

Die Rolle sekretorischer T2-Typ Ribonukleasen in Pflanzen –
Lokalisation, Expression und Regulation

KUMULATIVE HABILITATIONSSCHRIFT

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

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Dr. rer. nat. Margret Köck
geb. am 08.10.1955 in Kamenz (Sachsen)

Gutachter:

1. Prof. Dr. Claus Wasternack
2. Prof. Dr. Uwe Sonnewald
3. Prof. Dr. Erwin Grill

Halle (Saale), den 25.09.2007

urn:nbn:de:gbv:3-000013537

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013537>]

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	3
2	Die Superfamilie der T2-Typ RNasen	6
3	T2-Typ Ribonukleasen in Lycopersicon	11
3.1	Organisation der <i>RNaseLE</i> und <i>RNaseLX</i> Gene	11
3.2	Evolutionäre Abgrenzung der S- und S-like RNasen	13
3.3	Untersuchungen zur Basenpräferenz der RNA-Spaltung	14
4	Intrazelluläre Lokalisierung und Rolle der RNaseLX während der Pflanzenentwicklung	16
4.1	Allgemeine Aspekte	16
4.2	Biochemische und immunzytochemische Lokalisation der RNaseLX im Endomembransystem	17
4.3	Das Peptid HDEF - ein neuartiges ER-Retentionssignal	18
4.4	Zellspezifische Expression während der Pflanzenentwicklung und Funktion während pflanzlicher Zelltod-Prozesse	20
5	Untersuchungen zu Funktion der RNaseLE	23
5.1	Gewebespezifische Expression der RNaseLE	23
5.2	Räumliche Verteilung der Expression und Regulation der RNaseLE in der Wundantwort	24
6	Die Expression von T2-Typ RNasen als Teil der Phosphatmangel-Antwort von Pflanzen	28
6.1	Zellautonome Signaltransduktion von <i>PSI</i> -Genen	29
6.2	Transkriptionelle Regulation und Gewebespezifität der RNaseLX	30
7	Resümee und Ausblick	33
8	Literaturverzeichnis	35
9	Verzeichnis der angefügten Publikationen	48

1 Einführung

Ribonukleinsäuren sind essentielle Bestandteile aller lebenden Zellen. Ribosomale, messenger und transfer RNAs sind die primären Produkte der Genexpression und haben eine zentrale Rolle in der Proteinsynthese. Kleine RNA-Moleküle (small nuclear RNA, small nucleolar RNA), die RNA-Komponente der Telomerase und microRNAs bzw. small interfering RNAs sind an der RNA-Prozessierung, der DNA-Replikation, der endogenen Regulation der Genexpression bzw. an der Pathogenabwehr beteiligt. Ribonukleinsäuren können als Genom fungieren, sich replizieren und stellen die Basis für den evolutionären Erfolg der RNA-Viren dar.

Am **zellulären RNA-Metabolismus** sind ribonukleolytische Enzyme (RNasen) wesentlich beteiligt. Ribonukleasen katalysieren die Spaltung der 3',5'-Phosphodiesterbindungen im Ribose-Phosphat-Rückgrat der RNA-Moleküle. Obwohl die meisten bekannten Ribonukleasen Proteine sind, ist in einigen gut charakterisierten RNasen wie z.B. den RNasen P und MRP ein RNA-Molekül die katalytische Einheit (Guerrier-Takada et al., 1983; Piccinelli et al., 2005). Andere Ribonukleinsäuren, die Ribozyme, sind durch Ausbildung spezifischer Sekundärstrukturen ohne Beteiligung von Proteinen in der Lage, die Spaltung und Knüpfung neuer Polynukleotidketten zu katalysieren (Cech, 1993). Somit sind die RNasen eine der wenigen Enzymklassen, in der Verbindungen zur evolutionär alten RNA-Welt erhalten geblieben sind.

Die verschiedenen RNA-Sorten der Zelle unterliegen nach ihrer Synthese durch RNA-Polymerasen posttranskriptionellen Modifizierungen. Dazu zählen Splicing und 3'-Prozessierung von mRNAs sowie Funktionalisierung von rRNA-, tRNA-, snRNA- und snoRNA-Molekülen. Die prozessierenden Enzyme sind spezifische Exo- und Endonukleasen, die mit RNA-bindenden Proteinen interagieren oder Proteinkomplexe bilden. Die Enzyme des rRNA-Stoffwechsels aus eukaryontischen Organismen und aus Prokaryonten sind funktionell und strukturell hoch konserviert (Ross, 1997; Lafontaine und Tollervey, 2001; Fromont-Racine et al., 2003; Deutscher, 2006). Messenger RNAs werden in allen Organismen transkriptionell und posttranskriptionell über Syntheserate, Stabilität, Qualitätskontrolle und Abbau reguliert (Caponigro und Parker, 1996; Hilleren und Parker, 1999; Tucker und Parker, 2000; Parker und Song, 2004; Gilmartin, 2005; Deutscher, 2006; Valencia-Sanchez et al., 2006). Die Charakterisierung homolo-

ger Enzyme, die an diesen Prozessen beteiligt sind, durch Analysen von *Arabidopsis*-Mutanten und rekombinanter Proteine unterstreicht die Konserviertheit der Abbauewege für RNA auch in höheren Pflanzen. (Gutiérrez et al., 1999; Chekanova et al., 2002; Souret et al., 2004).

Weitere, im Zytoplasma und im Kern agierende Enzyme des zellulären RNA-Stoffwechsels sind die Doppelstrang-spezifischen Endoribonukleasen, die an verschiedenen Prozessen der RNA-Interferenz beteiligt sind. Die miRNA- bzw. siRNA-Produkte der Spaltungsreaktionen vermitteln in Pflanzen posttranskriptionelles Gen-Silencing über mRNA-Abbau, Translationsrepression oder Chromatin-Remodeling. Sie sind Elemente der pflanzlichen Virusabwehr, der Transposonkontrolle sowie der endogenen Regulation der Pflanzenentwicklung (Hamilton und Baulcombe, 1999; Waterhouse et al., 2001; Chen, 2005; Henderson et al., 2006).

Pflanzen exprimieren neben den Ribonukleasen dieses ‚klassischen‘, zellulären RNA-Metabolismus weitere RNasen. Frühe Untersuchungen bis in die 1980er Jahre zeigten, dass die Expression von RNasen und Nukleasen mit Entwicklungsprozessen wie Samenkeimung, Samenreifung, Wurzelwachstum und Differenzierung oder Seneszenz korrelierte. Die Induktion von RNasen erfolgt auch als Antwort auf wechselnde Umweltbedingungen (Licht, Nährstoffe), abiotischen Stress (Verletzung, Wasserstress), Pathogen-Interaktionen oder Hormongabe (vgl. Übersichtsartikel: Wilson, 1975; Farkas, 1982; Wilson, 1982; Green, 1994). Auf der Basis der biochemischen Eigenschaften wurde eine Klassifizierung der Enzyme in drei Hauptgruppen vorgenommen: (i) Lösliche RNasen, die RNA endonukleolytisch mit Guanin-Präferenz spalten und 3'-Nukleotide freisetzen, (ii) Partikel-gebundene Endonukleasen, die sowohl Einzelstrang-DNA (ssDNA) als auch RNA mit einer Adenin-Präferenz spalten und 5'-Nukleotide als Produkte generieren, und (iii) Lösliche Exonukleasen, die ssDNA und RNA zu 5'-Nukleotiden degradieren.

Allerdings ließen die biochemischen Eigenschaften, die Isoform-Muster, die Herkunft aus verschiedensten Pflanzenorganen und Geweben keinen verlässlichen Rückschluss auf die Anzahl, Verwandtschaft und gemeinsame Funktion der RNasen aus verschiedenen Organismen zu. Auch ließen sie sich bestimmten Zellkompartimenten nicht eindeutig zuordnen. Besonders die Identifizierung und biochemische Charakterisierung induzierbarer RNasen wurde durch begrenzte Probenmengen oder Ausbeu-

ten bei der Reinigung behindert. Deshalb stagnierten die experimentellen Untersuchungen zu Ribonukleasen (Green, 1994).

Neue Impulse erhielt die RNase-Forschung in Pflanzen zu Beginn der 1990-er Jahre durch die Aufklärung der ersten Primärsequenzen gereinigter und biochemisch charakterisierter KlasseI RNasen. Sie zeigten Verwandtschaft zu den RNasen T2, Rh und M aus Pilzen sowie den pflanzlichen S-Genen (Ide et al., 1991; Jost et al., 1991). Mit der Etablierung der molekularbiologischen Methoden und der reversen Genetik auch für Pflanzen sowie der Weiterentwicklung zytologischer und biochemischer Methoden waren neue experimentelle Werkzeuge verfügbar. Sie erlaubten und erlauben die Protein- und Genfamilien zu klassifizieren, evolutionäre Zusammenhänge aufzuklären sowie Expressionsmuster und die Regulation solcher entwicklungs- und stressabhängig exprimierter Ribonukleasen umfassend zu untersuchen.

Ziel der Untersuchungen, die in der vorgelegten Arbeit zusammengefasst werden, war die molekulare und funktionelle Charakterisierung von KlasseI/T2-Typ RNasen aus *Lycopersicon esculentum*¹. Arbeiten zur biochemischen Charakterisierung verschiedener Enzyme in Zellkulturen von Tomate wurden fortgeführt und um eigene Beiträge zur Enzymatik und besonders zum subzellulären Vorkommen und zum Proteintargeting erweitert. Die Isolierung von cDNA-Sequenzen und genomischen Klonen, die Anwendung zellbiologischer und molekularer Untersuchungsmethoden, die Nutzung von Modellorganismen und die Generierung und Untersuchung transgener Tomatenpflanzen ermöglichte uns die zeitliche und räumliche Analyse der Expression von T2-Typ RNasen in Pflanzen und damit Rückschlüsse auf ihre Funktion und Regulation in physiologischen Zelltod-Prozessen (Kap. 4), bei Verwundung (Kap. 5) und Phosphatmangel (Kap. 6).

¹ Für diese Arbeit wird die alte Nomenklatur der Gattung *Lycopersicon* beibehalten. Seit kurzem wird *Lycopersicon* der monophyletischen Gattung *Solanum* zugeordnet (*L. esculentum* jetzt *S. lycopersicum*) [vgl. http://soldb.cit.cornell.edu/about/solanum_nomenclature.pl].

2 Die Superfamilie der T2-Typ RNasen

T2-Typ RNasen sind saure Endoribonukleasen mit Spezifität für Einzelstrang-RNA, die 3'-phosphorylierte Nukleotide (**EC 3.1.27.1**) freisetzen.

Die Namensgebende RNaseT2 wurde aus *Aspergillus oryzae* isoliert (Kawata et al., 1988). Es folgte die Charakterisierung der homologen Enzyme RNaseRh aus *Rhizopus niveus* (Horiuchi et al., 1988) und RNaseM aus *Aspergillus saitoi* (Watanabe et al., 1990). Fast zeitgleich wurden die ersten pflanzlichen RNasen gefunden (McClure et al., 1989; Ide et al., 1991; Jost et al., 1991). Gemeinsames Kennzeichen der Primärstrukturen der T2-Typ RNasen sind zwei hoch konservierte Peptide (conserved active site segments, CAS I und II, vgl. Abb. 1), in denen die katalytisch wichtigen Aminosäuren enthalten sind (Irie, 1997). Die molekulare Masse der T2-Typ RNasen liegt im Bereich von etwa 22 - 26 kDa. Obwohl viele Enzyme glykosyliert sind, handelt es sich dabei um kein allgemeines Merkmal dieser Enzymfamilie (Deshpande und Shankar, 2002).

Ein Kennzeichen der Enzymkatalyse ist die Unspezifität in Bezug auf die zu spaltenden Basen. Auf der Grundlage chemischer Modifikationen, gerichteter Mutagenese und kinetischer Studien an RNaseRh (Ohgi et al., 1992; 1993; 1995) sowie ihrer Kristallstruktur (Kurihara et al., 1992; 1996) wurde von Irie und Mitarbeitern der in Abb. 1 dargestellte Mechanismus zur Hydrolyse der Nukleotidylbindung vorgeschlagen (Irie, 1997; Irie und Ohgi, 1998). Die Aminosäuren des aktiven Zentrums sind demnach His-46, His-104, Glu-105, Lys-108 und His-109, während Trp-49, Asp-51 und Tyr-57 an der Bindung der Base (B₁-Stelle) beteiligt sind. Sequenzvergleiche mit evolutionär entfernten Enzymen und die Analyse der verfügbaren Kristallstrukturen von T2-Typ RNasen beweisen, dass die katalytisch wirksamen Aminosäuren in allen Enzymen konserviert sind.

	CAS I		CAS II			
	1	43	51	101	111	222
SSCS	WTIHGLWPD		FWsHEWskHGT		YPTK	

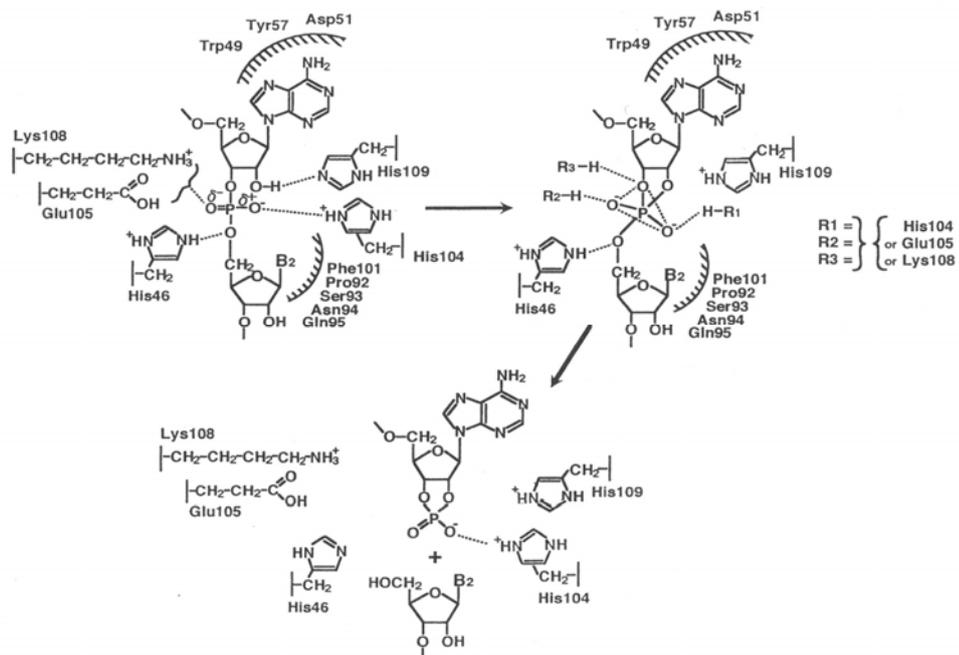


Abb. 1: Hochkonservierte Peptide in den T2-Typ RNasen (CAS, conserved active site segments) und Prinzip der enzymatischen Katalyse der T2-Typ RNasen, dargestellt für die RNaseRh von *Rhizopus niveus* [nach Irie, 1999].

Kristallisiert wurden bislang neben der RNaseRh ausschließlich pflanzliche RNasen: *Momordica charantia* RNaseMC1 (Nakagawa et al., 1999), *Lycopersicon esculentum* RNaseLE (Tanaka et al., 2000), *Pyrus pyrifolia* S₃-RNase (Matsuura et al., 2001), *Nicotiana alata* S_{F11}-RNase (Ida et al., 2001), *Nicotiana glutinosa* RNaseNW (Kawano et al., 2002) und Trichomaglin aus *Trichosanthes lepiniana* (Gan et al., 2004). Die T2-Typ RNasen gehören zum $\alpha + \beta$ Strukturtyp (Aravind und Koonin, 2001). Neben zwei konservierten Disulfidbrücken in allen RNasen, die von grundlegender Bedeutung für den Erhalt der aktiven Konformation sind (Irie, 1999), bestehen deutliche Unterschiede hinsichtlich der Zahl und Lage weiterer S-S-Bindungen zwischen den Enzymen aus Pilzen, Tieren und den pflanzlichen RNase-Klassen (Tanaka et al., 2000; Gan et al., 2004).

Die T2-Typ RNasen sind ubiquitär in Viren, Eubakterien, Protisten, Pilzen, Pflanzen und Tieren verbreitet (Abb. 2). Die Aufklärung der Primärstruktur und der enzymatischen Aktivität von verschiedenen tierischen Enzymen und solchen aus Pilzen ist der Arbeitsgruppe um M. Irie und K. Ohgi zu verdanken (Literatur in Irie und Ohgi, 2001; Kobayashi et al., 2003; Suzuki et al., 2005).

