

UNIVERSITÄT
BAYREUTH

**Signalwege und Toleranzfaktoren für die
Anpassung an Hypoxie und Überflutung in
*Arabidopsis thaliana***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften

eingereicht an der
Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

von

Willi Riber

geb. am 17.08.1983 in Wiesbaden

Bayreuth, August 2014

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2010 bis August 2014 in Bayreuth am Lehrstuhl Pflanzengenetik unter Betreuung von Frau Professor Dr. Angelika Mustroph angefertigt.

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

Dissertation eingereicht am: 15.08.2014

Zulassung durch die Promotionskommission: 17.09.2014

Wissenschaftliches Kolloquium: 14.01.2015

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Rhett Kempe

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Angelika Mustroph (Erstgutachterin)

Prof. Dr. Stefan Clemens (Zweitgutachter)

Prof. Dr. Benedikt Westermann (Vorsitz)

Prof. Dr. Bettina Engelbrecht

Inhaltsverzeichnis

Summary	1
Zusammenfassung	3
1 Einleitung	5
1.1 Der Sauerstoffbedarf für maximale Respiration und die Verfügbarkeit von Sauerstoff in Pflanzengeweben und bei Überflutung	5
1.2 Die Regulation von Metabolismus und Respiration bei Hypoxie	6
1.3 Die Wahrnehmung von Sauerstoffkonzentrationen	11
1.4 Anpassungen an Überflutung und ihre Bedeutung für die Herstellung toleranter Nutzpflanzen	14
1.5 Die EMS- Mutante <i>gedI</i>	16
1.6 Zielsetzung der Arbeit	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Pflanzenmaterial	18
2.2 Chemikalien und Geräte	18
2.3 Zusammensetzung der Erde für die Pflanzenanzucht	18
2.4 Verwendete Plasmide	18
2.5 Samensterilisation	19
2.6 Herstellung kompetenter Bakterien	19
2.6.1 <i>E.Coli</i>	19
2.6.2 <i>A.tumefaciens</i>	19
2.7 Transformation von Bakterien	20
2.8 gDNA Extraktion	20
2.9 RNA-Extraktion und semiquantitative RT-PCR	20
2.10 SDS-Gelelektrophorese	21
2.11 Coomassie-Färbung	21
2.12 Proteinbestimmung nach Bradford	21
2.13 Westernblot	22
2.14 Transiente Tabak-Transformation	22
2.15 Protoplasten Transformation	22
2.16 Promotoraktivierungsassay in Protoplasten	23
2.17 Map based cloning (Kartierung)	24
2.18 Tail-PCR	25
2.19 Pflanzentransformation mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	26
2.20 ADH -Aktivität	26
2.21 SAAB-Assay	26
2.20.1 Proteinexpression in Rosetta BL21	26
2.21.2 Proteinextraktion aus <i>E. coli</i>	27

2.21.3 Proteinaufreinigung und Durchführung des SAAB-Assays	27
2.22 Pflanzenanzucht und Behandlung für Überlebensexperimente	28
2.22.1 Überleben nach Keimung und Wachstum in Dunkelheit	28
2.22.2 Überleben 7 d alter Keimlinge in Dunkelheit.....	28
2.22.3 Überleben von Überflutung.....	28
2.23 Messung von Stärke und Zuckergehalten.....	29
2.23.1 Pflanzenanzucht und Behandlung	29
2.23.2 Messung von Stärke und Zuckergehalten.....	29
3 Ergebnisse	31
3.1 Die Rolle des <i>N-end rule pathway</i> bei der Anpassung an Hypoxie	31
3.1.1 Die EMS-Mutante <i>ged1</i> weist eine differentielle Expression Hypoxie-responsiver Gene auf und besitzt ein nicht-funktionelles <i>PRT6</i> Gen.....	31
3.1.2 Überprüfung von Microarray-Ergebnissen.....	40
3.1.3 <i>prt6</i> -Mutanten sind tolerant gegen Überflutung.....	41
3.1.3 Überflutung verursacht in <i>prt6</i> -Mutanten eine stärkere Verringerung des Kohlenhydratverbrauchs als in den Wildtypen	45
3.1.4 <i>prt6</i> -Mutanten sind tolerant in verschiedenen Hungerstress-Experimenten	51
3.2 Charakterisierung Hypoxie-responsiver Transkriptionsfaktoren	54
3.2.1 ERF-VII Transkriptionsfaktoren	54
3.2.2 ABA REPRESSOR1 (ABR1)	60
3.2.3 LOB domain containing protein 41 (LBD41)	70
3.2.4 Probleme bei der Detektion von transgenen Proteinen im Westernblot.....	75
4 Diskussion	78
4.1 Die Bedeutung des N-end-rule pathway für die Antwort auf Sauerstoffmangel.....	78
4.2 <i>ged1</i> besitzt ein nicht-funktionelles <i>PRT6</i> Gen.....	80
4.3 Überlebensexperimente.....	81
4.4 <i>prt6</i> -Mutanten verbrauchen bei Überflutung weniger Kohlenhydrate als die Wildtypen.....	86
4.5 Primärmetabolismus bei Anoxie	91
4.6 <i>prt6</i> -Mutanten sind tolerant gegen verschiedene Arten von Hungerstress.....	91
4.7 Mögliche Interaktionen zwischen Hypoxie, N-end-rule pathway, ABA-Signalwegen und der Anpassung an Energiemangel	93
4.8 ABR1.....	95
4.9 LBD41.....	96
4.10 Ausblick	97
5 Literaturverzeichnis.....	100
6 Anhang	111
6.1 Übersicht über <i>prt6</i> -Mutanten	111

6.2 Sequenzierungen	112
6.3 Zuckergehalte	117
6.4 Primer	118

Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
AOX	Alternative Oxidase
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serum-Albumin
Chr.	Chromosom
Col-0	Columbia- 0
COX	Cytochrom-c-Oxidase
dA	Desoxyadenin
dC	Desoxycytosin
dG	Desoxyguanin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dT	Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMS	Ethylmethansulfonat
G6PDH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GABA	γ -amino-Buttersäure
gFW	gramm Frischgewicht
HEPES	N-2-(Hydroxyethyl)piperazin-N-2-Ethansulfonsäure
IPTG	Isopropylthiogalactosid
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
MV	Methylviologen
NAD	Nicotinamid-adenin-dinukleotid
NADH	Reduziertes Nicotinamid-adenin-dinukleotid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDC	Pyruvat-Decarboxylase
PPi	Pyrophosphat
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNAP	(\pm)-S-Nitroso-N-acetylpenicillamin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tri-(hydroxymethyl-) aminomethan
UDP	Uridindiphosphat
UGPase	UDP-Glukose Pyrophosphorylase
UTP	Uridintriphosphat
Ws	Wassilewskija

Summary

Arabidopsis thaliana was used in this work to analyze signaling pathways and adaptation mechanisms that influence the tolerance to submergence and hypoxic stress.

The expression of a common set of 49 genes is upregulated by hypoxia in a wide range of different *Arabidopsis* cell types (Mustroph et al. 2009). A screening of microarray databases for mutants with a differential regulation of these genes lead to the discovery of data of the EMS-mutant *ged1* (*greening after extended darkness 1*, Choy et al. 2008). *Ged1* shows a significant upregulation of 36 of these 49 hypoxia-responsive genes under normoxic conditions.

Map based cloning of *ged1* revealed a mutation in the gene *PRT6* and therefore a new allele of a *prt6*-mutant in a *Wassilewskija* background. *PRT6* is an ubiquitin ligase, whose function as an essential enzyme for an oxygen sensing mechanism, mediated by the N-end rule pathway, had just been emerging through two independent publications at that time (Gibbs et al. 2011, Licausi et al. 2011).

Ged1 was compared to the T-DNA insertion line *prt6-1* in a Col-0 background. Both mutants were more tolerant than their respective wildtypes in submergence experiments.

These results are contradictory to published submergence experiments with *prt6*-mutants in similar ecotypic backgrounds that demonstrate an intolerance of the mutants (Licausi et al. 2011, Weits et al. 2014). Also the length of survival of all genotypes greatly differs between both experimental setups, i.e. they are up to severalfold shorter in the published experiments.

The reason for this difference could be identified as the humidity during the recovery treatment, revealing a susceptibility of *prt6*-mutants to an impaired water uptake by the root.

Interestingly, *ged1* showed higher Lt_{50} values when subjected to submergence in darkness compared to air in darkness, which was not observed in the other genotypes.

This finding could be linked to a fourfold higher carbohydrate content including starch, sucrose, glucose and fructose in rosette leaves of *ged1* after 24 h of submergence in darkness compared to air treatment. Similar differences in carbohydrate content were measured in *prt6-1* although the survival rate of this genotype is lower during submergence in darkness compared to air in darkness.

Remarkably, both mutants showed an about twofold higher carbohydrate content after 24 h of submergence compared to the wildtypes. No differences in carbohydrate content between the genotypes were, however, measured after air treatment, although both *prt6*-mutants survived longer than their wildtypes in different darkness in air survival experiments and showed delayed leaf senescence.

Hence, the observed reduction in carbohydrate consumption during submergence is triggered by hypoxia or some other submergence derived signals but is enhanced in mutants with an impaired N-end-rule pathway.

These results point to an involvement of a switched-off N-end rule pathway in the downregulation of carbohydrate consumption and economizing with energy sources in spite of a simultaneous upregulation of the expression of several genes with a function in sugar degradation and fermentation.

Furthermore, several phenotypes of N-end rule pathway mutants, namely an abscisic acid hypersensitive arrest of seedling establishment and the ability to survive long periods of darkness could be linked with the activity of subgroup VII ERF transcription factors that are known targets of protein degradation through the N-end-rule pathway.

A new putative target of the N-end rule pathway, the ERF transcription factor ABR1 (ABA REPRESSOR 1) was characterized. Its transcript was found to be highly upregulated by anoxia treatment. Experiments on overexpression lines revealed strong phenotypes like excessive root hair formation, severe growth defects and reduced seed yield. However, phenotyping of a knockout mutant contradicted already published results (Pandey et al. 2005), indicating that the function of ABR1 might not necessarily be involved in abscisic acid signaling as assumed before.

Lastly, some work on putative targets of the transcription factor LBD41 (LOB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 41) is presented. LBD41 is a transcriptional repressor and is highly induced by hypoxic stress. Its transcript abundance is regulated by a subset of subgroup VII ERF transcription factors.

Zusammenfassung

Arabidopsis thaliana wurde in dieser Arbeit verwendet, um Signalwege und Anpassungsmechanismen zu untersuchen, die die Toleranz gegen Überflutung und Hypoxiestress beeinflussen.

Eine Gruppe von 49 Genen wird bei Hypoxie in verschiedensten *Arabidopsis*-Zelltypen verstärkt exprimiert (Mustroph et al. 2009). Eine Durchsichtung von *Microarray*-Datenbanken nach Mutanten, die eine differentielle Regulation dieser Gene aufweisen, führte zu der Entdeckung eines *Microarrays* der EMS-Mutante *ged1*, der eine Hochregulation von 36 der 49 hypoxie-responsiven Gene bei Normoxie zeigt.

Durch die Kartierung von *ged1* wurde eine Mutation in dem Gen *PRT6* gefunden und damit ein neues Allel einer *prt6*-Mutante in einem *Wassilewskija* Hintergrund. *PRT6* ist eine Ubiquitin Ligase, deren Bedeutung als essentielles Enzym in einem durch den *N-end rule pathway* vermittelten Sauerstoffwahrnehmungsmechanismus zu jener Zeit gerade durch zwei unabhängige Publikationen bekannt wurde (Gibbs et al. 2011, Licausi et al. 2011).

Ged1 wurde mit der T-DNA Insertionslinie *prt6-1* in einem Col-0 Hintergrund verglichen. Beide Mutanten erwiesen sich in Überflutungsexperimenten toleranter als ihre jeweiligen Wildtypen.

Diese Beobachtung steht in Widerspruch zu veröffentlichten Überflutungsexperimenten, in denen *prt6*-Mutanten ähnlicher ökotypischer Hintergründe verwendet worden waren. Diese zeigen eine Intoleranz der Mutanten (Licausi et al. 2011, Weits et al. 2014). Zusätzlich unterscheiden sich die Überflutungsexperimente in der Überlebensdauer aller Genotypen. Diese sind in den publizierten Experimenten um bis zu einem Vielfachen kürzer.

Die Luftfeuchtigkeit während der Erholungsbehandlung konnte als Grund für diese Unterschiede zwischen den Experimenten verantwortlich gemacht werden, was darauf hindeutet, dass *prt6*-Mutanten bei Wiederbelüftung anfällig für eine verringerte Wasseraufnahme durch die Wurzel sind.

Interessanterweise zeigte *ged1* in den hier dargestellten Überflutungsexperimenten im Gegensatz zu den anderen Genotypen höhere Lt_{50} Werte bei Überflutung in Dunkelheit als bei Dunkelheit an der Luft.

Diese Beobachtung konnte mit einem etwa vierfach höheren Kohlenhydratgehalt, einschließlich Stärke, Saccharose, Glukose und Fruktose, in Rosettenblättern von *ged1* nach 24 h Überflutung im Vergleich zur Luftbehandlung in Verbindung gebracht werden. Ein ähnlicher Unterschied im Kohlenhydratgehalt wurde in *prt6-1* festgestellt, obwohl dieser

Genotyp eine im Vergleich zur Luftbehandlung geringere Überlebenswahrscheinlichkeit bei Überflutung aufwies.

Beide Mutanten zeigten nach 24 h Überflutung in Dunkelheit einen etwa zweifach höheren Kohlenhydratgehalt als die Wildtypen. Dagegen gab es keine signifikanten Unterschiede im Kohlenhydratgehalt nach 24 h Dunkelheit an der Luft, obwohl beide *prt6*-Mutanten in verschiedenen Dunkelheit-Überlebensexperimenten an der Luft toleranter waren als die jeweiligen Wildtypen und eine verzögerte Seneszenz aufwiesen.

Demzufolge hängt der verringerte Kohlenhydratverbrauch bei Überflutung von Hypoxie- und/oder Überflutungs-induzierten Signalen ab, findet aber verstärkt in *prt6*-Mutanten statt.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Ausschaltung des *N-end rule pathway* eine Herunterregulation des Kohlenhydratverbrauchs und einen ökonomischeren Umgang mit Energieressourcen bewirkt, obwohl gleichzeitig die Expression vieler Gene erhöht wird, die an Zuckerabbau und Fermentation beteiligt sind.

Darüber hinaus konnten bestimmte Phänotypen von *N-end-rule pathway*-Mutanten, nämlich ein Abscisinsäure-hypersensitives Anhalten der Keimlingsetablierung und die Fähigkeit lange Dunkelperioden zu überleben mit der Aktivität von ERF-VII Transkriptionsfaktoren in Verbindung gebracht werden, die selbst unter Kontrolle des *N-end-rule pathway* stehen.

Ein mögliches neues Zielprotein des *N-end-rule pathway*, der Transkriptionsfaktor ABR1 (ABA REPRESSOR1) wurde charakterisiert. Das Transkriptlevel von ABR1 ist bei Anoxie-Behandlung stark hochreguliert. Überexpressionslinien zeigten eindeutige Phänotypen, wie exzessive Wurzelhaarbildung, starke Wachstumsdefekte und reduzierten Samenertrag. Die Phänotypisierung einer *Knockout*-Mutante steht aber in Widerspruch zu bereits veröffentlichten Ergebnissen (Pandey et al. 2005) und deutet darauf hin, dass die Funktion von ABR1 nicht in der Weise mit ABA-Signalwegen in Verbindung steht, wie zuvor angenommen.

Des Weiteren werden Daten zu möglichen Zielen des Transkriptionsfaktors LBD41 (LOB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 41) präsentiert. LBD41 ist ein Repressor der Transkription und wird bei Hypoxie verstärkt exprimiert. Sein Transkriptlevel wird von ERF-VII Transkriptionsfaktoren reguliert.

1 Einleitung

1.1 Der Sauerstoffbedarf für maximale Respiration und die Verfügbarkeit von Sauerstoff in Pflanzengeweben und bei Überflutung

Pflanzen sind obligat aerobe Organismen. Sauerstoff ist als terminaler Akzeptor von Elektronen essentiell für die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien, die in Dunkelheit oder in nicht photosynthetisch aktiven Organen zum größten Teil für die Verfügbarkeit von ATP verantwortlich ist. Sauerstoff wird hauptsächlich durch die oxidative Phosphorylierung verbraucht, wird aber außerdem für eine Vielzahl biosynthetischer Prozesse benötigt, z.B. durch Cytochrom-P450 Monooxygenasen (Mao et al. 2013).

Von Millar et al. (1994) wurde in isolierten Mitochondrien der Sojabohne eine halbmaximale Sauerstoffverbrauchsrate (Michaelis-Menten-Konstante, K_m) der Cytochrom-c-oxidase (COX) von $0.14 \mu\text{M}$ (0.0108 kPa) bestimmt, die K_m der Alternativen Oxidase (AOX) beträgt $1.7 \mu\text{M}$. Basierend auf Michaelis-Menten Kinetiken sollte bei einer K_m von $0.14 \mu\text{M}$ eine annähernd maximale Respiration bei $14 \mu\text{M}$ (1 kPa) möglich sein, 95% des Maximums bei $2.6 \mu\text{M}$ (0.2 kPa) (Armstrong and Beckett 2011a, Armstrong 2014). Die Respirationsrate unterscheidet sich in verschiedenen Pflanzenspezies oder Gewebetypen und hängt zusätzlich u.a. von der Länge der Nacht bzw. den Zuckerressourcen am Ende des Tages, der Konzentration von Hormonen, der ATP/ADP-Konzentration, der Verfügbarkeit von Energieressourcen, der Wachstumsrate oder Stressbedingungen ab.

Da es in Pflanzen keine Transportsysteme für Sauerstoff gibt, erfolgt die Sauerstoffverteilung durch Diffusion. Die Diffusionsgeschwindigkeit von Sauerstoff ist in Wasser im Vergleich zur Luft um etwa das 10,000 fache herabgesetzt (der Diffusionskoeffizient beträgt bei 101.325 kPa und 20°C in der Luft $0.201 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ und in Wasser $2.1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$). Zusätzlich ist die Sauerstoffkonzentration in gesättigtem reinen Wasser bei 20°C (ca. $270 \mu\text{M}$) etwa 28 fach geringer als in der Luft (ca. 7.5 mM) (Armstrong et al. 2014).

Besonders anfällig für Hypoxie sind die inneren Zellen voluminöser Gewebe mit dicht aneinander liegenden Zellen und hoher metabolischer Aktivität. Beispielsweise wurden in Kartoffelknollen (Geigenberger et al. 2000), Früchten (Ho et al. 2011), der Stele von Wurzeln (Gibbs et al. 1998, Colmer and Greenway 2011) und in Wurzelmeristemen (Armstrong et al. 1994, Zabalza 2009) große Sauerstoffgradienten zwischen äußeren und inneren Zellschichten gemessen. Auch das Kambium von Bäumen (Kimmerer und Stringer 1988, Pöpke et al. 2014), Phloemgewebe (van Dongen et al. 2003), und Samen (Borisjuk und Rolletschek 2009)

sind während des optimalen Pflanzenwachstums oft sehr geringen Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt.

Die Sauerstoffzufuhr wird zudem verringert, wenn Teile oder die gesamte Pflanze von Wasser umschlossen sind. Staunässe oder Überflutung sind insbesondere problematisch für die Wurzel, da durch die Aktivität von Mikroorganismen im Wasser des Bodens innerhalb von 24 h Anoxie entsteht (Vashisht et al. 2011, Lee et al. 2011).

1.2 Die Regulation von Metabolismus und Respiration bei Hypoxie

Bei geringer werdenden Sauerstoffkonzentrationen, d.h. wenn der Sauerstoffverbrauch die Sauerstoffzufuhr übersteigt muss es zu einer Anpassung von Metabolismus und Respiration kommen. Eine plötzliche Verringerung der ATP-Produktion macht eine Priorisierung des Energieverbrauchs für lebenswichtige Prozesse notwendig (z.B. die Aufrechterhaltung von Ionengradienten). Dies findet in Pflanzen als auch in Tieren u.a. durch eine Regulation der Translation statt (Wheaton und Chandell 2010, Sorensen und Bailey-Serres 2014).

Translation ist ein sehr energieaufwändiger Prozess, da beispielsweise alleine für die Erweiterung einer Polypeptidkette um jede Aminosäure 4 ATPs verbraucht werden.

Branco-Price et al. (2008) verwendeten transgene *Arabidopsis* Keimlinge, die die Ribosomenuntereinheit RPL18 (*ribosomal protein L18*) mit einem fusionierten His₆-FLAG-Epitop überexprimieren. Diese Keimlinge wurden für 2 h bzw. 9 h mit Hypoxie behandelt, gefolgt von einer Immunpräzipitation der Polysomen mitsamt daran gebundenen mRNA. Diese mRNA spiegelt den Teil der Transkripte wieder, der aktiv in Polysomen translatiert wird und wurde für *Microarray*-Analysen verwendet. Dabei zeigte sich, dass nach 2h 67.5% und nach 9h 73.8% der mRNAs, die an Polysomen gebunden waren, signifikant reduziert waren im Vergleich zur Kontrollbehandlung.

In konventionellen *Microarrays* mit Gesamt-RNA Extrakten wurde nur eine reduzierte Transkription von 4.2% der Gene nach 2 h bzw. 22.1% nach 9 h beobachtet. MRNAs, die von der Translation in Polysomen ausgeschlossen werden akkumulieren in sogenannten mRNPs (*messenger RNA ribonucleoprotein complexes*), aus denen sie bei Bedarf teilweise wieder rekrutiert werden können (Branco-Price et al. 2008, Sorensen und Bailey-Serres 2014). Muströph et al. (2009) zeigten, dass bei Hypoxie die Translation bestimmter Transkripte selektiv erhöht wird: His₆-Flag-RPL18 wurde hierbei unter Kontrolle 13 verschiedener zelltypspezifischer Promotoren exprimiert. Die daraus resultierenden Translatom-Daten aller untersuchten Zelltypen sowie zusätzlich erhobene Transkriptom-Daten weisen nach Hypoxie-Behandlung eine gemeinsam erhöhte Expression von 49 Genen auf. Darunter befinden sich

viele Gene, die an Zuckerabbau und Fermentation beteiligt sind, wie *SUS6* (Saccharose Synthase), *PFK6* (Phosphofruktokinase), *PDC1* und *PDC2* (Pyruvat Decarboxylasen), *ADH1* (Alkohol Dehydrogenase), *AlaAT1/2* (Alanin Aminotransferasen) und *NIP2.1* (Laktattransporter). Die Funktion von etwa 50% der überlappend exprimierten Gene ist unbekannt.

Ein Vergleich der Hypoxie-induzierten Genexpression in 21 verschiedenen Organismen aus den Reichen Plantae, Animalia, Fungi, and Bacteria zeigte Gemeinsamkeiten bei Proteinen, die mit Glykolyse, Fermentation, alternativer Respiration, Metabolittransport, Schutz vor ROS, Chaperon-Aktivität und Ribosomensynthese in Verbindung stehen (Mustroph et al. 2010).

Es gibt in der Literatur unterschiedliche Interpretationen von Ergebnissen bezüglich der Regulation der Respiration bei Hypoxie aufgrund der Fragestellung welche Sauerstoffpartialdrücke außerhalb von Pflanzengewebe und Zellen, die aus technischen Gründen noch nicht in unmittelbarer Nähe der Mitochondrien gemessen werden können, zu einer Sauerstofflimitation der Cytochrom-C-Oxidase (COX) führen. In einigen Publikationen wird vorgeschlagen, dass die Respiration bei Hypoxie unabhängig von (bzw. vor) einer Sauerstofflimitation der COX proaktiv herunter reguliert werden kann (Geigenberger et al. 2000, Geigenberger 2003, Gupta et al. 2009, van Dongen et al. 2009, Zabalza et al. 2009). Dies basiert u.a. auf der Beobachtung, dass eine Inkubation von Kartoffelknollenscheiben (1mm dick) in Medium mit unterschiedlichen Sauerstoffpartialdrücken bereits dann zu einer signifikanten Abnahme des ATP/ADP Verhältnisses, einer Reduktion des Speichermetabolismus und des Saccharoseabbaus führt, wenn noch keine Änderungen des NADH/NAD Verhältnisses eingetreten sind (Geigenberger et al. 2000). Signifikante Änderungen der Metaboliten wurden bereits bei einer Begasung des umgebenden Mediums mit einem 12%igen Sauerstoffgemisch (entspricht etwa 127 μM O_2 im Medium, Gupta et al. 2009) festgestellt, während eine Zunahme des NADH/NAD Verhältnisses und eine Akkumulation von Laktat erst bei Begasung mit einem $\leq 1\%$ igen Sauerstoffgemisch stattfand. Die Respirationsrate der Kartoffelknollenscheiben verringerte sich bei einer Begasung mit 21%igem Sauerstoffgemisch im Vergleich zu einer Begasung mit einem 8%igen Sauerstoffgemisch um 22%, bei Supplementation mit 20 mM Saccharose betrug der Unterschied 40% (Geigenberger et al. 2000, Geigenberger 2003).

Auch das Wurzellängenwachstum 10 Tage alter *Arabidopsis thaliana* Keimlinge ist nach zweitägiger Inkubation in Dunkelheit bereits bei 8% (v/v) Sauerstoff im Vergleich zu 21% (v/v) signifikant reduziert (van Dongen et al. 2009).

Des Weiteren führten Zabalza et al. (2009) Messungen der Sauerstoffkonzentrationsabnahme in sauerstoffundurchlässig versiegeltem Medium, das Pflanzengewebe enthält, durch. Es wurden abgeschnittene Wurzeln von *Pisum sativum* und *Arabidopsis thaliana* verwendet und beobachtet, dass die aus der Sauerstoffabnahme im Medium pro Zeiteinheit bestimmte Respirationsrate einen biphasischen Verlauf nimmt, mit einer weniger starken linearen Abnahme der Respiration bei moderaten Sauerstoffkonzentrationen und einer starken Abnahme der Respiration bei sehr niedrigen Sauerstoffkonzentrationen; eine vergleichsweise starke Abnahme der Respirationsrate findet ab einer im Medium gemessenen Sauerstoffkonzentration von etwa 20 μM statt.

Es wird von den Autoren dieser Publikationen vermutet, dass bei den jeweiligen außerhalb des Pflanzengewebes gemessenen Sauerstoffkonzentrationen noch keine Sauerstofflimitation der COX auftritt, zumal es sich um relativ dünne Kartoffelscheiben (Geigenberger 2000) und *Arabidopsis*-Wurzeldurchmesser (ca. 200 μm) handelt und die *Arabidopsis*-Wurzeln sogar auf der Oberfläche von festem Agarmedium wuchsen, also direkt der Gasphase ausgesetzt waren (van Dongen et al. 2009).

Die Interpretation dieser Ergebnisse hinsichtlich einer proaktiven Regulation der Respiration sind aber umstritten, aufgrund des Gegenarguments, dass eine sich langsam ausbreitende Sauerstofflimitation der COX, ausgehend vom inneren Kern des Gewebes (aufgrund größerer Diffusionsbarrieren, der Respiration des umliegenden Gewebes und der hohen metabolischen Aktivität der Stele im Fall der Experimente mit Wurzeln) für den biphasischen Verlauf der Respirationsabnahme sowie für die beobachteten Metabolitänderungen (z.B. ATP/ADP) bei Sauerstoffpartialdrücken, die weit über dem kritischen Sauerstoffpartialdruck für maximale Respiration von Mitochondrien liegen, verantwortlich sein könnte (Armstrong et al. 2011a, Armstrong et al. 2011b).

In silico-Simulationen unter der Annahme, dass die Respiration ausschließlich von Michaelis-Menten-Kinetiken abhängt, basierend auf den Parametern der Messungen von Zabalza et al. (2009) mit *Pisum sativum* Wurzeln (z.B. 2 mm Durchmesser, 160 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ Respirationsrate), konnten den biphasischen Verlauf reproduzieren (Armstrong et al. 2011a, Armstrong et al. 2011b). Diesen Berechnungen zufolge kommt es bereits bei einem äußeren Sauerstoffpartialdruck von 52 kPa zu einer Sauerstofflimitation im Inneren des Wurzelgewebes von *Pisum sativum*. Bei 21 kPa, also bei einer Luftsättigung des Mediums ist die Stele bereits stark hypoxisch. Es scheint also grundsätzlich problematisch zu sein, den notwendigen Sauerstoffpartialdruck für maximale Respiration außerhalb des Pflanzengewebes

einzuschätzen, was der Hauptkritikpunkt an den Publikationen ist, in denen eine proaktive Respirationsregulation vorgeschlagen wird.

Abgesehen davon wird von Zabalza et al. (2009) berichtet, dass eine Supplementation mit Pyruvat oder Succinat, nicht aber mit Saccharose oder Glucose zu einer starken Erhöhung der Respirationsrate um das 2-3 fache führt, die bis zum Ende der Messung im Vergleich zu Kontrollbedingungen erhöht bleibt, obwohl auch hier ein biphasischer Verlauf der Respirationsrate beobachtet wurde. Die erhöhte Respirationsrate kann mit einer allosterischen Aktivierung der alternativen Oxidase (AOX) durch α -Ketosäuren erklärt werden. Es scheint daher in Pflanzen wichtig zu sein, bei Hypoxie den Input in den Krebs-Zyklus und die Pyruvatkonzentration zu kontrollieren, um einen erhöhten, ineffizienten Sauerstoffverbrauch durch die AOX zu verhindern. Bei der Regulation der Pyruvatkonzentration könnte fermentativer Metabolismus von Bedeutung sein, der Pyruvat als Substrat für die Umwandlung zu Ethanol, Laktat und Alanin verwendet. Paradoxaerweise findet aber in vielen Pflanzenspezies bei Hypoxie eine Akkumulation von Succinat statt (Menegus et al. 1989; Fan et al. 1997; Branco-Price et al. 2008; Kreuzwieser et al. 2009; Narsai et al. 2009; Rocha et al. 2010b; Nakamura et al. 2012; Barding et al. 2013).

Eine Regulation der Respiration kann theoretisch über die Versorgung der Elektronentransportkette mit Elektronen-Donoren, die Aktivität der Elektronentransportkette selbst oder den ATP-Verbrauch reguliert werden. In Säugetieren gibt es Beweise für die Existenz aller drei Regulationsmechanismen. An der Verwirklichung der meisten Anpassungen (z.B. die Inaktivierung der Pyruvat-Dehydrogenase, der Austausch von Untereinheiten der Cytochrom-c-Oxidase, die Regulation des ATP-Verbrauchs durch Na^+/K^+ -Pumpen) ist der Sauerstoffsensor HIF1 beteiligt, der ausschließlich in Metazoa vorkommt und über eine sauerstoffabhängige Modifikation von Prolinseitenketten durch Prolylhydroxylasen und eine darauffolgende Prozessierung durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg reguliert wird (Fukuda et al. 2007, Wheaton and Chandell 2010).

In Pflanzen sind mögliche Regulationsmechanismen, die unabhängig von den unmittelbaren Folgen einer Sauerstofflimitierung der COX wirken (z.B. durch die Veränderung der NADH- und ATP- Gehalte) bisher unbekannt (einige neue Einsichten gibt der Ergebnis- und Diskussionsteil).

Bei einer sehr geringen Sauerstoffkonzentration, die zu einer starken Beeinträchtigung der oxidativen Phosphorylierung führt, kann es zu dem sogenannten Pasteur-Effekt kommen, einer Zunahme des Zuckerabbaus durch die Glykolyse, um einen bioenergetischen Kollaps zu

verhindern. Dabei entstehendes NADH muss oxidiert werden, um den Vorgang der Substratkettenphosphorylierung aufrecht zu erhalten.

Dies findet anfangs durch eine Produktion von Laktat statt, dessen übermäßige Akkumulation aufgrund einer starken Erniedrigung des pH-Wertes schädlich ist, da gleichzeitig durch den Energiemangel u.U. die Aktivität von Protonenpumpen reduziert ist (Drew 1997, Tadege et al. 1999). Die Laktat-Dehydrogenase wird durch einen geringen pH-Wert gehemmt. Eine Verringerung des pH-Wertes erhöht aber die Aktivität der Pyruvat Decarboxylase (PDC). Nach einem Abfall des pH-Wertes zu Beginn der (starken) Hypoxie durch Laktat-Produktion, wird somit vermehrt Ethanol und weniger Laktat produziert (Davies 1980, Tadege et al. 1999, Ishizawa 2014).

