -2,413 | 1,658 | 2,239 | -0,833 | 1,856 | -0,360 | -0,773 |
| 250079_at | -1,377 | -1,229 | -1,766 | 1,153 | 2,085 | -0,794 | -1,522 | -0,322 | 1,082 |
| 262569_at | -1,183 | -1,680 | -1,665 | 1,054 | 2,654 | -0,737 | 0,319 | -1,281 | -0,599 |
| 245392_at | -3,572 | -2,364 | -3,537 | 3,784 | 2,141 | -0,684 | -0,349 | -0,478 | 1,628 |
| 256537_at | -2,598 | -1,969 | -1,373 | 1,782 | 1,607 | -0,680 | -1,132 | -0,294 | -1,003 |
| 263842_at | -0,742 | -0,790 | -0,651 | 1,313 | 1,600 | -0,669 | -0,479 | -1,007 | -1,361 |
| 263265_at | -2,689 | -2,436 | -3,163 | 1,505 | 2,905 | -0,640 | 1,839 | -0,050 | 0,741 |
| 251195_at | -0,922 | -0,429 | -0,628 | 3,110 | 3,092 | -0,588 | -0,366 | -1,188 | -0,293 |
| 255734_at | -1,423 | -1,182 | -2,427 | 1,546 | 2,308 | -0,585 | -0,322 | -0,303 | 1,296 |
| 258437_at | -1,702 | -1,529 | -1,955 | 2,407 | 1,925 | -0,567 | -0,857 | -0,627 | 0,085 |
| 247921_at | -1,133 | -1,298 | -2,325 | 1,691 | 1,587 | -0,303 | -0,600 | -0,404 | 0,239 |
| 248267_at | -3,579 | -3,206 | -3,638 | 2,750 | 3,250 | -0,246 | -0,460 | 0,067 | -0,121 |
| 258791_at | -3,546 | -4,492 | -5,121 | 2,485 | 3,864 | -0,166 | -0,897 | 1,537 | -0,006 |
| 261927_at | -1,831 | -1,929 | -3,294 | 1,211 | 3,356 | -0,055 | -0,746 | -0,311 | -0,859 |
| 260771_at | -1,888 | -2,168 | -2,852 | 3,402 | 2,100 | 0,054 | 0,236 | 0,518 | 0,599 |
| 249442_at | -1,918 | -1,720 | -2,120 | 1,092 | 1,743 | 0,054 | 1,509 | 0,662 | 1,832 |
| 256891_at | -0,987 | -2,065 | -3,211 | 1,624 | 3,202 | 0,466 | 1,159 | -0,430 | 2,272 |
| 264365_s_at | -2,027 | -2,610 | -3,637 | 1,133 | 2,110 | 0,561 | 1,103 | 1,982 | 2,925 |
| 249606_at | -0,255 | -0,555 | -0,978 | 2,054 | 1,832 | 0,677 | 0,634 | -1,297 | 1,780 |
| 246215_at | -1,934 | -1,801 | -2,494 | 1,425 | 1,588 | 0,846 | 1,193 | 0,784 | 1,722 |
| 247954_at | -2,307 | -2,809 | -4,267 | 1,387 | 3,020 | 1,058 | -1,537 | 1,067 | 3,873 |
| 265067_at | -1,961 | -1,556 | -1,814 | 2,303 | 2,072 | 3,082 | -0,919 | 1,250 | 2,071 |