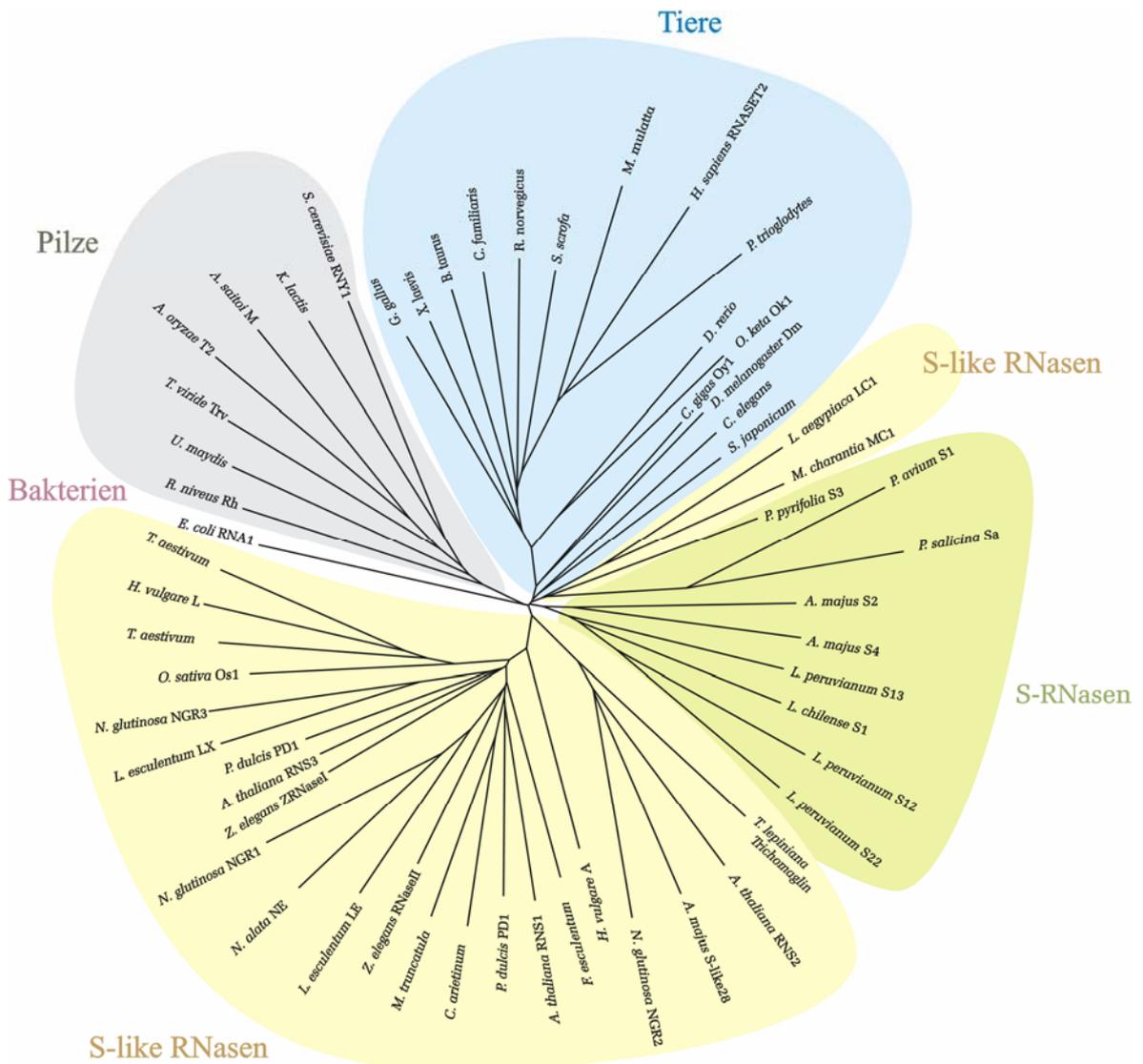


Abb. 2: Das ubiquitäre Vorkommen der T2-Typ RNasen in allen Organismenreichen und die Verwandtschaft der S-like RNasen der Pflanzen. Die Bezeichnungen hinter dem Artnamen sind die in der Literatur gebräuchlichen Bezeichnungen. Ein fehlender Zusatz kennzeichnet RNasen, die aus Datenbankeinträgen entnommen wurden und für die keine experimentellen Daten vorliegen.

Die physiologische Funktion vieler nicht-pflanzlicher T2-Typ RNasen ist allerdings nicht untersucht worden oder ergab kein schlüssiges Bild. Vielfach wird ihnen eine Metabolisierung externer RNA-Quellen zugeschrieben wie z.B. bei den sekretierten Enzymen aus Pilzen (Deshpande und Shankar, 2002) und der periplasmatischen RNase I aus *Escherichia coli*. Für *E. coli* ist diese Genfunktion nicht essentiell, da RNase I Stämme mit deletiertem *rna* Gen lebensfähig sind und auch die Überexpression nicht toxisch ist (Nicholson, 1997). Für die sekretierte RNY1, die einzige T2-Typ RNase von *Saccharomyces cerevisiae*, wird eine Beteiligung an der Regulation der Membranpermeabilität oder Stabilität vermutet (MacIntosh et al., 2001). Das menschliche Genom enthält ebenfalls ein homologes Gen, *RNASET2* (Trubia et al., 1997). Das Genprodukt ist ein sekretiertes Glykoprotein mit T2-Typ-RNase-Aktivität und Tumor- und Metastasen-supprimierender Wirkung (Acquati et al., 2005)

In den höheren Pflanzen erreicht die Superfamilie der T2-Typ RNasen ihre größte Vielfalt. Auf der Basis der Funktion wurden frühzeitig zwei Gruppen unterschieden, die **S-RNasen** und alle anderen T2-Typ RNasen, für die die Bezeichnung ‚**S-like RNasen**‘ eingeführt wurde (Taylor et al., 1993; Green, 1994). In den Primärsequenzen der S- und S-like RNasen sind neben den zwei CAS drei weitere Sequenzbereiche konserviert (Ioerger et al., 1991; Green, 1994). Eine aktuellere Einteilung auf der Basis der Exon-Intron-Strukturen und der Sequenzhomologien der kodierenden Bereiche pflanzlicher T2-Typ RNasen unterscheidet drei Klassen (Igic und Kohn, 2001):

- A) **T2-Typ/S-like** RNasen mit hochkonservierten Positionen von 2 bis 3 Introns,
- B) **T2-Typ/S-like** RNasen mit vielen konservierten Intronpositionen (> 6) unter Einschluß der Positionen der anderen Klassen,
- C) **S-RNasen** mit einer einzigen, aber hochkonservierten Intronposition.

Die **S-RNasen** wurden nur in den drei Pflanzenfamilien der Solanaceae, Rosaceae und Scrophulariaceae nachgewiesen und haben dort eine hochspezifische Funktion in der Pflanzenentwicklung. S-Gene (S-RNasen) sind die Genprodukte des polymorphen S-Locus (Anderson et al., 1986) und die Determinanten der gametophytischen Selbstinkompatibilität (GSI) des Solanaceen-Typs (McCubbin und Kao, 2000; Kao und Tsukamoto, 2004). Selbstinkompatibilität ist ein genetisch kontrollierter Zell-Zell-Erkennungsmechanismus, der zum Erhalt der genetischen Diversität durch Auskreuzung beiträgt (De Nettancourt, 2000). Die S-RNasen wirken als zytotoxische Agenzien

(McClure et al., 1989). Die blütenspezifisch exprimierten S-RNasen werden in das Transmissionsgewebe des Griffels sekretiert und in die wachsenden Pollenschläuche aufgenommen (Übersicht in Parry et al., 1997). Eine inkompatible Kreuzung (z.B. S-RNase und Pollen-S vom gleichen S-Haplotyp) führt zur Hemmung des Pollenschlauchwachstums als Folge des Abbaus der zytoplasmatischen RNA durch die S-RNase (McClure et al., 1990). Die RNase-Aktivität ist integraler Teil der S-Proteinfunktion. Enzymatisch inaktive S-RNasen mit Mutationen der katalytisch wirksamen Histidinreste hemmen das Pollenschlauchwachstum nicht mehr, und die Pflanzen verlieren die GSI Eigenschaft (Huang et al., 1994; Lee et al., 1994; Royo et al., 1994). Wie die Erkennung von ‚Selbst‘ und ‚Fremd‘ vor sich geht, ist noch nicht geklärt. Nach der Aufnahme der S-RNase in den wachsenden Pollenschlauch kommt es aber zur Interaktion mit dem F-box Protein (SLF) des Pollens, das durch den S-Locus kodiert wird (Luu et al., 2000; Qiao et al., 2004). Goldraij et al. (2006) zeigten kürzlich, dass S-RNasen in einem vakuolären Kompartiment des Pollenschlauches über Endozytose sequestriert werden und nur in der inkompatiblen Reaktion in das Zytoplasma entlassen werden.

Die ersten Primärsequenzen von **T2-Typ/S-like RNasen** wurden für die RNaseLE² und die RNaseLX aus *Lycopersicon esculentum* (Jost et al., 1991; Löffler et al., 1993) sowie für RNaseMC1 aus *Momordica charantia* (Ide et al., 1991) gewonnen. Im weiteren wurden Proteine oder kodierende DNA-Sequenzen aus anderen Pflanzenarten und Algen isoliert, darunter aus *Arabidopsis thaliana* (Taylor et al., 1993; Bariola et al., 1994), *Nicotiana glauca* (Dodds et al., 1996), *Zinnia elegans* (Ye und Droste, 1996), *Nicotiana glutinosa* (Kariu et al., 1998; Kurata et al., 2002), *Hordeum vulgare* (Rogers und Rogers, 1999), *Prunus dulcis* (Ma und Oliveira, 2000; Van Nerum et al., 2000), *Oryza sativa* (Iwama et al., 2001), *Antirrhinum majus x hisp* (Liang et al., 2002), *Trichosanthes lepiniana* (Gan et al., 2004), *Drosera adelae* (Okabe et al., 2005) und *Volvox carteri* (Shimizu et al., 2001).

² Abkürzungen zur Kennzeichnung der T2-Typ RNasen aus Tomate: LE - *Lycopersicon*, extrazellulär; LX - *Lycopersicon*, unbekannte, aber nicht-zytoplasmatische Lokalisation; LV - *Lycopersicon*, vakuolär.

3 T2-Typ Ribonukleasen in *Lycopersicon*

3.1 Organisation der *RNaseLE* und *RNaseLX* Gene

Notwendige Voraussetzung für eine molekulare und funktionelle Analyse der RNasen aus *Lycopersicon esculentum* war die Isolierung der Gene und ihrer regulatorischen Sequenzen. Den Ausgangspunkt dafür bildeten die von Jost et al. (1991) und Löffler et al. (1993) aufgeklärten Primärsequenzen der reifen, aus Zellkulturen gereinigten RNaseLE und RNaseLX Proteine, die 205 bzw. 213 Aminosäuren umfassen. Das entspricht molekularen Massen von 22,7 bzw. 24,3 kDa. Im Gegensatz zu vielen pilzlichen und tierischen T2-Typ RNasen und den pflanzlichen S-RNasen sind die beiden Enzyme aus Tomate nicht glykosyliert. Im Zuge der molekularen Analyse von isolierten Pflanzenvakoulen waren drei weitere, vakuolär lokalisierte Enzyme (RNaseLV1-3) nachgewiesen worden, deren Verwandtschaft zu den RNasen LE und LX geklärt werden sollte (Abel und Glund, 1986; 1987; Nürnberger et al., 1990; Löffler et al., 1992).

Die cDNA-Klone wurden aus einer λ ZAP-cDNA-Bank durch Immunscreening in Kombination mit PCR-Sonden und Plaque-Hybridisierung isoliert (Köck et al., 1995). In Übereinstimmung mit der bereits bekannten extrazellulären bzw. mikrosomalen Lokalisierung kodieren die RNaseLE und RNaseLX cDNA-Sequenzen auch für N-terminale, 25 bzw. 24 Aminosäuren umfassende Signalsequenzen zum kotranslationalen Transport in das endoplasmatische Retikulum (ER), enthalten aber keine zusätzlichen Propeptide (Köck et al., 1995).

RNaseLE und *LX* sind im haploiden Tomatengenom nur in je einer Kopie („single copy“) vorhanden (Köck et al., 1995; Stenzel, 1998). Das Fehlen von Kreuzhybridisierungen in genomischen Southernblots erlaubte den Schluss, dass keine unabhängigen Gene für die vakuolär lokalisierten Proteine LV1-3 existieren. Die Teilsequenzierung (N- und C-Termini, interne Peptide) und ein Fingerprinting tryptischer Peptide der LV1-3 Proteine untermauerten dieses Ergebnis (Köck et al., 1995):

- Die Sequenzen der extrazellulären RNaseLE und der vakuolären LV3 sind trotz unterschiedlicher Lokalisation identisch.
- LV1 und LV2 stellen posttranslationale Prozessierungsprodukte der RNaseLX mit Verkürzungen am C-Terminus dar (siehe Kap. 4.4 zur weiteren Diskussion).

In Übereinstimmung damit wurden auch unter nicht-stringenten Bedingungen stets nur cDNA-Klone der RNasenLE und LX aus der cDNA-Bank isoliert. Ob in anderen Pflanzenspecies vergleichbare Prozessierungen an T2-Typ RNasen stattfinden, ist nicht bekannt.

RNaseLE-orthologe Gene in anderen Pflanzenarten sind die RNasen *NE* und *NGRI* (*NW*) aus Tabak (Dodds et al., 1996; Kariu et al., 1998), *ZRNaseII* (Ye und Droste, 1996) und *RNSI* (Bariola et al., 1994). *RNaseLX* besitzt die höchste Sequenzidentität mit *RNaseNGR3* (Kurata et al., 2002) und *ZRNaseI* (Ye und Droste, 1996). Die deutlich geringere Identität zwischen den paralogen Genen *RNaseLE* und *LX* sowie die unterschiedliche, subzelluläre Lokalisation war für uns ein Hinweis, dass die beiden Mitglieder der T2-Typ RNase Familie in Tomate verschiedene Funktionen in der Pflanze haben, die sie jeweils mit orthologen Genprodukten aus anderen Pflanzenspecies teilen (Abel und Köck, 2001).

Auf der Basis der gewonnenen cDNA-Sequenzinformationen wurden die genomischen Sequenzen der RNasenLE und LX aus *L. esculentum* kloniert. Genomische Klone der RNaseLE wurden aus einer λ EMBL3-Bank isoliert. Zwei identische Klone enthalten das vollständige Gen mit 2,6 kbp 5'-aufwärts gelegener Sequenz (Köck et al., 2004). Dagegen wurde eine Promotorsequenz von 814 bp der *RNaseLX* unter Nutzung bereits charakterisierter Intronsequenzen (Schumann, 1995) und einer 5'-RACE-ähnlichen Methode mit PCR amplifiziert, kloniert und funktionell getestet (Köck et al., 2006). Darauf aufbauend lieferten GUS-Reporterpflanzen mit stabil integrierten Promotor-Konstrukten wichtige Hinweise für die zell- und gewebespezifische Expression der Tomaten-RNasen (vgl. Kap. 4.4; 5.1; 6.2). Es gibt bisher keine funktionellen Promotor-Untersuchungen für andere T2-Typ RNasen, die zum Vergleich herangezogen werden können.

RNaseLE besitzt zwei Introns, *RNaseLX* drei, wobei die Intronpositionen I_{LE1}/I_{LX1} und I_{LE2}/I_{LX2} konserviert sind und außerdem die Position I_{LE1}/I_{LX1} mit der Position des einzigen Introns der S-RNasen in Solanaceen übereinstimmt (Stenzel, 1998). Die beiden Gene gehören damit zur Klasse (A) der S-like RNasen mit hochkonservierten Positionen von 2 bis 3 Introns (vgl. Kap. 2).

3.2 Evolutionäre Abgrenzung der S- und S-like RNasen

Die RNasen *LE* und *LX* sind nicht in die Vermittlung von Selbstinkompatibilität involviert, sondern haben andere Funktionen im RNA-Katabolismus, z.B. im Abbau von endogener RNA während der Seneszenz, der Keimung (Kap. 4.4), bei Phosphatmangel (Kap. 6.2) und der Wundheilung (Kap. 5.2). Von den 9 Arten und 2 Varietäten der Gattung *Lycopersicon* sind 4 selbst-inkompatible und 7 selbst-kompatible Taxa. Die *LE* und *LX* Gene wurden von uns in allen selbst-kompatiblen und inkompatiblen Tomatenarten nachgewiesen (Stenzel, 1998). Kondo et al. (2002) bestätigten die Koexistenz der S-like und S-RNasen in Blüten und die fehlende Funktionalität der S-like RNasen in der Selbstinkompatibilität.

Perfekte Kosegregation und unabhängige Kartierung am gleichen Locus auf dem kurzen Arm von Chromosom 5 (zwischen den Markern TG432 und CT167; Tanksley et al., 1992) zeigen, dass (i) die *LE* und *LX* Gene aus einer Genduplikation hervorgegangen sind (Stenzel, 1998, Galan und Köck, unveröffentlichte Daten) und (ii) sie sich unabhängig von den S-RNasen entwickelt haben. Der polymorphe S-Locus, der die Allele der S-RNasen von Tomate kodiert (Tsai et al., 1992; Rivers et al., 1993) befindet sich dagegen auf dem Chromosom 1 des Tomatengenoms (Tanksley und Loaiza-Figueroa, 1985).

Evolutionäre Untersuchungen zum monophyletischen Ursprung der S-RNasen unterstreichen, dass S-RNasen und S-like RNasen ein gemeinsames Vorläufergen haben und sich die beiden Entwicklungslinien weit vor der Herausbildung der Asteridae und Rosidae getrennt haben (Ioerger et al., 1990; Taylor et al., 1993; Dodds et al., 1996; Igic und Kohn, 2001). Bereits die als Vorfahr für ca. 75 % aller dikotylen Pflanzen anzunehmende Spezies besaß S-RNasen und das darauf basierende System der gametophytischen Selbstinkompatibilität (siehe Kap. 2). Es hat sich nur in den Pflanzenfamilien der Solanaceae, Rosaceae und Scrophulariaceae erhalten. Die Trennung von der Entwicklungslinie der S-like RNasen war bereits vollzogen und liefert somit ein weiteres Argument für grundlegende und konservierte Funktionen der S-like RNasen im Pflanzenreich. Die Koexistenz der beiden pflanzlichen T2-Typ RNase-Gruppen wurde inzwischen in weiteren Pflanzenarten mit gametophytischer Selbstinkompatibilität bestätigt: in *Nicotiana glauca* (Dodds et al., 1996), *Prunus dulcis* (Ma und Oliveira, 2000) und *Antirrhinum sp.* (Liang et al., 2002).