Pyruvat kann in Pflanzen auch über andere Stoffwechselwege für die NADH Oxidierung genutzt werden. Dabei akkumulieren letztendlich die Endprodukte Alanin, γ -Aminobuttersäure (GABA) und/oder Succinat. Das Ausmaß der Akkumulation dieser Endprodukte ist Organ- und Spezies-spezifisch (Bailey-Serres et al. 2012).

Wie genau die Umschaltung von Respiration auf Fermentation reguliert wird ist unklar. Eine höhere Expression von Fermentationsgenen führt bei normalen Sauerstoffgehalten nicht zu einer erhöhten Fermentationsrate, sondern erst bei Hypoxie. Eine Theorie besagt, dass dafür die unterschiedlichen K_m s der beteiligten Enzyme verantwortlich sind. Die PDC kann demzufolge mit einem K_m -Wert im mM Bereich bei niedrigen Pyruvatkonzentrationen nicht mit der PDH konkurrieren, deren K_m -Wert im μ M Bereich liegt (Tadege et al. 1998, Tadege et al. 1999).

Des Weiteren erfolgen bei Sauerstoffmangel viele energieverbrauchende Reaktionsschritte unter Verwendung von Pyrophosphat (PP_i) anstelle von ATP. Der Saccharoseabbau erfolgt nicht mehr über die Invertase, sondern Saccharose Synthase und UDP-Glucose Pyrophosphorylase. Dadurch wird bei der Einspeisung von Saccharose in die Glycolyse weniger Energie verbraucht (Bailey-Serres 2012, Muströph et al. 2014). Als Alternative für die Verwendung von Nukleotiden beim Membrantransport kann außerdem der K^+ -Gradient verwendet werden (Gajdanowicz et al. 2011).

in primäre N-Degrone umgewandelt werden können. Sekundäre N-degrone werden durch Arginyltransferasen arginyliert, so dass ein Typ1 N-Degron entsteht, tertiäre N-Degrone können enzymatisch in sekundäre N-Degrone umgewandelt werden.

Der *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Col-0 besitzt zwei funktionelle Arginyltransferasen (ATE1 und ATE2). Typ1 N-degrone werden von der Ubiquitin-Ligase PRT6 erkannt (PRT1 ist an der Erkennung von Typ2 beteiligt). Es ist vielfach bestätigt, dass Zielproteine mit einem Typ1 N-Degron in *PRT6* Mutanten stabilisiert werden (Garzon et al. 2007, Holman et al. 2009, Graciet and Wellmer 2010, Licausi et al. 2011, Gibbs et al. 2011).

Die Sauerstoffwahrnehmung wird durch das tertiäre N-degrom Cystein vermittelt, das in Anwesenheit von Sauerstoff von Cysteinoxidasen (PCO1 und PCO2) oxygeniert werden kann. Hierfür ist wahrscheinlich auch Stickstoffmonoxid (NO) notwendig (Hu et al. 2005, Gibbs et al. 2014, Weits et al. 2014). Oxygeniertes N-terminales Cystein wird von ATE1 oder ATE2 arginyliert und kann somit von PRT6 erkannt werden. Durch die Ubiquitinierung einer Lysinseitenkette des betreffenden Proteins wird der Abbau durch das Proteasom veranlasst. Bei Hypoxie ist die Oxygenierung von Cystein beeinträchtigt und das entsprechende Protein hat eine längere Halbwertszeit. Bei der Entstehung von Proteinen während der Translation ist grundsätzlich Methionin die N-terminale Aminosäure. Es kann aber durch Methionin-Aminopeptidasen (MAP1A und MAP2A) abgespalten werden, wenn die nachfolgende Aminosäure eine kleine Seitenkette hat (C, V, G, P, A, S oder T) (Gibbs et al. 2014).

Damit sind alle Proteine, deren vorhergesagte Aminosäuresequenz mit MC beginnt mögliche Ziele des O₂ und NO abhängigen Abbaus durch den *N-end rule pathway*. Die bis heute einzigen bestätigten Zielproteine in *Arabidopsis* sind fünf Mitglieder der ERF-Transkriptionsfaktorenfamilie Untergruppe VII (Gibbs et al. 2011, Licausi et al. 2011). Darunter befinden sich drei konstitutiv exprimierte (RAP2.2, RAP2.12, RAP2.3) und zwei Hypoxie-induzierte Transkriptionsfaktoren (HRE1 und HRE2). Für RAP2.12 wurde gezeigt, dass er bei Normoxie an die an der Plasmamembran verankerten Proteine ACBP1 und ACBP2 (*acyl-CoA-binding protein*) bindet, wodurch er vom Abbau geschützt ist. Bei Hypoxie löst sich die Assoziation mit der Plasmamembran aufgrund eines noch unbekanntem Mechanismus und die nun stabilisierten Transkriptionsfaktoren können die Transkription von Genen aktivieren.

Eine gentechnische Veränderung des N-terminus dieser Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel ein Austausch der zweiten Aminosäure Cystein mit Alanin führt zu einer Stabilisierung unter Normoxie und einer erhöhten Expression Hypoxie-responsiver Gene (Licausi et al. 2011).

Microarray-Daten von Gibbs et al. (2011) zeigen, dass 45 von 135 im Wildtyp bei Hypoxie hochregulierten Genen, in *prt6* und *ate1ate2* Mutanten unter Normoxie hochreguliert sind. Darunter befinden sich 27 der 49 Gene, die bei Hypoxie in allen Zelltypen exprimiert werden (Kapitel 1.2, Muströph et al. 2009).

Der N-Terminus (MCGGAI-Motiv) der ERF-Transkriptionsfaktoren der Untergruppe VII ist in verschiedenen Pflanzenspezies (z.B. *Rumex palustris*, *Rumex acetosa*, *Glycine max*, *Malus x domestica*, *Pinus taeda*, *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana*) hoch konserviert (Licausi et al. 2011).

Interessanterweise sind die zur Untergruppe VII gehörenden Reis-Proteine OsSUB1A (SUBMERGENCE 1A) und OsSUB1C (SUBMERGENCE 1C) *in vitro* keine Ziele des Abbaus durch den *N-end rule pathway*. Des Weiteren unterscheidet sich das N-terminale Consensus Motiv in OsSK1 (SNORKEL 1) und OsSK2 (SNORKEL 2). Diese Gene spielen eine wichtige Rolle für die Überflutungstoleranz in Reis (Kapitel 1.4, Hattori et al. 2009, Gibbs et al. 2011, Licausi et al. 2011, Bailey-Serres et al. 2012a).

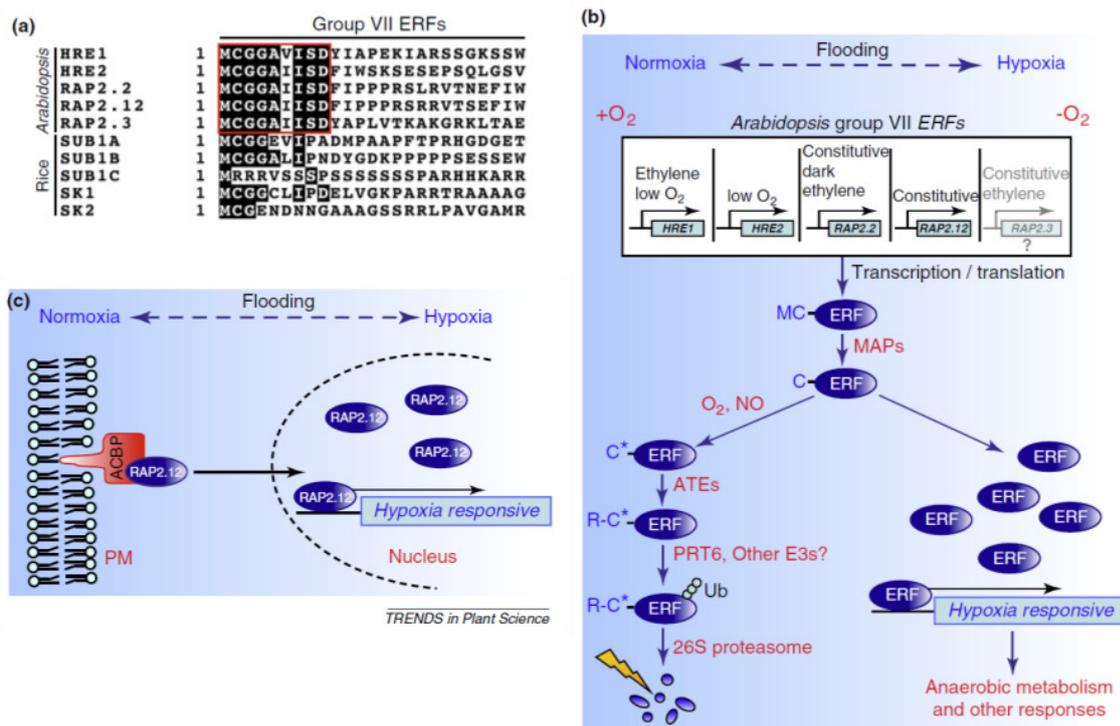


Abb.2: Die Regulation von ERF-Transkriptionsfaktoren der Untergruppe VII durch den *N-end rule pathway*. **a)** Sequenzvergleich von ERF-VII Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis* und Reis. **b)** Regulation von Transkriptmenge und Proteinestabilität. **c)** RAP2.12 ist durch eine Bindung an das membranverankerte Protein ACBP bei Normoxie an der Plasmamembran lokalisiert und erst bei Hypoxie im Zellkern. Die Abbildung wurde entnommen aus Bailey-Serres et al. (2012a).

1.4 Anpassungen an Überflutung und ihre Bedeutung für die Herstellung toleranter Nutzpflanzen

Zwei Überflutungssituationen können unterschieden werden: 1) teilweise Überflutung (einschließlich Staunässe, d.h. einer Wassersättigung des Bodens durch zu langsames Absickern) und 2) komplette Überflutung der Pflanze. Schätzungen zufolge sind etwa 10% der weltweiten Anbauflächen von Staunässe bedroht. Versicherungsauszahlungen aufgrund von Überflutungen betragen im Jahr 2011 in den USA mehr als 3 Milliarden US-Dollar. Zwischen 2000 und 2011 betrug der prozentuale Anteil von Überflutung am jährlichen Ernte-Gesamtverlust zwischen 10% und 50% (Shabala 2011, Bailey-Serres et al. 2012b). Es gibt große Unterschiede zwischen Pflanzenspezies hinsichtlich der Toleranz gegenüber Staunässe. Bei Gerste, Weizen, Mais und Sojabohne kann schon ein kurzzeitiger Staunässestress von wenigen Tagen zu Ertragseinbußen führen, während ein optimaler Ertragsgewinn bei Reis durch Staunässe kaum beeinflusst ist (Ahmed et al. 2013).

Die Problematik der Staunässe umfasst die Entstehung von Anoxie im Boden aufgrund der Aktivität von Mikroorganismen, sowie eine dadurch verursachte Entstehung von Toxinen wie Fe^{2+} , Mn^{2+} , H_2S , Ethanol, Acetaldehyd, kurzkettige Fettsäuren und Phenolen (Armstrong 2005a, Shabala 2011).

Die Wurzel ist in dieser Situation abhängig von longitudinaler Sauerstoffdiffusion ausgehend von überirdischen Pflanzenteilen, verliert aber gleichzeitig Sauerstoff an den anoxischen Boden durch radiale Diffusion. Dem kann durch die Ausbildung von Aerenchymen, Adventivwurzeln, sowie Barrieren für den radialen Sauerstoffverlust entgegengewirkt werden. Diese Barrieren entstehen u.a. durch eine Einlagerung von Lignin und Suberin in äußere Wurzelzellschichten und stellen gleichzeitig ein Hindernis für die Aufnahme toxischer Substanzen dar (Armstrong 2005a, Shabala 2011, Shiono et al. 2011). An der Entstehung von Aerenchymen und Adventivwurzeln sind die Signalmoleküle Ethylen und H_2O_2 beteiligt (Mühlenbock et al. 2007, Steffens et al. 2009).

Reis wird traditionell oft in stehendem Wasser von 5 bis 50 cm Tiefe angebaut, ist also offensichtlich sehr tolerant gegenüber Staunässe. Alleine in Indien sind aber 30% der Gesamtanbaufläche tiefliegende, regengewässerte Regionen, die regelmäßig von progressiven oder plötzlichen Überflutungen z.B. durch den Monsunregen bedroht sind (Dar et al. 2013). Die komplette Überflutung einer Reispflanze verhindert die effektive Nutzung von Aerenchymen.

Verschiedene Unterarten bzw. Varietäten von Reis nutzen in dieser Situation gegensätzliche Überlebensstrategien, nämlich Flucht (*escape-Strategie*) oder Ruhe (*quiescence-Strategie*).

Beide Strategien werden durch Ethylen initiiert. Bei Überflutung akkumuliert Ethylen im Pflanzengewebe aufgrund der durch den Wasserumschluss erniedrigten Diffusion von Gasen. Ethylen bewirkt in Reis eine höhere Expression der ABA-8'-Hydroxylase, die zu einem niedrigeren ABA-Level führt, sowie eine verringerte Expression von SLR1 (SLENDER-RICE 1) und SLRL1 (SLENDER-RICE-LIKE 1) (Fukao und Bailey-Serres 2008, Bailey-Serres et al. 2010).

Zusammen bewirkt das bei Pflanzen mit einer Fluchtstrategie eine höhere Gibberellin-Sensitivität, was letztendlich zu einem erhöhten Gibberellin-vermitteltem Längenwachstum des Stammes führt (Fukao und Bailey-Serres 2008). Dadurch können im günstigen Fall Teile der Pflanze über die Wasseroberfläche hinauswachsen und Aerenchyme als Schnorchel nutzen, d.h. die Diffusion von Sauerstoff zu den unter Wasser befindlichen Pflanzenteilen erleichtern.

Ein extremes Beispiel für ein überflutungsinduziertes Längenwachstum ist der Tiefwasser Reis, der bis zu 25 cm pro Tag wachsen und eine Höhe von bis zu 8 m erreichen kann. Hierfür ist zusätzlich die Existenz der Untergruppe VII ERF-Transkriptionsfaktoren SK1 (SNORKEL 1) und SK2 (SNORKEL 2) verantwortlich, die das Gibberellin-induzierte Längenwachstum zusätzlich verstärken (Hattori et al. 2009). Diese Gene fehlen oder sind nicht funktionell in den modernen ertragreichen Kultivaren, die somit eine abgeschwächte Fluchtstrategie verfolgen. Reisvarietäten mit einer Fluchtstrategie überleben komplette Überflutung nicht länger als eine Woche. In Gebieten, die von plötzlichen hohen Überflutungen bedroht sind werden traditionell Varietäten angebaut, die bis zu 2 Wochen kompletter Überflutung überleben können, z.B. die Varietät F13A.

Diesem Unterschied in der Überlebensdauer liegt die Expression des SUB1A-Gens zugrunde, einem Transkriptionsfaktor der ERF-Familie Untergruppe VII, der ausschließlich in toleranten Varietäten vorkommt und bei Überexpression in intoleranten Varietäten oder in Rückkreuzungslinien Toleranz verleiht (Xu et al. 2006, Fukao et al. 2006, Fukao et al. 2008, Dar et al. 2013). SUB1A wird durch Ethylen reguliert und verhindert in einem Rückkopplungs-Mechanismus dessen Produktion. Trotzdem findet in SUB1A-Varietäten bei Überflutung ein ähnlicher Abbau von ABA statt. SUB1A verursacht aber eine stärkere Expression von SLR1 und SLRL1, die zu einer geringeren Gibberellin-Sensitivität und damit einem geringeren Energieverbrauch durch Längenwachstum führen. Die geringere metabolische Aktivität von SUB1-Pflanzen ermöglicht eine geringere Energieverschwendung durch Fermentation und damit ein längeres Überleben von kompletter Überflutung.

Ein berühmtes Beispiel für die Herstellung überflutungstoleranter Reisvarietäten ist der sogenannte *Scuba-rice*, bei dem es sich um Rückkreuzungslinien von SUB1-Varietäten mit ertragreichen Kultivaren handelt. In Indien wird hauptsächlich die Varietät Swarna angebaut, die entsprechende Rückkreuzungslinie wird Swarna-SUB1 genannt. Eine kürzlich erschienene Publikation berichtet von Feldexperimenten mit Swarna-SUB1 bei Bauern aus 128 Dörfern in Orissa (Indien), deren Felder den natürlicherweise vorkommenden Überflutungen ausgesetzt waren. Dabei wurde festgestellt, dass es einen positiven Effekt von Swarna-SUB1 auf den Ertrag bei einer länger als 7 d anhaltenden kompletten Überflutung gibt, während es ohne Überflutung oder bei anderen Überflutungsbedingungen keinen Unterschied zu Swarna gibt (Dar et al. 2013).

1.5 Die EMS- Mutante *ged1*

Die EMS Mutante *ged1* (*greening after extended darkness 1*) war ursprünglich in einem *Screen* nach *gun1* (*genome uncoupled 1*) ähnlichen Mutanten entdeckt worden, die einen Defekt im retrograden Signalweg von Chloroplasten zum Nukleus aufweisen (Gray et al. 2003). *Gun-1* Mutanten regulieren im Gegensatz zum Wildtyp die Transkription der kleinen Rubiscountereinheit (*RBCS*) und Teilen des Lichtsammelkomplexes (*LHCBI*) im Nukleus nicht herunter, wenn die Chloroplasten durch Lincomycin- oder Norflurazonbehandlung beschädigt werden. Eine transgene *Arabidopsis thaliana* Linie (Ökotyp Wassilewskija), die GFP unter der Kontrolle eines *RBCS* Promotors aus Tabak exprimiert, wurde mit EMS mutagenisiert und Individuen selektiert, die nach Lincomycin oder Norflurazonbehandlung eine relativ hohe GFP-Expression zeigten. Choy et al. (2008) führten weitere Untersuchungen an der in diesem *Screen* selektierte Mutante *ged1* durch und fanden heraus, dass die *Arabidopsis* Allele von *RBCS* und *LHCBI* bereits unter Kontrollbedingungen höher exprimiert sind als im Wildtyp und Norflurazon oder Lincomycinbehandlung auch in *ged1* zu einer starken Reduktion der Transkriptlevel führt, die aber im Vergleich zum Wildtyp immer noch leicht erhöht sind. Damit entspricht die Mutante nicht der ursprünglichen Zielsetzung und eine Identifizierung der Mutation wurde nicht weiter verfolgt. Einige Phänotypen der Mutante sind von Choy et al. (2008) beschrieben: *Ged1* besitzt die Fähigkeit nach Keimung und 10 tägigem Wachstum in Dunkelheit gefolgt von einer Lichtbehandlung zu ergrünen bzw. nach kürzerer Inkubation in Dunkelheit nach zwei Tagen Belichtung mehr Chlorophyll zu akkumulieren als der Wildtyp.

Des Weiteren zeigt ein Microarray mit 7 d alten Keimlingen unter der Bedingung 5 d Dunkelheit gefolgt von 2 d Licht eine starke Herunterregulation vieler ABA-responsiver

Gene, wobei sich der ABA-Gehalt nicht signifikant vom Wildtyp unterscheidet. Außerdem reagiert die Samenkeimung sensitiv auf eine ABA-Behandlung (Choy et al. 2008).

Da der Fokus unserer Arbeitsgruppe auf Hypoxie-responsiven Genen lag, wurde deren differentielle Regulation in den *Microarray*-Daten erkannt und machte die Mutante daher interessant für weitere Analysen.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung dieser Arbeit war einerseits die Aufklärung von Signalwegen, die zu einer differentiellen Genexpression bei Hypoxie führen; dies geschah durch *map based cloning* der Mutante *ged1* sowie durch eine Charakterisierung der Hypoxie-responsiven Transkriptionsfaktoren LBD41 und ABR1.

Andererseits wurden Todesursachen in verschiedenen Hypoxie-Überlebensexperimenten analysiert. Hierbei wurde vor allem die Regulation des Primärmetabolismus, d.h. die Bedeutung von Energiehaushalt und Fermentation für die Toleranz gegen Hypoxie und Überflutung untersucht und inwiefern der *N-end rule pathway* an dieser Regulation beteiligt ist.

Darüber hinaus wurde untersucht, inwiefern ERF-VII-Transkriptionsfaktoren, als bisher einzige bekannte Ziele des sauerstoffabhängigen Proteinabbaus durch den *N-end rule pathway*, mit verschiedenen beobachteten Phänotypen von *prt6*-Mutanten in Verbindung gebracht werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Samen von *ged1* und *Ws* wurden von John C. Gray bezogen (Choy et al. 2008). Samen von *prt6-1* (SAIL_1278_H11) und *ate1ate2* (SALK_023492/SALK_040788) wurden von Julia Bailey-Serres bezogen (Gibbs et al. 2011). *Abr1-2* (SALK_012151) und *lbd41* (SALK_144556) wurden bei NASC bestellt.

2.2 Chemikalien und Geräte

Die verwendeten Chemikalien stammten von Duchefa Biochemie (Haarlem, Niederlande), Biozym (Hessisch Oldendorf), Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim) oder Merck (Darmstadt). Das verwendete Wasser wurde von einer Advantage Milli-Q-Anlage (Millipore, Billerica, USA) entionisiert. Alle Primer und Oligonukleotide wurden von Life Technologies GmbH (Darmstadt) bezogen. Restriktionsenzyme und Enzyme für die cDNA-Synthese wurden von Fermentas GmbH (St. Leon Rot) bezogen.

Alle Absorptionsmessungen (mit Ausnahme der Bestimmung von RNA oder DNA Konzentrationen) wurden mit dem Photometer Specord 200 Plus (AnalytikJena AG, Jena) durchgeführt.

2.3 Zusammensetzung der Erde für die Pflanzenanzucht

Es wurde Einheitspflanzenerde des Typs GS90 grob (Einheitserde Werkverband, Sinnatal-Jossa), Pikiererde (Okohum, Herbertingen) und Vermiculit (Deutsche Vermiculite Dämmstoff GmbH, Sprockhoevel) in einem Verhältnis von 3:3:1 gemischt und 1,5 Stunden bei 80°C pasteurisiert.

2.4 Verwendete Plasmide

Bei Verwendung des *Gateway Systems* (Life Technologies GmbH, Darmstadt) wurden zu transformierende Konstrukte zunächst in den Entryvektor pDONR221 kloniert und dann für eine stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* bzw. eine transiente Transformation von Tabakblättern in den *Destination*-Vektor p35S:HF-GATA rekombiniert, der das Transgen unter die Kontrolle eines *Cauliflower Mosaic Virus* 35S Promotors stellt und ein N-terminales His₆/FLAG Epitop fusioniert. Der Vektor verleiht *E. coli* eine Chloramphenicol-Resistenz

und transformierten Agrobakterien und Pflanzen eine Kanamycin-Resistenz (Zanetti *et al.* 2005; Mustroph *et al.* 2010, Peña-Castro *et al.* 2011).

Für die transiente Transformation von *Arabidopsis* Protoplasten wurde der Destination Vektor pHBT1 verwendet (Wehner *et al.* 2011), der das Transgen unter Kontrolle eines *Cauliflower Mosaic Virus* 35S Promotors stellt und ein N-terminales HA (Human Influenza Haemagglutinin) Epitop fusioniert. Der Vektor verleiht *E.coli* eine Ampicillinresistenz. Die Plasmide p70SRUC (Stahl *et al.*, 2004) und pBT10GAL4UAS (Wehner *et al.*, 2011) wurden zusätzlich für die Promotoraktivitätsversuche verwendet (beschrieben in Klecker *et al.* 2014).

Es wurden für alle Gateway-Klonierungen die BP-Clonase und LR-Clonase Enzymmischungen mit dem halben Volumen der Herstellerempfehlung verwendet (Life Technologies GmbH, Darmstadt).

Für die Proteinexpression in *E. coli* wurde der Vektor pET24b verwendet (Promega GmbH, Mannheim), der nicht Gateway-kompatibel ist. Der Vektor stellt das Transgen unter Kontrolle eines T7 Promotors und fusioniert ein N-terminales T7 und C-terminales His₆ Epitop.

2.5 Samensterilisation

Die Sterilisation von Samen erfolgte durch Chlorgasbehandlung in einem Exsikkator. Dafür wurden 10 ml NaClO mit 5 ml 37% HCl gemischt und Samen in einem verschlossenen Exsikkator für 45 min dem entstehenden Chlorgas ausgesetzt. Dieses wurde dann abgepumpt und die Samen danach für 20 min unter einer Sterilbank inkubiert.

2.6 Herstellung kompetenter Bakterien

2.6.1 *E.Coli*

Bereits vorhandene kompetente Zellen wurden über Nacht bei 37°C in 3 ml LB unter Schütteln inkubiert, danach in einen Kolben mit 200 ml LB-Medium überführt und für etwa 3 h bei 37°C bis zu einer OD von 0,5 – 0,8 inkubiert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert, in 20 ml 0,1 M CaCl₂ resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert, wieder abzentrifugiert und in 4 ml 0,1 M CaCl₂ resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde 820 µl Glycerin zugegeben und Aliquots bei -80°C bis zur Verwendung eingefroren.

2.6.2 *A.tumefaciens*

Bereits vorhandene kompetente Zellen wurden über Nacht bei 30°C in 200 ml YEB unter Schütteln inkubiert, danach abzentrifugiert und in etwa 350 ml TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM

EDTA, pH 8) resuspendiert, abzentrifugiert und in 20 ml YEB resuspendiert. Aliquots wurden bei -80°C bis zur Verwendung eingefroren.

2.7 Transformation von Bakterien

Für die Selektion und Vervielfältigung von Plasmiden wurden kompetente *E. coli* Bakterien vom Stamm DB3.1 oder DH10 β verwendet. Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und je 50 μ l der Bakteriensuspension mit 0,1- 2 μ l Plasmidlösung bzw. Ligationsansatz gemischt. Nach Inkubation auf Eis für 30 min erfolgte eine Hitzestressbehandlung für 1 min bei 42°C. Es wurde 800 μ l LB-Medium (5g/L Hefeextrakt, 10g/L Trypton, 5g/L NaCl) zugegeben und unter Schütteln bei 37°C für 1 h inkubiert. Die Bakterien wurden dann auf LB-Agarplatten unter Verwendung des entsprechenden Antibiotikums ausplattiert.

Bei der Verwendung von Agrobakterien wurde der Stamm GV3101 benutzt, anders als bei der Transformation von *E. coli* wurde die Hitzestressbehandlung bei 37°C durchgeführt und die nachfolgende Inkubation bei 30°C. Es wurde YEB-Medium (1 g/L Hefeextrakt, 10 g/L Pepton, 5 g/L Saccharose, 0,5 g/L MgSO₄) verwendet.

2.8 gDNA Extraktion

Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und mithilfe von Metallkugeln in einer Kugelmühle (durch heftiges Schütteln) zerkleinert. Das zerkleinerte Pflanzenmaterial wurde in Eppendorfgefäßen mit 500 μ l Extraktionspuffer versetzt (500mM NaCl, 100mM Tris-HCl pH 8, 50mM EDTA pH 8, 0,2%SDS), gevortext und bei 65°C für 30 min inkubiert. Es wurde 500 μ l einer 24:1 Mischung Chloroform:Isoamylalkohol zugegeben, gevortext und 10 min bei 12.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 500 μ l Isopropanol versetzt und das Gefäß zur Mischung mehrmals umgedreht. Nach 10 min Inkubation wurde für 15 min bei 12.000g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und in 50 μ l Wasser gelöst. Die DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.9 RNA-Extraktion und semiquantitative RT-PCR

Für die RNA-Extraktion wurde Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff eingefroren, zerkleinert, mit 500 μ l Trizol versetzt, gevortext und 10 min bei RT inkubiert. Es wurde 100 μ l Chloroform zugegeben, gevortext und 5 min bei RT inkubiert, dann 15 min bei 4°C und 12.000g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. 250 μ l Isopropanol wurden zugefügt und das Gefäß zum Mischen mehrmals umgedreht. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde bei 4°C und 12.000g zentrifugiert und das Pellet mit 75%

Ethanol gewaschen. Die RNA wurde in 50µl VE-Wasser gelöst und für 10 min bei 65°C inkubiert, bevor mit einem Photometer eine Konzentrationsmessung (basierend auf der Absorption bei 260 nm) durchgeführt wurde. Jeweils 1 µg der RNA wurde für eine cDNA-Synthese verwendet. Es wurden für jede Reaktion 100 pmol Oligo(dT)₁₅ verwendet. Die weiteren Schritte erfolgten nach Herstellerprotokoll mit der RevertAidTM Reverse Transcriptase (Fermentas, St. Leon Rot). Die Sichtbarmachung der DNA-Banden in Agarosegelen erfolgte mit Serva DNA-Stain (Serva, Heidelberg). Primersequenzen befinden sich in Tabelle 6 (Anhang).

2.10 SDS-Gelelektrophorese

SDS Gele bestanden aus einem 5%igen Sammelgel (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,01% SDS, 37,5:1 Acrylamid:Bisacrylamid, APS, TEMED) und einem 12%igen Trenngel (375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,01% SDS, 37,5:1 Acrylamid:Bisacrylamid, APS, TEMED). Proteinextrakte wurden 1:1 mit Harnstoffpuffer (5 ml 2-Mercaptoethanol, 50 ml 10 % SDS, 19 ml 87 % Glycerin, 24 g Harnstoff, ad 100 ml H₂O + Spatelspitze Bromphenolblau) gemischt und 5 min bei 95°C inkubiert, danach auf Eis abgekühlt. Als Marker wurde PageRulerTM Prestained Protein Ladder verwendet (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte). Die Protein-Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 200V in Lauf-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1% (w/v) SDS).

2.11 Coomassie-Färbung

Das SDS-Gel wurde in Färbelösung (0.1% Coomassie Brilliant Blue R250, 10% Essigsäure, 40% Methanol) gelegt und diese in einer Mikrowelle kurz aufgeköcht. 10 min wurde das Gel darin inkubiert und anschließend mit Entfärbelösung (20% Methanol, 10% Essigsäure) durch kurzes Aufkochen und Waschen entfärbt.

2.12 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford erfolgte unter Verwendung von Roti-Quant (Carl Roth, Karlsruhe) nach Herstellerprotokoll. Für eine Eichreihe wurde BSA (*bovine serum albumin*) verwendet.

2.13 Westernblot

Westernblots wurden mit einer Mini-PROTEAN tetra cell Apparatur von Biorad nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden PVDF-Membranen verwendet, die vorher für 1 min in Methanol inkubiert und dann kurz in Blotting-Puffer (50 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol, 40 mM Glycin) gewaschen wurden. Nach der Übertragung der Proteine aus dem SDS-Gel auf die Membran wurde diese für 1 h in TBS-T (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,001% Tween20) mit 5% Milchpulver inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation in TBS-T mit 3% Milchpulver und einem Primärantikörper für 1 h. Nach mehreren Waschrissen mit TBS-T wurde der Sekundärantikörper, gelöst in TBS-T mit 3% Milchpulver zugegeben, für 1 h inkubiert und die Membran danach wieder gewaschen. Es wurde ein polyklonaler α -Flag Antikörper und ein α -rabbit HRP-Antikörper verwendet (Carl Roth, Karlsruhe). Die Detektion der Lichtemission durch die HRP erfolgte durch Zugabe von ECL-Reagenz [Mischung aus 1ml (0,1 M Tris-HCl pH 8,6, 0,25 mg Luminol) mit 100 μ l (1,1 mg para-Hydroxycoumarinsäure pro ml DMSO) und 0,3 μ l 30% H₂O₂)] und unter Verwendung eines Detektors (Chemiluminescence Imager, INTAS, Göttingen).

2.14 Transiente Tabak-Transformation

Transformierte Agrobakterien wurden über Nacht bei 28 °C unter Schütteln in 3ml YEB Medium und entsprechenden Antibiotika angezogen. Am nächsten Tag wurden 500 μ l davon in 50 ml YEB mit 500 μ l MES (1M) und 10 μ l Acetosyringone (19,62 mg/ml DMSO) überführt und unter Schütteln über Nacht bei 28 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die 50 ml Kultur abzentrifugiert und mit Wasser gewaschen. Das Pellet wurde in Infiltrationspuffer (10 mM MgCl₂, 10 mM MES, 10 μ M Acetosyringone) aufgenommen und eine OD₆₀₀ von 1,0 eingestellt. Die Suspension wurde für 2 h bei RT inkubiert. Abschließend wurde die Flüssigkeit mit einer Spritze (ohne Kanüle) in die Blatt-Unterseiten von *Nicotiana benthamiana* gepresst.