Tabelle 2. N-spezifisch reprimierte Zielgene

| ATH1-ID | 4d noN | 7d noN | 10d noN | 3h N | 3d N | E-S | TS | Bc | Ps |
|-------------|--------|--------|---------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|
| 246682_at | 0,904 | 0,832 | 0,900 | -1,164 | -1,651 | 1,777 | 1,367 | 1,571 | 1,463 |
| 267319_at | 1,515 | 1,129 | 1,000 | -1,078 | -1,713 | 2,707 | 0,594 | 1,283 | 1,407 |
| 251207_at | 2,253 | 2,421 | 1,930 | -2,038 | -2,473 | 1,478 | 0,463 | 0,852 | 1,397 |
| 255630_at | 2,347 | 1,775 | 1,201 | -1,262 | -3,365 | 3,253 | 1,064 | 1,563 | 1,379 |
| 258167_at | 4,538 | 2,633 | 2,388 | -1,983 | -3,563 | 1,757 | -0,007 | 1,204 | 1,355 |
| 258021_at | 1,268 | 1,041 | 1,750 | -1,330 | -2,696 | 1,095 | -0,047 | -0,558 | 1,351 |
| 247304_at | 1,559 | 1,361 | 0,764 | -1,634 | -2,811 | 1,912 | -0,517 | 0,458 | 1,293 |
| 258925_at | 0,699 | 0,607 | 0,928 | -1,949 | -1,849 | 2,616 | 0,993 | 0,196 | 1,252 |
| 250207_at | 7,134 | 1,400 | -0,207 | -1,331 | -3,601 | 3,753 | 0,678 | 0,101 | 1,129 |
| 265539_at | -0,709 | -0,046 | 0,528 | -1,231 | -1,715 | 0,084 | 0,197 | -0,210 | 1,124 |
| 247049_at | 1,408 | 1,589 | 0,254 | -1,020 | -1,661 | 1,707 | 0,336 | 0,006 | 1,074 |
| 255127_at | 2,042 | 1,190 | 1,298 | -2,949 | -4,502 | 2,344 | 0,064 | 1,166 | 1,038 |
| 266962_at | 1,194 | 1,301 | 1,401 | -1,462 | -2,549 | 1,857 | 0,762 | 0,778 | 0,993 |
| 247305_at | 0,433 | 0,747 | 1,371 | -1,330 | -1,813 | 1,278 | 0,510 | 0,183 | 0,927 |
| 249306_at | 0,638 | 0,522 | 2,093 | -1,105 | -2,019 | 0,965 | 1,424 | 0,308 | 0,906 |
| 261535_at | 1,356 | 0,895 | 1,130 | -1,070 | -1,878 | 1,250 | 1,269 | -0,107 | 0,828 |
| 248271_at | 1,651 | 1,918 | 1,897 | -1,934 | -2,550 | 1,983 | 0,736 | 0,184 | 0,824 |
| 252023_at | 0,921 | 1,920 | 1,832 | -1,297 | -2,633 | 1,424 | 1,039 | -0,425 | 0,821 |
| 247800_at | -0,494 | -0,579 | 0,307 | -1,850 | -1,664 | 1,056 | 0,049 | 1,468 | 0,772 |
| 257789_at | 0,072 | 0,475 | 0,683 | -1,150 | -1,594 | 1,212 | 0,493 | 0,128 | 0,733 |
| 266545_at | 1,604 | 1,199 | 2,026 | -1,495 | -2,220 | 2,277 | 0,568 | -0,113 | 0,719 |
| 266062_at | 0,630 | 0,737 | 0,905 | -1,333 | -1,946 | 1,072 | -0,661 | 0,448 | 0,509 |
| 256650_at | 1,087 | 1,796 | 2,076 | -1,284 | -1,633 | 0,827 | 0,121 | 0,524 | 0,479 |
| 245401_at | 1,928 | 1,808 | 2,761 | -2,088 | -2,792 | 2,490 | 0,569 | -0,561 | 0,474 |
| 247775_at | 1,645 | 1,754 | 1,420 | -1,384 | -2,138 | 0,988 | 1,174 | 0,221 | 0,399 |
| 256008_s_at | 2,082 | 2,806 | 3,026 | -3,744 | -3,989 | 4,504 | 1,521 | -0,093 | 0,384 |
| 246468_at | 3,794 | 1,243 | 0,812 | -2,192 | -2,014 | 3,453 | 0,932 | -0,166 | 0,368 |
| 254300_at | 0,838 | 1,033 | 1,103 | -1,217 | -2,521 | 2,198 | 1,322 | 0,541 | 0,360 |
| 247751_at | 2,569 | 3,004 | 3,488 | -2,278 | -4,085 | 2,189 | 0,437 | -0,437 | 0,280 |
| 249581_at | 1,944 | 1,998 | 1,735 | -1,163 | -2,857 | 2,449 | -0,254 | 0,331 | 0,279 |
| 254274_at | 1,319 | 1,387 | 1,527 | -1,156 | -1,658 | 0,992 | 0,153 | 0,035 | 0,277 |
| 265091_s_at | 6,843 | 2,604 | 1,857 | -2,181 | -5,678 | 5,485 | 1,275 | 0,591 | 0,253 |
| 247005_at | 1,855 | 1,652 | 1,261 | -1,890 | -2,020 | 0,896 | 0,606 | -0,115 | 0,206 |
| 248185_at | 6,009 | 2,383 | 2,122 | -1,123 | -5,542 | 5,374 | 0,986 | 0,436 | 0,194 |
| 250446_at | 1,398 | 1,217 | 1,627 | -1,695 | -3,194 | 0,536 | -0,221 | 0,093 | 0,184 |
| 253779_at | 1,142 | 1,020 | 0,969 | -1,220 | -1,718 | 2,887 | 0,429 | 0,946 | 0,169 |
| 247265_at | 1,446 | 0,951 | 1,383 | -1,029 | -1,906 | 1,179 | 0,797 | 0,139 | 0,143 |
| 263373_at | 1,051 | 1,614 | 2,487 | -1,032 | -2,442 | 0,269 | -0,291 | -0,051 | 0,125 |
| 261134_at | 1,152 | 2,722 | 2,950 | -1,103 | -2,489 | 0,675 | 0,216 | -0,090 | 0,119 |
| 266578_at | 1,316 | 1,616 | 1,295 | -1,800 | -1,752 | 2,710 | 0,534 | 0,766 | 0,113 |
| 261607_at | 0,845 | 1,191 | 1,686 | -1,295 | -2,179 | 0,491 | 0,874 | -0,596 | 0,098 |
| 248726_at | 2,101 | 1,886 | 1,757 | -1,439 | -2,072 | 1,149 | 0,166 | 1,021 | 0,076 |
| 256924_at | 5,315 | 3,565 | 2,576 | -1,499 | -4,913 | 2,832 | 0,772 | 0,290 | 0,072 |
| 254283_s_at | 6,466 | 2,282 | 1,334 | -1,501 | -4,475 | 5,691 | 1,426 | 0,393 | 0,066 |
| 265494_at | 0,538 | 1,425 | 1,529 | -1,036 | -1,726 | 0,351 | -0,384 | -0,594 | 0,042 |
| 249215_at | 7,738 | 2,527 | 1,743 | -1,540 | -6,911 | 6,268 | 1,532 | 0,453 | 0,020 |
| 251472_at | 1,394 | 2,208 | 2,230 | -1,847 | -2,884 | 1,428 | 0,417 | -0,088 | -0,003 |
| 255056_at | 2,208 | 2,425 | 2,050 | -1,339 | -2,471 | 0,928 | 0,469 | -0,070 | -0,013 |
| 264287_at | 2,258 | 2,527 | 3,639 | -1,221 | -3,954 | 1,424 | 0,091 | 0,039 | -0,032 |
| 255689_at | 3,825 | 2,708 | 1,622 | -1,765 | -1,600 | 0,008 | 0,688 | -0,140 | -0,042 |
| 265954_at | 1,678 | 1,510 | 0,840 | -1,638 | -1,628 | 0,552 | 0,107 | -0,113 | -0,048 |
| 267141_at | 2,009 | 1,997 | 2,446 | -2,099 | -2,262 | 0,492 | -0,044 | 0,002 | -0,056 |
| 245624_at | 6,557 | 2,105 | 1,532 | -1,300 | -5,600 | 5,515 | 1,414 | 0,459 | -0,071 |
| 258270_at | 3,104 | 2,886 | 3,132 | -2,070 | -3,683 | 0,374 | 0,064 | -0,071 | -0,080 |
| 250344_at | 2,727 | 1,955 | 2,482 | -1,879 | -2,666 | 0,985 | -0,016 | -0,050 | -0,123 |