3.3 Untersuchungen zur Basenpräferenz der RNA-Spaltung

Die endonukleolytischen T2-Typ RNasen katalysieren die Phosphodiester-Spaltung einzelsträngiger RNA über eine Säure-Base-Katalyse unter Beteiligung von zwei absolut konservierten Histidinresten. Ein dritter Histidinrest ist für die Stabilisierung des pentakovalenten Intermediates notwendig (vgl. Abb. 1). Durch die Phosphotransferase-Funktion der RNasen, d. h. die Übertragung des Phosphatrestes auf die 2'-Hydroxyl-Gruppe der Ribose, entstehen als Intermediate 2',3'-zyklische Phosphate am 3'-Terminus des RNA-Moleküls (Irie, 1997). Die Spaltung erfolgt optimal unter sauren pH-Bedingungen. Endprodukte bei langer Inkubation sind Mononukleotide, so dass keine Basenspezifität der Spaltung vorliegt. Das bedeutet auch, dass die meisten Enzyme alle 16 möglichen Dinukleosidphosphate (XpY, 3' → 5'), die als artifizielle Substrate eingesetzt wurden, umsetzen konnten (Irie und Ohgi, 1998). Obwohl die Spaltung von Homopolynukleotiden (polyN) ebenfalls zur Bestimmung der Basenspezifität herangezogen wird, sind die gewonnenen Aussagen durch Löslichkeitsunterschiede der Substrate wahrscheinlich begrenzt (Ohgi et al., 1997).

Aus den unterschiedlichen Umsatzraten der XpY-Substrate wurden jedoch **Basenpräferenzen** festgestellt wie die Adeninpräferenz der pilzlichen T2-Typ RNasen (Übersicht: Deshpande und Shankar, 2002). Die Samen-spezifischen RNasen Cusavitin aus *Cucumis sativus* und Melosin aus *Cucumis melo* spalten Homopolynukleotide mit Cytosin-Präferenz (Rojo et al., 1994a; 1994b). Die RNaseMC1 aus *M. charantia* nimmt bislang eine Ausnahmestellung ein, da sie überwiegend NpU (N = A,G,U oder C) spaltet und die Uracil-Spezifität von der am 3'-Ende lokalisierten Base (B₂-Stelle) bestimmt wird (Nakagawa et al., 1999; Numata et al., 2001).

Enzymatische Untersuchungen der RNasenLE, LX und LV³ mit Dinukleosidphosphaten als Substrat ergaben eine **Guanin-Präferenz** der Enzyme aus Tomate, während die Hydrolyserate von Homopolynukleotiden die Reihenfolge polyU > polyI > polyA > polyC hatte (Übersicht: Abel und Köck, 2001). Aus Struktur-Funktionsuntersuchungen der RNaseRh war bekannt, dass die Basenbindungsstelle B₁ von Trp49, Tyr57 und Asp51 gebildet wird und Asp51 für die Adenin-Präferenz der RNaseRh eine besondere Rolle spielt (Ohgi et al., 1993). In der RNaseLE sind Trp42 und

³ Das von Abel und Glund (1986; 1987) charakterisierte Enzym wird hier als RNaseLV bezeichnet. Es ist identisch mit LV3 (Löffler et al., 1992).

Tyr50 konserviert, während Asp51 (Rh) mit Asn44 (LE) ersetzt ist, so dass die RNaseLE gerade im Hinblick auf diese Eigenschaft ein gutes Modell darstellte.

Um zu untersuchen, welchen Anteil Asn44 an der Basenerkennung und Präferenz der RNaseLE hat, wurde die Position in Asp44 mutiert. Rekombinante RNaseLE und die Mutante N44D wurden heterolog in *S. cerevisiae* exprimiert. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von M. Irie konnte gezeigt werden, dass die Spaltungseigenschaften der rekombinanten RNaseLE mit denen des gereinigten Enzyms aus Tomate übereinstimmen und Guanin-Präferenz vorliegt. Auf der Basis kinetischer Untersuchungen mit Dinukleosidphosphaten ist für die Mutante N44D eine klare Verschiebung der Basenpräferenz von Guanin zu Adenin zu beobachten. Das lässt auf eine ähnlich wichtige Rolle von Asn44 in der Basenerkennung der RNaseLE wie für Asp51 in RNaseRh schließen (Ohgi et al., 1997). Die Analyse der Kristallstruktur der RNaseLE bestätigte die Beteiligung der Aminosäure Asn44 an der Basenerkennung (Tanaka et al., 2000). Die Ergebnisse für RNaseLE sind auch für andere RNasen von grundlegender Bedeutung, da Asn44 auch in RNaseLX und anderen pflanzlichen RNasen konserviert ist.

Strukturell basieren die Basenspezifität und damit auch eine Basenpräferenz auf der Ausbildung der Substratbindungsstellen B₁ und B₂. In den Basenspezifischen Enzymen RNaseA (Pyrimidin-spezifisch; Richards und Wyckoff, 1971) und RNaseT1 (Guanin-spezifisch; Heinemann und Sängler, 1982)⁴ sind dichte Wasserstoffbrückenbindungen und Seitenketten aromatischer Aminosäuren für die Basenerkennung verantwortlich und bestimmen die Spezifität. Demgegenüber ist an der B₁-Stelle im aktiven Zentrum der RNaseLE ein Cluster von hydrophoben Resten zu finden, welches die Unspezifität der RNaseLE bedingt (Tanaka et al., 2000).

⁴ Die RNase T1 Familie (EC 3.1.27.3.) und die RNase A Familie (EC 3.1.27.5) sind ebenfalls Endonukleasen, die 3'-Phosphomonoester freisetzen.

4 Intrazelluläre Lokalisierung und Rolle der RNaseLX während der Pflanzenentwicklung

4.1 Allgemeine Aspekte

Durch die Analyse von Vakuoleninhalten wurde gezeigt, dass RNA-spaltende Enzymaktivitäten zur Grundausrüstung lytischer Vakuolen gehören (Boller, 1982; Boller und Wiemken, 1986). Obwohl die hochaktiven T2-Typ RNasen mit breiter Substratspezifität von den produzierenden Zellen in den sekretorischen Weg abgegeben werden, war es besonders überraschend, dass die intrazellulär exprimierte RNaseLX in hoch gereinigten Vakuolenpräparationen nicht nachgewiesen werden konnte (Löffler et al., 1992; Abel und Köck, 2001). Der intrazelluläre Verbleib der RNaseLX im Endomembransystem sollte bestimmt werden, da wir davon wichtige Hinweise auf die Funktion dieser RNase und ihre Rolle in der Pflanze erwarteten.

Das sekretorische Endomembransystem bildet die Grundlage der Kompartimentierung der meisten Komponenten eukaryontischer Zellen und ist Teil wichtiger biosynthetischer Wege für Proteine, Lipide und Kohlenhydrate. Strukturell umfasst der sekretorische Weg in Pflanzenzellen neben der Kernhüllmembran, das endoplasmatische Retikulum (ER), den Golgi-Apparat, das prävakuoläre Kompartiment, die lytische Vakuole, Speichervakuolen, die Plasmamembran und eine große Zahl von Transportvesikeln (Pimpl und Denecke, 2002). Der vesikuläre Transport führt zu einer hohen Dynamik im sekretorischen System und ist von Abschnürung bzw. Verschmelzung verschiedener Membrankomponenten gekennzeichnet. Für den Übertritt in das ER besitzen kernkodierte Proteine grundsätzlich ein N-terminales, hydrophobes Signalpeptid. ER-residente Proteine tragen hochspezifische C-terminale Tetrapeptide (Pelham, 1989). Auch alle weiteren Transport- und Sortierungssignale löslicher Pflanzenproteine für den Transport über den Golgi-Apparat hinaus werden von der Primärsequenz kodiert. Proteine mit einem vakuolären Zielort besitzen N- oder C-terminale Propeptide, die abgespalten werden, oder interne, sequenzspezifische Peptide. Proteintransport in die verschiedenen Vakuolentypen ist ein aktiver, sättigbarer Sortierungsprozeß, der von Rezeptoren wie z. B. BP-80 und Vesikeltransport vermittelt wird. Proteine ohne Sortierungssignale oder mit funktionell inaktiven oder deletierten Signalen werden über so genannten ‚Massentransport‘ (‚bulk flow‘) aus Zellen sekretiert. Neueste Untersuchungen belegen, dass in

Pflanzen funktionell und strukturell verschiedene Vakuolentypen in einer Zelle koexistieren können (Paris et al., 1996; Neuhaus und Rogers, 1998; Vitale und Denecke, 1999; Robinson und Rogers, 2000; Philipson et al., 2001; Vitale und Galili, 2001; Paris und Neuhaus, 2002).

4.2 Biochemische und immunzytochemische Lokalisation der RNaseLX im Endomembransystem der Zelle

Die folgenden Versuche hatten das Ziel, die subzelluläre Lokalisation der RNaseLX durch Zellfraktionierungsexperimente, immunologische Nachweise und mikroskopische Analysen zu bestimmen. Für die Immunnachweise wurden polyklonale anti-RNaseLX Antikörper in Kaninchen produziert. Als Antigen diente ein rekombinantes, verkürztes RNaseLX-Protein (C-terminaler Teil, ca. 14 kDa). Als experimentelles System für die Lokalisierungsexperimente wurden phosphatverarmte Tomaten-Zellsuspensionskulturen gewählt, die ein homogenes Zellmaterial mit hoher RNaseLX-Expression darstellen (Lehmann et al., 2001). Nach Isolierung in einem Saccharose-Stufengradienten wurde ein kontinuierlicher Saccharose-Dichtegradient zur Auftrennung der mikrosomalen Fraktion in ER und Golgi angeschlossen. Die Gradientfraktionen wurden sowohl mit enzymatischen als auch mit immunologischen Markern kontrolliert. RNaseLX kolokalisierte mit den ER-Markern NADH-abhängige Cytochrom C-Reduktase und BiP. Ein weiterer Beweis für die ER-Lokalisation der RNaseLX wurde mit ‚ER-Shift‘-Experimenten erbracht. Sie zeigen, dass bei Veränderung der ER-Dichte durch Ablösung der Ribosomen vom rauhen ER mittels Zusatz von EDTA die Kolokalisation von RNaseLX und BiP nach Dichtegradienten-Zonenzentrifugation erhalten bleibt. Der immunzytochemische Nachweis von RNaseLX im ER von Pi-Mangel-induzierten Zellen sowie die Kolokalsation mit BiP und dem ER-Marker Rhodamin B bestätigten unabhängig die Lokalisation der RNaseLX im ER (Lehmann et al., 2001).

4.3 Das Peptid HDEF – ein neuartiges ER-Retentionssignal

ER-Retention von Proteinen ist ein hoch konservierter, Rezeptor-abhängiger Sortierungsprozess und wird in eukaryontischen Zellen über die C-terminalen Peptide KDEL oder HDEL vermittelt. Aus dem Vergleich der Primärsequenzen von T2-Typ RNasen wurde sichtbar, dass RNaseLX einen unikalen C-Terminus von 9 Aminosäuren aufweist. Zudem besaßen die letzten vier Aminosäuren der RNaseLX (HDEF) eine bemerkenswerte Ähnlichkeit zu bekannten ER-Retentionssignalen (Köck et al., 1995). Obwohl verschiedene Varianten der Retentionssignale K/HDEL in Pflanzen getestet worden waren, gab es keine Untersuchungen zum Peptid HDEF (Vitale et al., 1993).

Targeting im eukaryontischen Modellsystem *Saccharomyces cerevisiae*

Um die Lokalisationsstudien zu untermauern, sollte das für die ER-Lokalisation verantwortliche Signal eindeutig identifiziert und seine Funktionalität als notwendiges und hinreichendes Sortierungssignal nachgewiesen werden. Ein Signal ist notwendig, wenn beim Fehlen die ER-Retention unterbleibt und das Protein sekretiert wird. Andererseits ist ein Signal hinreichend, wenn das gleiche Peptid die ER-Retention eines sonst vakuolären oder sekretierten Proteins vermittelt. Entsprechende Versuche wurden zuerst mit der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt, die ein Modellobjekt für die molekulare Analyse des Endomembrantransports darstellt. Wie in Tomaten-Zellsuspensionskulturen wird das rekombinante RNaseLX-Protein in Hefe intrazellulär gefunden und kolokalisiert mit dem ER-Marker SEC61 (Kaletta et al., 1998). C-terminal verkürzte LX-Proteine ohne das unikale Nonapeptid (RNaseLX Δ 9; Δ STNDDHDEF) oder das vermutete ER-Retentionssignal (RNaseLX Δ 4; Δ HDEF) werden sekretiert. Um die Fähigkeit der beiden Peptidmotive zur ER-Retention von Fremdproteinen zu testen, wurden in einem zweiten Schritt chimäre Gene auf der Grundlage der für die vakuoläre Chitinase FB7-1 aus Tabak kodierenden Sequenz hergestellt. Die Chitinase stellt ein für die Untersuchungen geeignetes Reporterprotein für *S. cerevisiae* dar. Kunze et al. (1998) hatten bereits gezeigt, dass FB7-1 in Hefe korrekt prozessiert wird und nach Abspaltung des C-terminalen, vakuolären Targetingpeptides (VTP, 7 Aminosäuren) auch in Hefevakuolen akkumuliert, während das Fehlen des VTP im Konstrukt Chitinase FB7-1 Δ VTP zur Sekretion führte. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Kunze (IPK Gatersleben) konnte gezeigt werden, dass die C-

terminale Verlängerung von FB7-1ΔVTP mit den RNaseLX-Peptiden STNDDHDEF bzw. HDEF zu einer vollständigen Retention der chimären Proteine in Hefezellen führt (vgl. schematische Übersicht der Konstrukte in Kaletta et al., 1998, Abb. 1). Nachfolgende Fraktionierungsexperimente bewiesen zudem die Akkumulation der Chitinase im ER. Zusammenfassend können wir feststellen (Kaletta et al., 1998):

- Das HDEF-Peptid ist ein funktionelles (notwendiges und hinreichendes) ER-Retentionssignal in Hefe.
- Das zusätzliche Peptid STNDD am C-Terminus der RNaseLX ist für diese Funktion nicht notwendig.

Nachweis des Targetings im pflanzlichen System

Nach den erfolgreichen Versuchen mit dem heterologen Hefe-System und der biochemischen und immunzytochemischen ER-Lokalisierung der RNaseLX (Kap. 4.2) wurde in einem weiteren Schritt das neuartige ER-Retentionssignal auch in Pflanzen getestet, da trotz vieler Gemeinsamkeiten im sekretorischen Weg im Einzelfall auch unterschiedliche Sortierungsprozesse für Proteine beobachtet wurden (Bassham und Raikhel, 2000a; 2000b). Als experimentelles System dienten stabil transformierte Tabakpflanzen mit 2S Albumin als Reporterprotein (Lehmann et al., 2001). 2S Albumin ist ein Samenprotein der Paranuss (*Bertholletia excelsa*), das in Speichervakuolen abgelagert wird. Da Tabakpflanzen keine ähnlichen Proteine enthalten, waren die chimären 2S Albumin-Proteine in den Fraktionierungsexperimenten eindeutig mit spezifischen Antikörpern detektierbar. Die Untersuchungen bauten auf Ergebnissen von Saalbach et al. (1996) auf, die bereits gezeigt hatten, dass rekombinantes 2S Albumin in Tabakpflanzen korrekt prozessiert und in die Vakuolen von Tabakmesophyllzellen transportiert wird, während das C-terminal um vier Aminosäuren verkürzte Protein 2SΔIAGF sekretiert wird. Wie in Lehmann et al. (2001) dargestellt, wurden die Oligonukleotide für die Peptide STNDDHDEF und HDEF sowohl an die vollständige cDNA des 2S Albumin als auch das verkürzte Konstrukt 2SΔIAGF fusioniert. Mit den Kontrollen 2S und 2SΔIAGF wurden insgesamt 6 verschiedene Genkonstrukte unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors hergestellt (vgl. Abb. 5 in Lehmann et al., 2001), in binäre Vektoren kloniert und zur Transformation von Tabak-Blattscheiben mit *Agrobacterium tumefaciens* genutzt. Transgene Regenerate wurden mit dem Antikörper auf konstitutive

Albuminexpression getestet und ausgewählte Linien für die biochemischen Analysen verwendet. Während die Kontrollen die erwartete Lokalisierung in Vakuolen (2S) bzw. extrazelluläre Proteinakkumulation (2SΔIAGF) aufwiesen, wurden alle Reporterkonstrukte mit dem Retentionssignal HDEF ausschließlich in der mikrosomalen Fraktion gefunden. ER-Shift-Experimente, analog zu den in Kap. 4.2 für die Tomatenzellkulturen dargestellten, und die Kolo-kalisation mit BiP bewiesen, dass das Peptidmotiv HDEF auch in Pflanzen ein voll funktionsfähiges ER-Retentionssignal ist (Lehmann et al., 2001).

4.4 Zellspezifische Expression während der Pflanzenentwicklung und Funktion während pflanzlicher Zelltod-Prozesse

RNaseLX ist nicht in den ‚normalen‘, in den Zellen ablaufenden RNA-Stoffwechsel involviert und wird nicht konstitutiv exprimiert. Um Hinweise auf eine Funktion der RNaseLX zu erhalten, wurden Pflanzenorgane, Gewebe und Entwicklungsstadien von Tomatenpflanzen auf RNaseLX Expression getestet sowie abiotische und biotische Stressfaktoren einbezogen. Neben der Bestimmung des RNase-Aktivitätsprofils (Abel und Köck, 2001) wurden Northern- und Westernanalysen durchgeführt und die räumliche Verteilung der GUS-Aktivität in transgenen Reporterpflanzen herangezogen.