2.15 Protoplasten Transformation

Etwa 50-60 Rosettenblätter 5-6 Wochen alter *Arabidopsis*-Pflanzen wurden geerntet, in 1mm breite Streifen geschnitten und in 10 ml einer Enzymlösung (1U/mg cellulase R10, 0,3% macerozyme R10, 0,4 M Mannitol, 20 mM KCl, 20 mM MES, 10 mM CaCl₂, 0,1% BSA, 5 mM β -Mercaptoethanol, pH 5,7, sterilfiltriert) in einer Petrischale ausgebreitet. Die Lösung wurde dann für 4 h einem Unterdruck ausgesetzt und die Protoplasten mit einem Stahl-Netz

(63 µm) filtriert. Die Protoplasten wurden bei 120 g abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Es wurde 2 mal mit 10 ml W5 Puffer (2 mM MES, 154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM KCl, pH 5,7, autoklaviert) gewaschen und die Protoplasten dann in MMg-Lösung (0,4 M Mannitol, 15 mM MgCl₂, 4 mM MES, pH 5,7, sterilfiltriert) resuspendiert.

Da die Protoplastentransformation nur mit einer sehr reinen Plasmidlösung funktioniert, wurde die Aufreinigung aus 200 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur mit dem NucleoBond PC500 plasmid midi kit (Machery-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben durchgeführt. 30 µg der Plasmid-DNA wurde mit 400 µl der Protoplastenlösung gemischt. 440 µl einer Polyethylenglycol-Lösung (40% PEG4000, 0,4 M Mannitol, 0,2 M CaCl₂) wurden zugegeben und vorsichtig vermischt. Nach 20 min wurde 1 ml W5 zugegeben, die Protoplasten abzentrifugiert und in WI-Lösung (4 mM MES 0,5 M Mannitol 20 mM KCL) resuspendiert. Die Protoplasten wurden bis zum nächsten Tag (über Nacht) in eine Langtag Klimakammer gestellt.

Die ABA-Behandlung der Protoplasten erfolgte dann durch Abzentrifugation und Resuspendierung in 600 µl WI-Puffer, der die angegebenen ABA-Konzentrationen enthielt.

2.16 Promotoraktivierungsassay in Protoplasten

Die verwendeten Plasmide sowie die exakte Durchführung der Versuche sind in Klecker et al. (2014) beschrieben.

Zur Herstellung des *PCO1*Promotor:fluc Reporterplasmids wurde eine PCR mit Col-0 gDNA sowie den Primerpaaren TTTTGGATCCAAAAGAATGGCCCCTGGTTT und AAAACCATGGAAAAGTCTCCCAAACCCAA durchgeführt, das PCR-Produkt mit den Restriktionsenzymen BamHI und NcoI verdaut, gereinigt und in den Vektor pBT10GAL4UAS kloniert, der zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten und gereinigt worden war (Wehner et al., 2011).

Das Plasmid zur Überexpression von LBD41 mit VP16 Domäne wurde hergestellt, indem die codierende Sequenz der VP16 Domäne mit den Primern TATTAATTAACGCCCCCGACCGATGTCAG und TGTTAATTAACCCACCGT-ACTCGTCAATTCC amplifiziert, den Restriktionsenzymen AseI und PacI geschnitten und in den Vektor pHBTl (Kapitel 2.4) ligiert wurde. LBD41 wurde mit den Primern AAAAAGCAGGCTTAATGCGGATGAGCTGTAATG und AGAAAGCTGGGTCT-TCACAGCCGGAGGCGAGA amplifiziert und unter Verwendung des Gateway-Systems über pDONR221 in pHBTl-VP16 kloniert.

2.17 Map based cloning (Kartierung)

Die F2 Generation einer Kreuzung zwischen Col-0 und *ged1* wurde für die Kartierung der Mutation benutzt. Zur Selektion von Individuen mit Mutanten-Phänotyp wurden oberflächensterilisierte Samen auf MS-Medium mit 1% Agar, 1% Saccharose und 0,1 µM ABA ausgelegt. Nach 7 d wurden Keimlinge, die keine grünen Kotyledonen ausgebildet hatten auf Erde gesetzt, wo sie sich erholten. Es wurden Blattproben für eine gDNA-Extraktion gesammelt und die Samen der nächsten Generation geerntet, um eine falsch positive Selektion auszuschließen. Für die grobe Kartierung wurden SSLP und CAPS-Marker für bekannte Polymorphismen verwendet. Für die Feinkartierung wurden durch einen Vergleich der Genomsequenzen von Ws-0 und Ws-2 (<http://signal.salk.edu/atg1001/3.0/gebrowser.php>) Genomabschnitte ausgewählt und im Ws Ökotyp sequenziert, dessen Genomsequenz noch nicht bekannt ist. Auf Grundlage dieser Sequenzierungen wurden SSLP (*simple sequence length polymorphism*) oder *Mismatch-Primer* hergestellt (Tab.6). Je nach Längenunterschiede der Sequenzlängenpolymorphismen wurden 1-2%ige LG-Agarosegele (Biozym, Hessisch Oldendorf) oder 3%ige NuSieve Agarosegele (Biozym) verwendet. Primersequenzen befinden sich in Tabelle 6 (Anhang).

2.18 Tail-PCR

Tail-PCRs mit gDNA von *ged1* wurden nach Liu et al. (1995) durchgeführt. Dafür wurden drei aufeinanderfolgende PCRs mit den Primern prt6_3b fw, prt6_3d fw bzw. prt6_3c fw durchgeführt. Diese Primer wurden für die drei PCR-Reaktionen jeweils mit einem der degenerierten Primerpools AD1-AD6 kombiniert. Für die erste PCR wurde gDNA verwendet, das entstandene PCR-Produkt in der nachfolgenden PCR usw.. In der umgekehrten Richtung wurden die Primer prt6_rev3, prt6_rev3n bzw. prt6_rev3d benutzt. PCR-Produkte der dritten PCR wurden sequenziert. Primersequenzen befinden sich in Tabelle 6 (Anhang).

Es wurden folgende PCR-Programme verwendet: (nächste Seite)

Tail-PCR 1

Schritt	Temperatur	Dauer
1	93°C	60 s
2	95°C	60 s
3	94°C	30 s
4	62°C	60 s
5	72°C	2.5 min
6	Schritt 3-5 für 5 Zyklen	
7	94°C	
8	25°C	
9	über 3 min von 25°C auf 72°C	
10	72°C	2.5 min
11	94°C	10 s
12	68°C	60 s
13	72°C	2.5 min
14	94°C	10 s
15	68°C	60 s
16	72°C	2.5 min
17	94°C	10 s
18	44°C	60 s
19	72°C	2.5 min
20	Schritt 11-19 für 15 Zyklen	
21	72°	5 min
22	4°	bis zur Verwendung

Tail-PCR 2

Schritt	Temperatur	Dauer
1	94°C	10 s
2	64°C	60 s
3	72°C	2.5 min
4	94°C	10 s
5	64°C	60 s
6	72°C	2.5 min
7	94°C	10 s
8	44°C	60 s
9	72°C	2.5 min
10	Schritt 1-9 für 12 Zyklen	
11	72°C	5 min
12	4°	bis zur Verwendung

Tail-PCR 3

Schritt	Temperatur	Dauer
1	94°C	15 s
2	44°C	60 s
3	72°C	2.5 min
4	Schritt 1-3 für 20 Zyklen	
5	72°C	5 min
6	4°C	bis zur Verwendung

2.19 Pflanzentransformation mit *Agrobacterium tumefaciens*

Stabile Überexpressionslinien wurden durch die *floral-dip* Methode in einem Col-0 Hintergrund hergestellt (Clough und Bent 1998). Transformierte *Agrobacterium tumefaciens* Kulturen vom Stamm GV3101 wurden bei 30°C unter Schütteln über Nacht in YEB-Medium (10 g Pepton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl pro Liter) mit entsprechendem Antibiotikum angezogen, abzentrifugiert und das Pellet in 5%iger Saccharoselösung aufgelöst, so dass die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) 0,8 betrug. Nach Zugabe von 0,02% Silwet L-77 wurden die Blüten von *Arabidopsis* Pflanzen für etwa 30 s eingetaucht. Die Pflanzen wurden unmittelbar nach der Behandlung über Nacht verdunkelt und dann bis zur Reifung der Samen in eine Langtagkammer gestellt.

2.20 ADH -Aktivität

Zur Messung der ADH-Aktivität wurden 7 d alte Keimlinge in flüssigen Stickstoff eingefroren und zerkleinert. Das Pflanzenmaterial wurde mit 500 µl Extraktionspuffer (50

mM Hepes-KOH Puffer pH 6.8, 5 mM Mg Acetat, 15% Glycerin, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1 mM Pefabloc Proteinase Inhibitor, 5 mM β -mercaptoethanol) gemischt und das unlösliche Material abzentrifugiert. 10 μ l des Proteinextraktes wurde mit 980 μ l 50 mM TES Puffer pH 7.5 und 0.17 mM NADH versetzt. Die Absorptionsänderung wurde für 5 min bei 340 nm gemessen und dann 10 μ l 1 M Acetaldehyd zugegeben und die Absorptionsänderung über 5 min gemessen. Der Proteingehalt des Extraktes wurde nach Bradford bestimmt. Die Enzymaktivität wurde aus der Differenz der ermittelten Absorptionsänderungen pro Zeit berechnet.

2.21 SAAB-Assay

2.20.1 Proteinexpression in Rosetta BL21

Der SAAB-Assay wurde nach einem Protokoll von Smith et al. (2002) durchgeführt. Die ersten 381 bp der kodierenden Sequenz von LBD41 (da sie die vorhergesagte DNA-Bindungsdomäne enthalten) wurden aus cDNA mit den Primern LBD41_fw_BamHI TTATGGATCCACGGATGAGCTGTAATGGATGC und LBD41_rev_XhoI TTATCTCGAGGATCTTAAGAGGCGGACCTTG amplifiziert und unter Verwendung der Restriktionsenzyme BamHI und XhoI in den Vektor pET24b kloniert. Dieser wurde dann in den *E. coli* Stamm Rosetta BL21 transformiert. Eine transformierte Kolonie wurde in 3ml LB-Medium mit Kanamycin (50mg/L) bei 37°C angezogen, bis eine Trübung sichtbar war, dann in 500 ml des gleichen Mediums überführt und für ca. 3,5 h bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Genexpression wurde durch Zugabe von IPTG auf eine Konzentration von 100 μ M induziert. Nach 2 h wurden die Bakterien bei 4°C abzentrifugiert und bei -80°C eingefroren.

2.21.2 Proteinextraktion aus *E. coli*

Zur Aufreinigung des löslichen Proteins wurde das Zellpellet auf Eis aufgetaut und in 3 ml Lysis-Puffer (57 mM NaH₂PO₄ pH 8, 294 mM NaCl, 10 mM Imidazol) resuspendiert. Es wurden 3 mg Lysozym zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde 6x 10s sonifiziert mit zwischenzeitlicher Abkühlung der Flüssigkeit auf Eis. Es wurde bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand für eine Aufreinigung mit Ni-NTA Agarose (Life Technologies GmbH, Darmstadt) benutzt.

2.21.3 Proteinaufreinigung und Durchführung des SAAB-Assays

100 µl Ni-NTA Agarose wurden mit 1,5 ml Lysat in einem 2 ml Eppendorffgefäß unter langsamer Drehung des Gefäßes bei 4°C für etwa 1 h gemischt, dann abzentrifugiert, und die Ni-NTA-beads mit Waschpuffer (57 mM NaH₂PO₄ pH 8, 294 mM NaCl, 20 mM Imidazol) 4x gewaschen. Danach wurde das Protein mit Elutionspuffer (57 mM NaH₂PO₄ pH 8, 294 mM NaCl, 250 mM Imidazol) eluiert.

T7 beads wurden bei 4°C in Bindungspuffer (BB; 10mM Tris-HCl pH 7.5 100 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM DTT, 6% Glycerol, 1% Triton X-100) für 1 h inkubiert, zweimal in BB gewaschen und dann mit dem Eluat aus der Ni-NTA Agarose-Aufreinigung für 5 h bei 4°C gemischt. Es wurde viermal mit BB gewaschen und die Ni-NTA Agarose in einem Volumen von 700 µl BB aufgenommen. Diese Lösung wurde zu je 100 µl auf 7 Eppendorffgefäße verteilt.

Eines der Gefäße wurde abzentrifugiert, der Überstand entfernt und die Beads in 100 µl SAAB Bindungspuffer (SBB; 10mM Tris-HCl pH 7.5, 14µg/100ul of Poly dI-dC, 75 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM DTT, 6% Glycerol, 1% BSA, 1% Nonideet P-40) resuspendiert. Nach 30 min Inkubation bei 4°C wurden 20 pmol doppelsträngiger SAAB-Oligonukleotide zugefügt und über Nacht bei 4°C inkubiert. SAAB-Oligonukleotide bestehen aus zwei Primer-Bindungsstellen, die eine 25 bp Zufallssequenz flankieren (GAGAGGATCCAGTCAGCATG(N)₂₅CTCAGCCTCGAGTCGACGCGC).

Die Ni-NTA Agarose wurde dann viermal in Waschpuffer mit BSA (WBB; 15 mM Tris-HCl pH7.5, 75 mM NaCl, 0.15% Triton X-100, 1% BSA), dann zweimal mit Waschpuffer (WB; 15 mM Tris-HCl pH7.5, 75 mM NaCl, 0.15% Triton X-100) gewaschen. Danach wurde die DNA durch Kochen in 50 µl WB vom Protein gelöst, zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Gefäß überführt. 10 µl wurden für eine PCR mit der Phusion Polymerase (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte) verwendet. Die PCRs bestanden aus 15 Zyklen.

5µl des PCR-Produkts wurden für eine gleichartige Behandlung mit den Proteinbindenden T7 *Beads* des nächsten Gefäßes benutzt. Diese Schritte wurden insgesamt 6x wiederholt. Das PCR-Produkt des letzten Schrittes wurde mit dem CloneJet PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte) in den Vektor pJET1.2 kloniert, in *E. coli* transformiert, aus einzelnen Kolonien aufgereinigt und sequenziert.

2.22 Pflanzenanzucht und Behandlung für Überlebensexperimente

2.22.1 Überleben nach Keimung und Wachstum in Dunkelheit

Samen wurden auf ½ MS-Medium (1,5% Agar) ausgelegt und 3d bei 4°C inkubiert. Für die Induktion der Keimung wurden die Agarplatten dann für 6 h belichtet und anschließend bei 23°C für 8 d bzw. 10 d in Dunkelheit gehalten. Die Platten wurden dann in eine Langtagkammer mit 16 h Licht ($100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) / 8 h Dunkelheit überführt und im Verlauf der nächsten Tage das Ergrünen beobachtet.

2.22.2 Überleben 7 d alter Keimlinge in Dunkelheit

Samen wurden auf ½ MS-Medium (1,5% Agar) ausgelegt, für 3d bei 4°C inkubiert und dann in einer Langtagkammer mit 16 h Licht ($100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) / 8 h Dunkelheit für 7 d angezogen. Nachfolgend wurden sie für 9d bzw. 10 d in Dunkelheit gehalten, wieder in die Langtagkammer überführt und nach einigen Tagen das Überleben beurteilt.

2.22.3 Überleben von Überflutung

Die Überflutungs- und dazugehörigen Experimente in Dunkelheit an der Luft wurden nach Vashisht et al. (2011) durchgeführt. Hierbei wurden Pflanzen bei 9 h Licht ($200 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) / 16 h Dunkelheit auf Erde angezogen. Im 10-Blatt Stadium (etwa 4 Wochen alt) wurden pro Genotyp, Behandlung und Zeitpunkt 10 Pflanzen der entsprechenden Behandlung unterzogen, die 2 h nach Beginn eines Lichtzyklus startete. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Pflanzen der Stressbehandlung entzogen und für 2 Wochen zur Erholung in eine Lichtkammer (9h Licht/ 16h Dunkelheit) mit 70% Luftfeuchtigkeit gestellt. Überflutung unter Lichtzyklen fand ebenfalls bei 9 h Licht ($200 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) / 16 h Dunkelheit statt.

2.23 Messung von Stärke und Zuckergehalten

2.23.1 Pflanzenanzucht und Behandlung

Samen wurden für mindestens 3 Tage bei 4°C in Wasser inkubiert. Mehrere Samen pro Genotyp wurden in den gleichen Topf (6 cm hoch, ca. 5 cm lang und breit) mit pasteurisierter Erde gesetzt, die Erde war mit einem feinmaschigen Netz überspannt, um bei einem späteren Eintauchen des Topfes in Wasser ein Aufwühlen der Erde zu verhindern. Nach einer Woche wurden spät gekeimte bzw. kleine Keimlinge entfernt, so dass nur noch eine Pflanze pro Topf übrig blieb. Die Pflanzen wurden insgesamt 5 Wochen bei 23°C in einer Kurztagkammer mit

8 h Licht ($80 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) /16 h Dunkelheit angezogen. Das direkte Aussähen von Samen auf Erde verhinderte eine frühzeitige Blütenbildung des Ws Ökotyps. Für die Überflutungsbehandlung wurden drei Pflanzen pro Genotyp und Zeitpunkt in die gleiche Kiste (40 cm lang x 31 cm breit) mit an die Raumtemperatur angepasstem Wasser gesetzt. Glaskugeln wurden als Gewichte verwendet, um die Töpfe sinken zu lassen. Jeweils nach 8h und 24 h wurden Rosettenblätter am Übergang von Petiole zu Blattspreite abgeschnitten. Die zwei ältesten und sehr kleine, junge Blätter wurden nicht verwendet. Für jede Pflanze wurden separate Proben gesammelt, das Frischgewicht gemessen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Vor der Gewichtsmessung und dem Einfrieren wurden die Blätter überfluteter Pflanzen mit Zellstoff vorsichtig abgetupft. Die Vergleichs-Pflanzen der Dunkel+Luft Behandlung wurden zusammen mit den überfluteten Pflanzen angezogen und zur gleichen Zeit der Stressbehandlung unterzogen.

Für die Anoxie Behandlungen wurden zwei Pflanzen pro Genotyp in einen Exsikkator gestellt, in den kontinuierlich Stickstoffgas gepumpt wurde, das den Exsikkator unter positivem Druck wieder verließ und dadurch die Luft verdrängte.

Alle Experimente wurden dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

2.23.2 Messung von Stärke und Zuckergehalten

Die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Rosettenblätter wurden gemörsert und mit 0,5 ml 0,83 N Perchlorsäure gemischt. Nach einer Zentrifugation wurde der Überstand isoliert durch die Zugabe von 125 μl 1M Bicin und 75 μl 4M KOH neutralisiert. Es wurde wieder zentrifugiert und der Überstand für die Messung der löslichen Zucker verwendet.

Für die Messung der Stärkegehalte wurde das Pellet des ersten Zentrifugation zweimal mit 80% Ethanol gewaschen. 400 μl 0,2 M KOH wurden zugefügt, gevortext und für eine Stunde bei 95°C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand isoliert und mit 80 μl Essigsäure neutralisiert. 50 μl davon wurden mit 100 μl 50 mM Na-Acetat Puffer, pH 5 und 0,5 U Amyloglukosidase bei 55°C über Nacht inkubiert.

Die Zucker wurden mit einem Photometer bei 340 nm basierend auf einer Umwandlung von NAD zu NADH durch die Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH) gemessen. Dazu wurden 50 μl des jeweiligen Extraktes mit 800 μl 0.1 M Imidazol Puffer pH 6,9 gemischt, der 5 mM MgCl_2 , 1 mM ATP, 0,5 mM NAD und 1 U G6PDH enthielt. Nachdem sich die Absorption bei 340 nm stabilisiert hatte wurden in nachfolgenden Schritten, jeweils bis zum Ende der Absorptionsänderung 0,5 U Hexokinase, 0,5 U Phosphoglukose Isomerase and 60 U Invertase zugegeben, um Glukose, Fruktose und Saccharosegehalte zu messen.

3 Ergebnisse

3.1 Die Rolle des *N-end rule pathway* bei der Anpassung an Hypoxie

3.1.1 Die EMS-Mutante *ged1* weist eine differentielle Expression Hypoxie-responsiver Gene auf und besitzt ein nicht-funktionelles *PRT6* Gen

Die EMS-Mutante *ged1* (*greening after extended darkness 1*) wurde bei einer Durchsichtung der *genevestigator*-Datenbank (Hruz et al. 2008) nach *Microarray*-Daten mit einer differentiellen Expression Hypoxie-responsiver Gene entdeckt. Mustroph et al. (2009) hatten zuvor von einer überlappenden Expression einer Gruppe von 49 Genen bei Hypoxie in 17 verschiedenen *Arabidopsis*-Zelltypen berichtet. Der *Microarray* von *ged1* zeigte eine Hochregulation von 36 dieser 49 Gene unter Normoxie, zusammen mit einer Herunterregulation vieler Abscisinsäure (ABA)-responsiver Gene (Choy et al. 2008, Abb.3). Vergleichsweise sind von 540 mehr als zweifach herunter regulierten Genen in *ged1* etwa die Hälfte in mindestens einem von drei ABA-Behandlungs-*Microarrays* mehr als 2-fach hoch reguliert, jeweils mit einem *adjusted. P-Value* < 0.05 (Nishimura et al. 2007, Goda et al. 2008, Kim et al. 2011, Choy et al. 2008, Abb.3B). Eine vergleichsweise starke Überlappung, die viele der am stärksten hoch bzw. herunter regulierten Gene umfasst, findet mit dem *Microarray* von Nishimura et al. (2007) statt, in dem Col-0 Pflanzen, beginnend als Samen, für 2 d auf 0.5 μ M ABA in 16 stündigen Lichtzyklen wuchsen. Bei den dargestellten Daten der beiden anderen *Microarrays* handelt es sich um eine 3 h bzw. 6 h andauernde Behandlung von Keimlingen mit 10 μ M ABA (Abb.3B).

Da zu jener Zeit noch kein Regulationsmechanismus für die differentielle Genexpression bei Hypoxie bekannt war, wurde beschlossen die für diesen Phänotyp verantwortliche Mutation zu identifizieren, da dies von Choy et al. (2008) nicht weiter verfolgt wurde. Der *Microarray* von *ged1* war nach 5 d Dunkelheit gefolgt von 2 d Licht mit insgesamt 7 d alten Keimlingen durchgeführt worden, die auf festem Murashige & Skoog (MS) Medium gewachsen waren. Die Expression der Hypoxie-responsiven Gene wurde in 7 Tage alten Keimlingen, die unter Standardbedingungen (16 h Licht/ 8 h Dunkelheit) herangewachsen waren durch eine semiquantitative RT-PCR bestätigt (Abb.4A).

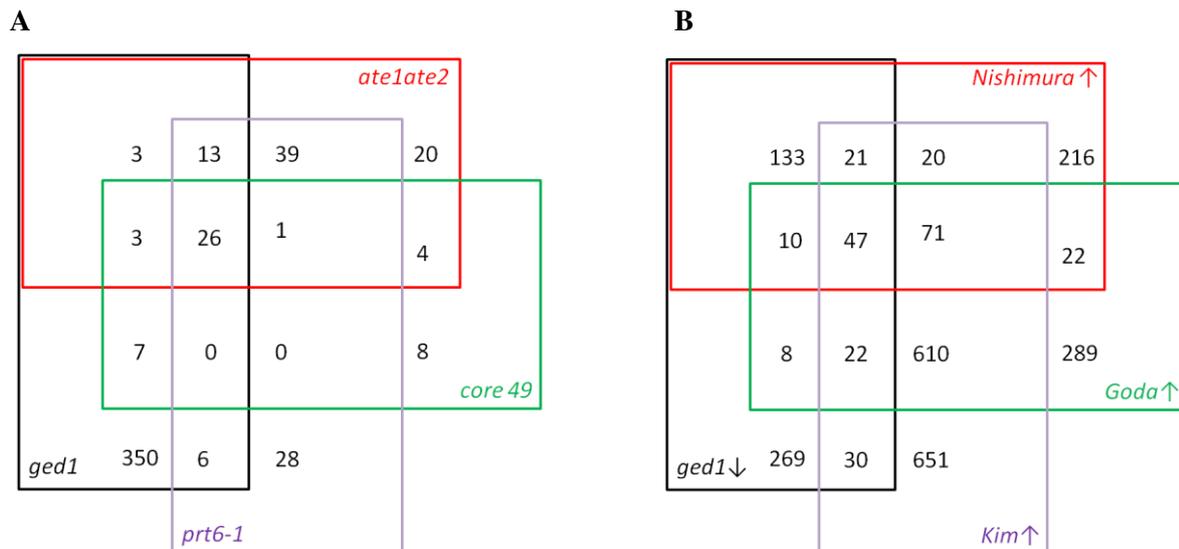


Abb.3: Vergleich von *Microarray*-Daten. **A)** Hoch regulierte Transkripte mit einem SLR (*signal-log-ratio*) > 1 und *adjusted P-Value* < 0.05 in *Microarrays* von *prt6-1*, *ate1ate2* (7 d alte Keimlinge ohne Stressbehandlung) und *ged1* (5 d Dunkelheit gefolgt von 2 d Belichtung) im Vergleich zu den *core 49* Hypoxie-responsiven Genen (7 d alte Anoxie-behandelte Keimlinge, Mustroph et al. 2009). **B)** Vergleich von herunterregulierten Genen im *ged1 Microarray* mit hochregulierten Genen in drei verschiedenen *Microarrays* von ABA-behandelten Keimlingen (SLR > 1 bzw. <1, *adj. P-Value* < 0,05) (Nishimura et al. 2007, Kim et al. 2011, Goda et al. 2008).

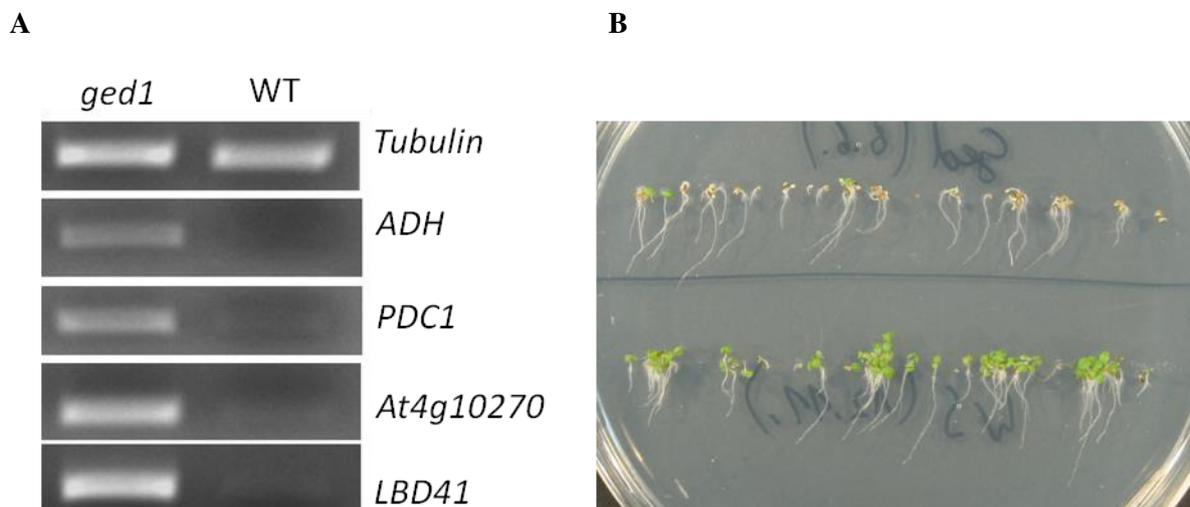


Abb. 4: Phänotypen von *ged1*. **A)** Bestätigung der differentiellen Transkriptakkumulation Hypoxie-responsiver Gene in *ged1* durch eine semiquantitative RT-PCR 7 d alter Keimlinge. **B)** Keimlingsetablierung von *ged1* (oben) und *Ws* (unten) nach Wachstum für 7 d auf 0.1 μ M ABA enthaltendem MS-Medium.

Für die Kartierung der Mutation wurde eine Kreuzung zwischen *ged1* und *Col-0* hergestellt. Die Selektion von Individuen in der F2 Generation basierte auf dem ABA-

Sensitivitätsphänotyp von *ged1*: Bei Wachstum auf 0.1 μ M ABA enthaltendem MS-Medium ergrünen die Kotyledonen von *ged1* nicht (Abb.4B). Dieser Phänotyp ist abhängig vom Alter der Samen und nach einigen Monaten Lagerung abgeschwächt (Daten nicht gezeigt). Nach 7 Tagen Wachstum auf ABA-haltigem Medium wurden die selektierten Keimlinge auf Erde überführt und so gerettet.

Eine grobe Kartierung mit 26 Markern, verteilt in Abständen von etwa 5 Millionen Basenpaaren (bp) über alle fünf Chromosome, gefolgt von einer Feinkartierung, führte zu der Entdeckung von zwei co-segregierenden Regionen, jeweils auf den Chromosomen 3 (zwischen 2.8 Millionen und 3.3 Millionen bp) und 5 (zwischen 1 und 2.7 Millionen bp). Trotz einer Kartierungspopulation von etwa 1000 Pflanzen konnte niemals eine Rekombination in den ersten 2.7 Millionen bp von Chr.5 gefunden werden.

Alle F2 Pflanzen, die erwiesenermaßen einen nicht segregierenden ABA-sensitiven Phänotyp in der nächsten Generation zeigten waren homozygot für den *ged1*-Genotyp in der kartierten Region auf Chr. 5. Davon war keine Pflanze homozygot für Col-0 in der anderen kartierten Region auf Chromosom 3, aber etwa 20% der Pflanzen heterozygot.

Es wurde eine Genotypanalyse der F3-Generation dieser heterozygoten Pflanzen durchgeführt bezüglich der Aufspaltung des Genotyps in der kartierten Region auf Chr.3. Dies resultierte aber nicht in dem Auffinden von Pflanzen mit dem Genotyp homozygot Col-0; die meisten Individuen waren homozygot *ged1* und nur verhältnismäßig wenige heterozygot (Abb.5).

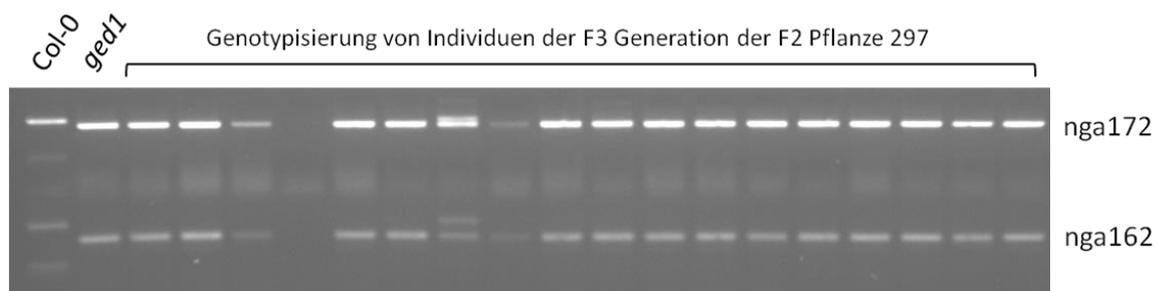


Abb.5: Repräsentatives Beispiel der Aufspaltung des Genotyps in der F3 Generation. Die F2 Pflanze 297 ist unter der Verwendung der hier dargestellten SSLP-Marker als heterozygot (Chr.3) genotypisiert worden und in der kartierten Region auf Chr.5 homozygot *Ws* (*ged1*). Die hier dargestellte Genotypisierung von 16 Individuen der F3 Generation führte nur zur Detektion eines einzigen heterozygoten Individuums, keines ist homozygot Col-0.

Daraufhin wurde die Genotypenverteilung zwischen Chr. 3 und 5 in 89 zufällig ausgewählten, also nicht auf ABA selektierten Individuen der F2-Generation untersucht. Es wurde dafür

jeweils ein repräsentativer Marker für beide kartierten Regionen verwendet (3367348_bp für Chr.3 und NGA158 für Chr.5).