Fortetzung Tabelle 2

| | | | | | | | | | |
|-------------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 259346_at | 1,173 | 2,452 | 3,512 | -1,036 | -3,325 | 1,083 | -0,244 | -1,081 | -0,139 |
| 252213_at | 1,437 | 1,812 | 2,012 | -1,421 | -2,607 | 1,343 | 0,658 | 0,061 | -0,175 |
| 253940_at | 1,234 | 2,753 | 4,102 | -1,192 | -3,701 | 1,762 | 0,001 | 0,235 | -0,186 |
| 246038_s_at | 3,107 | 3,008 | 3,300 | -1,428 | -2,090 | 1,794 | -0,098 | 0,198 | -0,217 |
| 254508_at | 1,502 | 1,622 | 1,983 | -1,711 | -2,109 | 0,919 | 0,649 | -0,360 | -0,221 |
| 250688_at | 1,448 | 2,463 | 2,372 | -1,511 | -2,004 | 1,558 | 0,415 | -0,048 | -0,236 |
| 265339_at | 1,449 | 1,933 | 1,686 | -1,135 | -1,701 | 1,919 | 0,003 | -0,973 | -0,236 |
| 262071_at | 0,923 | 1,574 | 1,435 | -1,041 | -1,669 | 0,662 | 0,262 | -0,128 | -0,253 |
| 251197_at | 2,794 | 3,515 | 4,164 | -1,521 | -2,837 | 2,827 | -0,174 | 0,117 | -0,269 |
| 261198_at | 2,567 | 3,378 | 3,359 | -1,624 | -3,085 | 2,116 | 0,090 | -0,072 | -0,280 |
| 250100_at | 4,079 | 4,625 | 4,503 | -2,200 | -5,642 | 4,100 | -0,557 | -0,640 | -0,312 |
| 250558_at | 4,441 | 1,704 | 1,262 | -2,426 | -2,198 | 2,244 | 0,463 | -0,180 | -0,373 |
| 266275_at | 1,754 | 1,951 | 2,427 | -1,066 | -2,085 | 0,344 | 0,142 | 0,316 | -0,454 |
| 264590_at | 1,585 | 1,555 | 1,950 | -2,146 | -2,883 | 3,180 | 0,324 | -0,230 | -0,471 |
| 255028_at | 0,751 | 1,500 | 1,757 | -1,293 | -2,259 | 1,053 | 1,403 | -1,006 | -0,597 |
| 253188_at | 1,154 | 2,032 | 1,636 | -1,056 | -1,731 | 1,079 | 1,405 | -0,493 | -0,614 |
| 248467_at | 1,302 | 1,659 | 1,941 | -1,680 | -2,025 | 0,537 | 1,110 | -0,314 | -0,733 |
| 245861_at | 1,015 | 1,338 | 1,099 | -1,142 | -1,588 | -0,551 | 0,859 | 0,180 | -0,844 |
| 245501_at | 2,996 | 2,127 | 1,804 | -1,569 | -1,772 | 0,852 | -0,351 | 0,828 | -0,948 |
| 255310_at | 1,970 | 2,646 | 2,671 | -2,259 | -3,279 | 1,763 | -1,425 | -1,315 | -1,201 |
| 255294_at | 2,145 | 1,478 | 1,311 | -1,727 | -1,671 | 0,466 | -0,204 | -0,745 | -1,363 |
| 262582_at | 2,043 | 1,833 | 1,798 | -2,256 | -2,477 | 1,397 | -0,233 | -1,242 | -1,382 |
| 265823_at | 1,520 | 1,732 | 2,156 | -1,607 | -1,723 | 0,825 | 1,226 | -1,139 | -1,834 |
| 245348_at | 2,102 | 1,826 | 1,859 | -1,994 | -1,717 | 0,783 | 0,250 | -1,073 | -2,046 |
| 252863_at | 1,588 | 1,202 | 1,615 | -1,750 | -1,605 | 0,409 | 0,419 | -1,524 | -2,652 |