RNaseLX-Transkript- und Proteinakkumulation erfolgt sowohl in seneszierenden Blättern und Blüten sowie im Endosperm keimender Samen (Lehmann et al., 2001; Stenzel et al., 2003b). RNaseLX wurde immunzytochemisch ausschließlich in sich entwickelnden Tracheenelementen nachgewiesen, die bereits sekundäre Zellwände ausgebildet haben (Lehmann et al., 2001). Außerdem wurde hohe Promotoraktivität in Abszissionszonen von Kotyledonen und Blättern gefunden, wenn Tomatenpflanzen Phosphatmangel ausgesetzt wurden sowie im Griffel der Blüte und im Leitgewebe reifer Früchte (Köck et al., 2006). Mit diesen Ergebnissen in Übereinstimmung stehen die Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Amnon Lers, die ebenfalls eine Seneszenz-abhängige Erhöhung der Transkriptlevel der *RNaseLX* (Lers et al., 1998) sowie eine Proteinakkumulation bei normaler und Ethylen-induzierter Seneszenz und in Abszissionszonen nachweisen können (Lers et al., 2006). Damit korreliert wiederum, dass der *RNaseLX*-Promotor eine Sequenz mit Homologie zu einem *cis*-Element für Ethylen-

abhängige Expression enthält (Köck et al., 2006). Obwohl diese Ergebnisse einen ersten Hinweis auf hormonelle Kontrolle geben, ist offen, wie die differentielle Expression der RNaseLX in den unterschiedlichen Entwicklungsprozessen reguliert wird. Die Xylembildung beispielsweise ist abhängig von Auxin-, Cytokinin- und Brassinosteroidwirkung und kann im *in vitro*-Modell als Transdifferenzierung von *Zinnia elegans*-Mesophyllzellen in Tracheenelemente untersucht werden (Fukuda, 2004). In diesem System wird die RNaseLX-homologe RNase ZRNaseI ebenfalls erst nach Bildung der sekundären Wände im letzten Stadium des Differenzierungsprozesses (Phase 3) exprimiert (Ye und Droste, 1996).

Seneszenz, Keimung, Xylemdifferenzierung und Abszission sind pflanzliche Differenzierungsprozesse, bei denen programmierter Zelltod (PCD) in ganzen Organen, Geweben oder nur in bestimmten Zelltypen auftritt (Greenberg, 1996; Pennell und Lamb, 1997; van Doorn und Stead, 1997; González-Carranza et al., 1998; Fukuda, 2000; Lam et al., 2000; Quirino et al., 2000). Funktionell werden für den programmierten Zelltod in Pflanzen inzwischen Autophagie-vermittelte Prozesse im Gegensatz zur Apoptose favorisiert (Thompson und Vierstra, 2005; van Doorn und Woltering, 2005). Van Doorn und Woltering (2005) unterscheiden auf morphologischer Ebene vier PCD-Typen. In drei Typen haben das Endomembransystem und im Besonderen die Vakuolen eine zentrale Stellung. Die zeitliche und räumliche Abfolge der Autophagie in den Zellen, ihr Umfang, das Auftreten der Vakuolenlyse, die Zerstörung von Plasmamembranen und Zellwänden differieren und sind vom betrachteten PCD-Prozess und seiner Rolle in der Pflanzenentwicklung, dem Zelltyp und auch der Pflanzenart abhängig (Marty, 1999; Obara et al., 2001; van Doorn und Woltering, 2005).

RNaseLX ist die einzige T2-Typ RNase, deren Expression in mehreren zell- und gewebespezifischen PCD-Prozessen nachgewiesen wurde. Das weist zugleich darauf hin, dass in den genannten Prozessen der gleiche zelluläre Sortierungsmechanismus für diese RNase benutzt wird. Nach unseren Ergebnissen nimmt RNaseLX am Abbau der zellulären RNA offensichtlich über einen alternativen Export-Mechanismus ohne Golgi-Beteiligung teil. Ausgehend von der entscheidenden Bedeutung des HDEF-Motivs für das Targeting der RNaseLX kommt die Sequestrierung in einem spezifischen, prävakuolären Kompartiment in Betracht, welches nach Aktivierung (z. B. Azidifizierung) die RNase und andere hydrolytische Enzyme kontrolliert in das Zytoplas-

ma der abzubauenen Zelle abgeben kann. Für die subzelluläre Funktionalisierung PCD-involvierter Proteasen wurden ähnliche Transportwege gefunden bzw. subzelluläre Kompartimente nachgewiesen:

- Charakterisierung spezieller KDEL-Vesikel in Kotyledonen während der Keimung, die nur bei Vorhandensein des Motivs mit Cystein-Proteinase mit KDEL-Motiv beladen werden (Toyooka et al., 2000; Okamoto et al., 2003)
- Die Bildung selektiver Transportvesikel wird durch Bindung des ‚Cargo‘-Moleküls an seinen Rezeptor ausgelöst (Paris und Neuhaus, 2002).
- Seneszierende Kotyledonen von *Ricinus communis* bilden ER-Vesikel (Ricosomen), die eine Cystein-Proteinase mit KDEL-Motiv sowie BiP und Protein-Disulfid-Isomerase enthalten. Ricinosomen werden azidifiziert und lösen sich im Endstadium des programmierten Zelltodes auf (Schmid et al., 1998; 1999; 2001).
- Nachweis strukturell unabhängiger, Seneszenz-assoziiierter Vakuolen in Zellen mit Zentralvakuolen (Otegui et al., 2005).

RNaseLX ist am Massenabbau von RNA beteiligt (Lehmann et al., 2001). Katabole Prozesse in seneszierenden Organen (Blätter, Blüten) und im Endosperm während der Keimung dienen dem Nährstoff-Recycling und der Versorgung von ‚Sink‘-Organen bzw. der Versorgung des Keimlings mit Nährstoffen. Andererseits ist bei zellspezifischem PCD wie der Xylembildung der Nährstoffgewinn gering, so dass die Rolle der RNase hier eher in der Beteiligung an der Ausdifferenzierung des Zelltyps (funktionsfähiges Tracheenelement) zu sehen ist. In RNaseLX-*antisense* Pflanzen mit stark reduzierter RNaseLX-Proteinmenge ist die Blattseneszenz sowie die Abszission der Kotyledonen merklich retardiert. Das könnte darauf hindeuten, dass die generelle Inhibition der Translation oder der Abbau von bestimmten Transkripten für den koordinierten Ablauf der Seneszenz notwendig ist (Lers et al., 2006).

Der Abbau von Ribonukleinsäuren stellt Nukleobasen, Zuckerreste und Phosphat für den Zellstoffwechsel bereit. Der erste Schritt im Endabbau, die Spaltung einzelsträngiger RNA in Mononukleotide wird dabei von der basenunspezifisch spaltenden RNaseLX durchgeführt, während akzessorische Enzyme (Phosphodiesterase, Nukleotidase, Phosphorylase) den weiteren Nukleotidabbau übernehmen oder die Metabolite in den Wiederverwertungsweg („salvage“) eingespeist werden (Wagner und

Backer, 1992; Abel et al., 2000; Moffatt und Ashihara, 2002; Zrenner et al., 2006). Uridin bzw. Oligonukleotide als Abbauprodukte von rRNA konnten in Vakuolen nachgewiesen werden (Leinhos et al., 1986; Abel et al., 1990).

Außer RNasen und Proteasen (Beers et al., 2004) wurden auch S1-Typ DNasen (Sugiyama et al., 2000) und Lipasen (Graham und Eastmond, 2002) charakterisiert, die in den Endabbau von Makromolekülen involviert sind. Es ist durchaus denkbar, dass die verschiedenen Enzymklassen räumlich getrennt in Vakuolen und speziellen Organellen oder Vesikeln akkumulieren und damit der spezifische Abbau zellulärer Komponenten reguliert werden kann. Das Auftreten der C-terminal verkürzten RNaseLX-Varianten RNaseLV1 und LV2 könnte ein Indiz für eine unspezifische Wirkung proteolytischer Enzyme sein, die mit RNaseLX während des Endabbaus zumindest zeitweise kolokalisieren.

5 Untersuchungen zur Funktion der RNaseLE

RNaseLE ist primär ein apoplastisches Protein, das keinen posttranslationalen Veränderungen unterliegt (Jost et al., 1991; Köck et al., 1995; Abel und Köck, 2001). Kultivierte Tomatenzellen sekretieren das Protein in das Medium. Das Enzym kann auch aus dem Interzellularraum von Blättern transgener Tomatenlinien (*35S::RNaseLE*) isoliert werden, die RNaseLE konstitutiv und ektopisch exprimieren (Köck et al., 1999). Da andererseits gereinigte Vakuolen aus Zellkulturzellen eine signifikant RNaseLE enthalten, sind auf zellulärer Ebene beide Lokalisationsorte in Betracht zu ziehen.

5.1 Gewebespezifische Expression der RNaseLE

Als Methode der Wahl zum Nachweis der gewebe- oder zellspezifischen Expression während der normalen Pflanzenentwicklung erwies sich die Analyse transgener Tomatenlinien mit dem Reporter β -Glucuronidase unter Kontrolle des *RNaseLE*-Promotors (*PromLE::uidA*). Überraschenderweise und erstmalig für eine T2-Typ RNase wurde Promotoraktivität im Phloem gefunden und die spezifische Expression im Leitgewebe

mit histochemischen Analysen von Stängeln, Blattstielen und Wurzelspitzen untermauert. Mittels *in situ* Hybridisierung wurde nachgewiesen, dass *RNaseLE* besonders in jungen, undifferenzierten Phloemparenchymzellen exprimiert wird, während im ausdifferenzierten Phloem kein Transkript nachgewiesen werden konnte. Dagegen konnte RNaseLE-Protein immunzytochemisch in Siebelementen nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit dem Expressionsort enthält der *RNaseLE*-Promotor putative *cis*-Elemente für Phloem-assoziierte Expression (Köck et al., 2004; Groß, 2005). Trotz dieser experimentellen Befunde, kann über eine mögliche Funktion der RNaseLE in der Phloemdifferenzierung während der normalen Pflanzenentwicklung bislang nur spekuliert werden, da auch transgene *antisense*-Tomatenpflanzen mit reduzierter RNaseLE-Expression keine Hinweise auf beeinträchtigte Zellfunktionen ergaben (Hoffmann, 2002).

Eine Abwehrfunktion des extrazellulär lokalisierten Enzyms innerhalb der unspezifischen Pathogenabwehr ist denkbar. Die LE-homologe RNaseNE aus *Nicotiana glauca* wird nach Applikation des Elizitors Cryptogein induziert (Galiana et al., 1997). Hugot et al. (2002) zeigten, dass die rekombinante und aktive RNaseNE *in vitro* das Hyphenwachstum pathogener Oomyceten hemmte während ein inaktives Protein keinen Effekt hatte. Es wird spekuliert, dass die RNaseNE in die Hyphen aufgenommen wird und deren zytoplasmatische RNA zerstört.

5.2 Räumliche Verteilung der Expression und Regulation der RNaseLE in der Wundantwort

Unter vielen getesteten, potentiellen Stressfaktoren induziert nur mechanische Verwundung RNaseLE-Expression. Dieses wurde von uns und der Arbeitsgruppe um A. Lers mit Northernanalysen nachgewiesen (Lers et al., 1998; Stenzel, 1998). Im Weiteren untersuchten wir die Expression eingehender und bezogen mikroskopische, molekularbiologische und biochemische Analysen ein (Groß et al., 2004; Köck et al., 2004; Groß, 2005).

Die Gewebespezifität der Wundantwort

Im Zusammenhang mit den Untersuchungen zur Gewebespezifität der RNaseLE-

Expression ungestresster Pflanzen wurde deutlich, dass GUS-Aktivität nur im Leitgewebe verwundeter Blätter von *PromLE::uidA*-Linien nachweisbar ist (Köck et al., 2004). Die transkriptionelle Aktivierung des RNaseLE-Promotors steht in Übereinstimmung mit dem mRNA- und Proteinnachweis für RNaseLE an der Verwundungsstelle. Im Vergleich von Blattspreite und Mittelrippe, die die primären Gefäßbündel enthält, ist sowohl die *RNaseLE* mRNA- als auch die mit Westernblotting nachgewiesene RNaseLE-Protein-Akkumulation in den Mittelrippen deutlich höher als in den verbleibenden Blattteilen. Die Analyse von verletzten Stängelbereichen in unterschiedlicher Entfernung von der Verwundungsstelle durch *in-situ* Hybridisierung bestätigte, dass *RNaseLE* (i) nur lokal begrenzt an der Verwundungsstelle und (ii) nur im Leitgewebe exprimiert wird. Parenchym- und Rindenzellen zeigten keine Expression (Köck et al., 2004; Groß, 2005).

Die pflanzliche Wundantwort

Pflanzen ändern nach mechanischer Verwundung oder Gewebeerstörung durch pflanzenfressende Tiere, im Besonderen Insekten, ihre Genexpression dramatisch. Als Konsequenz erhöht sich die Abwehr gegen Fraßfeinde, entsteht ein Wundverschluss begleitet von Wundheilung und eine nachfolgende Infektion mit opportunistischen Pathogenen wird verhindert. Ausdruck dieser komplexen Abwehrstrategien ist die synergistische und antagonistische Vernetzung meist jasmonatabhängiger Signaltransduktionsketten der Wundantwort und Pathogen-aktivierter Genexpression und ihre Modulation durch Ethylen und Abscisinsäure (ABA) (Felton und Korth, 2000; De Bruxelles und Roberts, 2001; León et al., 2001; Wasternack und Hause, 2002; Lorenzo und Solano, 2005).

Seit dem Bericht von Green und Ryan (1972) über die systemische Wundinduktion von Proteinase-Inhibitoren (PIN) ist *Lycopersicon esculentum* ein Modellobjekt für die Untersuchung der Wundantwort (Ryan, 2000) geworden. Dabei liegen eindeutige Unterschiede zur Signaltransduktion in *Arabidopsis thaliana* vor (León et al., 2001; Lorenzo und Solano, 2005). Zentrale Signalmoleküle für die lokale und systemische Wundantwort in Tomate sind das Peptid Systemin (Sys)⁵ und das Oxylinipin Jasmonsäure (JA)⁶

⁵ Das Systemin aus *Lycopersicon* besteht aus 18 Aminosäuren [AVQSKPPSKRDPPKMQTD], ist Prolin-reich und ein C-terminales Prozessierungsprodukt des Präkursors Prosystemin mit 200 Aminosäuren (Pearce et al., 1991).

(Ryan, 2000; Ryan und Moura, 2002; Wasternack und Hause, 2002). Eine Vielzahl von Daten besonders der Arbeitsgruppe um C. Wasternack zeigte, dass ein lokaler, positiver Feedback-Mechanismus zur Amplifikation der Wundsignale führt und zur Generierung des vermutlich JA-basierten, systemischen Signals (Schilmiller und Howe, 2005). Systemin amplifiziert die Synthese von JA durch transkriptionelle Aktivierung von Biosyntheseenzymen wie Allenoxydyclase (AOC) und JA-Akkumulation führt wiederum zur Prosystemin-Synthese (Hause et al., 2003; Stenzel et al., 2003a). Die Biosynthese sowohl von JA [Parenchym und Geleitzelle-Siebelement-Komplex (Hause et al., 2000; Hause et al., 2003)] als auch von Prosystemin [Phloemparenchym (Narváez-Vásquez und Ryan, 2004)] sind im vaskulären Gewebe lokalisiert. Systemin bindet an die LRR-Rezeptorkinase SR160, die auch Brassinosteroid-Wirkungen vermittelt (Montoya et al., 2002; Scheer und Ryan, 2002), während für JA kein Rezeptor bekannt ist.

Jasmonat- und Systemin-unabhängige Expression nach Verwundung

Die Begrenzung der wundinduzierten RNaseLE-Expression auf das vaskuläre Gewebe, aber vor allem die räumliche Nähe zur Lokalisation von Enzymen der Biosynthese von JA und Systemin im Leitgewebe von Tomate warf die Frage nach dem Zusammenhang zwischen wundinduzierter RNaseLE-Expression und systemischer Wundantwort auf.

Wir verglichen die zeitliche und räumliche RNaseLE-Expression mit der Expression von Proteinase-Inhibitor *PIN2*, einem ausgewiesenen, lokal und systemisch wundinduzierten Markergen der Tomate (Stenzel et al., 2003a). Die *PIN2*-Expression wurde gleichzeitig genutzt, um die Applikationsbedingungen in den pharmakologischen Experimenten zu kontrollieren. Die Hauptergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen (Groß et al., 2004; Groß, 2005):

- Im Gegensatz zu *PIN2* wird *RNaseLE* nur direkt in verwundeten Blättern (**lokale Wundantwort**) aber nicht in benachbarten, unverwundeten Blättern (systemisch) exprimiert. *RNaseLE* gehört zu den spät induzierten Genen.
- **Die wundinduzierte Expression von *RNaseLE* wird nicht durch Systemin reguliert.** Systeminapplikation induziert keine *RNaseLE*-Expression. Die lokale Wund-

⁶ Auch andere Oxylipine wie OPDA [*cis*-(+)-12-oxo-Phytodiensäure] und JA-Metabolite wie JA-Ile-Konjugat sind in die Wundantwort involviert (Strassner et al., 2002; Schaller et al., 2004; Staswick und Tiriyaki, 2004).

antwort in Form von *RNaseLE*-Expression ist in der Systemin-Perzeptionsmutante *spr1* (Li et al., 2003) nicht unterdrückt. Die Blockierung des Systemin-Rezeptors durch Vorinkubation mit einem inaktiven Systemin-Analogen⁷ kann die Induktion nach Verwundung ebenfalls nicht verhindern, wohl aber die *PIN2*-Expression.