Kein Individuum wies die Genotypenkombination homozygot Ws (*ged1*) zusammen mit homozygot Col-0 auf. Des Weiteren waren alle möglichen Genotypenkombinationen heterozygot/homozygot weniger häufig und Homozygotie für den gleichen Ökotyp auf beiden Chromosomen häufiger als bei einer zufälligen Genotypenverteilung zu erwarten wäre (Abb.6). Beispielsweise waren etwa 16% der Pflanzen homozygot Ws auf beiden Chromosomen, während nur 1% der Pflanzen heterozygot auf Chromosom 3 und homozygot Ws auf Chromosom 5 waren. Das passt in etwa zu einer Auszählung des ABA-sensitiven Anteils der F2-Pflanzen von 16.4%.

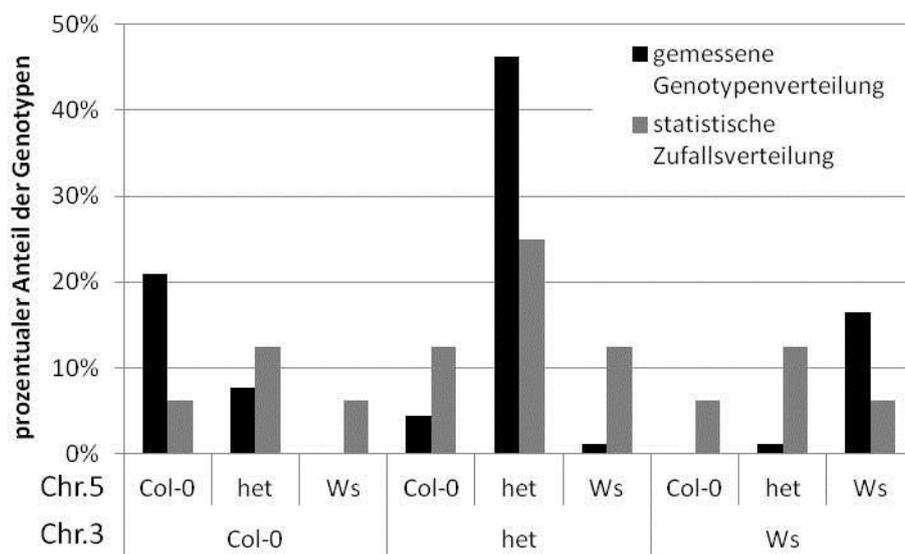


Abb.6: Individuelle Genotypenkombinationen zwischen den Chromosomen 3 und 5 der F2 Generation einer Kreuzung zwischen Col-0 und *ged1*. 89 zufällig ausgewählte Pflanzen wurden mit je einem repräsentativen in den co-segregierenden Regionen liegenden Marker pro Chromosom genotypisiert. Der prozentuale Anteil der Genotypenkombinationen ist im Vergleich zu einer Zufallsverteilung dargestellt. het = heterozygot.

Aufgrund der geringen Rekombinationsrate auf Chr.5 wurde die für den ABA-sensitiven Phänotyp verantwortliche Mutation erst nach dem Erscheinen zweier Publikationen über den Zusammenhang zwischen *N-end-rule pathway* und Sauerstoffwahrnehmung gefunden (Licausi et al. 2011, Gibbs et al. 2011). *Microarray*-Daten von *prt6-1* und *atellate2*, zwei Knockout-Mutanten von essentiellen Enzymen des sauerstoffabhängigen Proteinabbaus über den *N-end-rule-pathway*, zeigten Ähnlichkeiten zu denen von *ged1* in Bezug auf die differentielle Expression Hypoxie-responsiver Gene. 26 der von Mustroph et al. (2009) beschriebenen 49 in verschiedenen Zelltypen bei Hypoxie exprimierten Genen (*core 49*) sind

in allen drei *Microarrays* bei Normoxie hochreguliert. Insgesamt sind 41 der *core* 49 in mindestens einem *Microarray* der *N-end-rule pathway* Mutanten (SLR > 1, adj.P-Value < 0.05) hochreguliert (Abb.3A). Außerdem weisen *prt6-1* und *ate1ate2* ähnlich wie *ged1* eine ABA-hypersensitive Keimung und Keimlingsetablierung auf (Holman et al. 2009) und die entsprechenden Gene liegen zusätzlich in der Nähe bzw. innerhalb der kartierten Regionen auf Chr.3 (*ATE2*) und 5 (*PRT6*, *ATE1*). Es wurden daraufhin Kreuzungen zwischen *ged1* und *prt6* (*ged1xprt6*) und zwischen *ged1* und *ate1ate2* hergestellt (*ged1ate1ate2*). Die F1-Generation von *ged1prt6*, aber nicht *ged1ate1ate2* zeigte ein ABA-sensitives Anhalten Keimlingsetablierung auf 0.1 µM ABA haltigem Medium (Abb.7B). Demzufolge ist ein nicht funktionelles *PRT6* Gen für den ABA-sensitiven Phänotyp verantwortlich.

Bei dem Versuch der Sequenzierung des *PRT6* Allels von *ged1* konnte kein PCR-Produkt mit Primerpaaren hergestellt werden, die einen bestimmten Bereich des Gens flankierten. Ausgehend von beiden Seiten dieses Bereichs wurden daher Tail-PCRs durchgeführt (Anhang: Abb.40/41). Demzufolge geht etwa die erste Hälfte der genomischen DNA-Sequenz von *PRT6* (At5g02310) direkt in die DNA-Sequenz der zweiten Hälfte von *MYB3R3* (At3g09370) über, während von der umgekehrten Seite die zweite Hälfte von *PRT6* direkt in die DNA-Sequenz der ersten Hälfte von *MYB3R3* übergeht (Abb.7A). *PRT6* liegt innerhalb der kartierten Region auf Chromosom 5 und *MYB3R3* liegt innerhalb der kartierten Region auf Chromosom 3; es ist also davon auszugehen, dass ein DNA-Austausch zwischen den beiden Chromosomen stattgefunden hat, der zu einem nicht-funktionellen *PRT6* und vermutlich auch *MYB3R3* Gen geführt hat.

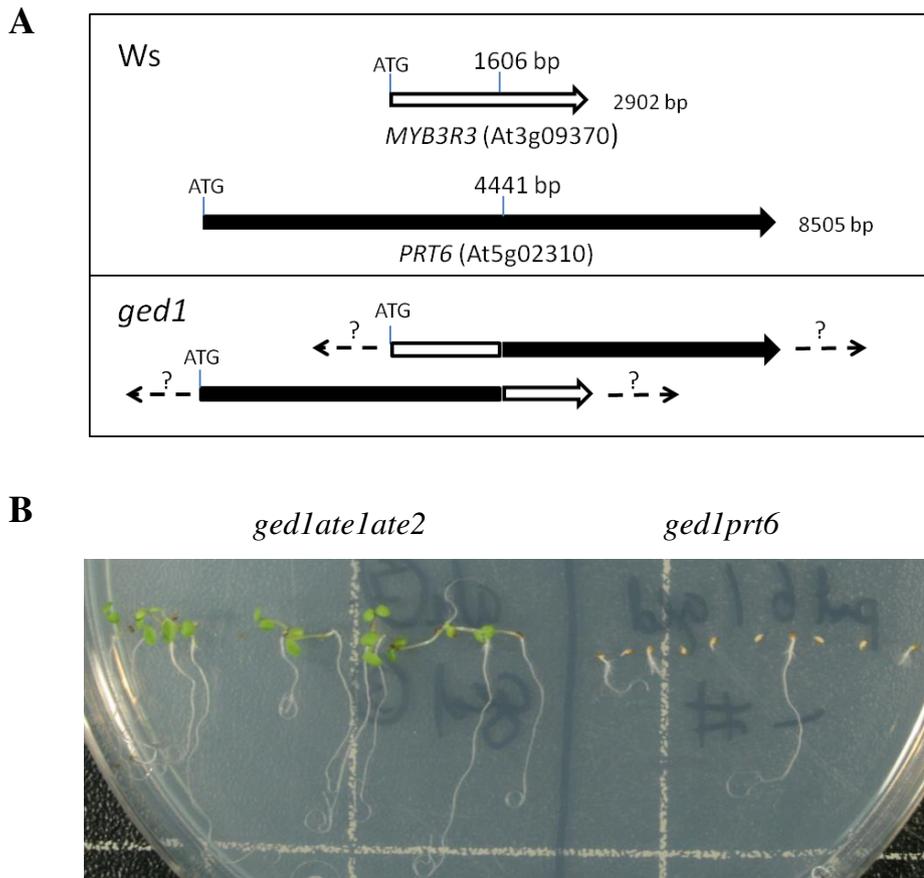


Abb.7: Ein nicht-funktionelles *PRT6* Gen ist verantwortlich für die ABA-sensitive Keimlingsetablierung von *ged1*. **A)** symbolische Darstellung von *MYB3R3* und *PRT6* mit Angabe der Länge der genomischen DNA-Sequenz und der Position des DNA-Austausches in *ged1*. **B)** Die F1-Generation einer Kreuzung zwischen *ged1* und *ate1ate2* bzw. *ged1* und *prt6* nach Wachstum für 7 d auf 0.1 μM ABA enthaltendem MS-Medium.

Drei Herangehensweisen wurden verfolgt, um das Ausmaß des DNA-Austausches einzugrenzen:

- 1) Es wurden PCRs durchgeführt mit Primern, die etwa 2000 bp lange, überlappende PCR-Produkte herstellen, um einen möglichen zweiten Punkt des DNA-Austausches zu finden. Damit wurden neben den betroffenen Genen mindestens 4000 bp stromaufwärts und stromabwärts beider Gene abgedeckt und jeweils immer ein PCR-Produkt der erwarteten Größe erhalten (Daten nicht gezeigt).
- 2) Aus der F2-Generation von *ged1*×*Col-0* wurden diejenigen Individuen herausgesucht, die den ABA-Phänotyp zeigten und damit homozygot *ged1* auf Chromosom 5 waren, aber eine Rekombination nahe der kartierten Region auf Chr.3 aufwiesen (heterozygot/homozygot *ged1*). Alle Pflanzen, die homozygot *ged1* innerhalb der Position 2.8 Millionen bp und 3.3 Millionen bp auf Chr.3, aber heterozygot außerhalb waren, wiesen eine normale Schotengröße

und Samenanzahl sowie eine normale Segregation in der F3-Generation auf, d.h. es wurden Individuen gefunden, die in den Bereichen, die in der F2-Generation heterozygot waren, homozygot Col-0 sind (Abb.8). Diejenigen Pflanzen der F2-Generation, die heterozygot innerhalb des kartierten Bereiches waren, entwickelten kleine Schoten mit wenigen Samen und zeigten in der F3-Generation keine normale Segregation des Genotyps, d.h. kein Individuum war homozygot Col-0 (vergl. Abb.5). Es handelte sich bei diesen Versuchen um eine Analyse von über 20 Pflanzen, die eine derartige Rekombination mit dem beschriebenen Phänotyp aufwiesen.

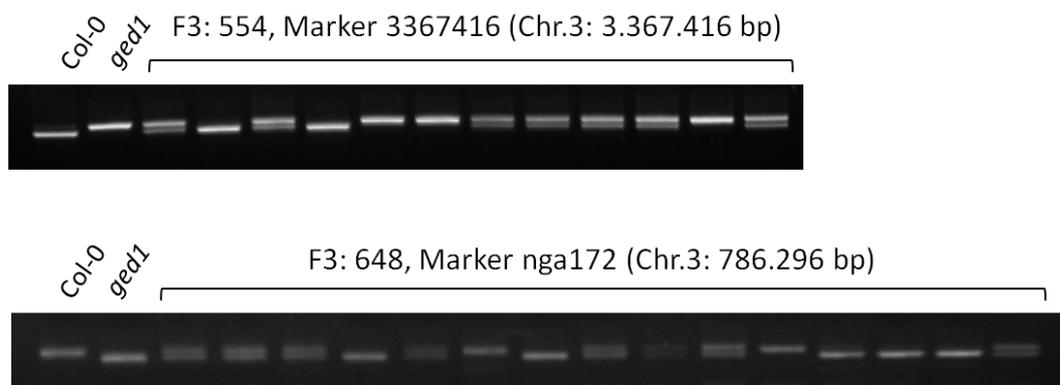


Abb.8: Repräsentatives Beispiel der Aufspaltung des Genotyps in der F3 Generation. Die F2 Pflanzen 554 und 648 wurden als homozygot *ged1* in der kartierten Region auf Chr.5 genotypisiert und zeigen eine Rekombination auf Chr.3, sind aber in der Umgebung von *MYB3R3* homozygot *ged1*. 554 ist stromabwärts der Position Chr.3: 3367416 bp heterozygot, 648 ist stromaufwärts der Position Chr.3: 1512231 bp heterozygot (*MYB3R3* liegt dazwischen). Beide zeigen eine normale Aufspaltung des Genotyps in diesen heterozygoten Bereichen.

3) Es wurden die verhältnismäßig seltenen Pflanzen der F2-Generation von *ged1* × Col-0 verwendet, die die Genotypenkombination homozygot Col-0 auf Chr.3 und heterozygot auf Chr.5 aufwiesen (und umgekehrt) und näher genotypisiert. Für den beschriebenen Genotypenscreen (Abb.6) waren zwei repräsentative Marker verwendet worden, die jeweils stromabwärts von *MYB3R3* und *PRT6* liegen (d.h. weiter unten auf einer Chromosomenkarte). Wie bei einem Austausch von Chromosomenteilen zu erwarten ist, zeigen Marker, die unmittelbar stromaufwärts und stromabwärts des DNA-Austauschpunktes der betroffenen Gene liegen eine plötzliche Änderung des Genotyps, ein Beispiel dafür ist in Abb. 10 dargestellt. Ein zweiter plötzlicher Wechsel des Genotyps sollte dann theoretisch einen zweiten Punkt des DNA-Austausches anzeigen. Eine symbolische Darstellung der unter Punkt 3) beschriebenen Herangehensweise ist in Abb.9 gegeben. Eine Genotypisierung von 5 Pflanzen mit den beschriebenen Genotypen ist in Tab.1 angegeben.

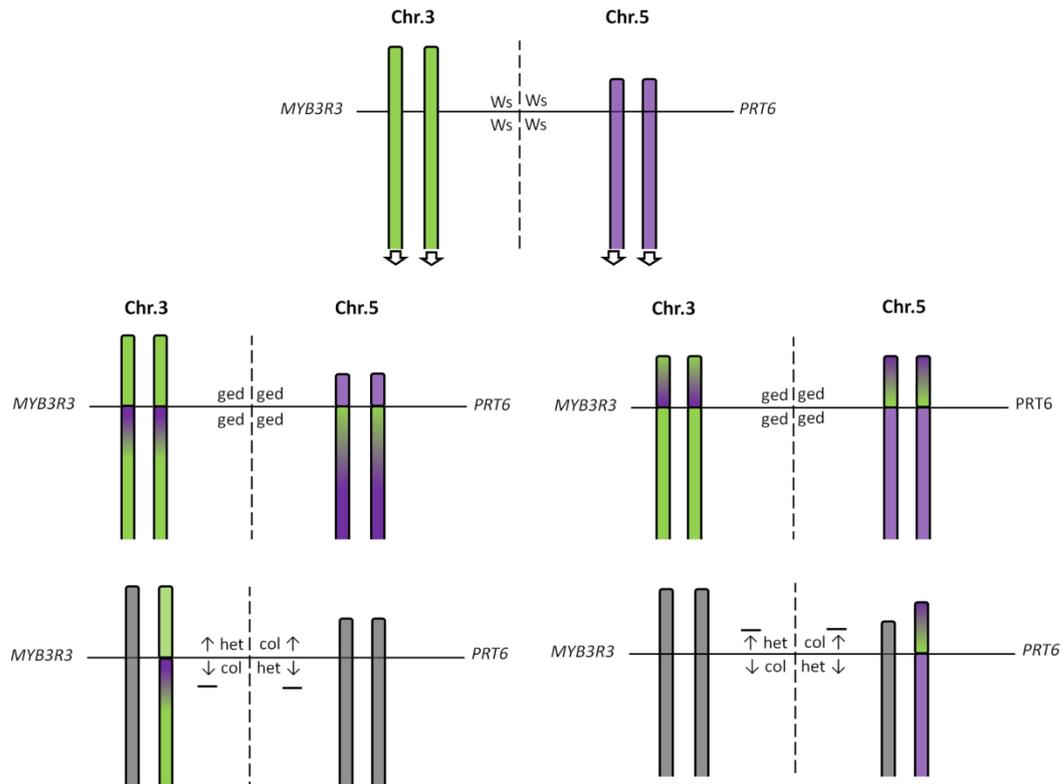


Abb.9: Symbolische Darstellung von zwei Möglichkeiten der DNA-Lokalisation bei den angegebenen Genotypenkombinationen in der F2-Generation einer Kreuzung zwischen Col-0 und *ged1*. Grüne bzw. lila Balken stellen die homologen Chromosomen von Chr.3 bzw. Chr.5 in *Ws* dar, graue Balken symbolisieren Col-0 Chromosomen. Die horizontale Linie schneidet die Gene *PRT6* und *MYB3R3* auf den jeweiligen Chromosomen, die Darstellung ist nicht maßstabsgetreu.

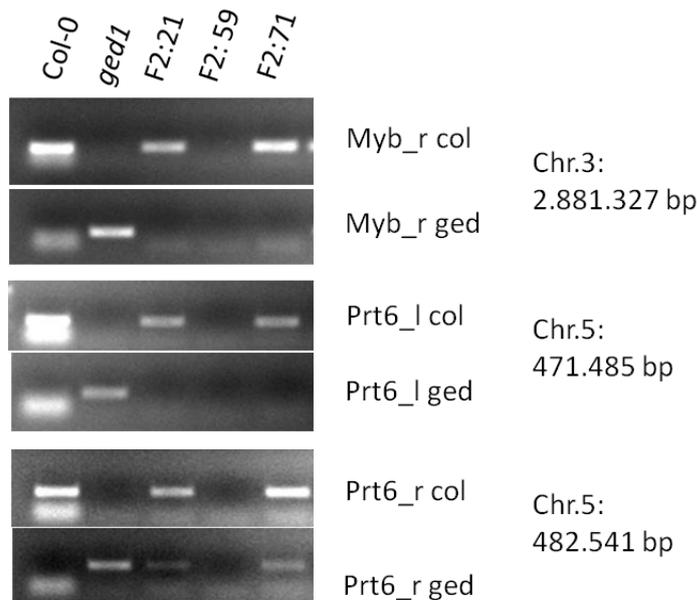


Abb.10: Anwendung von Genotypisierungsmarkern in Nähe der Verschmelzung von *PRT6* und *MYB3R3* (an der Position Chr.5: 478.721 bp bzw. Chr.3: 2.880.972 bp). Auf der rechten Seite ist der Name der verwendeten *Mismatch*-Primer und die ungefähre Position des Polymorphismus angegeben.

Tab.1: Kartierung interessanter Genotypen der F2 Generation einer Kreuzung zwischen Col-0 und *ged1*.

	Chr.3:					
Position →	786.296 bp	2124195 bp	2.848.709 bp	2956918 bp	3.367.416 bp	9.774.308 bp
Primer →	nga172	2124195	ds14	2956918	3367416	ciw11
F2-Pflanze ↓						
18	col		col		het	col
38	het		het		col	col
45	het		het		col	col
61	het		het		col	het
71	het		het		col	col
297	het				het	
554	ged	ged		ged	het	
648	het	ged		ged	ged	

	Chr.5:			
Position →	514 bp	148.106 bp	1.698.613 bp	8.428.133 bp
Primer →	Chr5_anfang	145_kb	nga158	nga139
F2-Pflanze ↓				
18			col	col
38			het	ged
45			het	het
61	col	col	het	ged
71	col	col	het	het
297			ged	
554			ged	
648			ged	

Eine Kombination der drei Herangehensweisen führte letztendlich innerhalb eines gewissen Zeitrahmens nicht zum Auffinden eines zweiten DNA-Austauschpunktes und wurde aufgrund einer Kosten/Nutzen-Abwägung abgebrochen.

Es waren außerdem die *Ws* und *ged1* Allele von *ATE1* (At5g05700) und *ATE2* (At3g11240) sequenziert worden. Dabei stellte sich heraus, dass *Ws* und *ged1* eine Nukleotidinsertion in *ATE2* aufweisen, die zu einer Verschiebung des Leserasters und einem frühen Stoppcodon führt (Abb.42/43).

Die Auszählung von Pflanzen mit einem ABA-sensitiven Phänotyp in der F2-Generation einer Kreuzung zwischen *Ws* und *ate1ate2* ergab eine Sensitivität von 25 von 90 Pflanzen,

also in etwa eine 1:3 Segregation. Dies bestätigt, dass ATE2 im Ws Ökotyp im Vergleich zu Col-0 nicht funktionell ist.

Vergleichsweise waren in der F2-Generation von *gedlateate2* 41.6% von 84 Pflanzen ABA-Sensitiv. Dies stimmt in etwa den Ergebnissen der Analyse der Genotypenkombinationen der F2-Generation von *ged1xCol-0* überein (Abb.6), nämlich den 17% der Pflanzen, die homozygot *ged1* auf Chromosom 5 waren plus den 25% der Pflanzen, die homozygot Col-0 (*ate1ate2*) auf Chromosom 5 waren (bei diesen Genotypen wäre bei *ged1xate1ate2* der ABA-sensitive Phänotyp zu erwarten).

3.1.2 Überprüfung von Microarray-Ergebnissen

Die *Microarray*-Daten von *prt6-1* und *ate1ate2* sind denen von *ged1* in Bezug auf einige hochregulierte Hypoxie-responsive Gene ähnlich (Abb.3A), unterscheiden sich aber in Bezug auf herunterregulierte Gene, die im *ged1 Microarray* viele ABA-responsive Gene umfassen (Abb.3B). Es wurde daher untersucht, ob die Herunterregulation dieser Gene auf die Behandlungsbedingungen der für den *ged1 Microarray* verwendeten Keimlinge zurückzuführen ist (5d Dunkelheit gefolgt von 2 d Licht). Mit einer semiquantitativen RT-PCR wurde das Transkriptlevel ABA-responsiver Gene verglichen, die im *ged1 Microarray* stark herunterreguliert sind. Dazu zählen die Transkriptionsfaktoren ABI3, ABI4 und ABI5, die im *ged1 Microarray*, aber nicht in den *Microarrays* von *prt6-1* und *ate1ate2* signifikant herunterreguliert sind. Des Weiteren haben die ABA-responsiven Gene *LEA* (AT3G02480) und *RAB18* (AT5G66400) im *ged1 Microarray* sehr hohe negative SLR-Werte von -6,9 bzw. -6,8 während im *prt6-1 Microarray* nur *LEA* mit einem SLR-Wert von -1,4 signifikant herunterreguliert ist.

Diese starken Expressionsunterschiede im *ged1 Microarrays* konnten unter ähnlichen Wachstumsbedingungen nicht bestätigt werden: Bei der Transkriptmenge von *LEA* und *RAB18* sind nach 5 d Dunkelheit gefolgt von 2 d Licht (ohne Saccharosezugabe) zwar Unterschiede zwischen den Ökotypen erkennbar, aber in mehreren Wiederholungen der Experimente wurde im Vergleich zu den Wildtypen in *prt6-1* oder *ged1* niemals ein geringeres Transkriptlevel dieser Gene festgestellt (Abb.11). Seltsamerweise wurde ein höheres Transkriptlevel von *TSPO* in *prt6*-Mutanten unter der Bedingung 5 d Dunkelheit gefolgt von 2 d Licht festgestellt. Den *Microarray*-Daten zufolge gibt es keinen signifikanten Unterschied im Transkriptlevel von *TSPO*. Die Transkriptlevels von ABI3, ABI4 und ABI5 waren aufgrund der Notwendigkeit sehr hoher Zyklenzahlen für eine Messung mit semiquantitativer RT-PCR ungeeignet. Das hier verwendete Referenzgen Tubulin zeigte

schwächere Banden nach Dunkelheitsbehandlung ohne Saccharosezugabe und wird daher möglicherweise unter dieser Bedingung in geringeren Mengen transkribiert.

Bei diesen Experimenten muss berücksichtigt werden, dass die Behandlung der Keimlinge in dieser Arbeit aus technischen Gründen 5 d Dunkelheit gefolgt von 2 d Langtag war, während Choy et al. (2008) die Keimlinge einer kontinuierlichen Belichtung aussetzten.

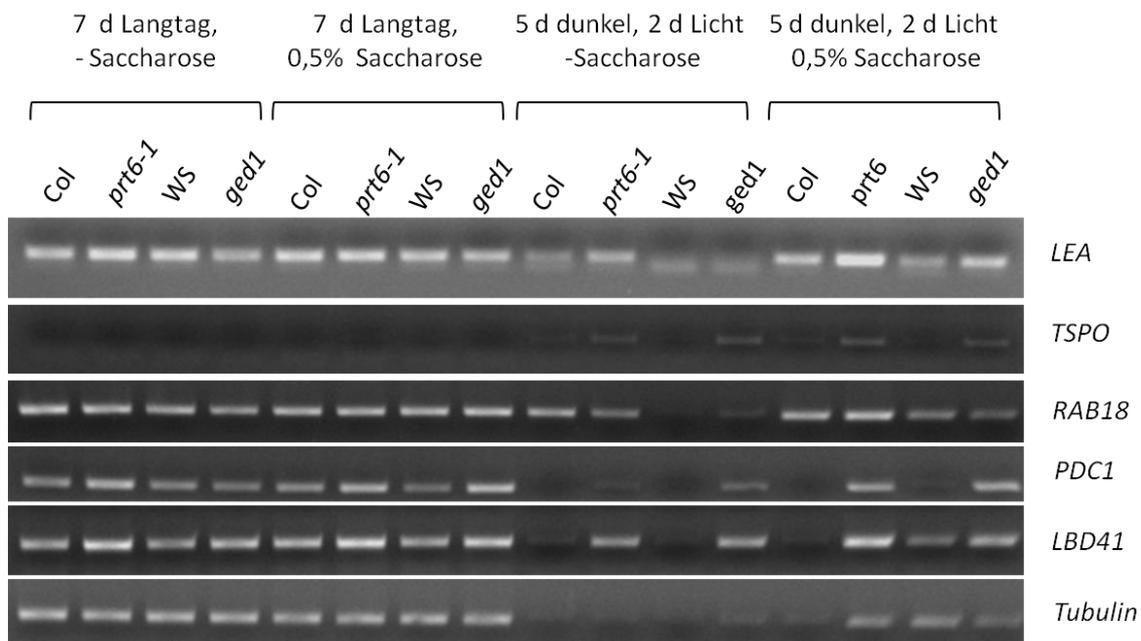


Abb.11: Unterschiede in der Transkriptakkumulation der ABA-responsiven Gene *LEA*, *TSPO* und *RAB18* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. Das Experiment wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

3.1.3 *prt6*-Mutanten sind tolerant gegen Überflutung

In der Literatur existieren widersprüchliche Ergebnisse zur Toleranz von *prt6*-Mutanten gegenüber Hypoxie-Stress.

Gibbs et al. (2011) behandelten 7 d alte Keimlinge von *prt6-1* und *ate1ate2*, zwei T-DNA Insertionslinien in einem Col-0 Hintergrund, mit einer Argonbegasung für 9 h bzw. 12 h. Das Ergebnis war eine höhere Toleranz der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.

Dagegen überfluteten Licausi et al. (2011) 5 Wochen alte Pflanzen für 3,5 d in Dunkelheit und benutzten die T-DNA Insertionslinie *prt6-6* in einem Ws Hintergrund, sowie die *ate1ate2* Mutante in einem Col-0 Hintergrund. Ihr Ergebnis zeigt im Widerspruch zu den Ergebnissen von Gibbs et al. (2011) eine Intoleranz der Mutanten (Ähnliche Ergebnisse zu denen von Licausi et al. (2011) mit einer *prt6*-Mutante in einem Col-0 Hintergrund wurden später auch von Weits et al. (2014) publiziert, siehe Diskussion und Tab.4).

Allerdings bestanden Unklarheiten in Bezug auf die Todesursache in den Experimenten von Licausi et al. (2011), da sich beispielsweise die Überlebensdauer des Col-0 Ökotyps in verschiedenen Publikationen stark unterscheidet. Während bei Licausi et al. (2011) bereits nach 3,5 d nur 70% der Pflanzen überleben, überstehen in einer Publikation von Vashisht et al. (2011) alle Col-0 Pflanzen eine fünf tägige Überflutungsbehandlung.

Es wurden in Utrecht in Kooperation mit Dr. Rashmi Sasidharan eigene Überflutungsexperimente mit *ged1*, *Ws*, *prt6-1* und Col-0 exakt wie von Vashisht et al. (2010) beschrieben durchgeführt (Abb.11, Tab.2): Auf Erde angezogene Pflanzen im 10-Blatt Stadium (etwa 4 Wochen alt) wurden in Dunkelheit an der Luft gelassen (Dunkel+Luft) oder komplett überflutet (Dunkel+Überflutung) und zu bestimmten Zeitpunkten je 10 Pflanzen pro Genotyp und Behandlung zur Erholung wieder in die ursprünglichen Wachstumskammern (mit 70% Luftfeuchtigkeit) zurückgestellt. Nach zwei Wochen der Erholung wurde das Überleben anhand des Aussehens der Pflanzen beurteilt. Zusätzlich wurden gleichartige Experimente mit Überflutung in 9 h/15 h Tag/Nacht Zyklen durchgeführt (Licht+Überflutung).

Ein Vergleich der Ökotypen zeigt, dass der *Ws* Ökotyp unter allen Behandlungsbedingungen toleranter war als Col-0 Ökotyp. Bei Dunkel+Luft ist ein großer Unterschied im Überleben zwischen Col-0 ($Lt_{50} = 9.15$) und *prt6-1* ($Lt_{50} = 11,28$ d) zu beobachten, aber nur ein geringfügiger Unterschied zwischen *Ws* ($Lt_{50} = 11,73$ d) und *ged1* ($Lt_{50} = 12,4$ d).

Im Vergleich von Dunkel+Luft zu Dunkel+Überflutung unterscheidet sich die Überlebenswahrscheinlichkeit des *Ws* Wildtyps kaum ($Lt_{50} = 11.76$ d), aber *ged1* zeigte einen etwa 2 d höheren Lt_{50} -Wert von 14,04 d bei Überflutung.

Im Gegensatz dazu überleben Col-0 und *prt6-1* Dunkel+Luft länger als Dunkel+Überflutung. *Prt6-1* überlebt mit einem Lt_{50} von 9.98 d Dunkel+Überflutung wesentlich länger als Col-0 ($Lt_{50} = 6.05$ d), aber nicht so lange wie der *Ws*-Ökotyp (Abb.11, Tab.2).

Auch bei Überflutung in Lichtzyklen sind beide *prt6*-Mutanten wesentlich toleranter als die Wildtypen. Der *Ws*-Wildtyp überlebt länger als Col-0, aber in diesem Fall nicht so lange wie *prt6-1*. Bei allen Stressbehandlungen weist *ged1* die höchsten Lt_{50} -Werte auf.