Tabelle 3. Signal-integriert-N-induzierte Zielgene

| ATH1-ID | 4d noN | 7d noN | 10d noN | 3h N | 3d N | E-S | TS | Bc | Ps |
|-------------|--------|--------|---------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
| 253255_at | -2,439 | -2,217 | -1,956 | 1,352 | 2,551 | -3,030 | -2,056 | -1,885 | -1,646 |
| 253028_at | -0,565 | -0,608 | -1,323 | 1,099 | 2,061 | -1,402 | -1,802 | -1,671 | -1,850 |
| 253208_at | -1,255 | -1,082 | -1,116 | 1,106 | 1,805 | -1,077 | -1,730 | -1,633 | -1,930 |
| 261782_at | -0,705 | -0,961 | -2,179 | 1,327 | 2,310 | -0,977 | -1,626 | -2,405 | -2,065 |
| 258468_at | -2,195 | -3,268 | -4,700 | 2,726 | 4,609 | -3,071 | -3,435 | -3,260 | -2,116 |
| 260388_at | -2,242 | -1,571 | -1,095 | 1,648 | 2,689 | -2,105 | -1,762 | -1,682 | -2,164 |
| 258708_at | -2,312 | -2,251 | -2,768 | 1,180 | 3,964 | -2,480 | -2,278 | -1,591 | -2,295 |
| 254328_at | -1,390 | -1,956 | -1,785 | 1,947 | 2,713 | -1,610 | -2,070 | -1,903 | -2,335 |
| 245362_at | -0,904 | 0,034 | -1,595 | 1,249 | 1,592 | -0,068 | -2,143 | -2,349 | -2,470 |
| 248566_s_at | -2,657 | -3,035 | -3,868 | 1,268 | 4,531 | -2,111 | -2,161 | -3,434 | -2,475 |
| 266123_at | -0,682 | -1,751 | -4,283 | 1,875 | 4,226 | -1,877 | -2,064 | -1,777 | -2,532 |
| 248962_at | -2,018 | -1,975 | -1,594 | 1,008 | 3,345 | -2,665 | -2,010 | -2,344 | -2,556 |
| 249037_at | -1,683 | -0,595 | -0,586 | 1,251 | 2,240 | -2,283 | -3,276 | -2,974 | -2,580 |
| 254783_at | -1,057 | -1,116 | -0,915 | 1,068 | 2,115 | -1,159 | -2,385 | -1,939 | -2,603 |
| 266575_at | -0,782 | -0,625 | -0,799 | 1,259 | 2,069 | -1,808 | -2,059 | -1,748 | -2,603 |
| 251759_at | -2,724 | -2,375 | -2,337 | 1,397 | 4,045 | -1,288 | -1,609 | -1,777 | -2,607 |
| 248402_at | -1,946 | -1,894 | -1,806 | 1,306 | 2,874 | -2,945 | -1,955 | -2,333 | -2,625 |
| 254102_at | -1,681 | -1,607 | -1,606 | 1,647 | 2,866 | -3,095 | -2,828 | -2,100 | -2,639 |
| 254623_at | -1,346 | -1,611 | -1,760 | 1,568 | 3,081 | -2,500 | -2,282 | -2,033 | -2,642 |
| 247376_at | -1,267 | -1,252 | -1,351 | 1,407 | 2,605 | -2,846 | -2,186 | -1,595 | -2,658 |
| 258250_at | -2,161 | -1,985 | -1,997 | 2,608 | 3,585 | -2,607 | -2,060 | -3,036 | -2,693 |
| 249900_at | -1,079 | -0,691 | -1,108 | 1,267 | 2,117 | -1,888 | -1,674 | -1,784 | -2,787 |
| 254553_at | -1,057 | -1,036 | -1,372 | 1,091 | 2,041 | -2,288 | -1,849 | -2,082 | -2,823 |
| 248920_at | -1,331 | -1,555 | -1,782 | 1,021 | 3,053 | -2,405 | -3,049 | -2,206 | -2,826 |
| 259161_at | -4,755 | -4,404 | -3,058 | 1,675 | 6,582 | -4,664 | -2,406 | -2,653 | -2,827 |
| 264014_at | -3,477 | -3,137 | -2,426 | 2,619 | 2,901 | -2,866 | -2,047 | -3,417 | -2,859 |
| 262283_at | -1,215 | -1,047 | -1,351 | 1,082 | 2,811 | -2,363 | -2,693 | -1,697 | -2,914 |
| 256299_at | -4,149 | -4,382 | -3,279 | 5,570 | 5,197 | -4,939 | -2,987 | -1,927 | -2,975 |
| 265704_at | -1,104 | -1,217 | -1,248 | 1,220 | 2,871 | -2,270 | -2,654 | -2,365 | -2,985 |
| 256979_at | -2,096 | -4,539 | -5,503 | 1,176 | 6,791 | -3,203 | -1,613 | -1,894 | -2,993 |
| 257294_at | -1,230 | -0,720 | -1,551 | 1,896 | 2,481 | -2,365 | -1,862 | -2,416 | -3,069 |
| 261638_at | -0,644 | -1,772 | -1,740 | 1,083 | 3,366 | -2,064 | -2,093 | -2,417 | -3,103 |
| 254835_s_at | -0,960 | -1,595 | -1,725 | 1,021 | 2,671 | -1,023 | -2,192 | -1,750 | -3,113 |
| 264037_at | -1,332 | -2,115 | -2,126 | 1,468 | 3,803 | -2,046 | -1,798 | -2,633 | -3,130 |
| 254105_at | -1,933 | -2,593 | -3,270 | 1,040 | 4,048 | -2,517 | -2,113 | -2,353 | -3,215 |
| 261078_at | -1,779 | -1,822 | -2,136 | 1,314 | 3,442 | -2,205 | -1,744 | -2,314 | -3,320 |
| 253871_at | -1,698 | -2,973 | -3,699 | 1,240 | 4,532 | -3,946 | -1,640 | -1,858 | -3,380 |
| 265724_at | -1,581 | -2,372 | -1,945 | 1,260 | 3,690 | -2,426 | -1,953 | -2,985 | -3,434 |
| 252965_at | -3,615 | -3,525 | -3,240 | 1,263 | 2,901 | -3,878 | -2,314 | -2,334 | -3,447 |
| 260877_at | -3,197 | -4,790 | -4,450 | 1,967 | 5,844 | -5,873 | -1,921 | -2,660 | -3,485 |
| 258956_at | -0,918 | -1,488 | -1,652 | 1,001 | 2,841 | -1,058 | -2,345 | -2,329 | -3,592 |
| 251036_at | -3,147 | -4,756 | -5,215 | 1,164 | 6,841 | -3,699 | -2,012 | -2,397 | -3,597 |
| 266790_at | -1,250 | -1,728 | -1,512 | 1,248 | 2,398 | -4,048 | -2,737 | -2,503 | -3,702 |
| 265066_at | -0,963 | -0,291 | -1,400 | 3,168 | 1,942 | -2,547 | -3,710 | -2,973 | -3,760 |
| 252441_at | -4,366 | -5,626 | -5,095 | 1,565 | 7,050 | -3,795 | -1,905 | -2,683 | -3,782 |
| 245318_at | -1,550 | -1,478 | -1,909 | 1,742 | 3,329 | -3,947 | -3,003 | -2,698 | -3,799 |
| 256796_at | -2,287 | -2,952 | -4,062 | 1,397 | 5,177 | -2,452 | -2,666 | -2,740 | -3,804 |
| 246275_at | -3,001 | -1,887 | -2,441 | 3,037 | 3,748 | -4,122 | -3,409 | -3,253 | -3,818 |
| 265076_at | -1,136 | -0,824 | -1,187 | 1,448 | 2,270 | -2,117 | -2,120 | -2,232 | -3,927 |
| 246596_at | -3,378 | -4,245 | -4,755 | 2,218 | 6,981 | -2,806 | -1,595 | -2,794 | -3,949 |
| 247347_at | -2,565 | -2,440 | -2,027 | 1,493 | 3,333 | -2,330 | -2,367 | -2,319 | -3,956 |
| 265342_at | -4,101 | -3,939 | -4,420 | 4,947 | 4,702 | -4,011 | -4,308 | -3,520 | -4,033 |
| 246011_at | -1,667 | -1,520 | -1,603 | 1,551 | 2,513 | -2,964 | -2,986 | -3,120 | -4,154 |
| 246487_at | -2,800 | -1,543 | -1,152 | 2,426 | 2,913 | -3,220 | -1,913 | -2,655 | -4,184 |
| 258156_at | -1,719 | -1,680 | -1,867 | 1,467 | 3,149 | -2,649 | -2,095 | -2,482 | -4,254 |

Fortsetzung Tabelle 3

| | | | | | | | | | |
|-----------|--------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
| 249073_at | -2,767 | -3,070 | -3,449 | 2,763 | 4,576 | -4,893 | -4,819 | -3,194 | -4,279 |
| 264672_at | -1,929 | -0,298 | 0,021 | 1,628 | 1,803 | -5,048 | -3,252 | -3,549 | -4,516 |
| 256015_at | -3,685 | -4,665 | -4,235 | 1,145 | 6,438 | -3,688 | -2,333 | -3,396 | -4,535 |
| 259892_at | -1,273 | -1,888 | -2,849 | 1,255 | 3,752 | -1,614 | -4,806 | -2,349 | -5,100 |
| 246919_at | -2,263 | -1,326 | -0,278 | 1,030 | 1,869 | -5,169 | -2,404 | -3,036 | -5,170 |
| 258055_at | -3,279 | -3,076 | -2,691 | 1,596 | 5,892 | -3,427 | -3,182 | -3,644 | -5,394 |
| 260221_at | -4,404 | -3,058 | -1,853 | 2,799 | 4,755 | -6,899 | -4,420 | -4,163 | -5,485 |
| 259842_at | -0,981 | -2,484 | -2,820 | 2,674 | 2,114 | -2,367 | -3,234 | -3,252 | -5,703 |