- **An der wundinduzierten Expression der *RNaseLE* sind JA und JA-Biosynthese nicht beteiligt.** Die exogene Applikation von Jasmonsäure-Methylester oder von Ethyl-indanoyl-Isoleucin-Konjugat, einem funktionellen Coronatin-Analogen (Schüler et al., 2001; 2004), führt weder zur Erhöhung des *RNaseLE*-mRNA-Levels noch zur Promotoraktivierung. Die endogene Erhöhung der JA-Konzentration in *AOCsense* Tomatenlinien oder die unterdrückte JA-Synthese in *AOCantisense* Pflanzen (Stenzel et al., 2003aa) hat keine Auswirkungen auf die wundinduzierte Transkriptakkumulation sowie die *RNaseLE*-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp.
- Weitere getestete Effektoren der Wundantwort in Tomate wie Oligogalakturonide, Chitosan, ABA, Ethylen und Salizylsäure ergaben keine Hinweise auf eine Beteiligung an der induzierten Expression der *RNaseLE* bei mechanischer Verwundung.

Mit der Identifizierung von Signaltransduktionsmutanten in Tomate wurde deutlich, dass in Bezug auf die Regulation zwei Gruppen wundinduzierter Gene unterschieden werden müssen. Das sind einerseits klassische Abwehrgene wie Polyphenoloxidase, Proteinase-Inhibitoren, Leucin-Aminopeptidase, Arginase, Threonin-Deaminase mit lokal/systemischer, Systemin/JA-abhängiger Aktivierung (Ryan, 2000; Chen et al., 2005) und andererseits lokal und systemisch aktivierte Gene mit JA-unabhängiger Regulation wie die Glukosyltransferase *Tw1*, LipoxygenaseD; Allenoxidsynthase1 und wundinduzierte Proteinkinase (O'Donnell et al., 1998; Howe et al., 2000; Lee und Howe, 2003).

Nach unseren Analysen ist *RNaseLE* der Prototyp einer dritten Gruppe von Genen in Tomate, die nach mechanischer Verwundung ausschließlich lokal und unabhängig vom Systemin/JA-Weg der Wundantwort reguliert werden (Groß et al., 2004). cDNA-Microarray-Daten zur späten bzw. lokalen Expression der *RNaseLE* unterstützen diese Ergebnisse (Frick und Schaller, 2002; Strassner et al., 2002). Die Tabak-

⁷ Das inaktive Analogon Systemin-17 hat den Aminosäure-Austausch T17A (Dombrowski et al., 1999).

Peroxidase *tpoxN1* mit einer lokalen, JA-unabhängigen Expression im verwundeten, vaskulären Gewebe gehört zu den wenigen, aus Solanaceen bekannten Genen mit vergleichbarem Expressionsmuster (Hiraga et al., 2000; Sasaki et al., 2002). Die RNaseLE-homologe *AtRNS1* wird unabhängig von den alternativen JA- und OGA-Signaltransduktionswegen in *A. thaliana* systemisch aktiviert (LeBrasseur et al., 2002). Neuere Microarray-Daten ordnen sie jedoch ebenfalls der lokalen Wundantwort zu (Delessert et al., 2004). Für andere wundinduzierte T2-Typ RNasen wie ZRNaseII oder RNaseNW liegen keine Untersuchungen zur Regulation oder räumlichen Verteilung der Expression vor. Welche Faktoren die Expression dieser lokal wundinduzierten Gene aktivieren ist noch nicht untersucht worden.

Die Gene der lokalen Wundantwort werden spät exprimiert und sind funktionell bevorzugt in Wundverschluss und Wundheilung wie die Wundphloembildung involviert (Delessert et al., 2004). So kommt ein extrazellulärer RNA-Abbau durch das sekretierte Enzym und die zelluläre Wiederverwertung der Metabolite ebenso in Betracht wie eine Rolle in der unspezifischen Pathogenabwehr an der Verwundungsstelle, dem potentiellen Eintrittsort für pathogene Organismen (vgl. 5.1). Der Nachweis von GUS-Reporteraktivität in der Wurzelrinde beim Durchbruch von Seitenwurzeln und an der Mikropyle, der Austrittsstelle der Radikula im keimenden Samen, könnte auf eine vergleichbare Rolle während der Pflanzenentwicklung hinweisen (Köck, unveröffentlichte Daten).

6 Die Expression von T2-Typ RNasen als Teil der Phosphatmangel-Antwort von Pflanzen

Der zelluläre Metabolismus ist abhängig von anorganischem Phosphat (Pi). Es ist Reaktionsteilnehmer, allosterischer Effektor sowie Substrat und regulatorischer Faktor in Proteinmodifikationen. Phosphatmangel induziert die Neusynthese der RNaseLE und RNaseLX in Tomaten-Zellkulturen (Nürnberger et al., 1990; Löffler et al., 1992). Diese Tatsache wurde ausgenutzt, um die Proteine zur Reinigung anzureichern (Übersicht in Abel und Köck, 2001) und die zellbiologischen Experimente zur Lokalisierung der RNaseLX durchzuführen (vgl. Kap. 4.2). Die Erhöhung bzw. Repression der Transkriptlevel nach Wechsel der exogenen Phosphatversorgung [+Pi → -Pi] bzw. [-Pi

→ +Pi] und die hohe Spezifität für Phosphat weisen *RNaseLX* und *RNaseLE* als Pi-Mangel-induzierte Gene (*PSI*-Gene) aus (Köck et al., 1995; 1998; 2006). Auch S-like RNasen von *Arabidopsis thaliana* (Taylor et al., 1993; Bariola et al., 1994), *Nicotiana glauca* (Dodds et al., 1996) und *Antirrhinum sp.* (Liang et al., 2002) sind durch Pi-Mangel induzierbar. Es stellte sich deshalb die Frage nach der Rolle der RNasen bei Nährstofflimitation. Trotz der Eignung von Zellkulturen zur Untersuchung der Pi-Mangel-Regulation auf zellulärer Ebene (siehe 6.1), kann die Frage der zeitlichen und räumlichen Verteilung der Expression und die Rolle der RNasen unter diesen Bedingungen nur direkt in Tomatenpflanzen analysiert werden. Sie haben die morphologische und physiologische Komplexität einer höheren Pflanze und die Genexpression ist ein integriertes System von Aufnahme, intrazellulärer Verteilung, Transport, Speicherung und Phosphatmobilisierung (Mimura, 1999; Raghothama, 1999). Pi-Mangel führt besonders im Wurzelbereich zu typischen Veränderungen (Wurzel-Spross-Verhältnis, Wurzelarchitektur, Wurzelhaare, Proteoidwurzeln, Mykorrhizierung), deren molekulare Grundlagen noch weitgehend unbekannt sind (Lynch, 1995; Harrison, 1999; Raghothama, 1999; López-Bucio et al., 2003; Vance et al., 2003; Ticconi und Abel, 2004).

6.1 Zellautonome Signaltransduktion von *PSI*-Genen

Die direkte Signalfunktion von anorganischem Phosphat bei Pi-Mangel wird aufgrund seiner ubiquitären Beteiligung im Stoffwechsel allseits ausgeschlossen. Andererseits lässt sich aus der spezifischen molekularen Pi-Mangel-Antwort ableiten, dass es zelluläre Mechanismen geben muß, die den Phosphatspiegel und -bedarf ‚registrieren‘ (‚Phosphate sensing‘) und die Regulation auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene steuern. Intrazellulär wird die Phosphathomöostase durch die physische Kompartimentierung der Zelle (Vakuole, Apoplast, Kern, Organellen), den Membrantransport und die chemische Phosphatform bestimmt (Schachtman et al., 1998).

Es stellte sich die Frage, wo das ‚Phosphate sensing‘ stattfindet. Neben der Möglichkeit eines extrazellulären Sensors kommt auch eine intrazelluläre Detektion des erniedrigten Phosphatspiegels bei Nährstoffmangel in Betracht. Wir nutzten das Tomaten-Zellkultursystem und die transkriptionelle Aktivierung der RNasen als Detektionssystem. Dabei wurde die Tatsache ausgenutzt, dass sich die intrazelluläre Phosphatkon-

zentration der Zellkulturzellen durch die Applikation nicht metabolisierbarer Zucker modulieren läßt (Goldworthy und Street, 1965; Loughman, 1966; Loughman et al., 1989; Jang und Sheen, 1994). Nach Aufnahme in die Zellen werden D-Mannose, 2-Deoxy-D-Glukose, D-Galaktose oder Glycerol von Kinasen mit breitem Substratspektrum (z. B. Hexokinase) phosphoryliert. Da die phosphorylierten Substanzen nicht oder nur sehr gering metabolisiert werden können, bleibt das Phosphat festgelegt und es kommt zum Abfall der intrazellulären Phosphatkonzentration. Mit diesem Versuchsansatz konnten wir folgende Sachverhalte nachweisen (Köck et al., 1998; Stenzel, 1998):

- das Sensing des Phosphatspiegels erfolgt innerhalb der Zellen, da eine Absenkung des intrazellulären Pi-Spiegels trotz normaler Phosphatkonzentration im Medium die Expression von *PSI*-Genen (*RNaseLE*, *RNaseLX*, Phosphatase *LePS2*) auslöst,
- die zeitabhängige Induktion auf Transkriptionsebene ist mit der Induktion bei exogenem Pi-Mangel vergleichbar ist.

Aus diesen Experimenten schließen wir, dass die Pi-Mangel-induzierte Expression dieser *PSI*-Gene zellautonom erfolgt. Die Transkriptakkumulation der *PSI*-Gene ist im Vergleich zu exogenem Pi-Mangel nur transient und läßt sich auf die Wiederherstellung der cytoplasmatischen Phosphathomöostase zurückführen. Anteil daran haben wahrscheinlich sowohl eine höhere Phosphataufnahme an der Plasmamembran durch die Induktion hochaffiner Phosphattransporter (Liu et al., 1998; Danova-Alt und Köck, unveröffentlicht) als auch die Freisetzung von Phosphat aus dem vakuolären Pool.

6.2 Transkriptionelle Regulation und Gewebespezifität der *RNaseLX*

Die Expression der RNasen während der Keimung (Endosperm, Phloem) erfolgt bei gleichzeitiger Mobilisierung der endogenen Phosphatspeicher des Samens⁸ und kann nicht durch exogene Pi-Zugabe beeinflusst werden. In dieser Phase ist deshalb von einer entwicklungsabhängigen, aber Pi-Mangel-unabhängigen Regulation auszugehen (Bosse und Köck, 1998; Altmann, 1999; Stenzel et al., 2003b). Bei andauerndem Pi-

⁸ Die Hauptspeicher im Samen sind Phytine, die Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Salze der Phytinsäure. In Phytinsäure, dem Hexaphosphorsäureester des Zuckeralkohols *myo*-Inositol ist jede OH-Gruppe mit Phosphorsäure verestert. Der Abbau erfolgt durch spezielle Phosphohydrolasen, die Phytasen (Brinch-Pedersen et al., 2002).

Mangel werden beide RNase-Transkripte in Tomatenpflanzen induziert, die *RNaseLX* in allen Pflanzenteilen, die *RNaseLE* vor allem in der Wurzel (Köck et al., 2006). Mit GUS-Reporterlinien wurde für die *RNaseLX* eine gewebespezifische Expression in den Wurzelspitzen von Primär-, Lateral- und Adventivwurzeln Pi-verarmerter Pflanzen nachgewiesen. Sowohl das Protein als auch die RNase-Aktivität akkumulieren bei Pi-Mangel in den Wurzelspitzen.

Funktionell von großem Interesse ist die Lokalisation der Promotoraktivität in den Epidermiszellen der meristematischen und Elongationszone (Köck et al., 2006). Zieht man die Expression der *RNaseLX* während der Seneszenz und der Keimung (siehe Kap. 4) in Betracht, sind funktionelle Parallelen unverkennbar: Lokal begrenzt auf die Wurzelspitze, ist *RNaseLX* bei Pi-Mangel an der Mobilisierung von Phosphat beteiligt ist. Nukleinsäuren, besonders zelluläre RNAs, sind eine ergiebige Phosphatquelle und enthalten ein Drittel des organisch gebundenen Phosphates, neben Phospholipiden und kleinen Metaboliten. In Übereinstimmung damit werden verschiedene intra- und extrazelluläre Phosphohydrolasen durch Pi-Mangel in Tomate induziert (Bosse und Köck, 1998; Abel et al., 2000; Stenzel et al., 2003bb; Bozzo et al., 2006), während Gene anderer Wege reprimiert werden (Ziethe et al., 1998; Franco-Zorrilla et al., 2004; Ticconi und Abel, 2004 und Literatur darin).

Eine ähnliche räumliche Verteilung der Expression von anderen *PSI*-Genen (Pi-Transporter, Phosphatasen, Riboregulatoren) ist nicht bekannt, obwohl Reaktionen zur Aufrechterhaltung der zellulären Phosphat-Homöostase bei inadäquater Pi-Versorgung nachgewiesen wurden. Zu ihnen zählen (i) die Aktivierung alternativer Stoffwechselwege, die Pi- und Adenylat-verbrauchende Reaktionen überbrücken (Plaxton und Carswell, 1999), (ii) das Recycling von phosphorylierten Metaboliten des Stärke- bzw. Anthozyanstoffwechsels und die Akkumulation von Stärke und Anthozyanen (Ticconi und Abel, 2004), (iii) der Ersatz von Phospholipiden mit Galacto- und Sulfolipiden, vor allem in Plasma- und Tonoplastenmembranen, und die Expression der entsprechenden Enzyme bei Pi-Mangel (Literatur in Frentzen, 2004; Andersson et al., 2005; Benning und Ohta, 2005).

Im Unterschied zur Lateral- und Adventivwurzelentwicklung selbst ist die Pi-abhängige Expression der *RNaseLX* in den Wurzeln unabhängig von Auxin und Ethylen und wird auch nicht durch Inhibitoren der Wirkung dieser Hormone (TIBA, AVG) moduliert. Deshalb ist eine direkte Beteiligung von *RNaseLX* an der Ausbildung von

Primordien der Lateralwurzeln nicht wahrscheinlich. RNaseLX könnte die lokale Pi-Versorgung der Wurzelspitze zur Aufrechterhaltung des Wurzelwachstums bei Pi-Mangel unterstützen, obwohl der direkte Zusammenhang noch zu belegen ist. Tatsächlich zeigen Tomatenpflanzen bei Pi-Mangel eine erhöhte Elongation von Primär- und Lateralwurzeln (Köck et al., 2006).

Die *antisense*-Inhibierung der RNasen *AtRNS1* und *AtRNS2* führt bei Pi-Mangel zu einer höheren Anthozyan-Akkumulation als in Kontrollenpflanzen. Obwohl die Wurzelentwicklung und die Lokalisation der RNasen nicht untersucht wurde, weist dieses typische Pi-Mangel-Symptom auf erhöhten Stress und eine verringerte Fähigkeit der *antisense*-Pflanzen zum Pi-Recycling hin (Bariola et al., 1999).

Beide RNase-Gene der Tomate werden bei Pi-Mangel transkriptionell aktiviert. An der Regulation der RNasen könnte der Myb-Transkriptionsfaktor PHR beteiligt sein, da beide Promotoren ein entsprechendes *cis*-Bindungsmotiv besitzen (Köck et al., 2006). Trotz offener Fragen würden sich damit erste Hinweise auf einen Signalweg bei Pi-Mangel ergeben: Es wird angenommen, dass PHR1 ein ‚Master-Regulator‘ für Pi-Mangel ist (Rubio et al., 2001; Franco-Zorrilla et al., 2004). PHR1 wird konstitutiv exprimiert, besitzt Sumoylierungsstellen und ist ein mögliches Target der SUMO E3-Ligase SIZ1, eines weiteren Modulators der Pi-Mangel-abhängigen Signaltransduktion (Miura et al., 2005). Die Transkription eines Subsets von PHR1-regulierten *PSI*-Genen wird von der Ubiquitin-E2-Conjugase PHO2 beeinflusst, die selbst unter der Kontrolle der microRNA miR399 steht (Aung et al., 2006; Bari et al., 2006).

Obwohl funktionelle Zusammenhänge mit *PSI*-Genen wie den RNasen nicht untersucht wurden, unterstreichen neuere Ergebnisse, dass das Endomembransystem über seine Proteintransportfunktion offensichtlich einen wichtigen regulatorischen Einfluß auf die Anpassung an Pi-Mangel ausübt: (i) Das Membranprotein *AtPHO1* ist notwendig für die Phosphattranslokation in das Xylem (Wang et al., 2004). (ii) Der korrekte Transport des hochaffinen, durch Pi-Mangel-induzierbaren Phosphattransporters *AtPht1;1* zur Plasmamembran ist von PHF1 (PHOSPHATE FACILITATOR1), abhängig, einem ER-residenten Protein (González et al., 2005). (iii) *AtPDR2*, eine ER/Golgi assoziierte P-Typ ATPase, ist notwendig für das Pi-Mangel-abhängige Wurzelwachstum von *Arabidopsis* und möglicherweise in das ‚Phosphate sensing‘ an der Wurzelspitze involviert (Ticconi et al., 2004; Abel, persönl. Mitteilung).

7 Resümee und Ausblick

Die hier zusammengefassten Untersuchungen leisten einen Beitrag zu einem besseren Verständnis der Rolle sekretorischer T2-Typ RNasen in Pflanzen. In den Mittelpunkt der Analysen wurden zwei aus Zellkulturen von *Lycopersicon esculentum* isolierte Enzyme gestellt, die zu Beginn der Arbeiten als einzige RNasen aus Pflanzen enzymatisch charakterisiert waren und deren Primärsequenzen vorlagen.