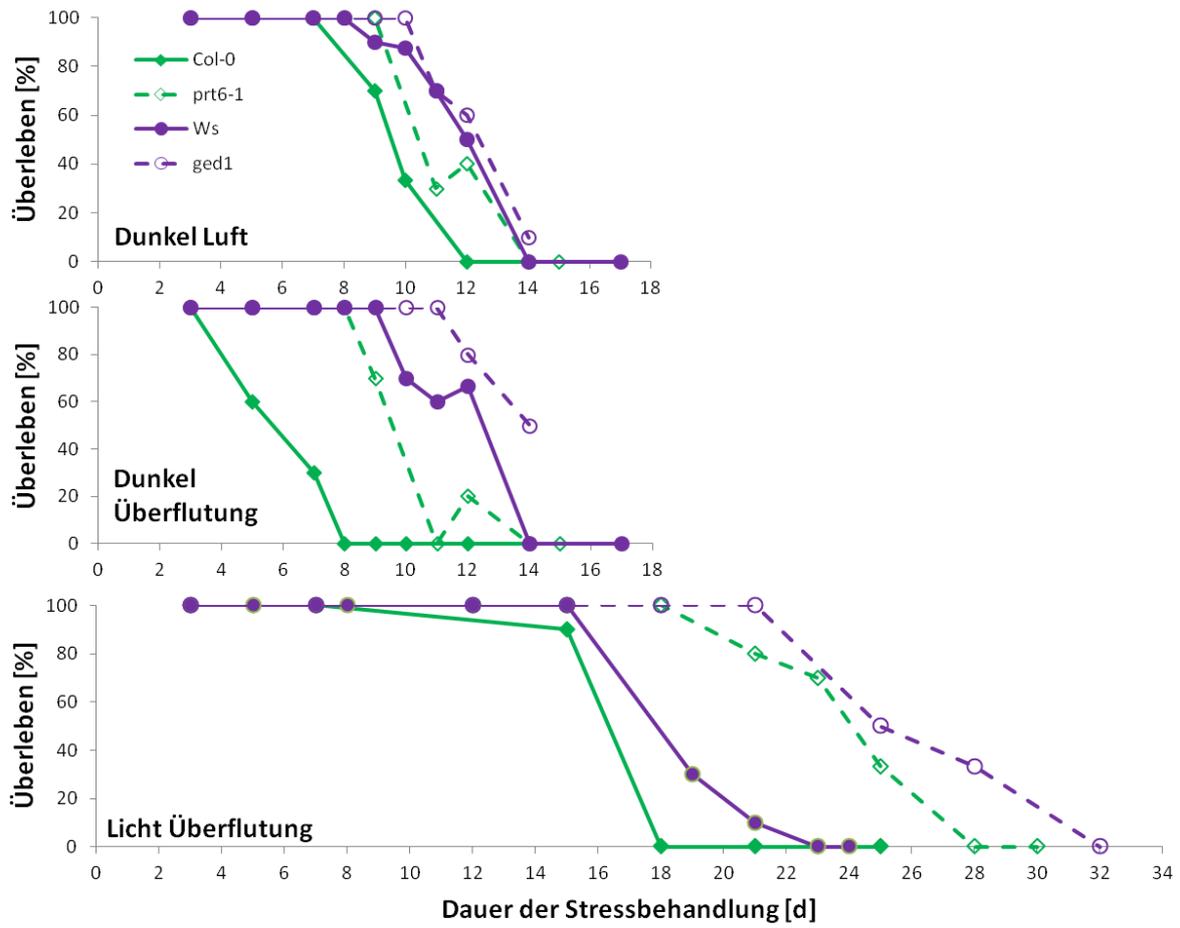


Abb.12: Überlebensexperimente mit den *prt6* KO-Mutanten *prt6-1* und *ged1*, sowie deren Wildtypen Col-0 und Ws. Auf Erde angezogene Pflanzen im 10-Blatt Stadium wurden 2 h nach Beginn eines Lichtzyklus mit Dunkelheit in der Luft (Dunkel Luft), Dunkelheit bei kompletter Überflutung (Dunkel Überflutung) oder Überflutung in 9h/15h Tag/Nacht Zyklen (Licht Überflutung) behandelt. Zu den angezeigten Zeitpunkten wurden je 10 Pflanzen pro Genotyp zur Erholung für 2 Wochen in eine Lichtkammer mit 70% Luftfeuchtigkeit gestellt und dann das Überleben beurteilt.

Tab.2: Lt_{50} Werte der Überlebensexperimente in [d] mit Standardfehler.

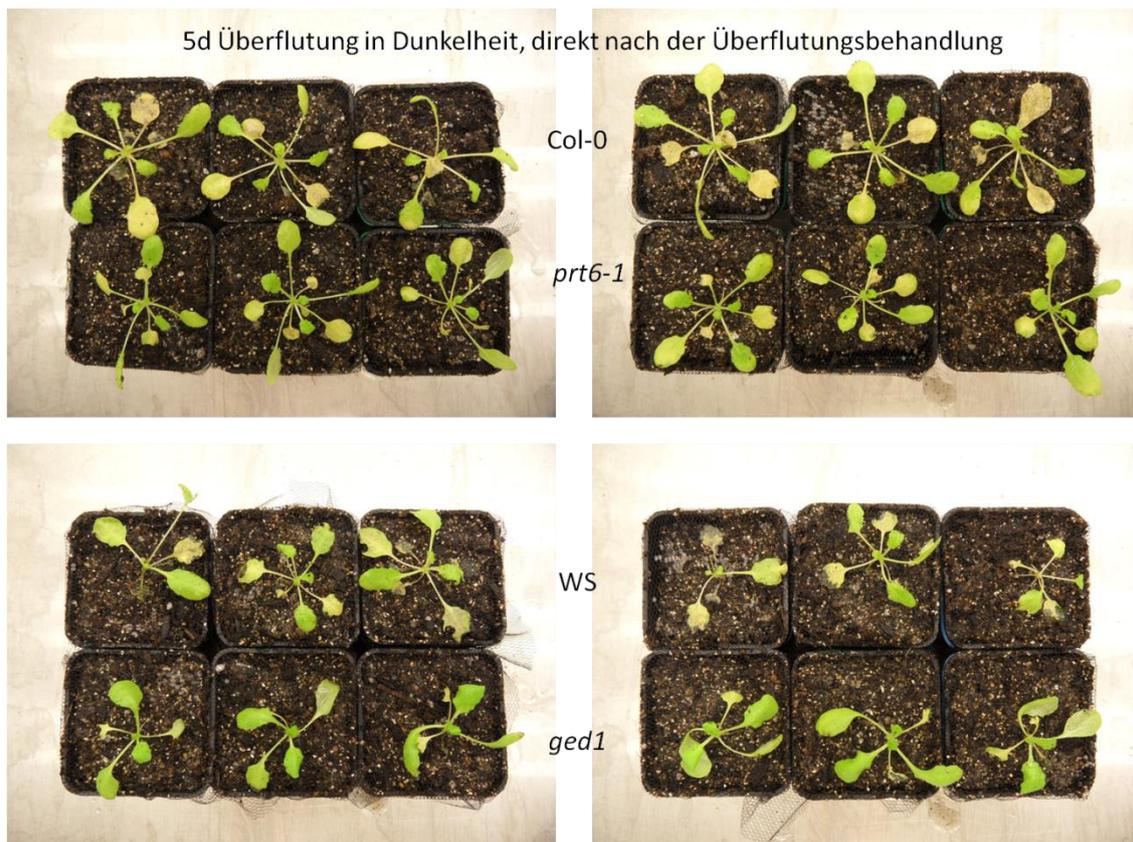
	Col-0 WT	<i>prt6</i>	Ws WT	<i>ged1</i>
Dunkel+Luft	9.15 ± 0.25	11.28 ± 0.28	11.73 ± 0.33	12.40 ± 0.33
Dunkel+Überflutung	6.05 ± 0.29	9.98 ± 0.38	11.76 ± 0.32	14.04 ± 0.56
Licht+Überflutung	16.24 ± 0.65	22.16 ± 0.35	18.64 ± 0.53	26.34 ± 0.87

Obwohl die Überflutungsbehandlung von Licausi et al. (2011) unseren Experimenten der Methodenbeschreibung zufolge sehr ähnlich zu sein schien, gibt es große Unterschiede in der Überlebensdauer der Genotypen und sogar widersprüchliche Resultate bezüglich der Toleranz der *prt6*-Mutanten. Hierbei wurde die Intoleranz der Mutanten von Licausi et al. (2011) nach

nur 3.5 d beurteilt, während in unseren Versuchen *prt6-1* und *ged1* zu 100% nach 8 d bzw. 11 d überlebten.

Es wurde daher untersucht, was der verantwortliche Unterschied in der Durchführung der Überlebensexperimente sein könnte. Dazu wurden unsere Überlebensexperimente, die an der Universität Utrecht durchgeführt worden waren, mit 5 Wochen alten Pflanzen in Bayreuth, unter Bayreuther Standardbedingungen (siehe Methodenteil/Diskussion), wiederholt. Hier wurden die Pflanzen zur Erholungsbehandlung in eine Klimakammer gestellt, in der die Luftfeuchtigkeit nicht regulierbar war; sie betrug 25%, nicht 70% wie in Utrecht. Dies führte zu der Beobachtung, dass die verschiedenen Genotypen kaum 5 d Tage Überflutung in Dunkelheit überlebten und die Blätter während der Erholungsphase verwelkten und austrockneten, trotz feuchter Erde und ausreichender Wässerung (Abb.13). Dies konnte aber verhindert werden, wenn eine durchsichtige Haube über die Pflanzen gestellt wurde, so dass eine Umgebung mit hoher Luftfeuchtigkeit entstand (Abb.13). Ebenso konnte beobachtet werden, dass bei niedriger Luftfeuchtigkeit die *prt6*-Mutanten schlechter überlebten, bei höherer Luftfeuchtigkeit dagegen etwas besser (Abb.13).

Nach persönlicher Kommunikation mit Francesco Licausi stellte sich heraus, dass die Luftfeuchtigkeit bei deren Experimenten nicht kontrolliert worden war. Demnach ist die Luftfeuchtigkeit während der Erholungsphase ein ausschlaggebender Faktor für die unterschiedliche Überlebensdauer in Überlebensexperimenten verschiedener Publikationen.



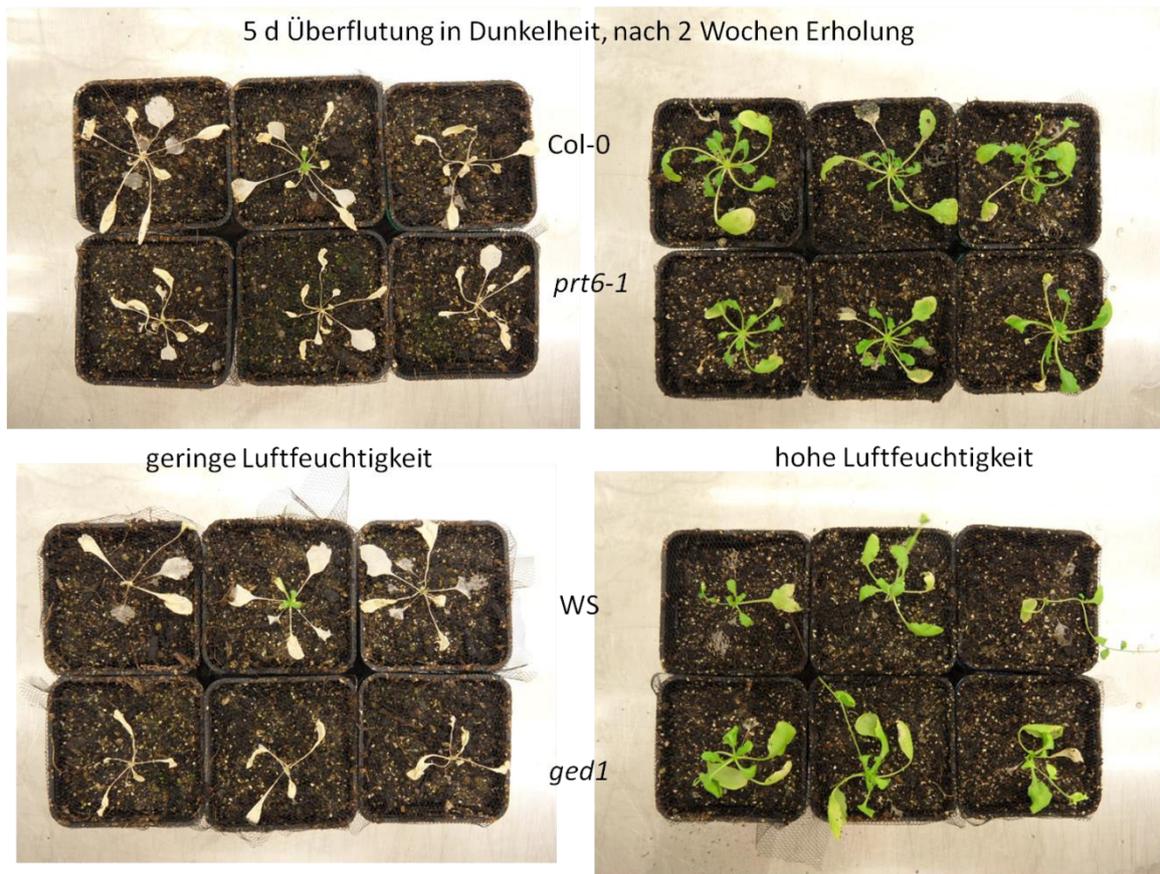


Abb.13: Die Überlebensdauer von Überflutung in Dunkelheit hängt von der Luftfeuchtigkeit während der Erholungsphase ab. 5 Wochen alte Pflanzen wurden für 5 d in Dunkelheit überflutet und danach einer Erholungsbehandlung in einer Umgebung mit unterschiedlichen Luftfeuchtigkeiten ausgesetzt.

3.1.3 Überflutung verursacht in *prt6*-Mutanten eine stärkere Verringerung des Kohlenhydratverbrauchs als in den Wildtypen

Aufgrund der bisherigen Beobachtungen, dass *prt6*-Mutanten zumindest unter bestimmten Bedingungen tolerant gegen Überflutung sind; vor allem aber, dass *ged1*, anders als sein Wildtyp oder *prt6-1*, in der Lage ist Dunkelheit bei Überflutung länger zu überleben als in der Luft, stellte sich die Frage, ob die beobachteten Toleranzunterschiede auf Unterschiede im Primärmetabolismus zurückgeführt werden können. Insbesondere die verstärkte Expression von Genen in *prt6*-Mutanten, die an Zuckerabbau und Fermentation beteiligt sind und zu der intuitiven Vermutung verleiten, dass Kohlenhydrate bei Fermentationsprozessen ineffizient verbraucht würden, lies das längere Überleben von *ged1* bei Überflutung paradox erscheinen. Es wurden daher die Stärke- und Zuckergehalte von Rosettenblättern 5 Wochen alter Pflanzen nach 8 h und 24 h Dunkelheit in der Luft und bei Überflutung gemessen. Zusätzlich wurden die Zuckergehalte zum Vergleich nach 8 h Stickstoffbegasung gemessen. Alle

Stressbehandlungen wurden am Ende eines 8 stündigen Lichtzyklus gestartet, so dass die Pflanzen zu Beginn der Behandlung über ein Maximum an Zuckerressourcen verfügten.

Die Messung der Kohlenhydratgehalte am Ende dieses Lichtzyklus zeigte keine großen Unterschiede zwischen den Genotypen und lag insgesamt zwischen 40,9 und 44,8 $\mu\text{mol}_{(\text{Glukoseeinheiten})}/\text{gFW}$ (Abb.14, die genauen Zahlenwerte sind im Anhang in Tab.5 dargestellt).

Fruktosegehalte waren in beiden *prt6*-Mutanten signifikant erhöht, tragen aber insgesamt nur zwischen 0,6% und 1,8% zum gemessenen Gesamt-Kohlenhydratgehalt bei (Abb.15).

Nach 8h Dunkelheit wiesen die Kohlenhydratgehalte im Vergleich zwischen Luft und Überflutung keine signifikanten Unterschiede innerhalb oder zwischen den Genotypen auf, mit Ausnahme von signifikant erhöhten Fruktosegehalten in beiden *prt6*-Mutanten bei Überflutung. (Abb.15). Der Gesamt-Kohlenhydratgehalt betrug hierbei zwischen 12,2 und 17,7 $\mu\text{mol}_{(\text{Glukoseeinheiten})}/\text{gFW}$, der Fruktose-Anteil am Gesamt-Kohlenhydratgehalt betrug in *prt6-1* und *ged1* bei Überflutung 2,5% bzw. 3,3%.

Nach 24 h Stunden Dunkel-Luft Behandlung gab es keine Unterschiede zwischen den Genotypen, die Kohlenhydratgehalte näherten sich zu diesem Zeitpunkt dem Detektionsminimum an.

Interessanterweise waren nach 24 h aber große Unterschiede zur Überflutungsbehandlung erkennbar. *Prt6-1* und *ged1* wiesen 6-fach bzw. 10-fach höhere Stärkegehalte bei Überflutung im Vergleich zur Luftbehandlung auf, während diesbezügliche Unterschiede in den Wildtypen nicht signifikant bzw. weitaus geringer waren.

In allen Genotypen konnte ein signifikant erhöhter Saccharosegehalt im Vergleich zur Luftbehandlung festgestellt werden und mit Ausnahme des Col-0 Wildtyps waren auch die Fruktosegehalte signifikant erhöht. Insgesamt resultierte dies bei Überflutung im Vergleich zur Luftbehandlung in einem etwa 4-fach höheren Gesamt-Kohlenhydratgehalt in den Rosettenblättern der *prt6*-Mutanten, während dieser in Col-0 1,5-fach und in Ws 2-fach erhöht war (Abb.14).

Die 8 stündige Stickstoffbegasung der Pflanzen führte zu einem signifikant reduzierten Stärkeverbrauch im Vergleich zur Luftbehandlung und einer starken Akkumulation von Glukose. Saccharosegehalte waren dagegen sehr niedrig und zum Teil kaum noch messbar.

Es konnten keine Unterschiede zwischen *prt6*-Mutanten und Wildtypen beobachtet werden. Die Akkumulation von Glukose war im Ws Hintergrund signifikant geringer als im Col-0 Hintergrund (Abb.14, Abb.15).

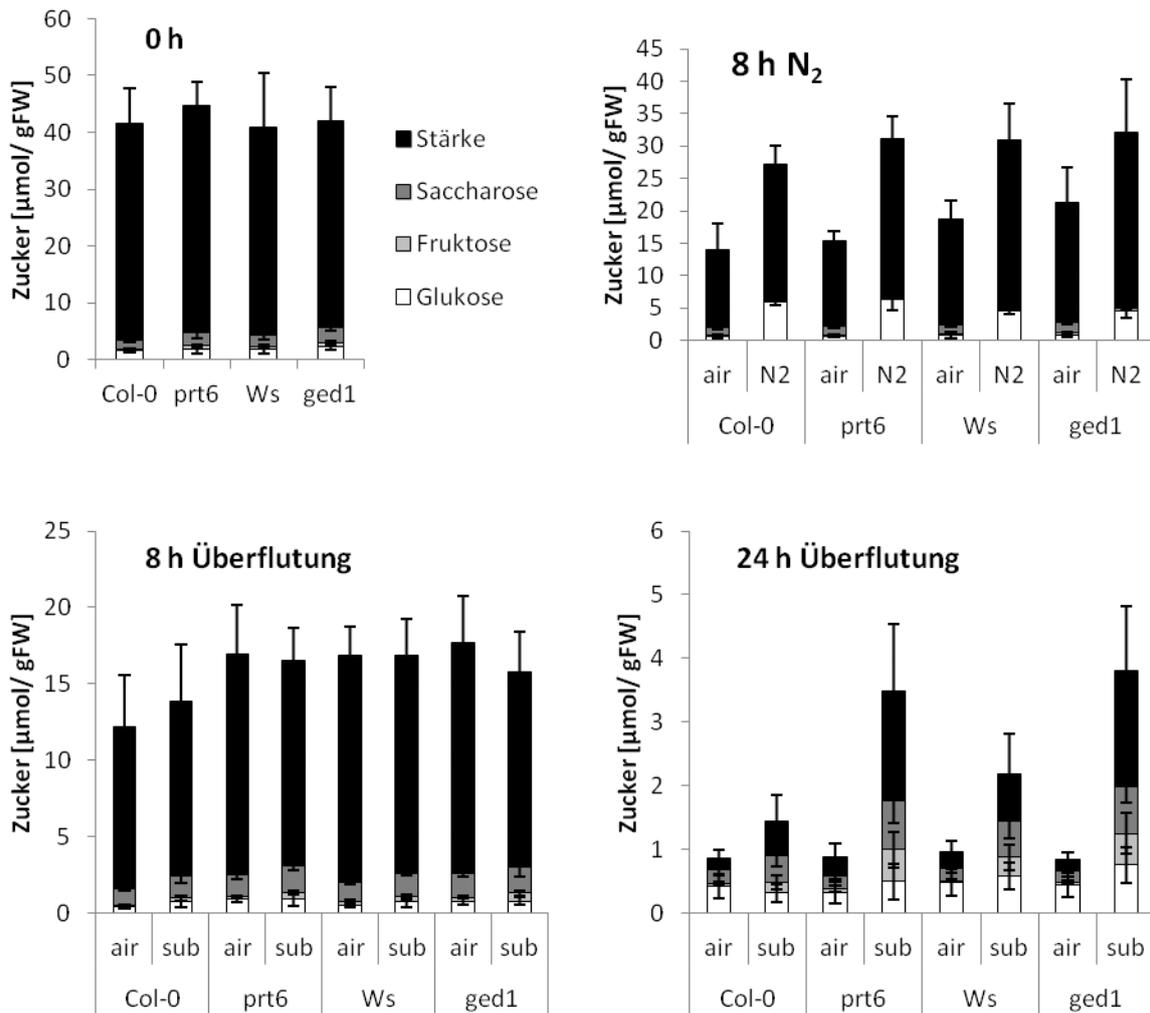
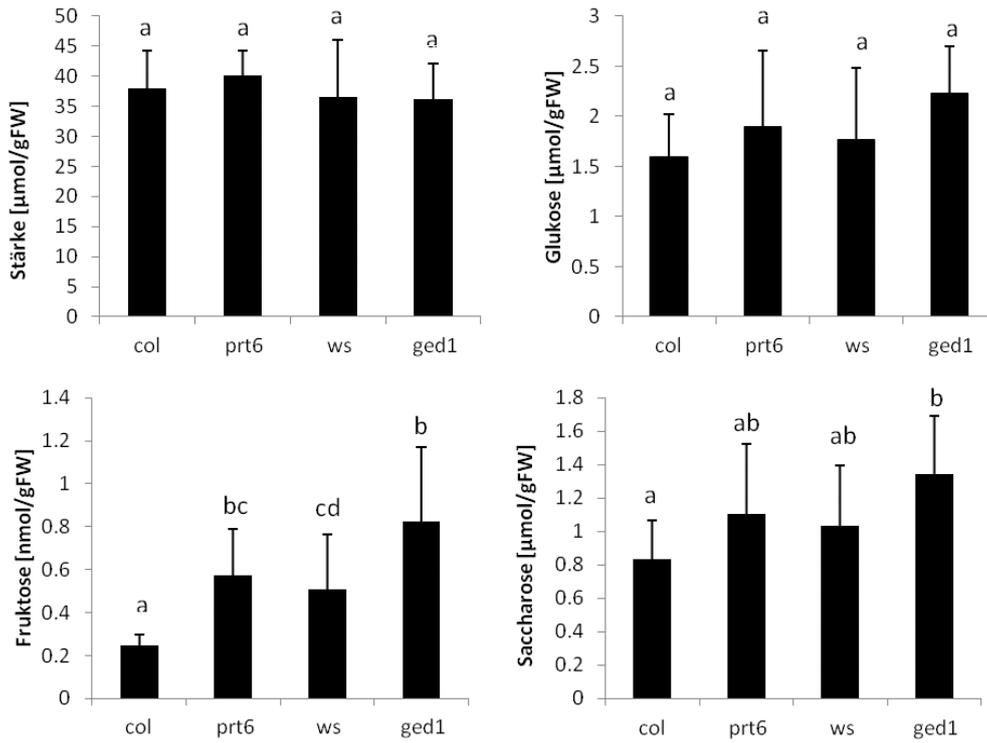
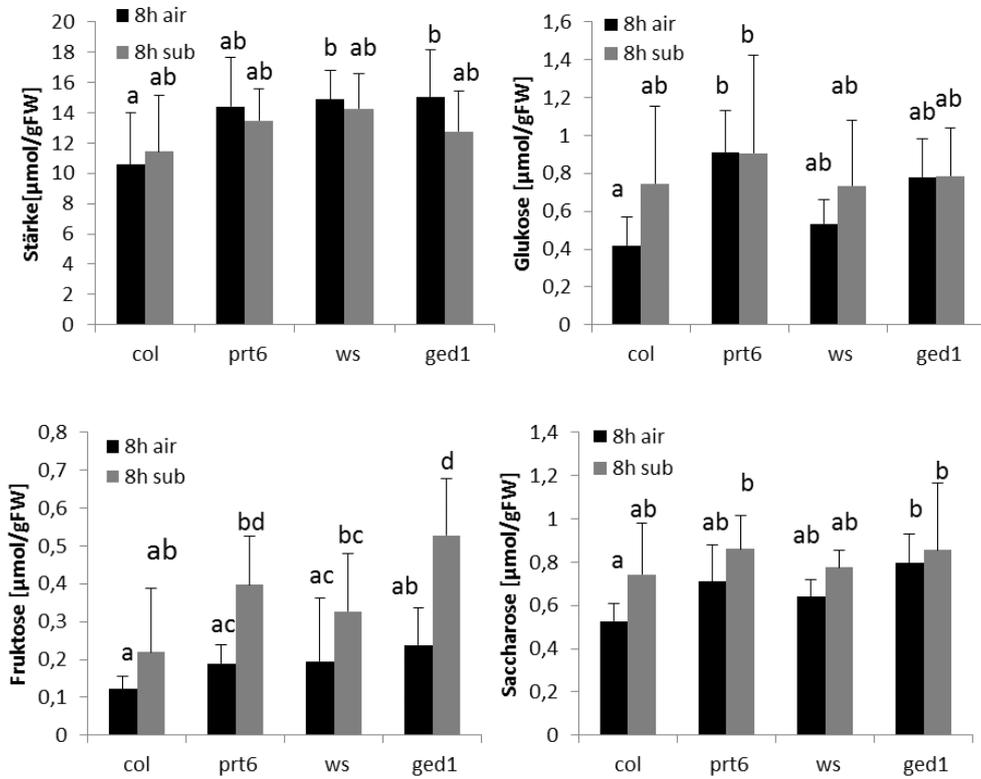


Abb.14: Übersicht über den Gesamt-Kohlenhydratgehalt in Rosettenblättern 5 Wochen alter Pflanzen nach verschiedenen Stressbehandlungen. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichung aus 3 Experimenten mit einer Messung von 2-3 Pflanzen pro Experiment, Genotyp und Stressbehandlung. Die Werte repräsentieren die Menge an Glukoseeinheiten, die aus einer enzymatischen Umwandlung der Stärke bzw. ursprünglichen Zucker entstanden sind. air = Dunkelheit+Luft, sub = Dunkelheit+Überflutung, 0h = Start der Stressbehandlung am Ende eines Lichtzyklus, N₂ = Begasung mit Stickstoff.

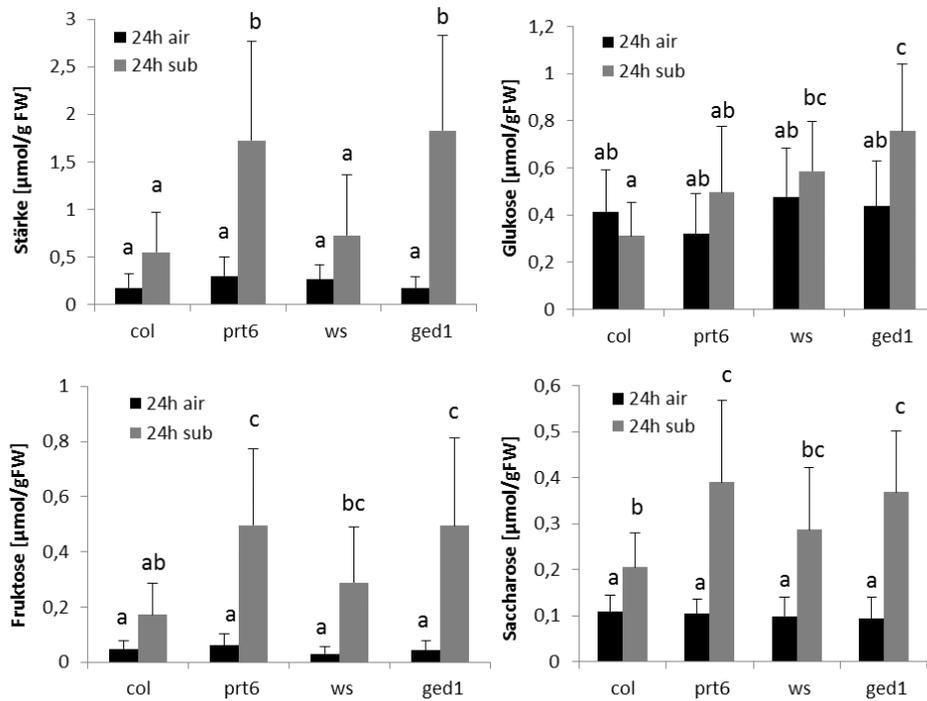
0h



8h Überflutung



24 h Überflutung



8h N₂ Begasung

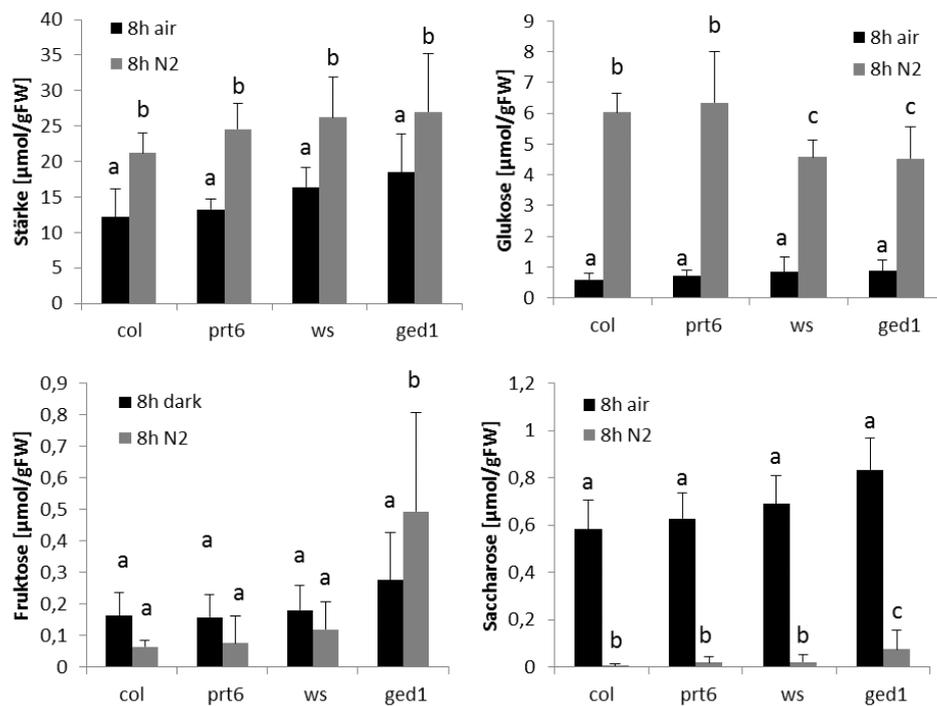


Abb.15: Zucker und Stärkegehalte in Rosettenblättern 5 Wochen alter Pflanzen nach verschiedenen Stressbehandlungen. Die Daten zeigen die statistische Auswertung aus Abb.14. Buchstaben geben das Ergebnis einer *two-way*-Anova mit Tukey-Test an. air = Dunkelheit+Luft, sub = Dunkelheit+Überflutung, 0h = Start der Stressbehandlung am Ende eines Lichtzyklus, N₂ = Begasung mit Stickstoff.

Rosettenblättern von Pflanzen, die den gleichen Bedingungen wie bei den Zuckermessungen ausgesetzt waren wurden für die Durchführung von RT-PCRs verwendet. Im Wildtyp konnte ein leicht erhöhtes Transkriptlevel von *PDC1* und *ADH* bei Überflutung im Vergleich zur Luftbehandlung festgestellt werden, dieses war aber in *prt6*-Mutanten deutlich höher. Interessanterweise war das Transkriptlevel von *PDC1* in den *prt6*-Mutanten nach Überflutung im Vergleich zur Luftbehandlung stark erhöht, während sich das Transkriptlevel bei *PDC2* und *ADH* im Vergleich von Überflutung und Luftbehandlung nicht unterschied (Abb.16/17). Transkriptlevel ABA-responsive Gene waren bei Überflutung im Vergleich zur Luftbehandlung in allen drei Wiederholungen der Experimente deutlich herunterreguliert (Abb.17).

Die Tubulinbanden sind in diesem Experiment schwer erkennbar, es zeigte sich aber in allen Durchführungen ein ähnliches Muster der Genexpression (Daten nicht gezeigt).

In Bezug auf ABA-responsive Gene konnte bei Überflutung oder Luftbehandlung insgesamt kein eindeutiger Unterschied zwischen Wildtypen und *prt6*-Mutanten festgestellt werden, die Interpretation der Ergebnisse ist aber hier schwieriger, da kleine Expressionsunterschiede durch die ungenaue Methode (semiquantitative RT-PCR) nicht erkennbar sind.