Tabelle 4. Signal-integriert-N-reprimierte Zielgene

| ATH1-ID | 4d noN | 7d noN | 10d noN | 3h N | 3d N | E-S | TS | Bc | Ps |
|-------------|--------|--------|---------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|
| 246302_at | -1,792 | -1,883 | -0,834 | -1,698 | -1,712 | 1,149 | 1,873 | 3,285 | 3,464 |
| 248132_at | 0,826 | 0,739 | 1,019 | -1,346 | -1,997 | 2,152 | 1,973 | 2,140 | 2,054 |
| 249454_at | 4,547 | 2,254 | 1,025 | -2,049 | -6,546 | 5,295 | 5,112 | 4,123 | 5,369 |
| 249467_at | 0,431 | 0,844 | 0,154 | -2,288 | -2,837 | 2,633 | 4,002 | 4,141 | 4,935 |
| 250287_at | 1,317 | 1,518 | 1,075 | -1,337 | -2,467 | 2,186 | 1,733 | 3,859 | 4,989 |
| 251191_at | 0,995 | 1,095 | 1,058 | -1,429 | -3,180 | 3,076 | 2,594 | 2,953 | 2,726 |
| 252134_at | 1,726 | 1,849 | 1,706 | -1,342 | -2,450 | 2,405 | 2,147 | 1,659 | 3,167 |
| 252400_at | 2,875 | 1,806 | 1,148 | -1,987 | -3,348 | 2,887 | 3,163 | 1,859 | 2,157 |
| 253473_at | 0,372 | 1,044 | 0,933 | -1,047 | -2,467 | 2,792 | 2,115 | 2,206 | 3,037 |
| 254189_at | 1,986 | 1,885 | 0,948 | -1,390 | -2,736 | 3,044 | 4,053 | 5,150 | 5,890 |
| 254299_at | 0,886 | 1,286 | 1,388 | -1,289 | -2,860 | 3,671 | 2,496 | 2,143 | 2,469 |
| 254952_at | 1,250 | 1,186 | 1,146 | -1,468 | -1,862 | 2,786 | 2,261 | 1,739 | 2,262 |
| 256296_at | 0,783 | 1,642 | 1,536 | -1,208 | -2,404 | 1,459 | 2,019 | 2,215 | 3,263 |
| 256300_at | 1,155 | 1,986 | 1,164 | -3,485 | -3,704 | 3,390 | 3,909 | 1,818 | 3,402 |
| 258162_at | 0,500 | 0,607 | 0,710 | -1,383 | -1,953 | 2,574 | 2,294 | 2,038 | 3,319 |
| 258809_at | 0,958 | 2,067 | 1,190 | -1,619 | -3,527 | 4,769 | 2,943 | 3,549 | 4,608 |
| 259058_at | 0,427 | 0,220 | 0,090 | -2,213 | -2,486 | 2,897 | 4,424 | 2,195 | 2,836 |
| 259618_at | 1,249 | 0,596 | 0,172 | -1,142 | -1,660 | 2,424 | 2,456 | 2,563 | 1,952 |
| 259705_at | 1,516 | 2,579 | 2,016 | -1,469 | -2,016 | 2,598 | 4,445 | 2,694 | 3,423 |
| 259879_at | 3,253 | 2,800 | 1,760 | -1,138 | -2,623 | 2,602 | 2,616 | 2,040 | 2,561 |
| 260203_at | 0,819 | 2,221 | 0,330 | -2,890 | -2,637 | 4,163 | 3,840 | 5,179 | 5,701 |
| 260327_at | 1,283 | 1,256 | 1,963 | -1,277 | -3,304 | 3,088 | 2,150 | 3,155 | 3,106 |
| 260900_s_at | 0,601 | 1,041 | 0,770 | -2,172 | -1,608 | 2,242 | 3,482 | 1,706 | 2,966 |
| 262482_at | 2,357 | 2,526 | 1,972 | -1,155 | -4,135 | 4,231 | 2,524 | 4,048 | 4,307 |
| 262635_at | 0,346 | 1,144 | 1,237 | -1,194 | -1,973 | 3,509 | 2,647 | 1,803 | 2,985 |
| 264400_at | 4,696 | 5,261 | 4,497 | -2,502 | -6,356 | 3,310 | 2,913 | 3,525 | 3,317 |
| 264524_at | 2,593 | 1,981 | 1,168 | -1,838 | -2,468 | 2,588 | 2,935 | 3,055 | 2,249 |
| 264580_at | 0,740 | 0,485 | -0,235 | -2,043 | -4,282 | 5,639 | 7,826 | 3,940 | 6,134 |
| 265119_at | 1,198 | 1,535 | 1,337 | -2,212 | -3,469 | 3,120 | 4,553 | 3,156 | 3,404 |
| 265276_at | 1,443 | 1,560 | 1,618 | -2,652 | -3,453 | 2,863 | 4,229 | 2,359 | 4,750 |
| 265913_at | 0,845 | 1,159 | 1,487 | -2,843 | -3,594 | 4,348 | 5,139 | 2,786 | 3,847 |

A3. Primersequenzen

qPCR Primer

In der folgenden Tabelle sind die Sequenzen der Primer dargestellt, die zur spezifischen Quantifizierung in der qPCR eingesetzt wurden. AGI-Code: Genname des spezifischen Gens, dessen in cDNA umgewandelte mRNA oder sRNA in der qPCR quantifiziert wurde. (for...forward primer, rev...reverse Primer, RTQ...RealTimeQuantification)

Arabidopsis thaliana

| AGI-Code | Primername | 5'-3' Sequenz |
|-----------|---------------------|------------------------------|
| At1G66390 | PAP2 RTQ-PCR for | TGGGCTAAATCGATGCAGAAAGA |
| At1G66390 | PAP2 RTQ-PCR rev | CCAGCAATCAAGGACCACCTAT |
| At1G69490 | ANAC029 RTQ-PCR for | TCATCCTACCGACGAAGAACTC |
| At1G69490 | ANAC029 RTQ-PCR rev | CTAGGGCTGAAGAAATACCACTC |
| At2G36270 | ABI5 RTQ-PCR for | ATTGGCGGAGTTGGAGAGGAAGAG |
| At2G36270 | ABI5 RTQ-PCR rev | TCGGTTGTGCCCTTGACTTCAAA |
| At5G67420 | LBD37 RTQ-PCR for | TGCTTTGTTTCAGTCGTTGCTC |
| At5G67420 | LBD37 RTQ-PCR rev | TGCTCCGTTAACTGGATTGACA |
| At3G49940 | LBD38 RTQ-PCR for | TGCCCTGCTTTGTTTCAGTCTT |
| At3G49940 | LBD38 RTQ-PCR rev | CGTTCACCGGATTCACAGTTCT |
| At4G37540 | LBD39 RTQ-PCR for | GAACTCCAACGTCCTGCTTTGT |
| At4G37540 | LBD39 RTQ-PCR rev | ATACCAACCGCTCCGTTAACC |
| At2G19190 | FRK RTQ-PCR for | GTTTATAGTCTTGGGGTTGTTCTTC |
| At2G19190 | FRK RTQ-PCR rev | GATCACTTATATGCACCTTCTCTG |
| At5G35630 | GS2 RTQ-PCR for | CAAACACCAAACCTCTCCTGATTC |
| At5G35630 | GS2 RTQ-PCR rev | GATGATGATGCAATGACTGATG |
| At1G67090 | RBCS RTQ-PCR for | CATCACAAGCAATGGGGGAAGAG |
| At1G67090 | RBCS RTQ-PCR rev | CCATTTGTTGCGGAGAAGGTAGTC |
| At2G28390 | SAND RTQ-PCR for | AACTCTATGCAGCATTGATCCACT |
| At2G28390 | SAND RTQ-PCR rev | TGATTGCATATCTTTATCGCCATC |
| At4G27765 | miR828 RT-PCR for | GGTTCTTGCTTAAATGAGTATT |
| At3g25790 | TAS4 RTQ-PCR for | GTGAAGGATCGAGGTCGAG |
| At2G47585 | miR164 RTQ-PCR for | TGTGGAGAAGCAGGGCACG |
| At2G46685 | miR166 RTQ-PCR for | CCTCGGACCAGGCTTCATTC |
| At3G13405 | miR169 RTQ-PCR for | TGCACGTAGCCAAGGATGACTT |
| At4G23713 | miR319 RTQ-PCR for | TCCTTGGACTGAAGGGAGC |
| At2G01020 | 5srRNA RTQ-PCR for | CGAAATGCGATACTTGGTGTG |
| | miRNA RTQ-PCR rev | CCAGTGCAGGGTCCGAGGT |
| Gerste | | |
| | Primername | |
| | GS2 RTQ-PCR for | AGCGCGATCTCACAGGTCG |
| | GS2 RTQ-PCR rev | ATCGTCGTCTCTACGTACTTGC |
| | LKR/SDH RTQ-PCR for | CCTGCTCTTGCTCCAGAA |
| | LKR/SDH RTQ-PCR rev | CATCCCATGCTGACATCCTCA |
| | 18S RTQ-PCR for | CAGGTCCAGACATAGCAAGGATTGACAG |
| | 18S RTQ-PCR rev | TAAGAAGCTAGCTGCGGAGGGATGG |