Neben der Fortführung enzymologischer Untersuchungen zur Bedeutung bestimmter Aminosäurepositionen im aktiven Zentrum der RNasen für die Präferenz der Basenspaltung und zur funktionellen Abgrenzung der T2-Typ/S-like RNasen von den S-RNasen der Selbstinkompatibilität, lag das Hauptaugenmerk auf molekularbiologischen und zellbiologischen Untersuchungen im homologen Pflanzensystem. Ziel war es, möglichst umfangreiche Informationen zu den Genstrukturen, zur subzellulären Lokalisation sowie zur zell- und gewebespezifischen Expression und ihrer Einbindung oder den Ausschluss aus bekannten Signaltransduktionswegen zu erlangen, um auf dieser Grundlage die physiologische Rolle der T2-Typ RNasen in Pflanzen zu charakterisieren. Spezifische Antikörper, transgene Überexpressions- und Knock-down-Pflanzen, Promotor-GUS-Reporterpflanzen, ein induzierbares Zellkultursystem, die heterologen Expressionssysteme *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* sowie weitere Instrumente erlaubten einen direkten Zugang zur funktionellen und regulatorischen Analyse der Ribonukleasen.

Die T2-Typ RNasen von *Lycopersicon esculentum* sind entwicklungspezifisch und stressabhängig exprimierte, Einzelstrang-RNA-spezifische Endonukleasen mit abgrenzbaren physiologischen Funktionen der RNaseLE im Phloem und bei Verwundung einerseits sowie solcher der RNaseLX im Xylem, Endosperm, bei Phosphatmangel und PCD-Prozessen andererseits. Das Vorkommen orthologer Enzyme mit entsprechenden Expressionsprofilen in anderen Pflanzenspezies dokumentiert, dass viele dieser Funktionen der T2-Typ RNasen in höheren Pflanzen konserviert sind.

Die RNaseLE ist der Prototyp einer Gruppe lokal wundinduzierbarer Gene in *Lycopersicon esculentum*, die nicht der systemischen, Jasmonat-abhängigen Wundantwort zuzurechnen sind. Diese Tatsache und die durch genomweite Analysen erfolgte Identifizierung ähnlich regulierter Gene unterstreichen die Notwendigkeit zur Charak-

terisierung alternativer Wege der Wundantwort wie z.B. der auslösenden Signale und der Signaltransduktion für lokale Wundheilungsprozesse. Hier bieten sich als ein erster Schritt Bioassays zum Screening auf Signalsubstanzen an, in denen z.B. die enzymatische Aktivität der RNaseLE als Reporter genutzt und PromLE::GUS-Pflanzen in die Analyse transkriptioneller Genaktivierung einbezogen werden können. Untersuchungen mit Mutanten und Ansätze reverser Genetik, deren Auswahl sich auf die wachsende Zahl identifizierter Genfunktionen, vertiefter Kenntnis der biochemischen Pathways sowie Informationen aus Genexpressionsdatenbanken stützen kann, werden ebenfalls zur Aufklärung beitragen.

Die hier vorgestellten Arbeiten zur RNaseLX und zum ER-Targetingsignal belegen erstmalig, dass intrazelluläre, sekretorische RNasen nicht-vakuolär lokalisiert sein können und diese Lokalisation mit einer Funktion in PCD-Prozessen korreliert. Mit diesen Ergebnissen konnten bemerkenswerte Parallelen zum zellulären Targeting PCD-exprimierter Proteasen aufgezeigt werden. Die Ergebnisse bieten die Grundlage für weitere Untersuchungen zur Funktion des Endomembransystems in PCD-Prozessen und zur zeitlichen und räumlichen Funktionalisierung der verschiedenen katabolen Enzyme. Biochemische und mikroskopische Analysenmethoden in Verbindung mit der molekularen Markierung von Vesikeltypen, mit Protein-Interaktionsstudien, mit pharmakologischen Untersuchungen und reverser Genetik können hierfür wichtige Beiträge leisten. Der Nachweis der lokalen Expression der RNaseLX in Wurzelspitzen Phosphat-limitierter Pflanzen liefert zudem interessante und neuartige Hinweise auf eine Beteiligung des Endomembransystems an der Kontrolle des Phosphatstatus der Wurzeln. Ansätze mit transgenen Pflanzen und Mutanten, die Nutzung des zellautonomen ‚Phosphate sensing‘ der pflanzlichen Zellkulturen, aber auch die genannten Methoden zur Untersuchung der Dynamik des Endomembransystems können hier eine besondere Rolle spielen.

- Abel S, Blume B, Glund K** (1990) Evidence for RNA-oligonucleotides in plant vacuoles isolated from cultured tomato cells. *Plant Physiol* **94**: 1163-1171
- Abel S, Glund K** (1986) Localization of RNA-degrading enzyme activity within vacuoles of cultured tomato cells. *Physiol Plant* **66**: 79-86
- Abel S, Glund K** (1987) Ribonuclease in plant vacuoles: purification and molecular properties of the enzyme from cultured tomato cells. *Planta* **172**: 71-78
- Abel S, Köck M** (2001) Secretory acid ribonucleases from tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill. In AW Nicholson, ed, Ribonucleases, Meth Enzymol, Vol 341. Academic Press, New York, pp 351-368
- Abel S, Nürnberger T, Ahnert V, Krauß GJ, Glund K** (2000) Induction of an extracellular cyclic nucleotide phosphodiesterase as an accessory ribonucleolytic activity during phosphate starvation of cultured tomato cells. *Plant Physiol* **122**: 543-552
- Acquati F, Possati L, Ferrante L, Campomenosi P, Talevi S, Bardelli S, Margiotta C, Russo A, Bortoletto E, Rocchetti R, Calza R, Cinquetti R, Monti L, Salis S, Barbanti-Brodano G, Taramelli R** (2005) Tumor and metastasis suppression by the human *RNASET2* gene. *Int J Onc* **26**: 1159-1168
- Altmann D** (1999) Untersuchungen zur differentiellen Expression von Ribonukleasen während der Keimlingsentwicklung von Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Lukullus). Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Anderson MA, Cornish EC, Mau SL** (1986) Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature* **321**: 38-44
- Andersson MX, Larsson KE, Tjellström H, Liljenberg C, Sandelius AS** (2005) Phosphate-limited oat: The plasma membrane and the tonoplast as major targets for phospholipid-to-glycolipid replacement and stimulation of phospholipases in the plasma membrane. *J Biol Chem* **280**: 27578-27586
- Aravind L, Koonin EV** (2001) A natural classification of ribonucleases. In AW Nicholson, ed, Ribonucleases, Meth Enzymol, Vol 341. Academic Press, New York, pp 3-28
- Aung K, Lin SI, Wu CC, Huang YT, Su CL, Chiou TJ** (2006) *pho2*, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a microRNA399 target gene. *Plant Physiol* **141**: 1000-1011
- Bari R, Pant BD, Stitt M, Scheible WR** (2006) PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiol* **141**: 988-999
- Bariola PA, Howard CJ, Taylor CB, Verburg MT, Jaglan VD, Green PJ** (1994) The Arabidopsis ribonuclease gene RNS1 is tightly controlled in response to phosphate limitation. *Plant J* **6**: 673-685
- Bariola PA, MacIntosh GC, Green PJ** (1999) Regulation of S-like ribonuclease levels in Arabidopsis. Antisense inhibition of RNS1 or RNS2 elevates anthocyanin accumulation. *Plant Physiol* **119**: 331-342
- Bassham DC, Raikhel NV** (2000a) Unique features of the plant vacuolar sorting machinery. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 491-495
- Bassham DC, Raikhel NV** (2000b) Plant cells are not just green yeast. *Plant Physiol* **122**: 999-1001

- Beers EP, Jones AM, Dickerman AW** (2004) The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in Arabidopsis. *Phytochem* **65**: 43-58
- Benning C, Ohta H** (2005) Three enzyme systems for galactoglycerolipid biosynthesis are coordinately regulated in plants. *J Biol Chem* **280**: 2397-2400
- Boller T** (1982) Enzymatic equipment of plant vacuoles. *Physiol Vég* **20**: 247-257
- Boller T, Wiemken A** (1986) Dynamics of vacuolar compartmentation. *Annu Rev Plant Physiol* **37**: 137-164
- Bosse D, Köck M** (1998) Influence of phosphate starvation on phosphohydrolases during development of tomato seedlings. *Plant Cell Environ* **21**: 325-332
- Bozzo GG, Dunn EL, Plaxton WC** (2006) Differential synthesis of phosphate-starvation inducible purple acid phosphatase isozymes in tomato (*Lycopersicon esculentum*) suspension cells and seedlings. *Plant Cell Environ* **29**: 303-313
- Brinch-Pedersen H, Sørensen LD, Holm PB** (2002) Engineering crop plants: Getting a handle on phosphate. *Trends Plant Sci* **7**: 118-125
- Caponigro G, Parker R** (1996) Mechanisms and control of mRNA turnover in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **60**: 233-249
- Cech TR** (1993) The efficiency and versatility of catalytic RNA: Implications for an RNA world. *Gene* **135**: 33-36
- Chekanova JA, Dutko JA, Mian IS, Belostotsky DA** (2002) Arabidopsis thaliana exosome subunit AtRrp4p is a hydrolytic 3' → 5' exonuclease containing S1 and KH RNA-binding domains. *Nucleic Acids Res* **30**: 695-700
- Chen H, Wilkerson CG, Kuchar JA, Phinney BS, Howe GA** (2005) Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 19237-19242
- Chen X** (2005) MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Lett* **579**: 5923-5931
- De Bruxelles GZ, Roberts MH** (2001) Signals regulating multiple responses to wounding and herbivores. *Crit Rev Plant Sci* **20**: 487-521
- De Nettancourt D** (2000) Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants. Springer-Verlag, Berlin
- Delessert C, Wilson LW, Van Der Straeten D, Dennis ES, Dolferus R** (2004) Spatial and temporal analysis of the local response to wounding in Arabidopsis leaves. *Plant Mol Biol* **55**: 165-181
- Deshpande RA, Shankar V** (2002) Ribonucleases from T2 family. *Crit Rev Microbiol* **28**: 79-122
- Deutscher MP** (2006) Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. *Nucleic Acids Res* **34**: 659-666
- Dodds PN, Clarke AE, Newbigin E** (1996) Molecular characterisation of an S-like RNase of *Nicotiana glauca* that is induced by phosphate starvation. *Plant Mol Biol* **31**: 227-238
- Dombrowski JE, Pearce G, Ryan CA** (1999) Proteinase inhibitor-inducing activity of the prohormone prosystemin resides exclusively in the C-terminal systemin domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 12947-12952
- Farkas GL** (1982) Ribonucleases and ribonucleic acid breakdown. In B Parthier, D Boulter, eds, *Encycl Plant Physiol*, Vol 14B. Springer-Verlag, Berlin, pp 224-262
- Felton GW, Korth KL** (2000) Trade-offs between pathogen and herbivore resistance. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 309-314

- Franco-Zorrilla JM, González E, Bustos R, Linhares F, Leyva A, Paz-Ares J** (2004) The transcriptional control of plant responses to phosphate limitation. *J Exp Bot* **55**: 285-293
- Frentzen M** (2004) Phosphatidylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol: anionic membrane lipids and phosphate regulation. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 270-276
- Frick UB, Schaller A** (2002) cDNA microarray analysis of fusicoccin-induced changes in gene expression in tomato plants. *Planta* **216**: 83-94
- Fromont-Racine M, Senger B, Saveanu C, Fasiolo F** (2003) Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* **313**: 17-42
- Fukuda H** (2000) Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Mol Biol* **44**: 245-253
- Fukuda H** (2004) Signals that control plant vascular cell differentiation. *Nature Rev Mol Cell Biol* **5**: 379-391
- Galiana E, Bonnet P, Conrod S, Keller H, Panabières F, Ponchet M, Poupet A, Ricci P** (1997) RNase activity prevents the growth of a fungal pathogen in tobacco leaves and increases upon induction of systemic acquired resistance with elicitor. *Plant Physiol* **115**: 1557-1567
- Gan JH, Yu L, Wu J, Xu H, Choudhary JS, Blackstock WP, Liu WY, Xia ZX** (2004) The three-dimensional structure and X-ray sequence reveal that trichomaglin is a novel S-like ribonuclease. *Structure* **12**: 1015-1025
- Gilmartin GM** (2005) Eukaryotic mRNA 3' processing: a common means to different ends. *Genes Dev* **19**: 2517-2521
- Goldraj A, Kondo K, Lee CB, Hancock CN, Sivaguru M, Vazquez-Santana S, Kim S, Phillips TE, Cruz-Garcia F, McClure B** (2006) Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature* **439**: 805-810
- Goldworthy A, Street HE** (1965) The carbohydrate nutrition of tomato roots. VIII: The mechanism of the inhibition by D-mannose of the respiration of excised roots. *Ann Bot* **29**: 45-58
- González-Carranza ZH, Lozoya-Gloria E, Roberts JA** (1998) Recent developments in abscission: Shedding light on the shedding process. *Trends Plant Sci* **3**: 10-14
- González E, Solano R, Rubio V, Leyva A, Paz-Ares J** (2005) PHOSPHATE TRANSPORTER TRAFFIC FACILITATOR1 is a plant-specific SEC12-related protein that enables the endoplasmic reticulum exit of a high-affinity phosphate transporter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**: 3500-3512
- Graham IA, Eastmond PJ** (2002) Pathways of straight and branched chain fatty acid catabolism in higher plants. *Prog Lipid Res* **41**: 156-181
- Green PJ** (1994) The ribonucleases of higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **45**: 421-445
- Green TR, Ryan CA** (1972) Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves - Possible defense mechanism against insects. *Science* **175**: 776-777
- Greenberg JT** (1996) Programmed cell death: A way of life for plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 12094-12097
- Groß N** (2005) Die sekretorische RibonukleaseLE in *Lycopersicon esculentum* - Charakterisierung von Regulation und Funktion Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Groß N, Wasternack C, Köck M** (2004) Wound-induced RNaseLE expression is jasmonate and systemin independent and occurs only locally in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus). *Phytochem* **65**: 1343-1350

- Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T** (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* **35**: 849-857
- Gutiérrez RA, MacIntosh GC, Green PJ** (1999) Current perspectives on mRNA stability in plants: multiple levels and mechanisms of control. *Trends Plant Sci* **4**: 429-438
- Hamilton AJ, Baulcombe DC** (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**: 950-952
- Harrison MJ** (1999) Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Plant Biol* **50**: 361-389
- Hause B, Hause G, Kutter C, Miersch O, Wasternack C** (2003) Enzymes of jasmonate biosynthesis occur in tomato sieve elements. *Plant Cell Physiol* **44**: 643-648
- Hause B, Stenzel I, Miersch O, Maucher H, Kramell R, Ziegler J, Wasternack C** (2000) Tissue-specific oxylipin signature of tomato flowers: allene oxide cyclase is highly expressed in distinct flower organs and vascular bundles. *Plant J* **24**: 113-126
- Heinemann U, Sängler W** (1982) Specific protein-nucleic acid recognition in ribonuclease T1-2'-guanylic acid complex: an X-ray study. *Nature* **299**: 27-31
- Henderson IR, Zhang X, Lu C, Johnson L, Meyers BC, Green PJ, Jacobsen SE** (2006) Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nat Genet* **38**: 721-725
- Hilleren P, Parker R** (1999) Mechanisms of mRNA surveillance in eukaryotes. *Annu Rev Genet* **33**: 229-260
- Hiraga S, Ito H, Sasaki K, Yamakawa H, Mitsuhara I, Toshima H, Matsui H, Honma M, Ohashi Y** (2000) Wound-induced expression of a tobacco peroxidase is not enhanced by ethephon and suppressed by methyl jasmonate and coronatine. *Plant Cell Physiol* **41**: 165-170
- Hoffmann D** (2002) Inhibierung von S-ähnlichen RNasen mittels Antisense- und RNAi-Ansätzen in Tomate. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Horiuchi H, Yanai K, Takagi M, Yano K, Wakabayashi E, Sanda A, Mine S, Ohgi K, Irie M** (1988) Primary structure of a base non-specific ribonuclease from *Rhizopus niveus*. *J Biochem* **103**: 408-418
- Howe GA, Lee GI, Itoh A, Li L, DeRocher AE** (2000) Cytochrome P450-dependent metabolism of oxylipins in tomato. Cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase. *Plant Physiol* **123**: 711-724
- Huang S, Lee HS, Karunanandaa B, Kao T-H** (1994) Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. *Plant Cell* **6**: 1021-1028
- Hugot K, Ponchet M, Marais A, Ricci P, Galiana E** (2002) A tobacco S-like RNase inhibits hyphal elongation of plant pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* **15**: 243-250
- Ida K, Norioka S, Yamamoto M, Kumasaka T, Yamashita E, Newbigin E, Clarke AE, Sakiyama F, Sato M** (2001) The 1.55 Å resolution structure of *Nicotiana glauca* SF11-RNase associated with gametophytic self-incompatibility. *J Mol Biol* **314**: 103-112
- Ide H, Kimura M, Arai M, Funatsu G** (1991) The complete amino acid-sequence of ribonuclease from the seeds of bitter melon (*Momordica charantia*). *FEBS Lett* **284**: 161-164