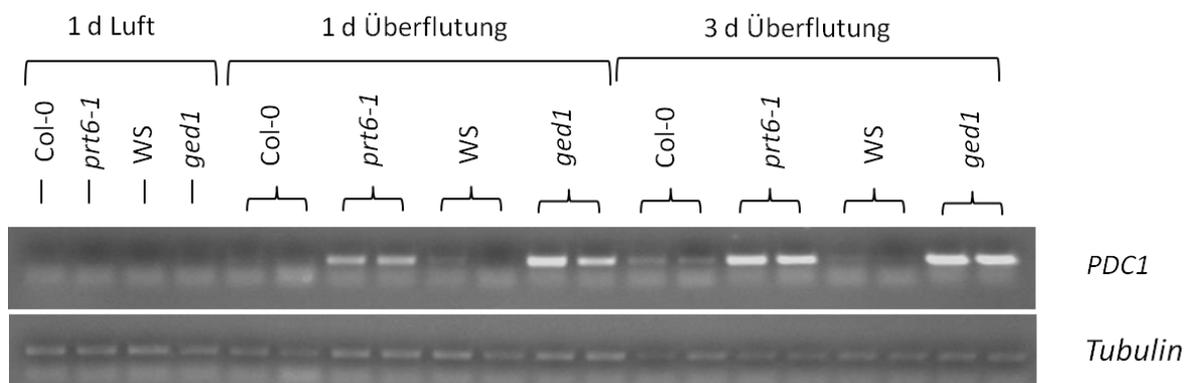


Abb.16: Transkriptakkumulation von *PDC1* in Rosettenblättern nach Dunkel+Überflutung oder Dunkel+Luft. Bei Überflutung wurden jeweils zwei RNA-Extrakte von verschiedenen Individuen desselben Genotyps und der gleichen Behandlung verwendet. Das Experiment wurde viermal wiederholt.

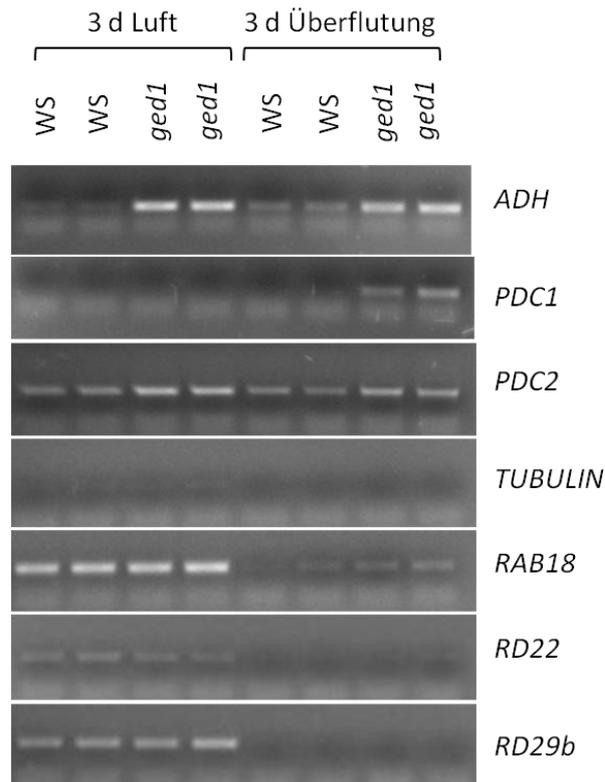


Abb.17: Transkriptlevel von Hypoxie- und ABA-responsiven Genen in Rosettenblättern des Ws Ökotyps und *ged1* nach 3 d Dunkelheit in der Luft oder bei Überflutung. Es wurde jeweils RNA aus Rosettenblättern von zwei verschiedenen Pflanzen pro Genotyp und Behandlung extrahiert. Das Experiment wurde dreimal wiederholt.

3.1.4 *prt6*-Mutanten sind tolerant in verschiedenen Hungerstress-Experimenten

Von Choy et al. (2008) wurde beschrieben, dass *ged1* im Vergleich zum Wildtyp nach Keimung und Wachstum in Dunkelheit bei nachfolgender Belichtung (schneller) mehr Chlorophyll akkumuliert. Dies wurde dadurch bestätigt, dass nach 10 Tagen in Dunkelheit nur *ged1* in der Lage war grüne Kotyledonen zu entwickeln und somit zu überleben. Col-0, *prt6-1* und Ws ergrünten nicht (Abb.18A).

Prt6-1 überlebte allerdings im Gegensatz zu Col-0 8 Tage Dunkelheit (Abb.18B). Ähnliche Unterschied im Überleben der *prt6*-Mutanten waren feststellbar, wenn 7 Tage alte, bereits ergrünte Keimlinge, für 9 (Col-0 und *prt6-1*) bzw. 10 Tage (Ws und *ged1*) verdunkelt wurden (Abb.19). Bereits unmittelbar nach der Dunkelheitsbehandlung ist ein klarer Unterschied in der Blattfarbe zwischen *prt6*-Mutanten (grün) und Wildtypen (gelb) erkennbar. Alle Wildtypen starben während der Erholungsbehandlung im Licht und wurden weiß, während alle *prt6*-Mutanten überlebten. Bei Saccharosesupplementation (0,5% oder 1%) überleben in beiden beschriebenen Experimenten alle Genotypen und es sind zumindest nach 10 d Dunkelheit keine Unterschiede erkennbar (Daten nicht gezeigt).

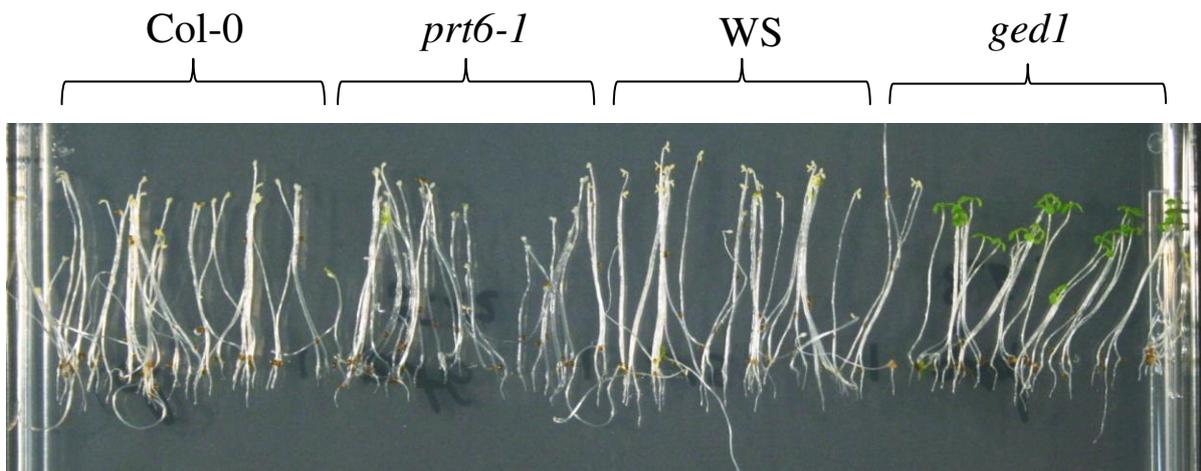
A**B**

Abb.18: Überleben nach Keimung und Wachstum in Dunkelheit. **A)** Nur *ged1* bildet nach 10 Tagen Keimung und Wachstum in Dunkelheit gefolgt von 6 d im Licht grüne Kotyledonen aus **B)** *prt6-1* ist im Gegensatz zum Col-0 Wildtyp in der Lage nach 8 d Keimung und Wachstum in Dunkelheit gefolgt von einer Lichtbehandlung grüne Kotyledonen auszubilden. Die Experimente wurden 6mal wiederholt.

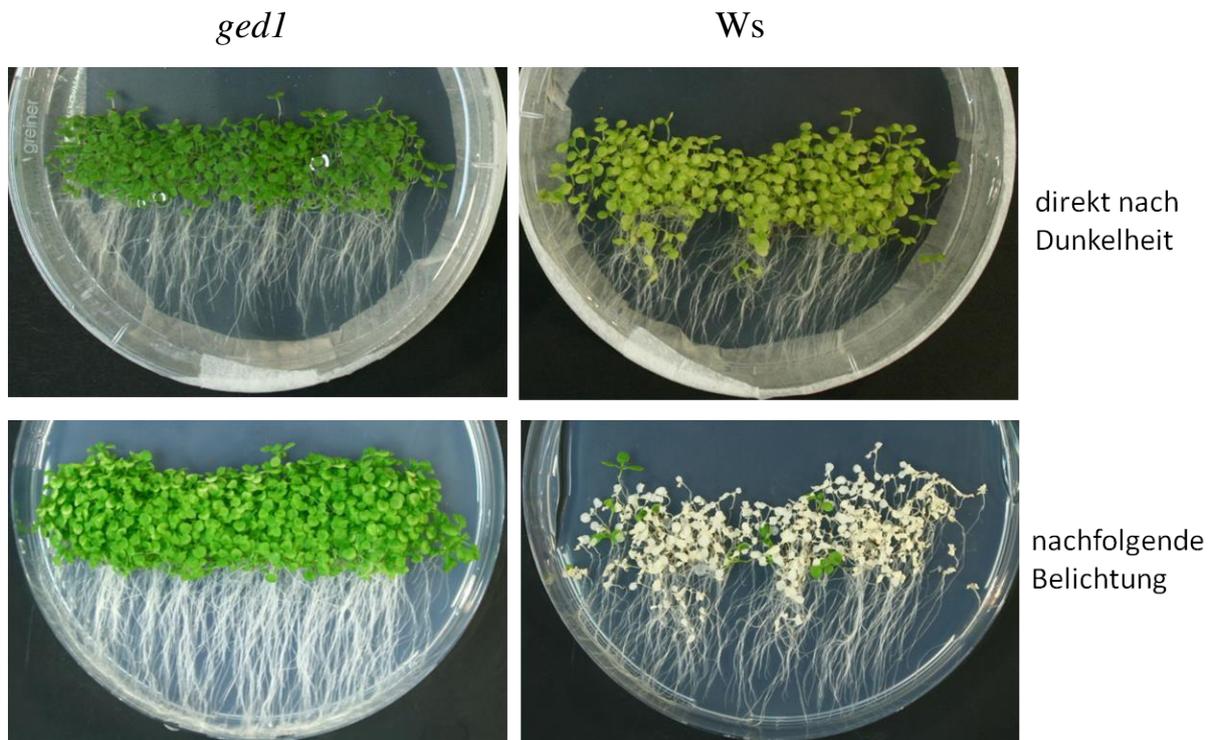
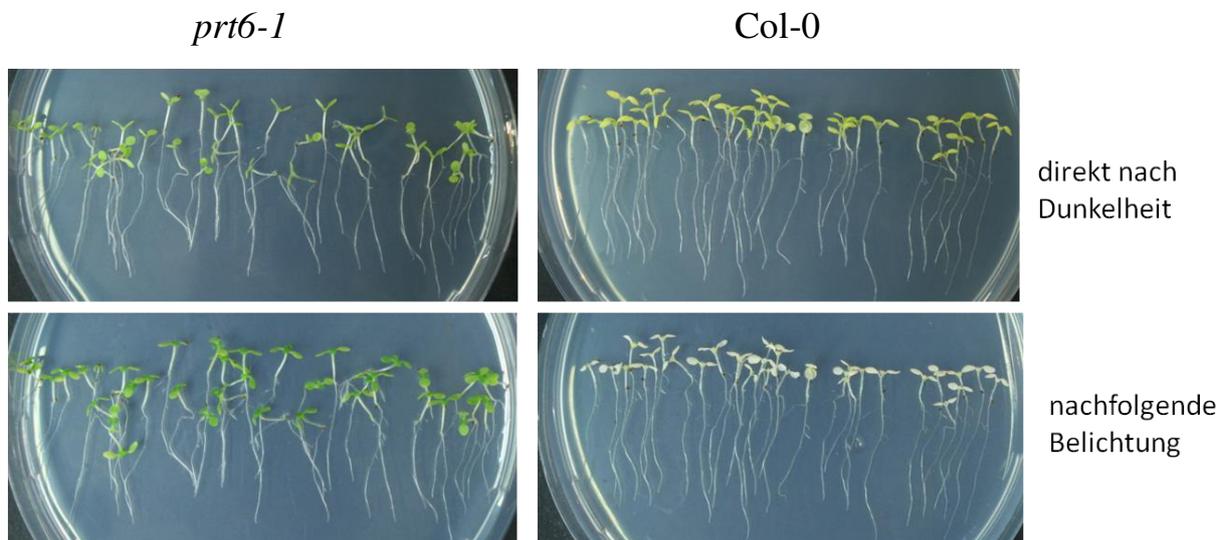
A**B**

Abb.19: Überleben 7 d alter Keimlinge in Dunkelheit. **A)** *gedl* und Ws nach 10 d Dunkelheit vor und nach einer darauffolgenden Belichtung von 6 d. **B)** *prt6-1* und Col-0 nach 9 d Dunkelheit vor und nach einer darauffolgenden Lichtbehandlung von 6 d. Die Experimente wurden 6mal wiederholt.

3.2 Charakterisierung Hypoxie-responsiver Transkriptionsfaktoren

3.2.1 ERF-VII Transkriptionsfaktoren

In *Arabidopsis* sind bisher fünf Ziele des sauerstoffabhängigen Proteinabbaus durch den N-end-rule pathway bestätigt, nämlich die fünf Mitglieder der Untergruppe VII der ERF Transkriptionsfaktorenfamilie. Es wurde untersucht, ob und inwiefern die beobachteten Phänotypen der *prt6*-Mutanten (ABA sensitive Keimlingsentwicklung und Überleben nach Dunkelheit) über ERF VII Transkriptionsfaktoren vermittelt werden. Hierfür wurden Überexpressionslinien unter Verwendung des Vektors p35S:HF-GATA hergestellt, der ein N-terminales His6/Flag Epitop fusioniert, so dass ein Abbau des Proteins über den N-end-rule pathway verhindert wird.

Aufgrund der in Kapitel 3.2.4 beschriebenen Schwierigkeiten bei der Detektion von Proteinen im Westernblot wurden zur Auswahl und Bestätigung von Überexpressionslinien Transkriptanalysen durchgeführt (Daten nicht gezeigt) und im Fall von RAP2.12-, RAP2.2- und RAP2.3-Überexpressionslinien ADH(Alkohol-Dehydrogenase)-Aktivitäten gemessen, da die Regulation von *ADH* durch diese Transkriptionsfaktoren bekannt ist (Abb.20, Licausi et al. 2011).

Experimente konnten mit der T2 Generation nicht durchgeführt werden, da die Samen vermutlich aufgrund ungünstiger Wachstumsbedingungen der Eltern nicht gut keimten. Daher sind hier erste Ergebnisse nur anhand von wenigen Überexpressionslinien nachfolgender Generationen gezeigt, die noch weiter geführt und bestätigt werden müssen. Hierbei zeigte die homozygote RAP2.12 Überexpressionslinie 30-3 auf 0,2 μM ABA ein Anhalten der Keimlingsentwicklung (Abb.21) und außerdem Toleranz gegenüber Dunkelheit (Abb.22), analog zu den *prt6*-Mutanten. Auch die heterozygote RAP2.3 Überexpressionslinie 5-1 zeigte auf ABA ein Anhalten der Keimlingsentwicklung (Abb.21). Beide Überexpressionslinien haben eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte ADH-Aktivität. Die in Abb.20 dargestellte Aktivität der heterozygoten T2 Generation der Linie 30 erscheint im Vergleich zu anderen Überexpressionslinien gering, ist aber etwa doppelt so hoch wie die Aktivität des Wildtyps. Wiederholungen mit der homozygoten Nachfolgeneration 30-3 zeigten einen deutlich größeren Unterschied der ADH-Aktivität zum Wildtyp sowie eine höhere Aktivität als *prt6-1* (Daten nicht gezeigt).

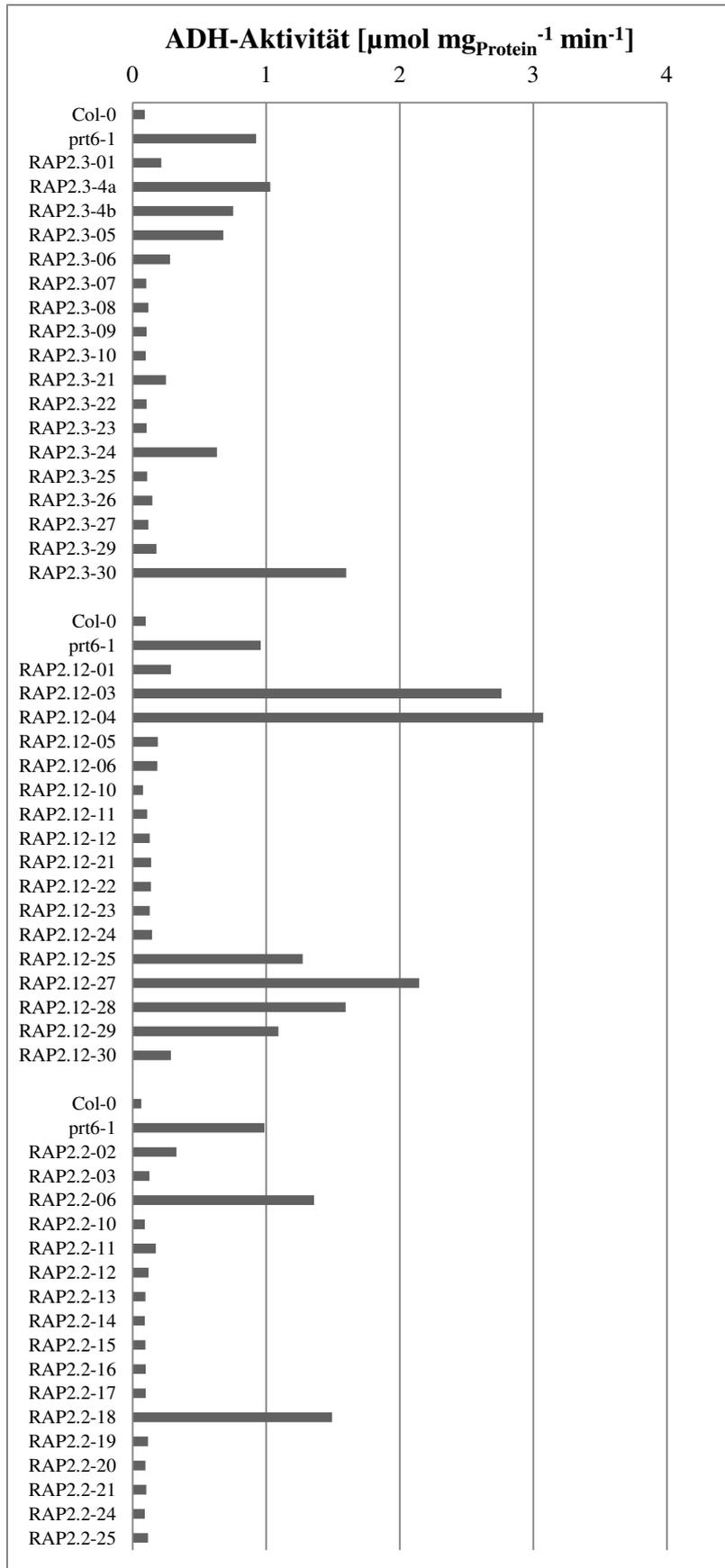


Abb.20: Messung der ADH-Aktivitäten von ERF-VII-Transkriptionsfaktoren. Es wurden 7 d alte Keimlinge der T2 Generation verwendet.

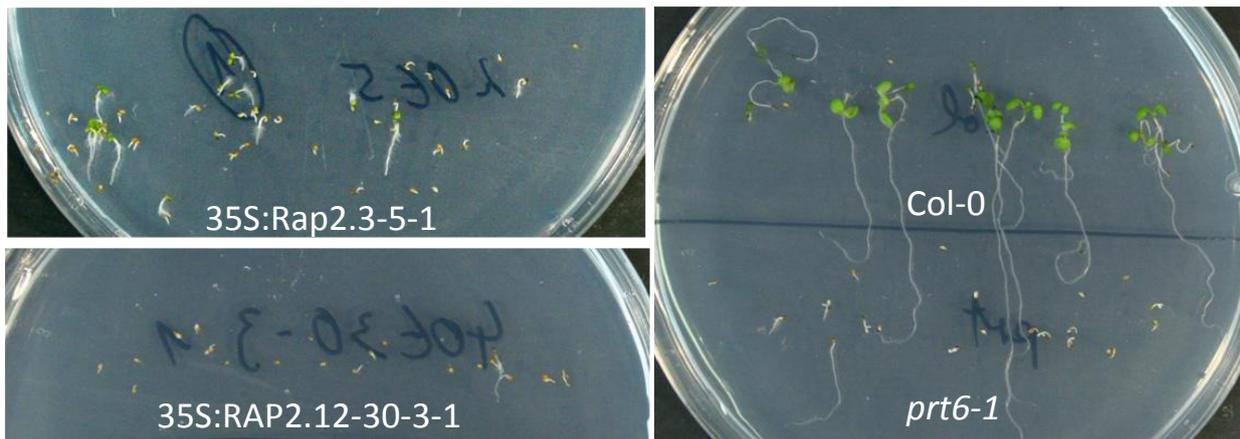
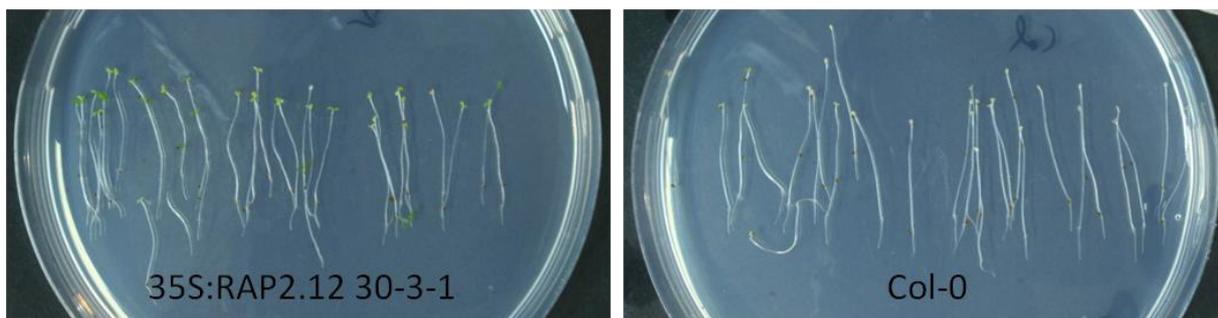


Abb.21: ABA-sensitives Anhalten der Keimlingsentwicklung von ERF-VII Überexpressionslinien. Pflanzen wurden auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium mit 1% Saccharose und $0,2 \mu\text{M}$ ABA angezogen. **Links oben:** die heterozygote RAP2.3 Überexpressionslinie 5-1 (T3 Generation), **links unten:** die homozygote RAP2.12 Überexpressionslinie 30-3-1 (T4 Generation, die Nummern bezeichnen den Samenpool), **rechts:** Col-0 und *prt6-1*.

A



B

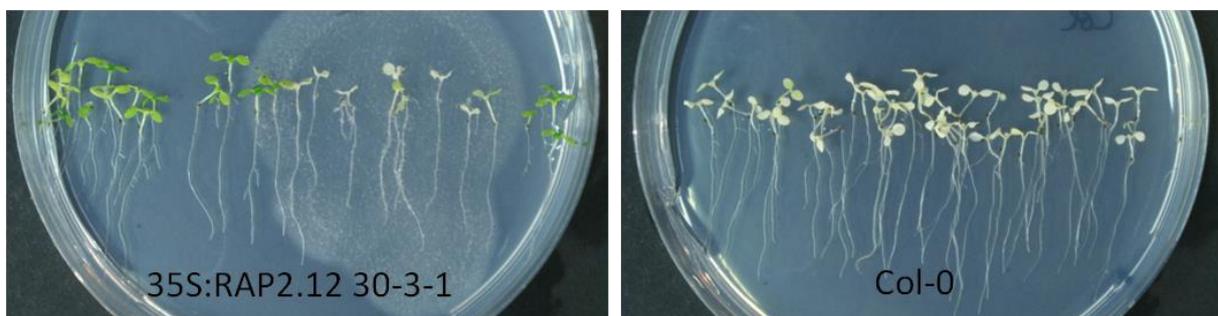
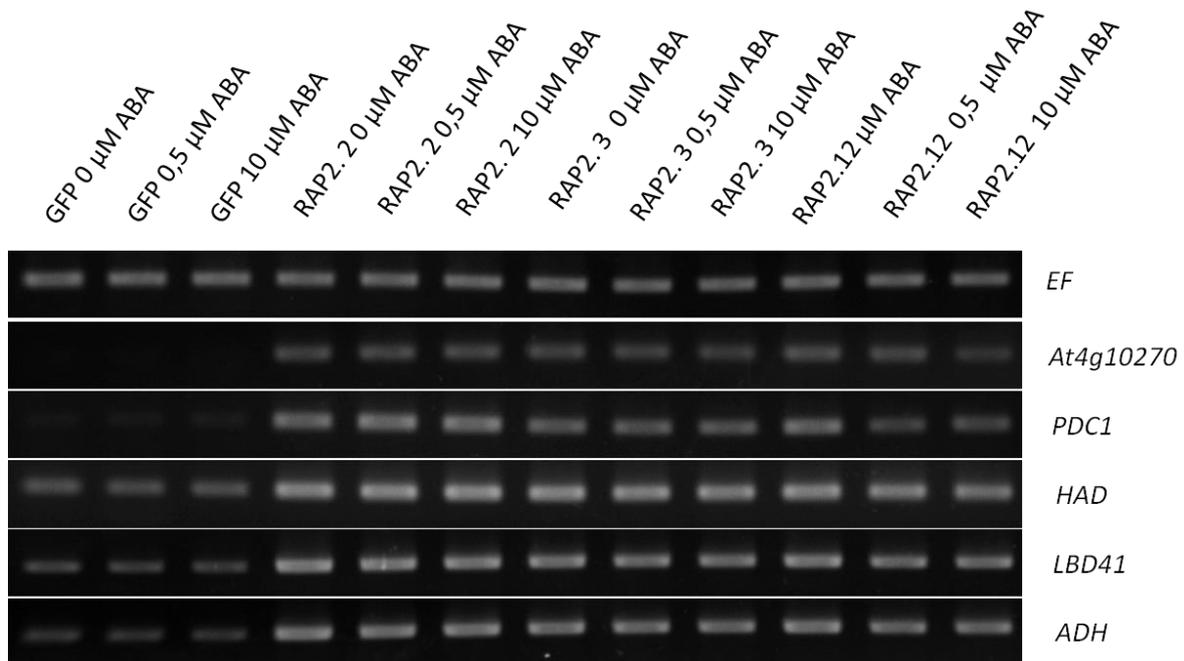


Abb.22: Die RAP2.12-Überexpressionslinie 30-3 ist tolerant gegen Dunkelheit. **A)** Keimung und Wachstum in Dunkelheit für 8 d gefolgt von 6 d Belichtung. **B)** 9 d Dunkelheitsbehandlung 7 d alter Keimlinge gefolgt von 6 d Belichtung (links ist ein Pilz gewachsen).

Zusätzlich wurden verschiedene Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis*-Protoplasten transformiert und RT-PCRs durchgeführt. Dies führte bei RAP2.12, RAP2.2 und RAP2.3 zu einer Transkriptakkumulation der Hypoxie-responsiven Gene *At4g10270*, *PDC1*, *HAD*(*At5g44730*), *LBD41* und *ADH* (Abb.23A). Dieser Effekt konnte bei Überexpression von HRE1 und HRE2 nicht beobachtet werden (Abb.24A). Bei keiner Überexpression konnte eine veränderte Regulation ABA-responsiver Gene festgestellt werden. Diese wurden jedoch erwartungsgemäß bei einer ABA-Zugabe in den transformierten Protoplasten hochreguliert (Abb. 23B/24B).

A



B

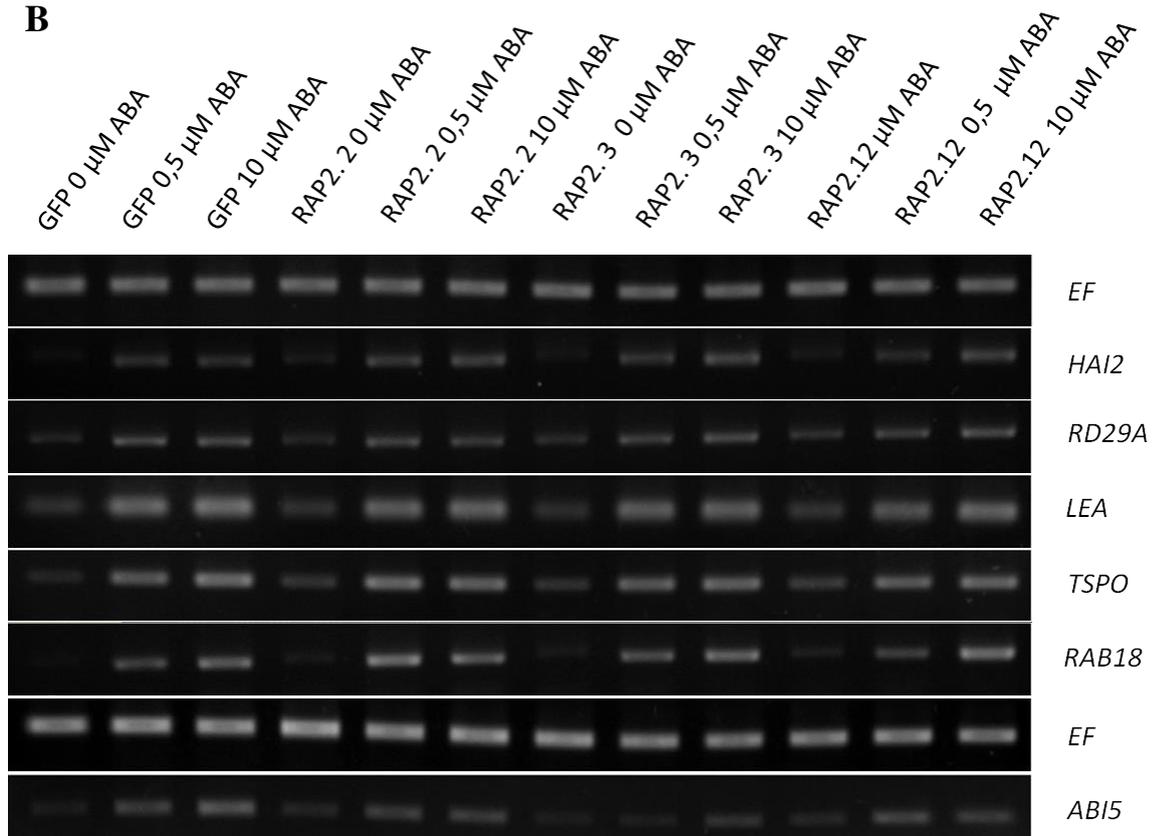


Abb.23: Auswirkung einer transienten Überexpression verschiedener Transkriptionsfaktoren (RAP2.2, RAP2.12, RAP2.3) bzw. GFP in *Arabidopsis* Protoplasten, sowie einer ABA-Behandlung dieser Protoplasten auf die Expression Hypoxie- (A) bzw. ABA- responsiver (B) Gene. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt.