sRNA RT- Primer

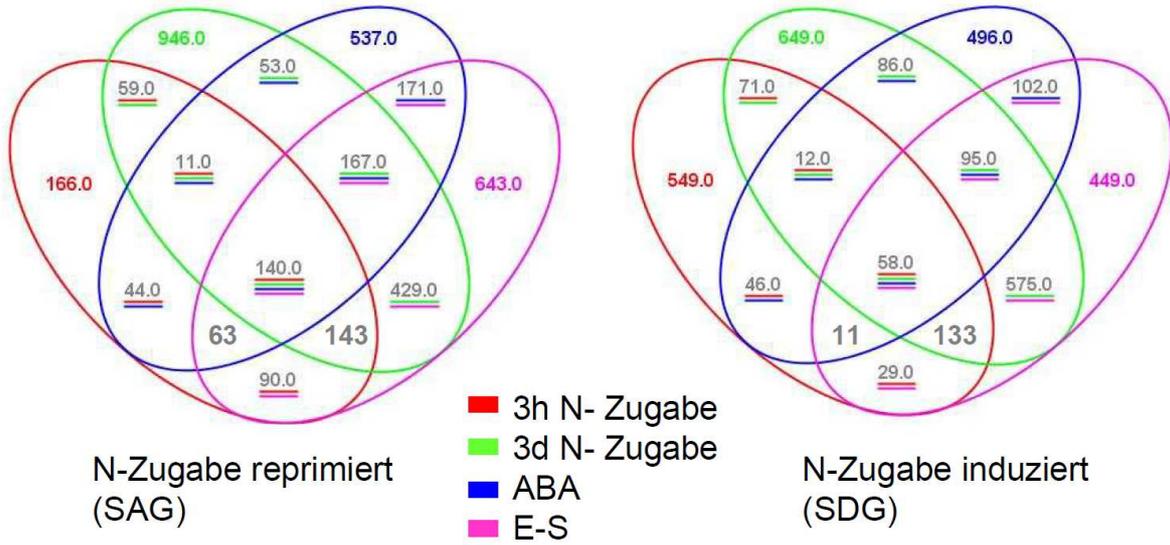
In der folgenden Tabelle sind die Sequenzen der Primer dargestellt, die zur reversen Transkription (RT) spezifischer sRNA eingesetzt wurden. AGI-Code: Genname der spezifischen sRNA, deren Sequenz mit dem entsprechenden Primer in cDNA umgewandelt wurde.

| AGI-Code | Primername | 5'-3' Sequenz |
|-----------|------------|--|
| At4G27765 | miR828 RT | GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTGGAAT |
| At3g25790 | TAS4 RT | GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTGCCTC |
| At2G47585 | miR164 RT | GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGCACGT |
| At2G46685 | miR166 RT | GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGGGGAA |
| At3G13405 | miR169 RT | GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCAGGCA |
| At4G23713 | miR319 RT | GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGGAGCT |
| At2G01020 | 5srRNA RT | GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTTGTGAC |

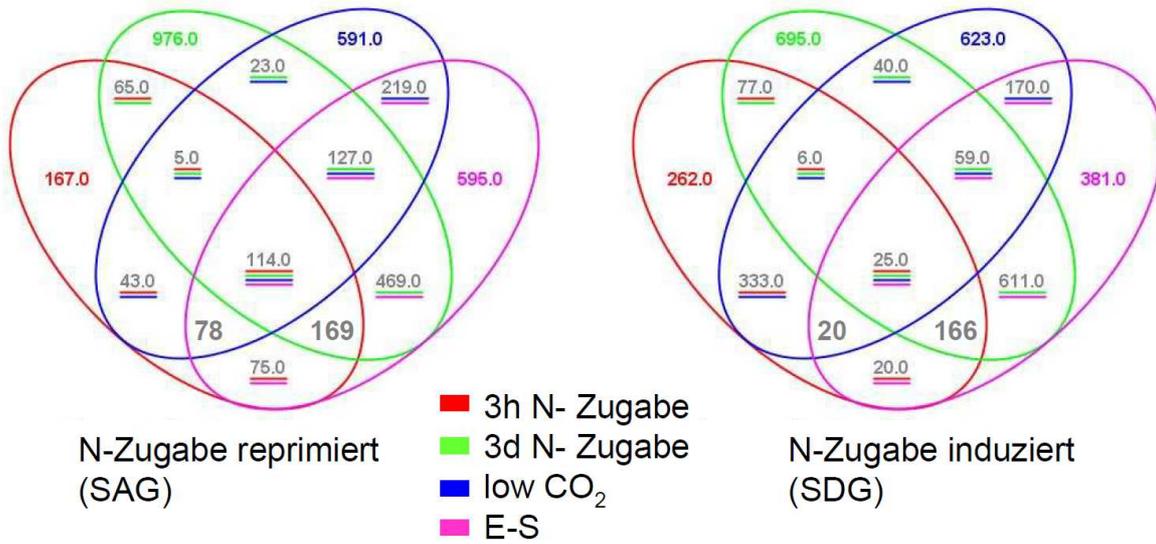
A4. Venn-Diagramme zu Abbildung 15

Die folgenden Venn-Diagramme habe ich genutzt, um festzustellen, wie viele der regulierten Gene der Wegweiser-Datensätze (Modul 4) auch durch N-Zugabe und in der E-S reguliert werden. Ich habe dafür den Filtergrenzwert ± 2 -fach ($\log_2 = \pm 1$) reguliert gewählt. Die Venn-Vergleiche erfasse nur Gene die in den zu vergleichenden Datensätzen entweder induziert oder reprimiert sind. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 A und 15 B dargestellt. Die Venn-Diagramme wurden mit dem Programm MapMan erstellt (Thimm et al. 2004). 3d N-Zugabe: 3 Tage nach N-Zugabe; 3h N-Zugabe: 3 Stunden nach N-Zugabe, E-S: Entwicklungsinduzierte Blattseneszenz (Datensatz aus Buchanan-Wollaston et al. 2005), SAG: Blattseneszenz-induziertes Gen, SDG: Blattseneszenz-reprimiertes Gen, ABA: Abscisinsäure-Behandlung, low CO₂ (Licht): 4 Stunden CO₂-Mangel im Licht, dor Trockenstress: dor-KO-Mutanten unter Trockenstress, flu/tAPX: flu-tAPX-Doppelmutante, gun5/Norflurazon: gun5-KO-Mutante unter Norflurazonbehandlung, Ozon: Ozon-Behandlung, trans-Zeatin: trans-Zeatin Behandlung

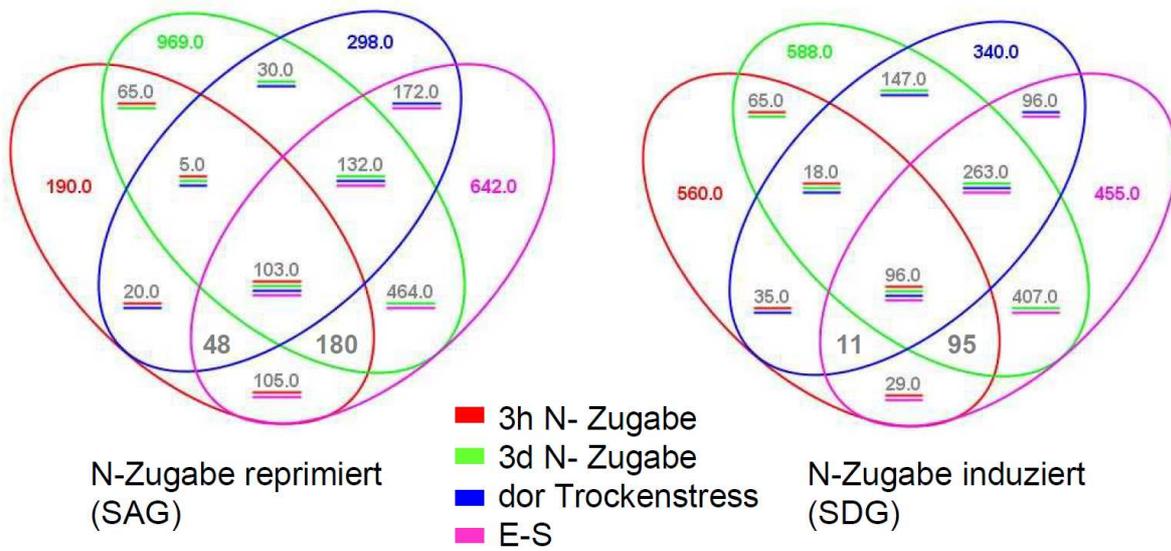
ABA



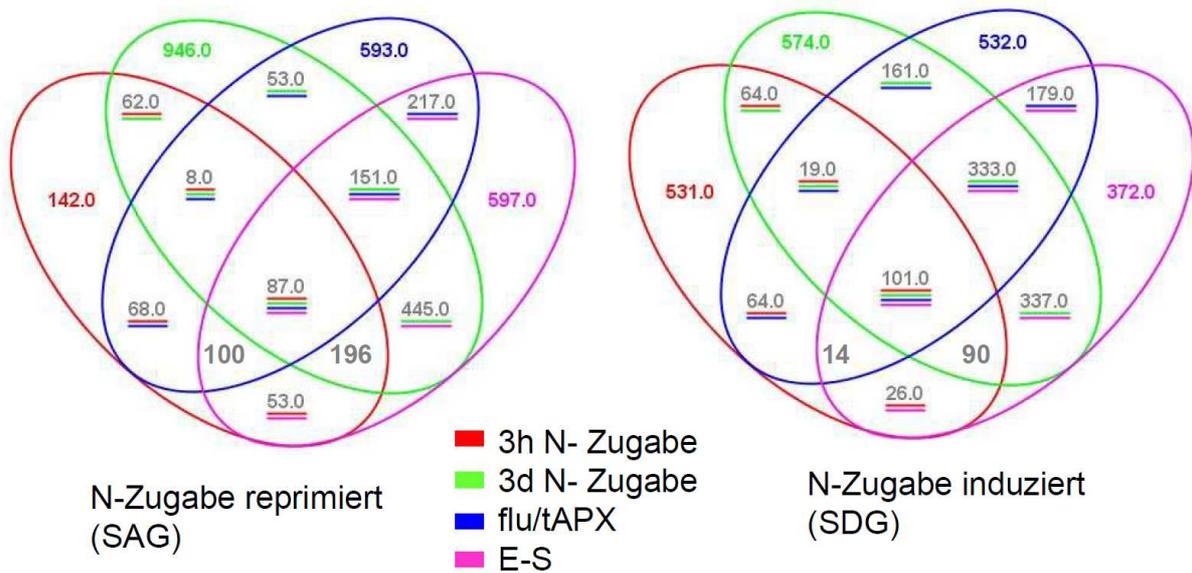
low CO₂ (Licht)