- Igic B, Kohn JR** (2001) Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 13167-13171
- Ioerger TR, Clark AG, Kao TH** (1990) Polymorphism at the self-incompatibility locus in Solanaceae predates speciation. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 9732-9735
- Ioerger TR, Gohlke JR, Xu B, Kao T-H** (1991) Primary structural features of the self-incompatibility protein in solanaceae. *Sex Plant Reprod* **4**: 81-87
- Irie M** (1997) RNase T1/RNase T2 family RNases. In G D'Alessio, JF Riordan, eds, *Ribonucleases: Structures and functions*. Academic Press, New York, pp 101-130
- Irie M** (1999) Structure-function relationships of acid ribonucleases: Lysosomal, vacuolar, and periplasmic enzymes. *Pharmacol Ther* **81**: 77-89
- Irie M, Ohgi K** (1998) Structure-function relationship of fungal base non-specific ribonucleases and their homologous RNase/RNase T2 family RNases. *Recent Res Dev Agric Biol Chem* **2**: 77-95
- Irie M, Ohgi K** (2001) Ribonuclease T2. In AW Nicholson, ed, *Methods in Enzymology*, Vol 341. Academic Press, New York, pp 42-55
- Iwama M, Ogawa Y, Yamagishi M, Itagaki T, Inokuchi N, Koyama T, Imai R, Ohgi K, Tsuji T, Irie M** (2001) Amino acid sequence and characterization of a rice bran ribonuclease. *Biol Pharm Bull* **24**: 760-766
- Jang JC, Sheen J** (1994) Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell* **6**: 1665-1679
- Jost W, Bak H, Glund K, Terpstra P, Beintema JJ** (1991) Amino acid sequence of an extracellular, phosphate-starvation-induced ribonuclease from cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells. *Eur J Biochem* **198**: 1-6
- Kaletta K, Kunze I, Kunze G, Köck M** (1998) The peptide HDEF as a new retention signal is necessary and sufficient to direct proteins to the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* **434**: 377-381
- Kao TH, Tsukamoto T** (2004) The molecular and genetic bases of S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell* **16**: S72-S83
- Kariu T, Sano K, Shimokawa H, Itoh R, Yamasaki N, Kimura M** (1998) Isolation and characterization of a wound-inducible ribonuclease from *Nicotiana glutinosa* leaves. *Biosci Biotech Biochem* **62**: 1144-1151
- Kawano S, Kakuta Y, Kimura M** (2002) Guanine binding site of the *Nicotiana glutinosa* ribonuclease NW revealed by X-ray crystallography. *Biochemistry* **41**: 15195-15202
- Kawata Y, Sakiyama F, Tamaoki H** (1988) Amino acid sequence of ribonuclease T2 from *Aspergillus oryzae*. *European Journal of Biochemistry* **176**: 683-697
- Kobayashi H, Itagaki T, Inokuchi N, Ohgi K, Wada T, Iwama M, Irie M** (2003) A new type of RNase T2 ribonuclease in two basidiomycetes fungi, *Lentinus edodes* and *Irpex lacteus*. *Biosci Biotech Biochem* **67**: 2307-2310
- Köck M, Groß N, Stenzel I, Hause G** (2004) Phloem-specific expression of the wound-inducible ribonuclease LE from tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus). *Planta* **219**: 233-242
- Köck M, Kaletta K, Stenzel I** (1999) Biochemical and functional analysis of S-like ribonucleases. In 5th International Meeting on Ribonucleases, Warrenton, Virginia, USA
- Köck M, Löffler A, Abel S, Glund K** (1995) cDNA structure and regulatory properties of a family of starvation-induced ribonucleases from tomato. *Plant Mol Biol* **27**: 477-485

- Köck M, Stenzel I, Zimmer A** (2006) Tissue-specific expression of tomato Ribonuclease LX during phosphate starvation-induced root growth. *J Exp Bot* doi:10.1093/jxb/erl124
- Köck M, Theierl K, Stenzel I, Glund K** (1998) Extracellular administration of phosphate-sequestering metabolites induces ribonucleases in cultured tomato cells. *Planta* **204**: 404-407
- Kondo K, Yamamoto M, Itahashi R, Sato T, Egashira H, Hattori T, Kowyama Y** (2002) Insights into the evolution of self-compatibility in *Lycopersicon* from a study of stilar factors. *Plant J* **30**: 143-153
- Kunze I, Nilsson C, Adler K, Manteuffel R, Horstmann C, Bröker M, Kunze G** (1998) Correct targeting of a vacuolar tobacco chitinase in *Saccharomyces cerevisiae* - Post-translational modifications are dependent on the host strain. *Biochim Biophys Acta* **1395**: 329-344
- Kurata N, Kariu T, Kawano S, Kimura M** (2002) Molecular cloning of cDNAs encoding ribonuclease-related proteins in *Nicotiana glutinosa* leaves, as induced in response to wounding or to TMV-infection. *Biosci Biotech Biochem* **66**: 391-397
- Kurihara H, Mitsui Y, Ohgi K, Irie K, Irie M, Mizuno H, Nakamura KT** (1992) Crystal and molecular structure of RNase Rh, a new class of microbial ribonuclease from *Rhizopus niveus*. *FEBS Lett* **306**: 189-192
- Kurihara H, Nonaka T, Mitsui Y, Ohgi K, Irie M, Nakamura KT** (1996) The crystal structure of ribonuclease Rh from *Rhizopus niveus* at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol* **255**: 310-320
- Lafontaine DLJ, Tollervey D** (2001) The function and synthesis of ribosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 514-520
- Lam E, Fukuda H, Greenberg JT** (2000) Programmed cell death in higher plants. *Plant Mol Biol* **44**
- LeBrasseur ND, MacIntosh GC, Pérez-Amador MA, Saitoh M, Green PJ** (2002) Local and systemic wound-induction of RNase and nuclease activities in *Arabidopsis*: RNS1 as a marker for a JA-independent systemic signaling pathway. *Plant J* **29**: 393-403
- Lee GI, Howe GA** (2003) The tomato mutant spr1 is defective in systemin perception and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *Plant J* **33**: 567-576
- Lee HS, Huang S, Kao T-H** (1994) S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature* **367**: 560-563
- Lehmann K, Hause B, Altmann D, Köck M** (2001) Tomato ribonuclease LX with the functional endoplasmic reticulum retention motif HDEF is expressed during programmed cell death processes, including xylem differentiation, germination, and senescence. *Plant Physiol* **127**: 436-449
- Leinhos V, Krauß G-J, Glund K** (1986) Evidence that a part of cellular uridine of a tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell suspension culture is located in the vacuoles. *Plant Sci* **47**: 15-20
- León J, Rojo E, Sánchez-Serrano JJ** (2001) Wound signalling in plants. *J Exp Bot* **52**: 1-9
- Lers A, Khalchitski A, Lomaniec E, Burd S, Green PJ** (1998) Senescence-induced RNases in tomato. *Plant Mol Biol* **36**: 439-449
- Lers A, Sonogo L, Green PJ, Burd S** (2006) Suppression of LX ribonuclease in tomato results in a delay of leaf senescence and abscission. *Plant Physiol* **142**: 710-721

- Li CY, Liu GH, Xu CC, Lee GI, Bauer P, Ling HQ, Ganal MW, Howe GA** (2003) The tomato Suppressor of prosystemin-mediated responses2 gene encodes a fatty acid desaturase required for the biosynthesis of jasmonic acid and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *Plant Cell* **15**: 1646-1661
- Liang L, Lai Z, Ma W, Zhang Y, Xue Y** (2002) AhSL28, a senescence- and phosphate starvation-induced S-like RNase gene in *Antirrhinum*. *Biochim Biophys Acta* **1579**: 64-71
- Liu CM, Muchhal US, Uthappa M, Kononowicz AK, Raghothama KG** (1998) Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. *Plant Physiol* **116**: 91-99
- Löffler A, Abel S, Jost W, Beintema JJ, Glund K** (1992) Phosphate-regulated induction of intracellular ribonucleases in cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells. *Plant Physiol* **98**: 1472-1478
- Löffler A, Glund K, Irie M** (1993) Amino acid-sequence of an intracellular, phosphate-starvation-induced ribonuclease from cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells. *Eur J Biochem* **214**: 627-633
- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L** (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 280-287
- Lorenzo O, Solano R** (2005) Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 532-540
- Loughman BC** (1966) The mechanism of absorption and utilization of phosphate by barley plants in relation to subsequent transport to the shoot. *New Phytol* **65**: 388-397
- Loughman BC, Ratcliffe RG, Schwabe JWR** (1989) Galactose metabolism in *Zea mays* root tissues observed by ³¹P-NMR spectroscopy. *Plant Sci* **58**: 11-23
- Luu DT, Qin X, Morse D, Cappadocia M** (2000) S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature* **407**: 649-651
- Lynch J** (1995) Root architecture and plant productivity. *Plant Physiol* **109**: 7-13
- Ma RC, Oliveira MM** (2000) The RNase PD2 gene of almond (*Prunus dulcis*) represents an evolutionarily distinct class of S-like RNase genes. *Mol Gen Genet* **263**: 925-933
- MacIntosh GC, Bariola PA, Newbigin E, Green PJ** (2001) Characterization of Rny1, the *Saccharomyces cerevisiae* member of the T2 RNase family of RNases: Unexpected functions for ancient enzymes? *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 1018-1023
- Marty F** (1999) Plant vacuoles. *Plant Cell* **11**: 587-599
- Matsuura T, Sakai H, Unno M, Ida K, Sato M, Sakiyama F, Norioka S** (2001) Crystal structure at 1.5 Å resolution of *Pyrus pyrifolia* pistil ribonuclease responsible for gametophytic self-incompatibility. *J Biol Chem* **276**: 45261-45269
- McClure BA, Gray JE, Anderson MA, Clarke AE** (1990) Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA. *Nature* **347**: 757-760
- McClure BA, Haring V, Ebert PR, Anderson MA, Simpson RJ, Sakiyama F, Clarke AE** (1989) Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* **342**: 955-957
- McCubbin AG, Kao TH** (2000) Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 333-364
- Mimura T** (1999) Regulation of phosphate transport and homeostasis in plant cells. *Int Rev Cytol* **191**: 149-200

- Miura K, Rus A, Sharkhuu A, Yokoi S, Karthikeyan AS, Raghothama KG, Back D, Koo YD, Jin JB, Bressan RA, Yun DJ, Hasegawa PM** (2005) The Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 9734-9734
- Moffatt BA, Ashihara H** (2002) Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. In CR Somerville, EM Meyerowitz, eds, *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi: 10.1199/tab.0018, www.aspb.org/publications/arabidopsis/
- Montoya T, Nomura T, Farrar K, Kaneta T, Yokota T, Bishop GJ** (2002) Cloning the tomato curl3 gene highlights the putative dual role of the leucine-rich repeat receptor kinase tBRI1/SR160 in plant steroid hormone and peptide hormone signaling. *Plant Cell* **14**: 3163-3176
- Nakagawa A, Tanaka I, Sakai R, Nakashima T, Funatsu G, Kimura M** (1999) Crystal structure of a ribonuclease from the seeds of bitter melon (*Momordica charantia*) at 1.75 Å resolution. *Biochim Biophys Acta* **1433**: 253-260
- Narváez-Vásquez J, Ryan CA** (2004) The cellular localization of prosystemin: a functional role for phloem parenchyma in systemic wound signaling. *Planta* **218**: 360-369
- Neuhaus JM, Rogers JC** (1998) Sorting of proteins to vacuoles in plant cells. *Plant Mol Biol* **38**: 127-144
- Nicholson A** (1997) *Escherichia coli* Ribonucleases: Paradigms for understanding cellular RNA metabolism and regulation. In G D'Alessio, JF Riordan, eds, *Ribonuclease: Structures and functions*. Academic Press, New York, pp 1-49
- Numata T, Suzuki A, Yao M, Tanaka I, Kimura M** (2001) Amino acid residues in ribonuclease MC1 from bitter melon seeds which are essential for uridine specificity. *Biochemistry* **40**: 524-530
- Nürnberg T, Abel S, Jost W, Glund K** (1990) Induction of an extracellular ribonuclease in cultured tomato cells upon phosphate starvation. *Plant Physiol* **92**: 970-976
- O'Donnell PJ, Truesdale MR, Calvert CM, Dorans A, Roberts MR, Bowles DJ** (1998) A novel tomato gene that rapidly responds to wound- and pathogen-related signals. *Plant J* **14**: 137-142
- Obara K, Kuriyama H, Fukuda H** (2001) Direct evidence of active and rapid nuclear degradation triggered by vacuole rupture during programmed cell death in *Zinnia*. *Plant Physiol* **125**: 615-626
- Ohgi K, Horiuchi H, Watanabe H, Iwama M, Takagi M, Irie M** (1992) Evidence that three histidine residues of a base non-specific and adenylic acid preferential ribonuclease from *Rhizopus niveus* are involved in the catalytic function. *J Biochem* **112**: 132-138
- Ohgi K, Horiuchi H, Watanabe H, Iwama M, Takagi M, Irie M** (1993) Role of Asp51 and Glu105 in the enzymatic activity of a ribonuclease from *Rhizopus niveus*. *J Biochem* **113**: 219-224
- Ohgi K, Iwama M, Tada K, Takizawa R, Irie M** (1995) Role of Lys108 in the enzymatic activity of RNase Rh from *Rhizopus niveus*. *J Biochem* **117**: 27-33
- Ohgi K, Shiratori Y, Nakajima A, Iwama M, Kobayashi H, Inokuchi N, Koyama T, Köck M, Löffler A, Glund K, Irie M** (1997) The base specificities of tomato ribonuclease (RNase LE) and its Asp44 mutant enzyme expressed from yeast cells. *Biosci Biotech Biochem* **61**: 432-438

- Okabe T, Iwakiri Y, Mori H, Ogawa T, Ohyama T** (2005) An S-like ribonuclease gene is used to generate a trap-leaf enzyme in the carnivorous plant *Drosera adelae*. *FEBS Lett* **579**: 5729-5733
- Okamoto T, Shimada T, Hara-Nishimura I, Nishimura M, Minamikawa T** (2003) C-terminal KDEL sequence of a KDEL-tailed cysteine proteinase (sulfhydryl-endopeptidase) is involved in formation of KDEL vesicle and in efficient vacuolar transport of sulfhydryl-endopeptidase. *Plant Physiol* **132**: 1892-1900
- Otegui MS, Noh YS, Martínez DE, Vila Petroff MG, Staehelin LA, Amasino RM, Guiamet JJ** (2005) Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of Arabidopsis and soybean. *Plant J* **41**: 831-844
- Paris N, Neuhaus JM** (2002) BP-80 as a vacuolar sorting receptor. *Plant Mol Biol* **50**: 903-914
- Paris N, Stanley CM, Jones RL, Rogers JC** (1996) Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments. *Cell* **85**: 563-572
- Parker R, Song HW** (2004) The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 121-127
- Parry SK, Liu Y, Clarke AE, Newbiggin E** (1997) S-RNases and other plant extracellular ribonucleases. *In* G D'Alessio, JF Riordan, eds, *Ribonucleases: Structures and functions*. Academic Press, New York, pp 191-211
- Pearce G, Strydom D, Johnson S, Ryan CA** (1991) A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* **253**: 895-898
- Pelham HRB** (1989) Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol* **5**: 1-23
- Pennell RI, Lamb C** (1997) Programmed cell death in plants. *Plant Cell* **9**: 1157-1168
- Philipson BA, Pimpl P, Pinto daSilva LL, Crofts AJ, Taylor PJ, Movafeghi A, Robinson DG, Denecke J** (2001) Secretory bulk flow of soluble proteins is efficient and COPII dependent. *Plant Cell* **13**: 2005-2020
- Piccinelli P, Rosenblad MA, Samuelsson T** (2005) Identification and analysis of ribonuclease P and MRP RNA in a broad range of eukaryotes. *Nucleic Acids Res* **33**: 4485-4495
- Pimpl P, Denecke J** (2002) Protein-protein interactions in the secretory pathway, a growing demand for experimental approaches *in vivo*. *Plant Mol Biol* **50**: 887-902
- Plaxton WC, Carswell CM** (1999) Metabolic aspects of the phosphate starvation response in plants. *In* HR Lerner, ed, *Plant responses to environmental stresses: From phytohormones to genome reorganization* Marcel Dekker, New York, pp 349-372
- Qiao H, Wang H, Zhao L, Zhou J, Huang J, Zhang Y, Xue Y** (2004) The F-box protein AhSLF-S2 physically interacts with S-RNases that may be inhibited by the ubiquitin/26S proteasome pathway of protein degradation during compatible pollination in *Antirrhinum*. *Plant Cell* **16**: 582-595
- Quirino BF, Noh YS, Himelblau E, Amasino RM** (2000) Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Sci* **5**: 278-282
- Raghothama KG** (1999) Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 665-693
- Richards FM, Wyckoff HW** (1971) Bovine pancreatic ribonuclease. *In* PD Boyer, ed, *The Enzymes*, Vol 4. Academic Press, New York, pp 647-806

- Rivers BA, Bernatzky R, Robinson SJ, Jahnen-Dechent W** (1993) Molecular diversity at the self-incompatibility locus is a salient feature in natural populations of wild tomato (*Lycopersicon peruvianum*). *Mol Gen Genet* **238**: 419-427
- Robinson DG, Rogers JC** (2000) Vacuolar compartments in plants, Vol 5. Academic Press, Sheffield
- Rogers SW, Rogers JC** (1999) Cloning and characterization of a gibberellin-induced RNase expressed in barley aleurone cells. *Plant Physiol* **119**: 1457-1464
- Rojo AM, Arias JF, Iglesias R, Ferreras MJ, Munoz R, Escarmis C, Soriano F, López-Fando F, Méndez E, Girbés T** (1994a) Cusativin, a new cytidine-specific ribonuclease accumulated in seeds of *Cucumis sativus* L. *Planta* **194**: 328-338
- Rojo AM, Arias JF, Iglesias R, Ferreras MJ, Soriano F, Méndez E, Escarmis C, Girbés T** (1994b) Enzymic activity of melonin, a translational inhibitor present in dry seeds of *Cucumis melo* L. *Plant Sci* **103**: 127-134
- Ross J** (1997) RNA-processing RNases in mammalian cells. In G D'Alessio, JS Riordan, eds, *Ribonucleases: Structures and functions*. Academic Press, New York, pp 553-587
- Royo J, Kunz C, Kowyama Y, Anderson M, Clarke AE, Newbigin E** (1994) Loss of a histidine residue at the active site of S-locus ribonuclease is associated with self-compatibility in *Lycopersicon peruvianum*. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 6511-6514
- Rubio V, Linhares F, Solano R, Martin AC, Iglesias J, Leyva A, Paz-Ares J** (2001) A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev* **15**: 2122-2133
- Ryan CA** (2000) The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim Biophys Acta* **1477**: 112-121
- Ryan CA, Moura DS** (2002) Systemic wound signaling in plants: A new perception. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 6519-6520
- Saalbach G, Rosso M, Schumann U** (1996) The vacuolar targeting signal of the 2S albumin from Brazil nut resides at the C terminus and involves the C-terminal propeptide as an essential element. *Plant Physiol* **112**: 975-985
- Sasaki K, Hiraga S, Ito H, Seo S, Matsui H, Ohashi Y** (2002) A wound-inducible tobacco peroxidase gene expresses preferentially in the vascular system. *Plant Cell Physiol* **43**: 108-117
- Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM** (1998) Phosphorus uptake by plants: From soil to cell. *Plant Physiol* **116**: 447-453
- Schaller F, Schaller A, Stintzi A** (2004) Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *J Plant Growth Regul* **23**: 179-199
- Scheer JM, Ryan CA** (2002) The systemin receptor SR160 from *Lycopersicon peruvianum* is a member of the LRR receptor kinase family. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 9585-9590
- Schillmiller AL, Howe GA** (2005) Systemic signaling in the wound response. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 369-377
- Schmid M, Simpson D, Gietl C** (1999) Programmed cell death in castor bean endosperm is associated with the accumulation and release of a cysteine endopeptidase from ricinosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 14159-14164
- Schmid M, Simpson D, Kalousek F, Gietl C** (1998) A cysteine endopeptidase with a C-terminal KDEL motif isolated from castor bean endosperm is a marker enzyme for the ricinosome, a putative lytic compartment. *Planta* **206**: 466-475