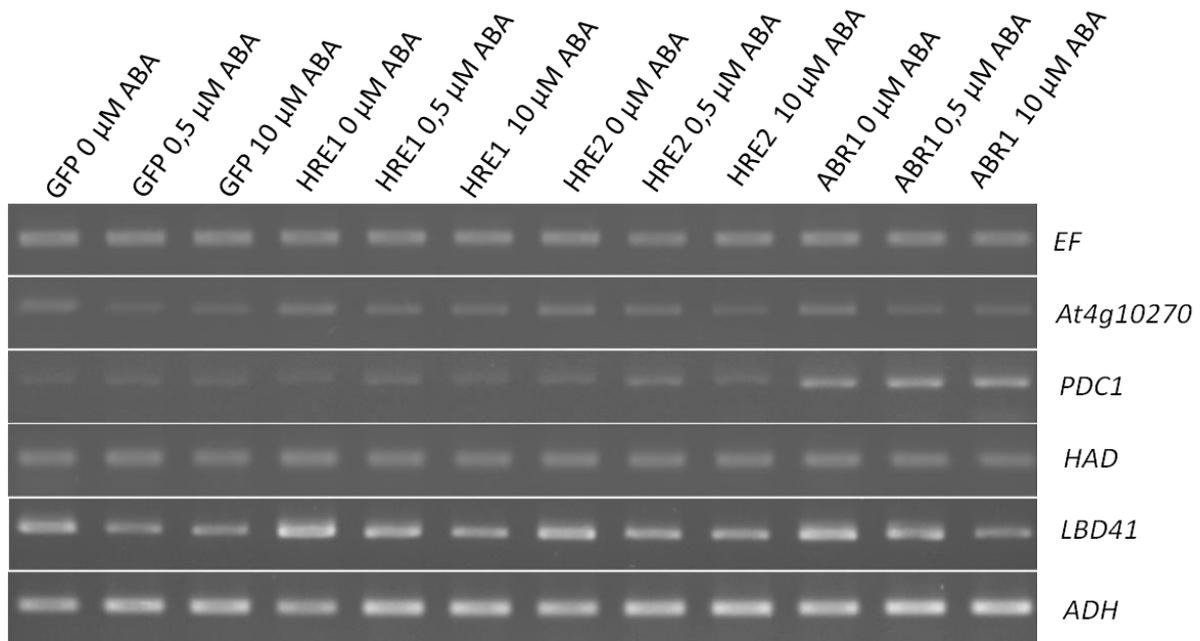
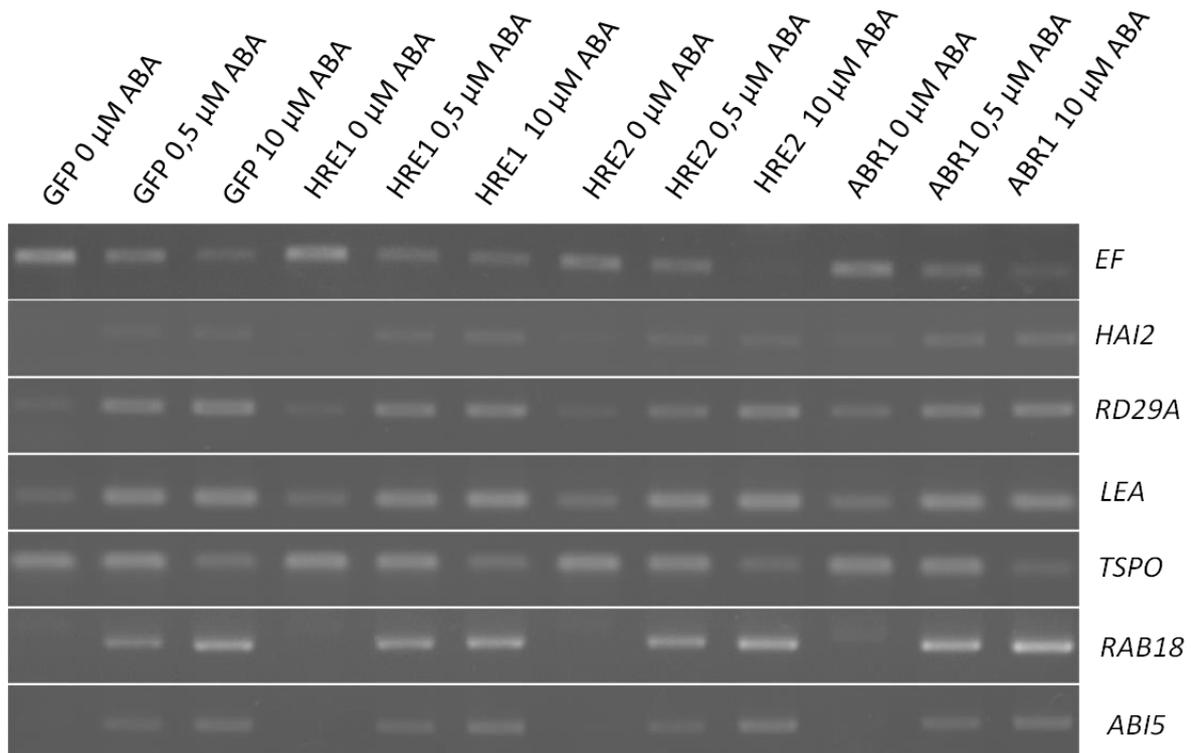
A**B**

Abb.24: Auswirkung einer transienten Überexpression verschiedener Transkriptionsfaktoren (HRE1, HRE2, ABR1) bzw. GFP in *Arabidopsis* Protoplasten, sowie einer ABA-Behandlung dieser Protoplasten auf die Expression Hypoxie- (A) bzw. ABA- responsiver (B) Gene. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt.

3.2.2 ABA REPRESSOR1 (ABR1)

In *Arabidopsis thaliana* sind die fünf Mitglieder der ERF-Transkriptionsfaktorenfamilie der Untergruppe VII bisher die einzigen bekannten Ziele der Cysteinoxygenierung über den *N-end-rule pathway*. Es existieren aber noch ca. 200 weitere Gene, deren vorhergesagte Poteinsequenz mit Methionin und Cystein beginnt. Auch diese Proteine stellen damit mögliche Ziele des sauerstoffabhängigen Abbaus durch den *N-end-rule pathway* dar.

Da zu jenem Zeitpunkt noch nicht bekannt war, dass die ABA-sensitive Keimung und die Fähigkeit nach langen Dunkelperioden zu ergrünen auf ERF-VII Transkriptionsfaktoren zurückgeführt werden kann (Kapitel 3.2.1) und es viele Verbindungen zwischen Hypoxie, *N-end rule pathway* und ABA-Signalwegen gibt (siehe Kapitel 4.7), wurden die Annotationen dieser 200 Gene nach einer Verbindung zu ABA-Signalwegen durchsucht. Dabei wurde der AP2 Domain Transkriptionsfaktor ABR1 (ABA REPRESSOR1) entdeckt. Eine Publikation von Pandey et al. (2005) besagt, dass ABR1 ein Repressor der ABA-Antwort sei und die Expression einer Reihe ABA-responsiver Gene reguliere.

ABR1 ist auf dem ATH1 Microarray-Chip von Affymetrix nicht repräsentiert und entging daher der Aufmerksamkeit in Bezug auf eine mögliche Rolle bei Hypoxie. Um zu untersuchen, ob *ABR1* durch Hypoxie reguliert wird, wurde eine RT-PCR mit Pflanzenmaterial von Col-0 und *prt6-1* Keimlingen durchgeführt, die für 4 h mit N₂ behandelt, für eine Stunde Wiederbelüftet oder als Kontrollbehandlung nicht begast worden waren. Es wurde festgestellt, dass *ABR1* tatsächlich durch Hypoxie hochreguliert wird und die Transkriptmenge auch nach 1 h Wiederbelüftung erhöht bleibt. Dabei wurden keine Unterschiede zwischen Col-0 und *prt6-1* Keimlingen entdeckt (Abb.25).

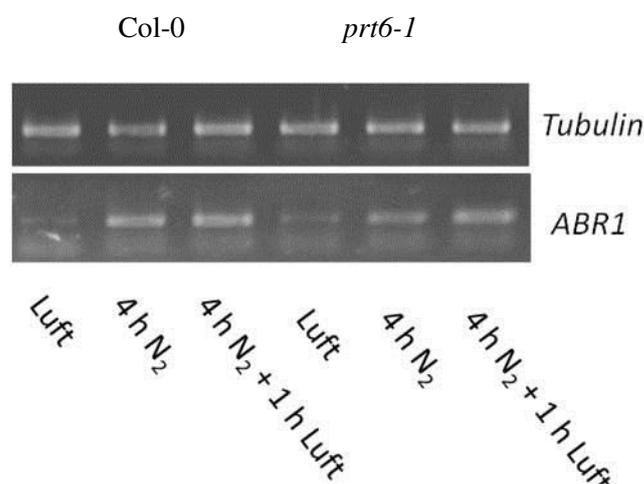


Abb.25: Transkriptakkumulation von *ABR1* bei Hypoxie und nach Wiederbelüftung. 7 d alte Col-0 und *prt6-1* Keimlinge wurden für 4 h einer Stickstoffgasbehandlung unterzogen bzw. 1 h wiederbelüftet.

Die Publikation von Pandey et al. (2005) basierte auf der Untersuchung von zwei T-DNA Insertionslinien in Col-0 Hintergründen (*abr1-1* und *abr1-2*).

Eine dieser Linien, *abr1-2*, die eine T-DNA-Insertion in einem Exon aufweist, wurde bestellt und es wurde bestätigt, dass kein PCR-Produkt entsteht, wenn Primer verwendet werden, die die T-DNA-Insertion flankieren (Abb.26).

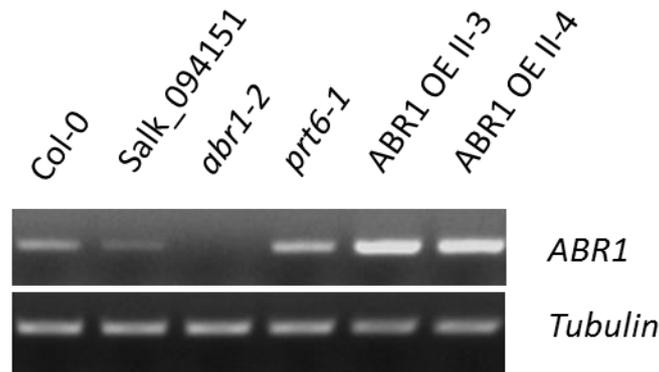


Abb.26: Transkriptakkumulation von *ABR1* nach Wachstum für 7 d auf MS-Medium mit 0,3 μ M ABA. Die verwendeten Primer flankieren die T-DNA Insertion in *abr1-2*.

Durch Kreuzung wurde die Doppelknockout Linie *prt6-1xabr1-2* hergestellt. Außerdem wurden Überexpressionslinien hergestellt, in denen ein N-terminales His₆/Flag Epitop fusioniert wurde, so dass der N-Terminus nicht als Signal für einen möglichen Abbau über den N-end-rule pathway erkannt werden kann.

Einige Überexpressionslinien zeigten schon bei normaler Anzucht auffällige Phänotypen: Im Keimlingstadium bildeten sie kürzere Wurzeln mit vielen langen Wurzelhaaren aus (Abb.27). Überexpressionslinien mit besonders vielen, langen Wurzelhaaren wiesen höhere Transkriptlevels von ABR1 auf, als solche mit weniger, kürzeren Wurzelhaaren (Abb.27B). Linien mit hohem ABR1-Transkriptlevel und ausgeprägtem Wurzelhaarphänotyp sind in späteren Stadien kleiner (Abb.28) und entwickeln kleinere Schoten mit wenigen Samen.

A



B

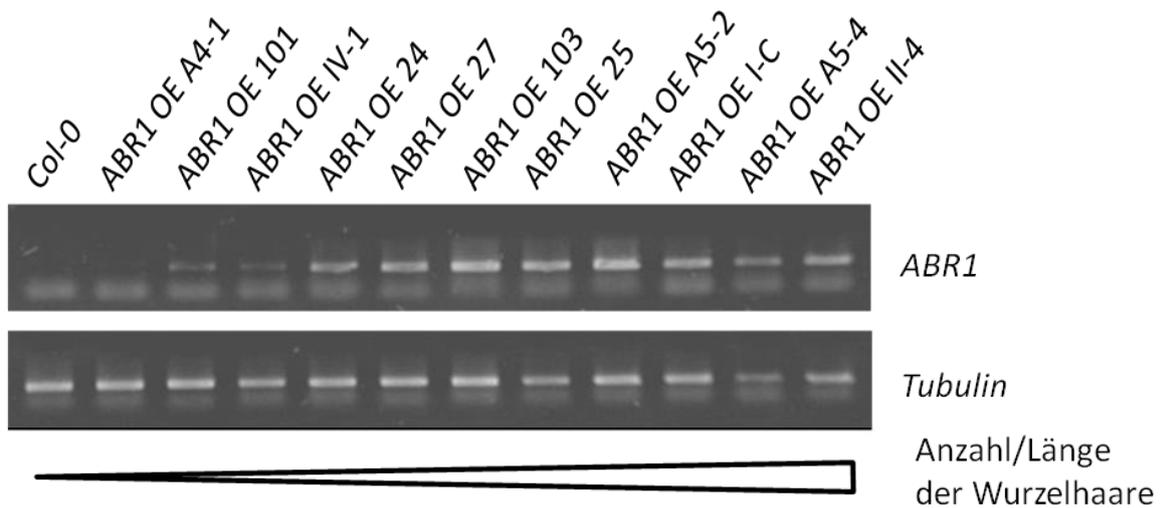


Abb.27: Starke ABR1 Überexpressionslinien bilden unter Standardbedingungen (MS-Medium, Langtag) viele lange Wurzelhaare aus. **A)** Foto der Wurzeln von 7 d alten Col-0 Pflanzen (links) und der Überexpressionslinie ABR1 OE II-4 (rechts). **B)** Das Transkriptlevel von ABR1 in Überexpressionslinien korreliert mit einer Abschätzung der Anzahl und Länge von Wurzelhaaren.

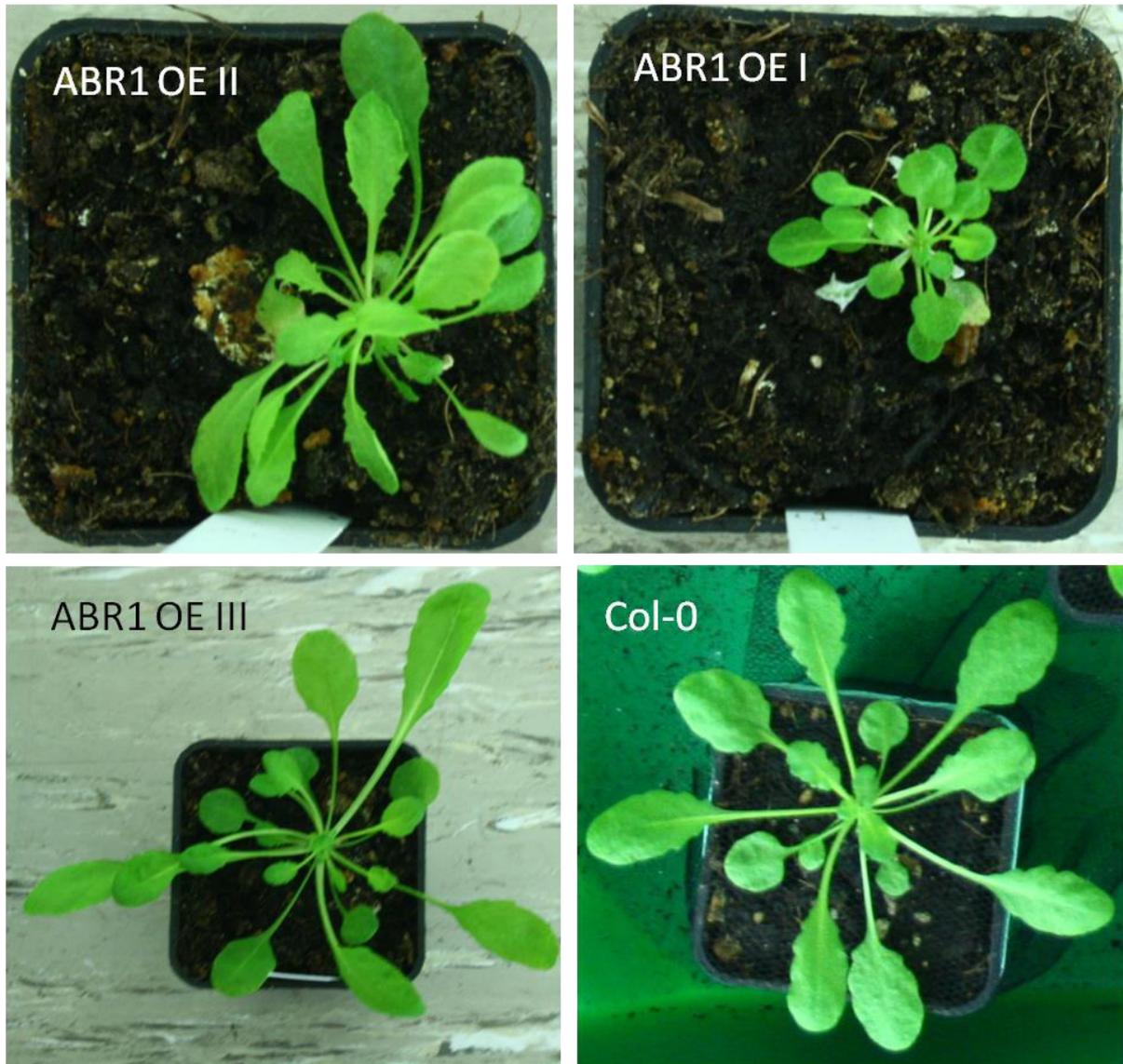


Abb.28: Phänotypen von ABR1-Überexpressionslinien. Die Pflanzen sind zwischen 5-6 Wochen alt und in einer Kurztagkammer (8 h/16 h) angezogen worden. Überexpressionslinien, die auch den Wurzelhaarphänotyp aufweisen, haben kleinere Rosettenblätter und kürze Petiolen (**oben**) im Vergleich zu einer schwachen Überexpressionslinie, die diese Phänotypen nicht aufweist (**unten**). Die Seitenlänge der Töpfe beträgt 5,5 cm.

Es wurde daraufhin versucht die Ergebnisse von Pandey et al. (2005) unter Einbeziehung der Überexpressionslinien nachzustellen.

Die Schlussfolgerung von Pandey et al. (2005), dass es sich bei ABR1 um einen Repressor der ABA-Antwort handeln würde, beruhte auf der Beobachtung, dass die Keimung sowie das Wurzellängenwachstum von *abr1-1* und *abr1-2* hypersensitiv auf ABA reagieren. Zusätzlich wurden semiquantitative RT-PCRs durchgeführt, die eine eindeutig stärkere Expression von

ABA-responsiven Genen nach ABA-Behandlung in den Knockoutpflanzen zeigten (Pandey et al. 2005).

Die in dieser Arbeit dargestellten Wiederholungen aller drei Experimente zeigten in Widerspruch zu Pandey et al. (2005) keinen Unterschied zwischen Wildtyp, *abr1-2* oder Überexpressionslinien in Bezug auf die ABA-Sensitivität:

1) Bei den Wurzellängenmessungen sollte das relative Wurzellängenwachstum der Mutante *abr1-2* auf 10 μ M bzw. 30 μ M ABA den Ergebnissen von Pandey et al. (2005) zufolge etwa die Hälfte des Wildtyps betragen. Ein derartiger Unterschied im Wurzellängenwachstum konnte nicht bestätigt werden, wobei zu berücksichtigen ist, dass es sich erst um zwei Wiederholungen der Experimente mit 7-10 Wurzelmessungen pro Experiment handelt. Auf eine statistische Auswertung wurde daher zunächst verzichtet (Abb.29).

Starke Überexpressionslinien zeigen unter allen Bedingungen ein geringeres Wurzelwachstum als der Wildtyp. Bei Betrachtung der jeweiligen prozentualen Verringerung des Wurzelwachstums im Vergleich zur Kontrollbehandlung ist aber kein Unterschied festzustellen (nicht dargestellt).

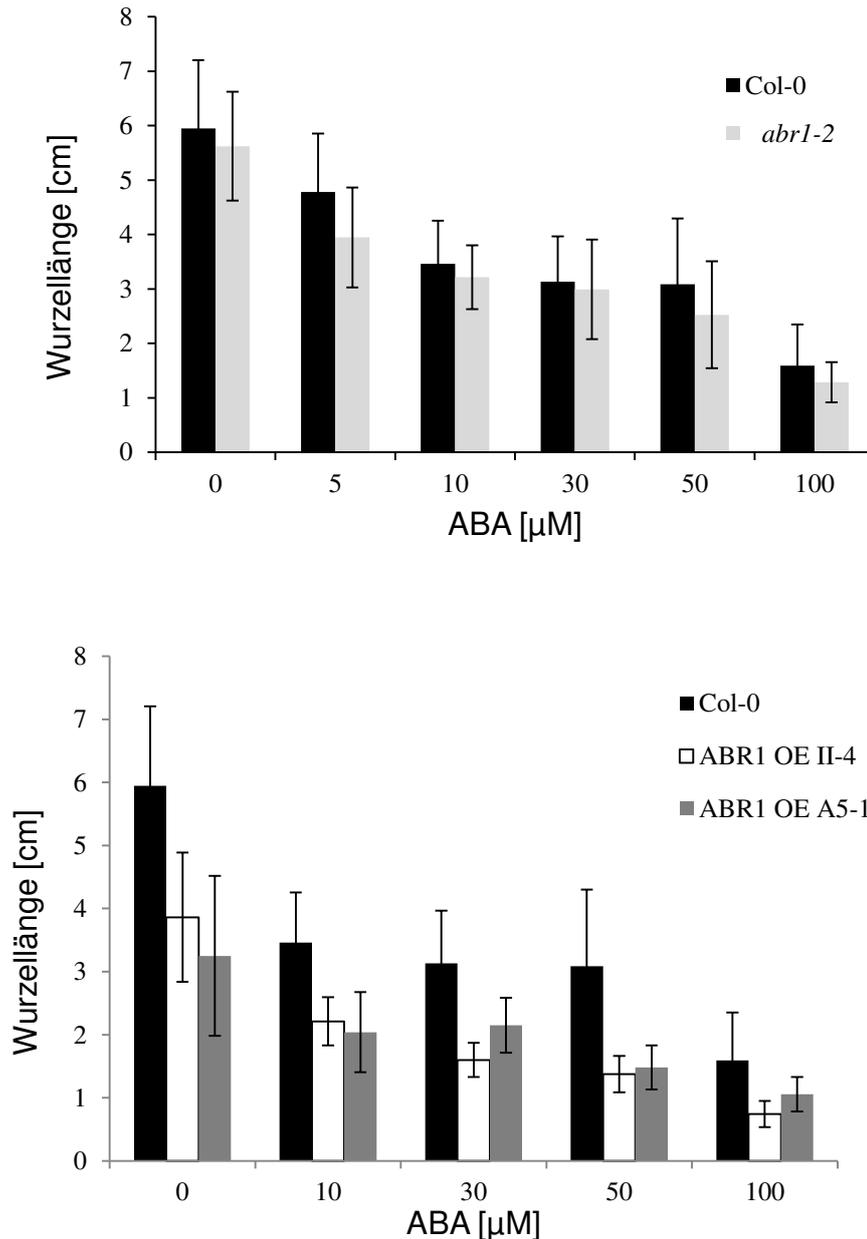


Abb.29: Auswirkung einer ABA-Behandlung auf das Wurzellängenwachstum. 4 d alte Keimlinge wurden auf ABA haltiges MS-Medium umgesetzt und nach weiteren 12 d Wachstum die Wurzellänge gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte aus zwei (**oben**) bzw. einem Experiment (**unten**) mit jeweils 7-10 Pflanzen pro Genotyp und Experiment.

2) In Bezug auf die ABA-sensitive Keimung und Keimlingsentwicklung wurde von Pandey et al. (2005) eine Sensitivität bei Wachstum auf $0,7 \mu\text{M}$ ABA festgestellt. Die Abbildungen 30 und 31 zeigen repräsentative Bilder von Wiederholungen dieser Experimente mit 2 Wochen (Abb.30) bzw. etwa 1 Monat alten Samen (Abb.31), eine Auszählung keimender Samen pro Zeit, wie von Pandey et al. (2005) präsentiert, wurde nicht durchgeführt.

Die hier dargestellten Bilder stehen aber in Widerspruch zu den von Pandey et al. (2005) präsentierten Abbildungen zur Keimlingsetablierung. Es ist nämlich kein Unterschied zwischen *abr1-2* und Col-0 ersichtlich.

Das Alter der Samen spielt eine große Bedeutung bei der Untersuchung von Keimung und Keimlingsentwicklung. Die ABA-Sensitivität ist höher in jungen Samen und nimmt beispielsweise auch bei alternden *prt6-1* oder *ged1* Samen ab. Derartige Experimente sind aus diesem Grund irreführend, wenn nicht gleichaltrige Samen verwendet werden. Ob dies von Pandey et al. (2005) berücksichtigt wurde geht aus der Publikation nicht hervor, könnte aber für die in dieser Publikation beobachteten Unterschiede verantwortlich sein. Die in Abb.30 und Abb.31 dargestellten Experimente wurden mit Col-0 und *abr1-2* Samen des gleichen Alters durchgeführt.

3) Die Transkriptakkumulation ABA-responsiver Gene im Vergleich von Col-0, *abr1-2* und zwei starken Überexpressionslinien zeigte keine eindeutigen Unterschiede und vor allem keine Ähnlichkeiten zu den Daten von Pandey et al. (2005) (Abb.32).

Zusätzlich wurde der Transkriptlevel ABA-responsiver Gene bei transienter Überexpression von ABR1 in Protoplasten mit und ohne ABA Behandlung untersucht und kein Unterschied zur Kontrolle (Überexpression von GFP) festgestellt (Abb.24).

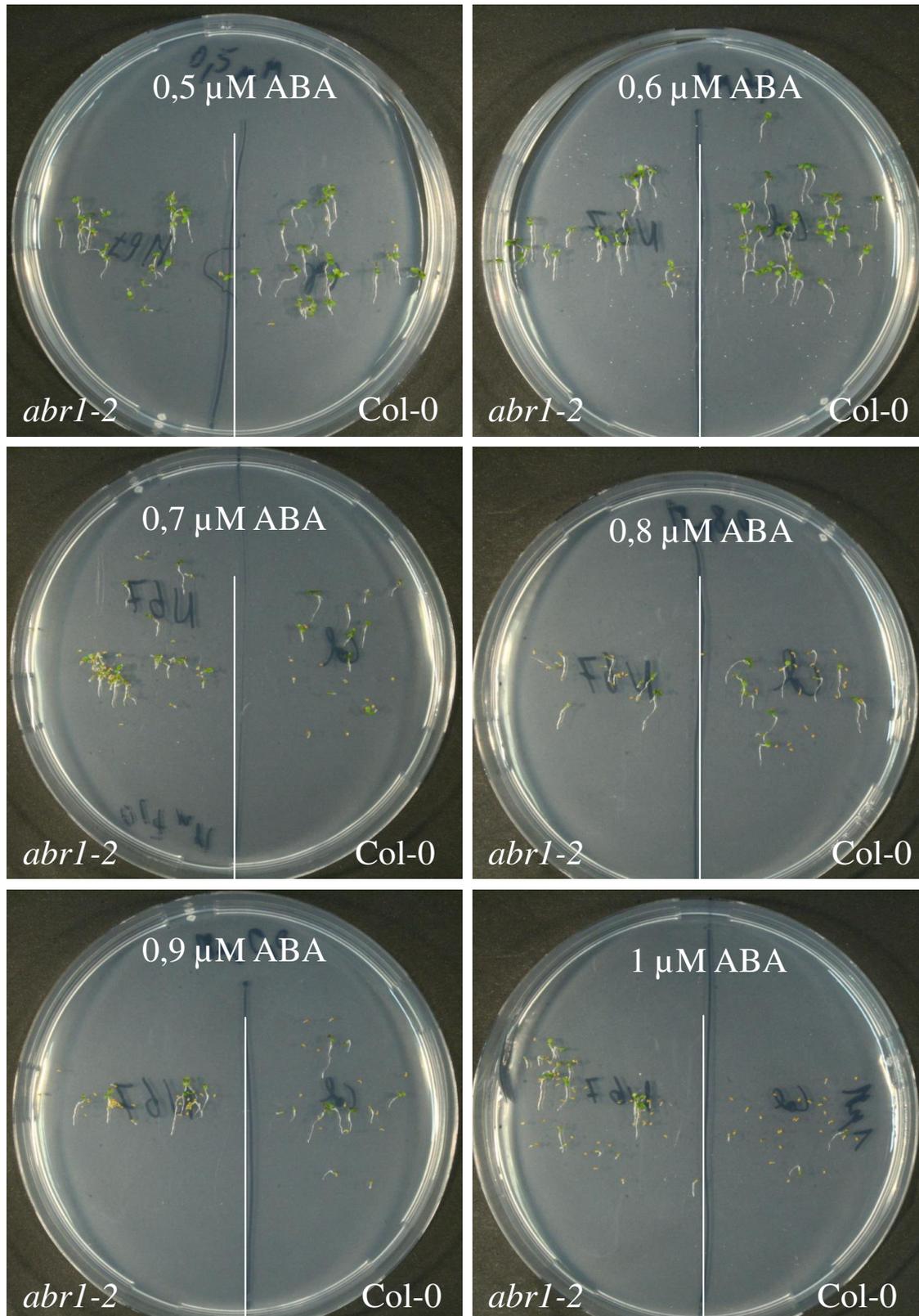


Abb.30: Vergleich der Keimlingsentwicklung von *abr1-2* und Col-0 nach Wachstum für 7 d auf MS-Medium mit verschiedenen ABA-Konzentrationen. Das Experiment wurde 2 Wochen nach Samenernte durchgeführt.

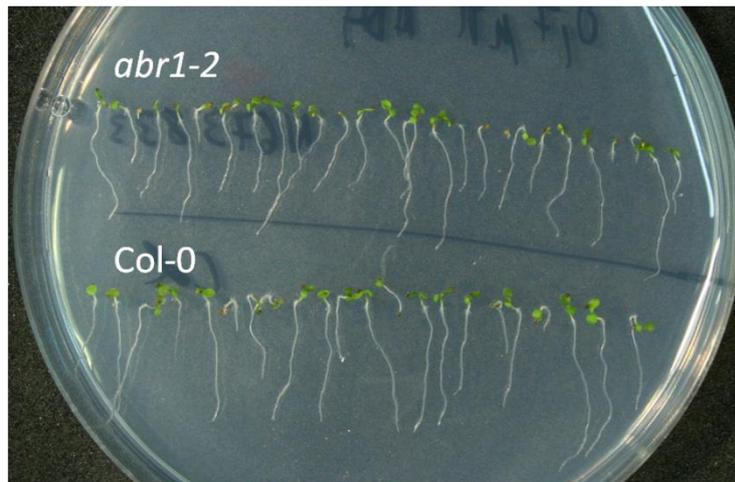


Abb.31: Vergleich der Keimlingsentwicklung von *abr1-2* und Col-0 nach Wachstum für 7 d auf MS-Medium mit $0,7 \mu\text{M}$ ABA. Das Experiment wurde etwa 1 Monat nach Samenernte durchgeführt.

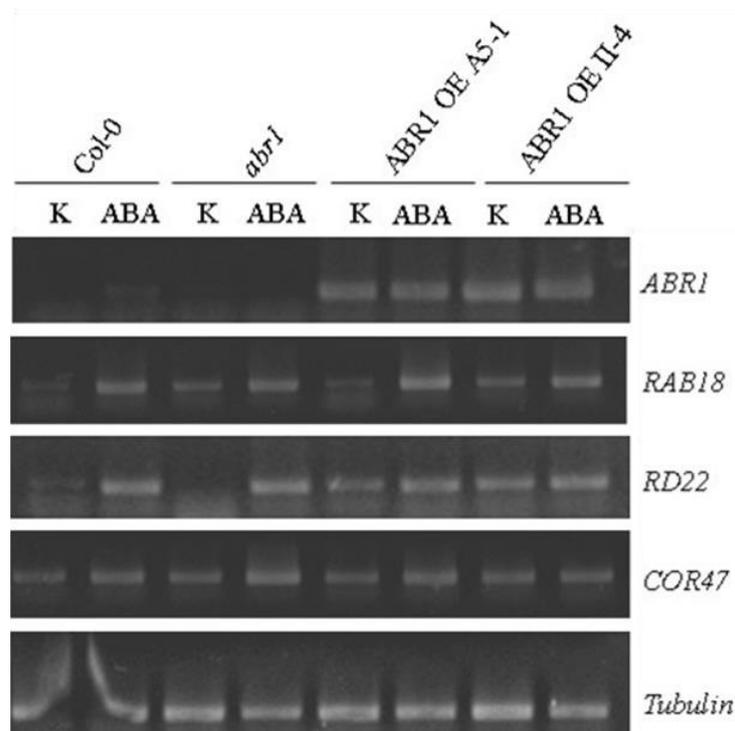


Abb.32: Vergleich der Transkriptakkumulation ABA-responsiver Gene nach ABA-Behandlung in Wildtyp, *abr1-2* und zwei ABR1 Überexpressionslinien. 7 d alte Keimlinge wurden mit 2 ml $100 \mu\text{M}$ (ABA) oder Wasser (K) besprüht und für 4 h in einer Lichtkammer inkubiert. Das Experiment wurde zweimal wiederholt.