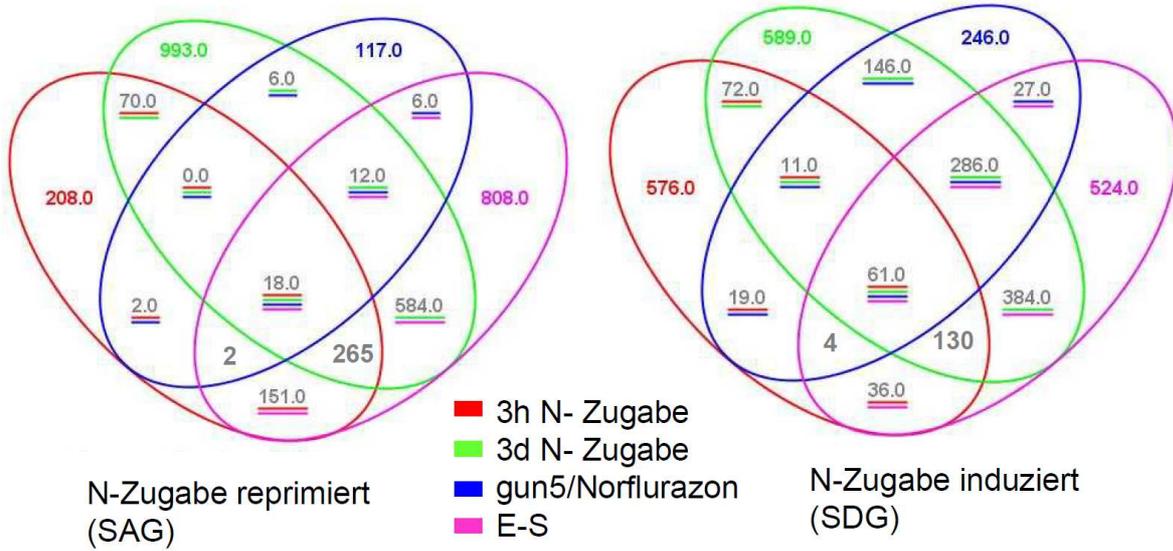
dur Trockenstress



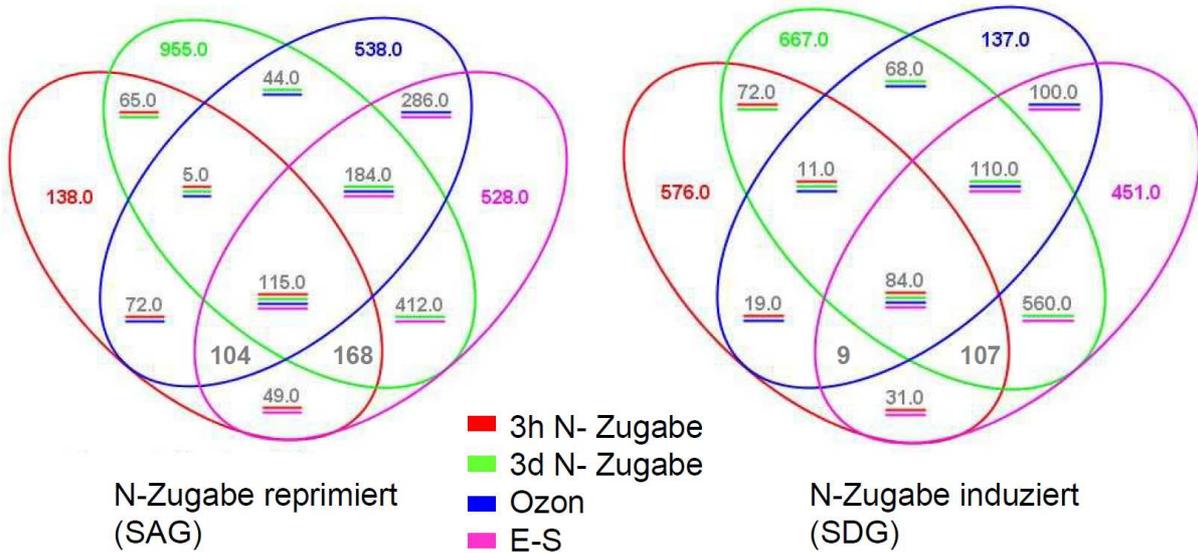
flu/tAPX



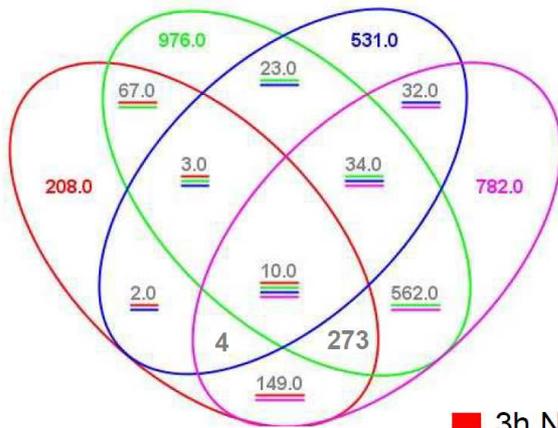
gun5/Norflurazon



Ozon




trans-Zeatin



N-Zugabe reprimiert
(SAG)

- 3h N- Zugabe
- 3d N- Zugabe
- trans-Zeatin
- E-S



N-Zugabe induziert
(SDG)

Lebenslauf

Name: Jörg Schildhauer
Geburtsdatum: 06.08.1981
Geburtsort: Lutherstadt Wittenberg
Berufsabschluss: Diplom-Biochemiker

Ausbildung

Seit 2006 Promotion an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg über das Thema: „Molekulare Mechanismen der Stickstoffmangel-induzierten Blattseneszenz“

2005-2006 Diplomarbeit: „Überexpression, Reinigung und funktionelle Charakterisierung des Proteins HNFP6 aus *Arabidopsis thaliana*“

2001-2006 Studium des Diplom-Studiengangs Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

2000-2001 Grundwehrdienst

2000 Abitur

1994-2000 Melanchthon-Gymnasium Lutherstadt Wittenberg

1992-1994 Sekundarschule, Zahna

1988-1992 Grundschule, Zahna

Veröffentlichung

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

DOI: 10.1111/j.1438-8677.2008.00075.x

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Humbeck für die Überlassung dieses aktuellen und vielschichtigen Themas und für die konstruktiven Diskussionen. Ich danke den Mitarbeitern der AG Humbeck für ihre Hilfsbereitschaft und für das freundliche und konstruktive Arbeitsklima. Ich danke Herrn Prof. Dr. Niclas und den Mitarbeitern der Landwirtschaftlichen Anwendungsforschung in Cunnnersdorf für die freundliche Zusammenarbeit und Unterstützung bei den Experimenten zur Fahnenblattseneszenz der Gerste. Ich danke Wagner Luiz Araujo, AG Fernie am MPI-MP für die Messung der Metabolite und Maria Amparo Asensi-Fabado, AG Munne-Bosch an der Universität Barcelona für die Messung der Phytohormone. Ich danke Dr. Salma Balazadeh, AG Müller-Röber am MPI-MP für die wissenschaftliche Zusammenarbeit, die wesentlich zur Datengrundlage meiner Arbeit beigetragen hat.

Meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre Geduld und Unterstützung während „DER ARBEIT“.

Vielen Dank!

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen, habe ich als solche kenntlich gemacht. Weiterhin versichere ich, dass die Arbeit an keiner anderen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Halle, den 23. August 2011

Jörg Schildhauer