- Schmid M, Simpson DJ, Sarioglu H, Lottspeich F, Gietl C** (2001) The ricinosomes of senescing plant tissue bud from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 5353-5358
- Schüler G, Gorls H, Boland W** (2001) 6-substituted indanoyl isoleucine conjugates mimic the biological activity of coronatine. *Eur J Org Chem*: 1663-1668
- Schüler G, Mithofer A, Baldwin IT, Berger S, Ebel J, Santos JG, Herrmann G, Holscher D, Kramell R, Kutchan TM, Maucher H, Schneider B, Stenzel I, Wasternack C, Boland W** (2004) Coronalon: a powerful tool in plant stress physiology. *FEBS Lett* **563**: 17-22
- Schumann H** (1995) Klonierung genomischer Sequenzen der intrazellulären RNase LX aus Tomate. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Shimizu T, Inoue T, Shiraishi H** (2001) A senescence-associated S-like RNase in the multicellular green alga *Volvox carteri*. *Gene* **274**: 227-235
- Souret FF, Kastenmayer JP, Green PJ** (2004) AtXRN4 degrades mRNA in Arabidopsis and its substrates include selected miRNA targets. *Mol Cell* **15**: 173-183
- Staswick PE, Tiryaki I** (2004) The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugate it to isoleucine in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 2117-2127
- Stenzel I** (1998) Isolierung und Charakterisierung genomischer Sequenzen Phosphatmangel-induzierbarer Gene aus Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Lukullus). Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Stenzel I, Hause B, Maucher H, Pitzschke A, Miersch O, Ziegler J, Ryan CA, Wasternack C** (2003a) Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato - amplification in wound signalling. *Plant J* **33**: 577-589
- Stenzel I, Ziethe K, Schurath J, Hertel SC, Bosse D, Köck M** (2003b) Differential expression of the LePS2 phosphatase gene family in response to phosphate availability, pathogen infection and during development. *Physiol Plant* **118**: 138-146
- Strassner J, Schaller F, Frick UB, Howe GA, Weiler EW, Amrhein N, Macheroux P, Schaller A** (2002) Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductases reveals differential roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. *Plant J* **32**: 585-601
- Sugiyama M, Ito J, Aoyagi S, Fukuda H** (2000) Endonucleases. *Plant Mol Biol* **44**: 387-397
- Suzuki R, Kanno S, Ogawa Y, Iwama M, Tsuji T, Ohgi K, Irie M** (2005) On a salmon (*Onchorhynchus keta*) liver RNase, belonging to RNase T2 family: Primary structure and some properties. *Biosci Biotech Biochem* **69**: 343-352
- Tanaka N, Arai J, Inokuchi N, Koyama T, Ohgi K, Irie M, Nakamura KT** (2000) Crystal structure of a plant ribonuclease, RNase LE. *J Mol Biol* **298**: 859-873
- Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, Devicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB, Messeguer R, Miller JC, Miller L, Paterson AH, Pineda O, Roder MS, Wing RA, Wu W, Young ND** (1992) High-density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* **132**: 1141-1160
- Tanksley SD, Loaiza-Figueroa F** (1985) Gametophytic self-incompatibility is controlled by a single major locus on chromosome 1 in *Lycopersicon peruvianum*. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 5093-5096
- Taylor CB, Bariola PA, DelCardayre SB, Raines RT, Green PJ** (1993) RNS2: A senescence-associated RNase of Arabidopsis that diverged from the S-RNases before speciation. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 5118-5122

- Thompson AR, Vierstra RD** (2005) Autophagic recycling: Lessons from yeast help define the process in plants. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 165-173
- Ticconi CA, Abel S** (2004) Short on phosphate: plant surveillance and countermeasures. *Trends Plant Sci* **9**: 548-555
- Ticconi CA, Delatorre CA, Lahner B, Salt DE, Abel S** (2004) Arabidopsis *pdr2* reveals a phosphate-sensitive checkpoint in root development. *Plant Journal* **37**: 801-814
- Toyooka K, Okamoto T, Minamikawa T** (2000) Mass transport of preform of a KDEL-tailed cysteine proteinase (SH-EP) to protein storage vacuoles by endoplasmic reticulum-derived vesicle is involved in protein mobilization in germinating seeds. *J Cell Biol* **148**: 453-463
- Trubia M, Sessa L, Taramelli R** (1997) Mammalian Rh/T2/S-glycoprotein ribonuclease family genes: Cloning of a human member located in a region of chromosome 6 (6q27) frequently deleted in human malignancies. *Genomics* **42**: 342-344
- Tsai DS, Lee HS, Post LC, Kreiling KM, Kao TH** (1992) Sequence of an S-protein of *Lycopersicon peruvianum* and comparison with other solanaceous S-proteins. *Sex Plant Reprod* **5**: 256-263
- Tucker M, Parker R** (2000) Mechanisms and control of mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Biochem* **69**: 571-595
- Valencia-Sanchez MA, Liu JD, Hannon GJ, Parker R** (2006) Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev* **20**: 515-524
- van Doorn WG, Stead AD** (1997) Abscission of flowers and floral parts. *J Exp Bot* **48**: 821-837
- van Doorn WG, Woltering EJ** (2005) Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends Plant Sci* **10**: 117-122
- Van Nerum I, Certal AC, Oliveira MM, Keulemans J, Broothaerts W** (2000) PD1, an S-like RNase gene from a self-incompatible cultivar of almond. *Plant Cell Rep* **19**: 1108-1114
- Vance CP, Uhde-Stone C, Allan DL** (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol* **157**: 423-447
- Vitale A, Ceriotti A, Denecke J** (1993) The role of the endoplasmic reticulum in protein synthesis, modification and intracellular transport. *J Exp Bot* **44**: 1417-1444
- Vitale A, Denecke J** (1999) The endoplasmic reticulum - Gateway of the secretory pathway. *Plant Cell* **11**: 615-628
- Vitale A, Galili G** (2001) The endomembrane system and the problem of protein sorting. *Plant Physiol* **125**: 115-118
- Wagner KG, Backer AI** (1992) Dynamics of nucleotides in plants studied on a cellular basis. *Int Rev Cytol* **134**: 1-84
- Wang Y, Ribot C, Rezzonico E, Poirier Y** (2004) Structure and expression profile of the Arabidopsis PHO1 gene family indicates a broad role in inorganic phosphate homeostasis. *Plant Physiol* **135**: 400-411
- Wasternack C, Hause B** (2002) Jasmonates and octadecanoids: Signals in plant stress responses and development. *In* K Moldave, ed, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, Vol 72. Academic Press, New York, pp 165-221
- Watanabe H, Naitoh A, Suyama Y, Inokuchi N, Shimada H, Koyama T, Ohgi K, Irie M** (1990) Primary structure of a base non-specific and adenylic acid preferential ribonuclease from *Aspergillus saitoi*. *J Biochem* **108**: 303-310

- Waterhouse PM, Wang MB, Lough T** (2001) Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* **411**: 834-842
- Wilson CM** (1975) Plant nucleases. *Annu Rev Plant Physiol* **26**: 187-208
- Wilson CM** (1982) Plant nucleases: Biochemistry and development of multiple molecular forms. *Isozymes: Curr Top Biol Med Res* **6**: 33-54
- Ye ZH, Droste DL** (1996) Isolation and characterization of cDNAs encoding xylogenesis-associated and wounding-induced ribonucleases in *Zinnia elegans*. *Plant Mol Biol* **30**: 697-709
- Ziethe K, Stenzel I, Hertel SC, Köck M** (1998) Cloning and characterization of PSR5, a tomato cDNA (Accession No. Y14339) encoding a 20S subunit from the proteasome repressed by phosphate starvation. *Plant Physiol* **116**: 1605
- Zrenner R, Stitt M, Sonnewald U, Boldt R** (2006) Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 805-836

9 Verzeichnis der angefügten Publikationen

1. **Köck, M.**, Löffler, A., Abel, S., Glund, K. (1995) cDNA structure and regulatory properties of a family of starvation-induced ribonucleases from tomato. *Plant Molecular Biology* **27**: 477-485
2. Ohgi, K., Shiratori, Y., Nakajima, A., Iwama, M., Kobayashi, H., Inokuchi, N., Koyama, T., **Köck, M.**, Löffler, A., Glund, K. und Irie, M. (1997) Expression of tomato ribonuclease (RNase LE) and its mutant enzyme, 44D, from yeast cells, and their enzymatic properties. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **61**: 432-438
3. Bosse, D., **Köck, M.** (1998) Influence of phosphate starvation on phosphohydrolases during development of tomato seedlings. *Plant, Cell and Environment* **21**: 325-332
4. Kaletta, K., Kunze, I., Kunze, G., **Köck, M.** (1998) The peptide HDEF as a new retention signal is necessary and sufficient to direct proteins to the endoplasmic reticulum. *FEBS Letters* **434**: 377-381
5. **Köck, M.**, Theierl, K., Stenzel, I., Glund, K. (1998) Extracellular administration of phosphate sequestering metabolites induces ribonucleases in cultured tomato cells. *Planta* **204**: 404-407
6. Ziethe, K., Stenzel, I., Hertel, S.C., **Köck, M.** (1998) Cloning and characterization of PSR5, a tomato cDNA (Accession No. Y14339) encoding a 20S subunit from the proteasome repressed by phosphate starvation (PGR98-065). *Plant Physiology* **116**: 1605
7. Abel, S., **Köck, M.** (2001) Secretory acid ribonucleases from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In Nicholson AW (Ed) Ribonucleases. *Methods in Enzymology* **341**: 351-368
8. Lehmann, K., Hause, B., Altmann, D., **Köck, M.** (2001) Tomato ribonuclease LX with the functional ER retention motif HDEF is expressed during physiological cell death processes including xylem differentiation, germination and senescence. *Plant Physiology* **127**: 436-449
9. Stenzel, I., Ziethe, K., Schurath, J., Hertel, S.C., Bosse, D., **Köck, M.** (2003) Differential expression of *LePS2*, a phosphatase gene family, in response to phosphate availability, plant development and pathogen infection. *Physiologia Plantarum* **118**: 138-146

10. Groß, N., Wasternack, C., **Köck, M.** (2004) Wound-induced *RNaseLE* expression is jasmonate and systemin independent and occurs only locally in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus).
Phytochemistry **65**: 1343-1350
11. **Köck, M.**, Groß, N., Stenzel, I., Hause, G. (2004) Phloem-specific expression of the wound-inducible ribonuclease LE from tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus).
Planta **219**: 233-242
12. **Köck, M.**, Stenzel, I., Zimmer, A. (2006) Tissue-specific expression of tomato Ribonuclease LX during phosphate starvation-induced root growth.
Journal of Experimental Botany, **doi:10.1093/jxb/erl124**

Betreute Diplomarbeiten und Promotionsarbeiten zum Thema

Diplomarbeiten

Stenzel, Irene (1993) „Klonierung genomischer Sequenzen einer extrazellulären RNase (RNase LE) aus Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Lukullus“), FB Biochemie/ Biotechnologie

Lange, Annett (1994) „Untersuchungen zur Expression der RNasen LE und LX in Tomate“, FB Biochemie/ Biotechnologie

Tscheudschilsuren, Gerelsul (1994) „Untersuchungen zur Expression der RNasen in Tomatenkeimlingen“, FB Biochemie/ Biotechnologie

Schumann, Heike (1995) „Klonierung genomischer Sequenzen der intrazellulären RNase LX aus Tomate“, Biozentrum und FB Biochemie/ Biotechnologie

Wolf, Michaela (1995) „Untersuchungen zur Etablierung eines stabilen Transformationssystems für Tomate“, Biozentrum und FB Biochemie/ Biotechnologie

Krüger, Sabine (1995) „Expression von Ribonukleasen aus Tomate in *Escherichia coli*“, Biozentrum und FB Biochemie/ Biotechnologie

Altmann, Dorit (1999) „Untersuchungen zur differentiellen Expression von Ribonukleasen während der Keimlingsentwicklung von Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Lukullus)“, Biozentrum und FB Biologie

Schurath, Jörg (2002) „Expressionsanalyse einer neuen Phosphatmangel-induzierten Genfamilie (PSI14) in Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Lukullus)“, FB Biologie und Biozentrum

Hoffmann, Dana (2002) „Inhibierung von S-ähnlichen RNasen mittels Antisense- und RNAi-Ansätzen in Tomate“, FB Biochemie/ Biotechnologie und Biozentrum

Wolf, Babette (2005) „Relative Quantifizierung von Phosphatmangel-induzierbaren Genen und eines mykorrhizaspezifischen Phosphattransporters in *Lycopersicon esculentum* mittels Real-Time PCR“, FB Pharmazie und Biozentrum

Promotionsarbeiten

Stenzel, Irene (1998) „Isolierung und Charakterisierung genomischer Sequenzen Phosphatmangel induzierbarer Gene aus Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Lukullus). Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Groß, Nadine (2005) „Die sekretorische RibonukleaseLE in *Lycopersicon esculentum* - Charakterisierung von Regulation und Funktion“, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Danksagung

Ich danke allen Mitarbeitern der Pflanzenbiochemischen Abteilung des ehemaligen Fachbereiches Biochemie/Biotechnologie und des Biozentrums der Universität für die kollegiale Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt dem ersten Direktor des Biozentrums, Herrn Prof. Dr. M. Luckner, und der gegenwärtigen Direktorin des Biozentrums, Frau Prof. Dr. B. Dräger, für das persönliche Vertrauen, die Unterstützung der wissenschaftlichen Arbeit und die Freiräume während der Abfassung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt allen Projektmitarbeitern, Promotionsstudenten, Diplomanden und technischen Mitarbeiterinnen meiner Arbeitsgruppe, die zum erheblichen Teil die Basis für die vorliegende Arbeit gelegt haben.

Ich bedanke mich bei Freunden, Kollegen und den Mitgliedern des Sonderforschungsbereiches 363 sowie des Graduiertenkollegs 416 für die Projektkooperationen, für die Unterstützung bei der Etablierung neuer Methoden, die gemeinsame Nutzung von Materialien, den Gedankenaustausch und viele Anregungen.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Claus Wasternack für sein wissenschaftliches Interesse und die kollegiale Hilfe und Unterstützung der betreuten Promotionen.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Kultusministerium des Landes Sachsen-Anhalt für die finanzielle Unterstützung der Forschungsvorhaben.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Dr. Margret Köck, geb. Techritz
Geburtsdatum/-ort: 08.10.1955 in Kamenz (Sachsen)
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder (* 1979; * 1983)

Ausbildung / Qualifikationen

1962-1970 Polytechnische Oberschule Brauna
1970-1974 EOS „Lessingschule“ Kamenz, Allgemeine Hochschulreife
1974-1979 Biochemie-Studium, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
02/1979 Diplom-Biochemikerin, Thema der Arbeit: „Adeninnukleotide und energy charge als physiologische Indikatoren einer Sulfitschädigung bei der Flechtenalge *Trebouxia spec.*“, Betreuer: Dozent Dr. D. Schlee, Pflanzenbiochemie, MLU Halle-Wittenberg
04/1983 Dr. rer. nat., Thema der Arbeit: „Wirkung von Sulfid auf ausgewählte Photosyntheseprozesse in *Trebouxia spec.* und *Euglena gracilis* sowie isolierte Chloroplasten“, Betreuer: Prof. Dr. Dieter Schlee, Wissenschaftsbereich Biochemie, MLU Halle-Wittenberg

Beruflicher und wissenschaftlicher Werdegang

1979-1983 Forschungsstudentin in der Arbeitsgruppe „Bioindikationsforschung“, Pflanzenbiochemische Abteilung, Wissenschaftsbereich Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1983-1994 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Pflanzenbiochemischen Abteilung des Wissenschaftsbereiches Biochemie, später Fachbereich Biochemie/ Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg
1989 / 1990 Stipendiatin des ‚British Council‘ mit Forschungsaufenthalt in der AFRC Research Group in Plant Gene Regulation, Universität Nottingham, Großbritannien (Prof. Dr. Donald Grierson)
11/1994-1996 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Aufbaustab des Biozentrums der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
seit 1997 Abteilungsleiterin „Angewandte biowissenschaftliche Forschung/ Radionuklidlabor“ im Biozentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Halle, den 14.11.2006

gez. Margret Köck

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel wurden nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde nur an der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt.

Halle, den 14.11.2006

gez. Margret Köck