Experimente zur Keimlingsentwicklung der Überexpressionslinie ABR1 OE II zeigten wiederholt eine ABA-Sensitivität auf 0,3 bzw. 0,5 μM ABA (Abb.33), was ursprünglich der Grund für die Herstellung einer *prt6-1xabr1-2* Doppel-KO Mutante war. Diese Sensitivität konnte aber in anderen Überexpressionslinien nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Doppelknockoutmutante *prt6-1xabr1-2* zeigte bei Keimung auf 0,1 μM ABA keinen Unterschied zu *prt6-1* (Abb.34).

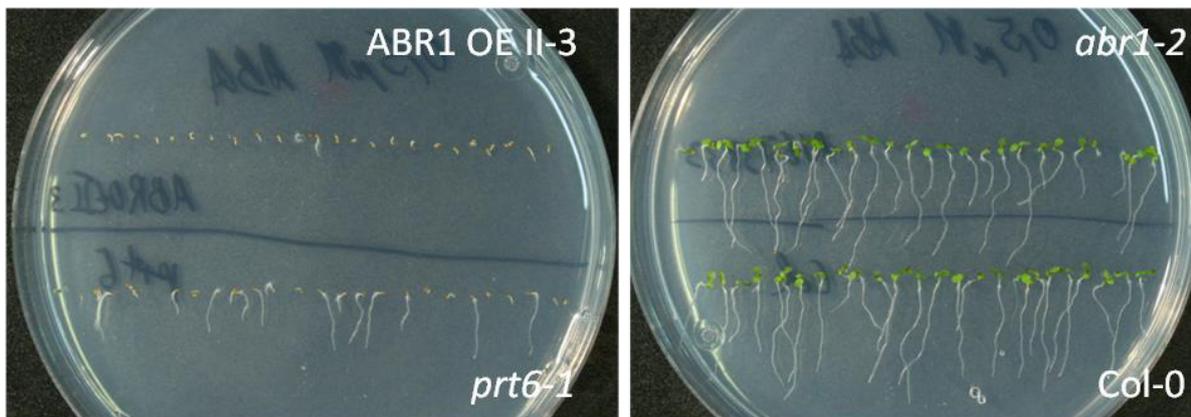


Abb.33: Keimlingsentwicklung nach 7 d Wachstum auf MS-Medium mit 0,5 μM ABA. Das Alter der Samen der verschiedenen Genotypen war in diesem Experiment unterschiedlich, es ist aber selbst in sehr jungen Wildtysamen bei dieser ABA-Konzentration niemals ein Anhalten der Keimlingsetablierung beobachtet worden (vergleiche Abb.30). Das Experiment wurde dreimal unabhängig mit gleichem Ergebnis wiederholt.



Abb.34: Keimlingsentwicklung von *abr1-2* (oben) und einer *abr1-2prt6-1* Doppel-KO Linie (unten) nach 10 d Wachstum auf MS-Medium mit 0,1 μM ABA.

3.2.3 LOB domain containing protein 41 (LBD41)

LBD41 enthält eine vorhergesagte EAR-Domäne und ist damit ein Repressor der Transkription (Mitsuda et al. 2009). *LBD41* zählt zu den *Core 49* Hypoxie-responsiver Gene (Abb. 35, Mustroph et al. 2009), ist in *prt6*-Mutanten bzw. *ate1ate2* hochreguliert (Choy et al. 2008, Gibbs et al. 2011) und sein Promotor wahrscheinlich ein direktes Ziel der Transkriptionsfaktoren RAP2.2, RAP2.12 und RAP2.3 (Klecker et al. 2014, Philipp Gasch unveröffentlicht).

Es wurden Überexpressionslinien hergestellt und eine T-DNA-Insertionslinie untersucht, die aber keine erkennbaren Phänotypen zeigten, weder im Wachstum noch in der Expression Hypoxie-responsiver Gene (Daten nicht gezeigt).

Ein *SAAB-assay* (*selection and amplification binding assay*) wurde durchgeführt, mit dem Ziel, von einer DNA-Bindungssequenz auf mögliche Zielpromotoren von LBD41 zu schließen. Dafür wurden die ersten 381 bp der kodierenden Sequenz von LBD41 verwendet, die die vorhergesagte DNA-Bindungsdomäne enthalten. Insgesamt hat das exprimierte Protein mit T7 und His₆ Epitop ein Molekulargewicht von 17,63 kDa.

Nach der Expression in *E. coli* befand sich ein Großteil des transgenen Proteins in der unlöslichen Fraktion, bei kurzer Expressionsdauer (2 h) konnte aber ausreichend lösliches Protein für eine Aufreinigung extrahiert werden (Abb. 36).

Der *SAAB-assay* führte nicht zur Entdeckung einer überzeugenden Consensus-Sequenz; trotzdem ist ein bestimmtes Muster erkennbar: In 16 sequenzierten Sequenzen enthält jede Zufallssequenz in 5'-3' Richtung zu mindestens 40% Desoxythymidin (dT), während der Desoxyadenin (dA)-Anteil maximal 32% beträgt. Desoxyguanin (dG) ist mit Ausnahme einer Sequenz stets häufiger als Desoxycytosin (dC). Insgesamt beinhalten die 16 Zufallssequenzen (zwischen den Primerbindestellen) 408 dNTPs, davon sind 224 dT, 81 dA, 76 dG und 27 dC (Tabelle 2).

Da der *SAAB-assay* nicht das erwünschte Ergebnis lieferte, müssten eine Wiederholung des Experiments und verschiedene Kontrollen durchgeführt werden, z.B. mit bekannten Transkriptionsfaktoren und Bakterienlysaten ohne Expression eines transgenen Proteins. Es konnten aber aus Zeitgründen keine weiteren Versuche durchgeführt werden.

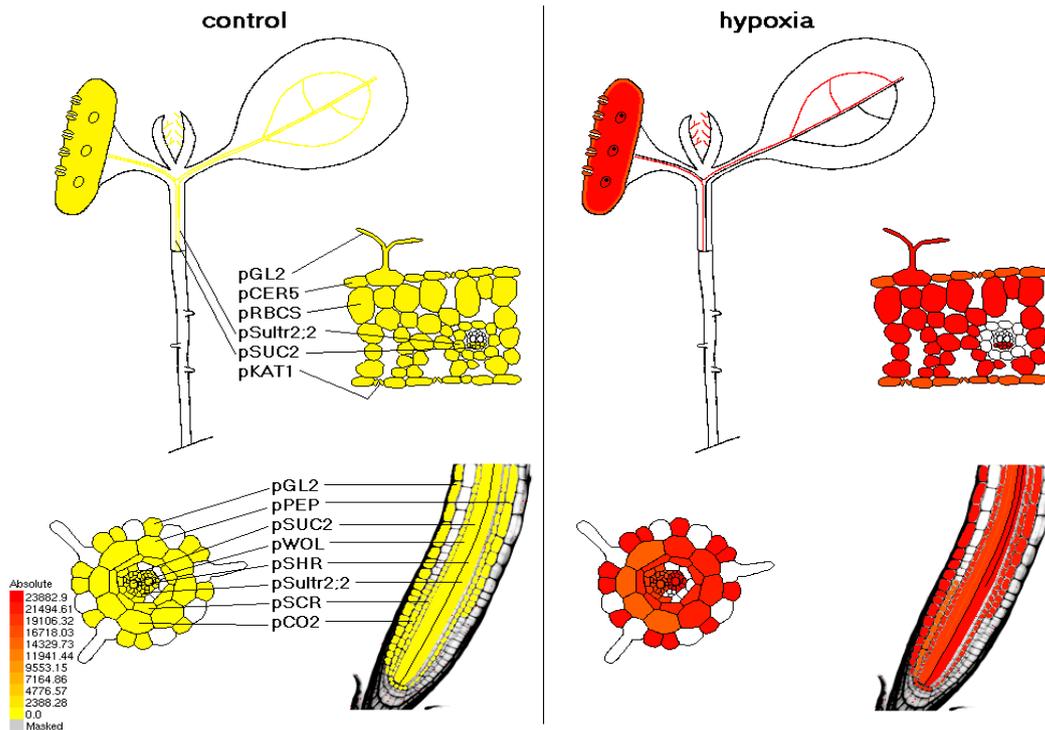


Abb.35: Expression von *LBD41* bei Hypoxie und unter Kontrollbedingungen in verschiedenen Zelltypen (<http://efp.ucr.edu>, Mustroph et al. 2009).

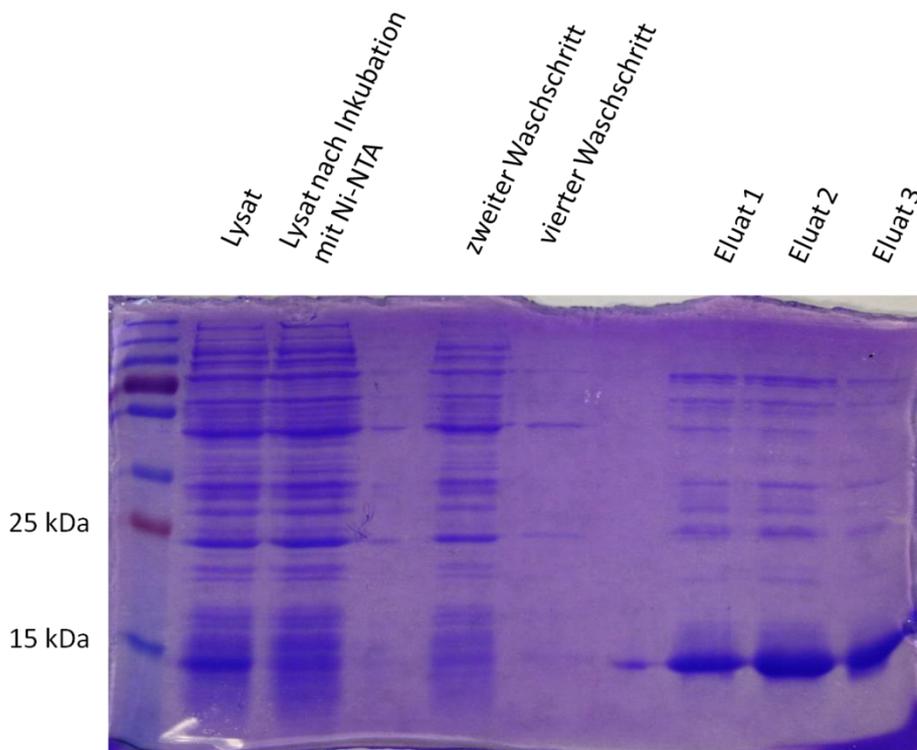


Abb.36: Coomassie-Färbung eines SDS-Gels mit Proben aus verschiedenen Aufreinigungsschritten von *LBD41* mit Ni-NTA aus einem Lysat überexprimierender *E.coli* Zellen.

Tabelle 3: Ergebnis des *SAAB-assays* mit der vorhergesagten DNA-Bindungsdomäne von LBD41. Dargestellt sind 16 erfolgreich sequenzierte Sequenzen, die nach 6 facher Selektion und Anreicherung in Vektoren kloniert worden waren. Diese bestehen aus Primer Bindestellen, die eine Zufallssequenz flankieren. Auf der rechten Seite sind die Anzahl der Basenpaare der von den Primerbindestellen flankierten Sequenz und eine Auszählung der einzelnen Nukleotide angegeben.

Primer-Bindestelle fw	Sequenzierte Zufallssequenzen	Primer-Bindestelle rev	Länge der Sequenz [bp]	T	A	C	G
GAGAGGATCCAGTCAGCAT(T)	CTTGTTCCAAATTTGAGTTATAGAA	CTCAGCCTCGAGTCGACGCGC	25	10	8	3	4
GAGAGGATCCAGTCAGCATG	ATGTGTGATGTACGTAGTGTATTGAGTGTT	CTCAGCCTCGAGTCGACGCGC	32	15	6	1	10
GAGAGGATCCAGTCAGCATG	TGGGGTATTTGCTGTGTTTTGTTATT	CTCAGCCTCGAGTCGACGCGC	26	15	2	1	8
GAGAGGATCCAGTCAGCATG	TTTTTTTATTCTTTATTTTATGTGAT	CTCAGCCTCGAGTCGACGCGC	26	19	4	1	2
GAGAGGATCCAGTCAGCATG	TATTGTTTTACTATGTTTGTATTT	(T)TCAGCCTCGAGTCGACGCGC	25	17	4	1	3
GAGAGGATCCAGTCAGCATG	TGATGTTATTAGTTGTTTATTAAAT	CTCAGCCTCGAGTCGACGCGC	25	14	7	0	4
GAGAGGATCCAGTCAGCATG	TGAGTCGTATTATTTCTCTTATTCG	CTCAGCCTCGAGTCGACGCGC	25	13	4	4	4
GAGAGGATCCAGTCAGCATG	TGTTAAGATTAATTATGTTATAGGT	CTCAGCCTCGAGTCGACGCGC	25	12	8	0	5
GAGAGGATCCAGTCAGCATG	TTTTAATACTACTTTTTTTTTTTTT	CTCAGCCTCGAGTCGACGCGC	24	18	4	2	0
GAGAGGATCCAGTCAGCATG	ATATTTTTTATTTTTTTTTTTGTA	CTCAGCCTCGAGTCGACGCGC	25	18	6	0	1
GAGAGGATCCAGTCAGCATG	GTTACATGTTTTGGTATATCAGATG	CTCAGCCTCGAGTCGACGCGC	25	11	6	2	6
GAGAGGATCCAGTCAGCATG	TCAGCAGGTGTTGTTATTGTTGTAC	CTCAGCCTCGAGTCGACGCGC	25	11	4	3	7
GAGAGGATCCAGTCAGCATG	ACATTAATGCTCTCTGTTTGTGTGT	CTCAGCCTCGAGTCGACGCGC	25	12	4	4	5
GAGAGGATCCAGTCAGCATG	TCATACATTGTGCTTATGTGTTGTA	CTCAGCCTCGAGTCGACGCGC	25	12	5	3	5
GAGAGGATCCAGTCAGCATG	TGTTTATGAATGGTATCTTTGTATA	CTCAGCCTCGAGTCGACGCGC	25	13	6	1	5
GAGAGGATCCAGTCAGCATG	ATGTTGTGTACTGGTTTTAGTGTT	CTCAGCCTCGAGTCGACGCGC	25	14	3	1	7
			408	224	81	27	76

Die Charakterisierung von LBD41 wurde in unserer Arbeitsgruppe von Philipp Gasch und Fabian Zech weitergeführt, deren Versuche neue Hinweise auf eine Funktion von LBD41 bei der Regulation des Promotors von PCO1 (At5g15120) liefern. Deren Daten sind daher in Abb.37 dargestellt. PCO1 ist eine Cysteinoxidase, die eine Rolle bei der Cysteinoxygenierung in Zusammenhang mit dem N-end rule pathway spielt und wird bei Hypoxie verstärkt exprimiert (Weits et al. 2014). Der Promotoraktivierungsassay in Arabidopsis-Protoplasten führte bei einer Überexpression der mit einem N-terminalen HA-Epitop versehenen Transkriptionsfaktoren RAP2.2 und RAP2.12 zu einer signifikant erhöhten Aktivität des PCO1-Promotors (fLUC steht unter der Kontrolle des PCO1 Promotors, rLUC wird durch einen 35S Promotor konstitutiv exprimiert und dient zur Normalisierung). Die Promotoraktivität von PCO1 wurde aber bei einer gemeinsamen Expression der genannten Transkriptionsfaktoren mit LBD41 signifikant verringert. Als Kontrolle wurde die Aktivierung des Promotors von At5g20790 durch PHR1 und PHL1 genutzt (Klecker et al. 2014). Eine Co-Expression mit LBD41 führte hier nicht zu einer Verringerung der Promotoraktivität.

Zusätzlich wurde die EAR-Domäne von LBD41 durch eine VP16-Domäne ersetzt, also eine Transkription verändernde Domäne durch eine Transkription aktivierende Domäne ersetzt. Eine Überexpression von LBD41:HA:VP16 führte zu einer signifikant erhöhten Aktivierung des PCO1 Promotors.

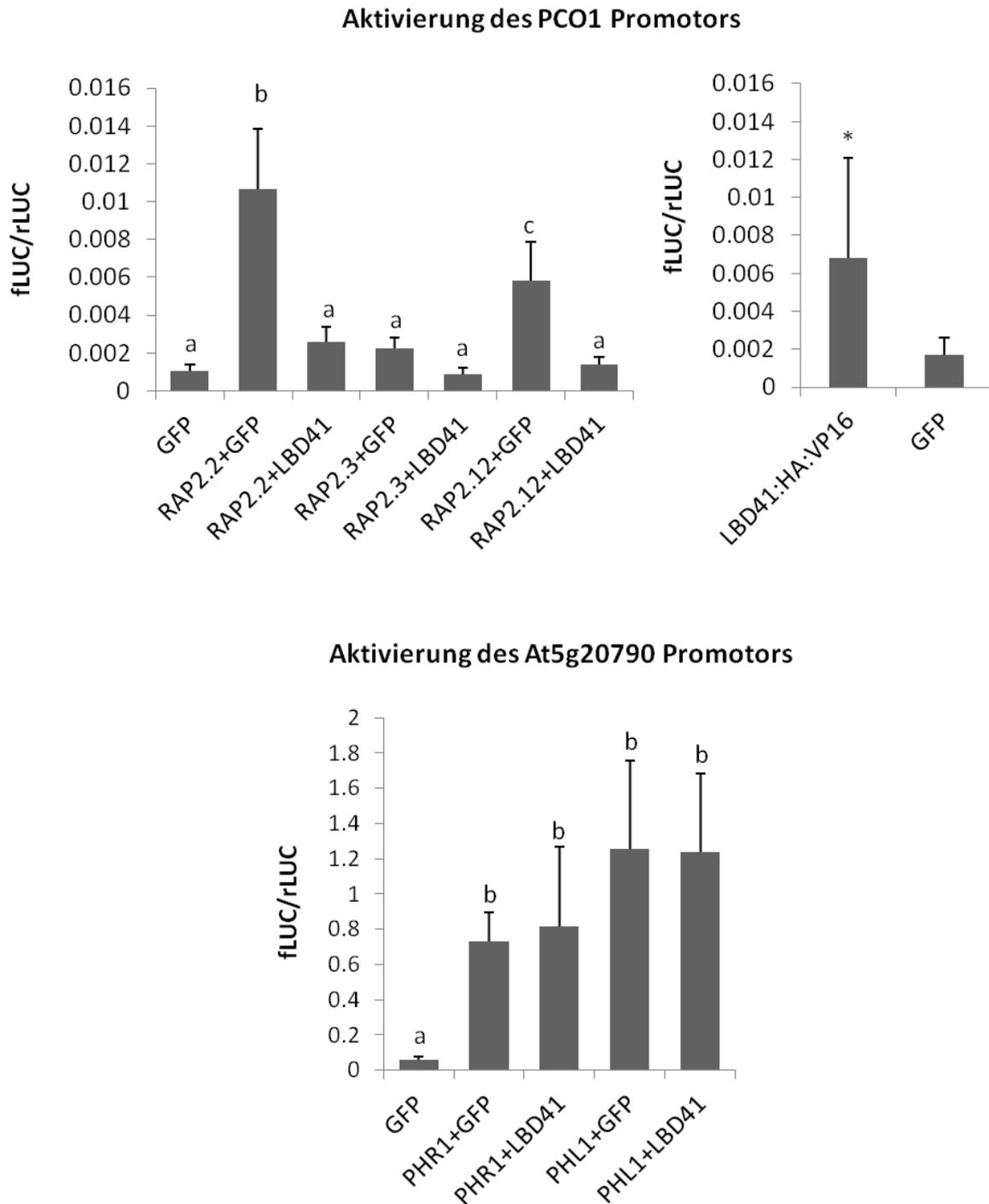


Abb.37: LBD41 verhindert die Aktivierung des Promotors von *PCO1* bei einer gemeinsamen Überexpression mit RAP2.2 oder RAP2.12 (**oben links**). Bei Austausch der EAR-Domäne von LBD41 mit einer VP16-Domäne führt eine Überexpression dieses Konstruktes zu einer Aktivierung des PCO1 Promotors (**oben rechts**). LBD41 hat dagegen keinen Einfluss auf die Aktivierung des At5g20790 Promotors durch PHR1 oder PHL1 (**unten**). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung von drei Wiederholungen der Experimente mit jeweils zwei technischen Replikaten. Für die statistische Auswertung wurde eine *one-way* ANOVA mit Tukey-Test bzw. ein t-Test verwendet.

3.2.4 Probleme bei der Detektion von transgenen Proteinen im Westernblot

Ein grundsätzliches, ungelöstes Problem bei allen stabilen Überexpressionslinien, die in dieser Arbeit präsentiert wurden und unter Verwendung des gleichen Vektors (p35S:HF-GATA) hergestellt worden waren, besteht darin dass das entsprechende Protein in Westernblots trotz fusioniertem His₆/Flag Epitop bisher niemals nachgewiesen werden konnte.

Seltsamerweise ist es möglich mit denselben Vektoren, die für die Herstellung der Überexpressionslinien verwendet worden waren, Tabakblätter zu infiltrieren, das transgene Protein zu extrahieren und im Westernblot mit α -Flag Antikörpern zu detektieren (Abb.38). Obwohl diverse stabile Überexpressionslinien eindeutige und oft. vorhersagbare Phänotypen zeigten (z.B. eine erhöhte ADH-Aktivität in ERF-VII Überexpressionslinien, Kapitel 3.2.1), Proteine also funktionell vorhanden sein müssen, ist es niemals gelungen diese im Westernblot aus *Arabidopsis*-Extrakten nachzuweisen.

In einer Überexpressionslinie, die mit einem ähnlichen Plasmid in Zusammenhang mit einer Publikation von Mustroph et al. 2009 hergestellt worden war (bevor dieses nach Bayreuth importiert wurde) und als Positiv-Kontrolle zur Verfügung stand, konnte das transgene Protein mit Flag Antikörper detektiert werden (Linie 35S:RPL18-HF-GFP, Abb. 38), jedoch mit stark verringertem Signal im Vergleich zu früheren Westernblots (Daten nicht gezeigt).

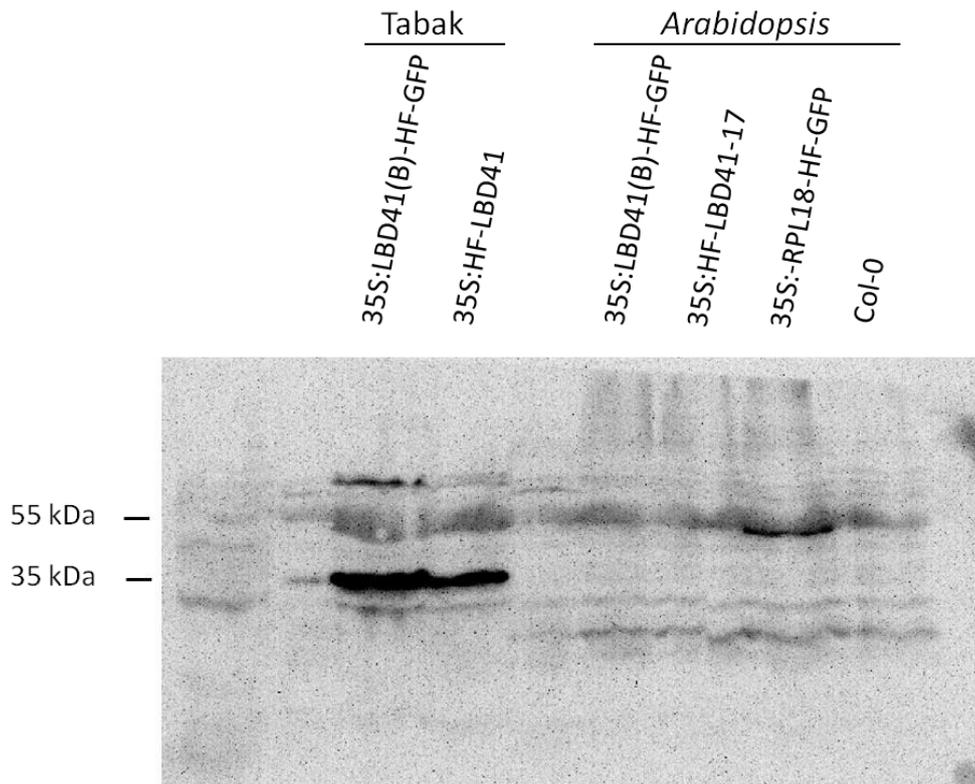


Abb.38: Westernblot von Überexpressionslinien unter Verwendung eines α -Flag Antikörpers. Die gleichen Plasmide, die für die Herstellung der in dieser Arbeit beschriebenen stabilen Überexpressionslinien verwendet worden waren (35S:HF-GATA, 35S:GATA-HF-GFP) wurden in Tabak infiltriert. In Tabak, aber nicht in *Arabidopsis*-Überexpressionslinien, in denen zuvor eine hohe Transkriptakkumulation des Transgens bestätigt worden war (Daten nicht gezeigt) sind Banden sichtbar. 35S:RPL18-HF-GFP ist eine Überexpressionslinie, die unter Verwendung eines ähnlichen Plasmids in Zusammenhang mit einer Publikation von Mustroph et al. (2009) hergestellt worden war. Hier ist eine schwache Bande erkennbar, die der erwarteten Größe des Proteins entspricht. Das (B) in 35S:LBD41(B)-HF-GFP symbolisiert eine verkürzte Version des LBD41 Proteins (ohne EAR-Domäne). Daher laufen die Banden der Proteine mit und ohne GFP-Fusion auf etwa der gleichen Höhe. Dies hat in diesem Zusammenhang keine weitere Bedeutung.

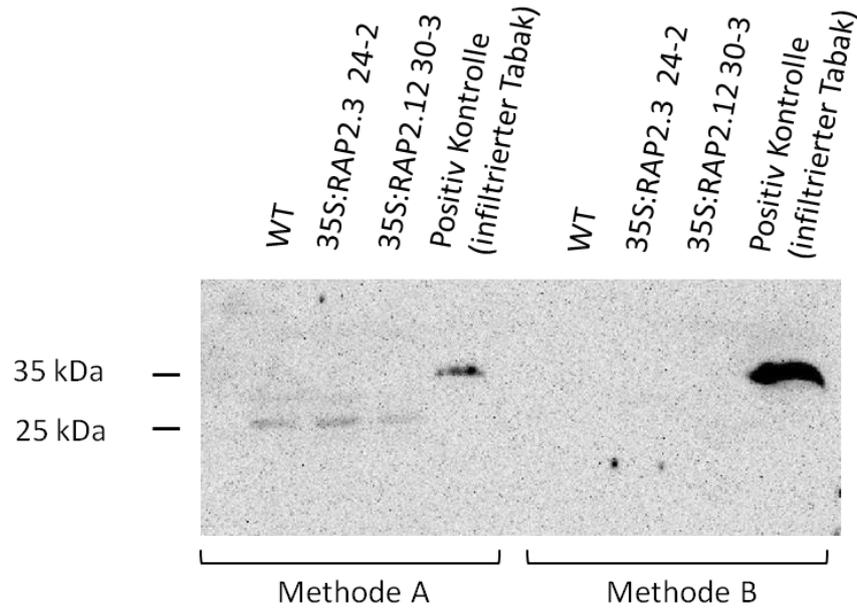


Abb.39: Westernblot mit α -Flag Antikörper von Proteinextrakten aus dem Wildtyp, stabilen Überexpressionsline von ERFVII-Transkriptionsfaktoren, die eine erhöhte ADH-Aktivität aufweisen (*Arabidopsis thaliana*) und infiltriertem Tabak (mit 35S:HF-LBD41). Methode A: Extraktion des löslichen Proteins vor Zugabe des Ladepuffers, Methode B: Direkte Zugabe des Ladepuffers zu zermörsertem Pflanzenmaterial.

4 Diskussion

4.1 Die Bedeutung des N-end-rule pathway für die Antwort auf Sauerstoffmangel

Die Kartierung der EMS-Mutante *ged1* wurde aufgrund der differentiellen Regulation Hypoxie-responsiver Gene bei Normoxie zu einer Zeit begonnen, als Regulationsmechanismen für die Expression Hypoxie-responsiver Gene weitgehend unbekannt waren. Es wurde in *ged1* eine Mutation in dem Gen *PRT6* gefunden, das eine Ubiquitin-Ligase kodiert, deren Funktion bei der Erkennung bestimmter N-degrons im Zusammenhang mit dem *N-end-rule pathway* schon länger bekannt war (Garzon et al. 2007, Graciet et al. 2009, Holman et al. 2009). Die Bedeutung des *N-end-rule pathway* bei der Wahrnehmung und Anpassung an Hypoxie wurde aber erst später und zwar kurz vor Beendigung der Kartierung von *ged1*, unabhängig von zwei anderen Arbeitsgruppen entdeckt und publiziert (Licausi et al. 2011, Gibbs et al. 2011).

In allen Fällen führte eine Auswertung von Transkriptom-Daten, nämlich das Transkriptlevel Hypoxie-responsiver Gene zu dieser Entdeckung:

Gibbs et al. (2011) wurden durch Microarray-Daten der *PRT6* T-DNA Insertionslinie *prt6-1* auf die Regulation Hypoxie-responsiver Gene aufmerksam und entdeckten daraufhin die sauerstoffabhängige Destabilisierung von ERF-VII Transkriptionsfaktoren nach Expression in Kaninchen Retikulozyten.

Licausi et al. (2011) beobachteten, dass eine Überexpression von ERF-VII-Transkriptionsfaktoren nur bei Hypoxie zu einer verstärkten Transkription Hypoxie-responsiver Gene führt, die aber bei einer Modifikation des N-terminus auch bei Normoxie stattfindet (Sasidharan und Mustroph 2011).

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde etwas verspätet, veranlasst durch Microarray Daten, *ged1* als *prt6*-Mutante identifiziert.

Viele Phänotypen transgener Pflanzen, in denen der N-end-rule pathway inaktiviert wurde, sind bereits vor oder während der Anfertigung dieser Arbeit in der Literatur beschrieben worden (Yoshida et al. 2002, Garzon et al. 2007, Graciet et al. 2009, Holman et al. 2009, Licausi et al. 2011, Gibbs et al. 2011, Gibbs et al. 2014, Weits et al. 2014). In Bezug auf die Bedeutung des *N-end-rule pathway* bei der Anpassung an Hypoxie gibt es viele Hinweise darauf, dass eine Funktion darin besteht, das Fermentationspotential zu erhöhen.

Eine Überexpression von HRE1 führt zu erhöhter PDC und ADH Aktivität sowie erhöhter Ethanol-Produktion bei einer Hypoxiebehandlung; die Doppel-KO Linie *hre1hre2*, aber nicht die Einzel-KO-Linien, zeigte eine reduzierte Ethanolproduktion bei Hypoxie (Licausi et al. 2010). Überexpressionslinien von HRE1 oder HRE2 zeigten Toleranz in einem Anoxie-Überlebensexperiment (7 d alte Keimlinge wurden für 10 h auf MS-Medium mit 1% Saccharose einer Anoxie-Behandlung ausgesetzt), *hre1hre2* ist dagegen intolerant (Licausi et al. 2010). Außerdem zeigen HRE1 RNAi Linien eine geringere Transkriptakkumulation von *PDC1*, *PDC2*, *ADH*, *SUS1* und *SUS4* (Yang et al. 2011).

Darüber hinaus ist auch RAP2.12 in der Lage das Transkriptlevel dieser Gene zu erhöhen (Licausi et al. 2011), zumindest *PDC1* und *ADH* werden auch von RAP2.2 und RAP2.3 reguliert (Abb.23).

Folgerichtig sind diese Gene für Fermentation und Zuckerabbau auch in *prt6* und *ate1ate2* Mutanten hochreguliert und zählen zu den Genen, die in allen untersuchten Zelltypen bei Hypoxie verstärkt exprimiert werden (*core 49*, Mustroph et al. 2009).

Es existieren in der Literatur Überlebensexperimente mit PDC Überexpressionslinien (*Arabidopsis thaliana*), die belegen, dass eine höhere PDC-Aktivität alleine schon Toleranz verleihen kann (Shiao et al. 2002, Ismond et al. 2003). Demzufolge ist die höhere Toleranz der beschriebenen *N-end-rule pathway* Mutanten in bestimmten Überlebensexperimenten nicht verwunderlich, vor allem dann, wenn ein Überschuss an Saccharose supplementiert wird.

Eine erhöhte Fermentationsrate kann aber unabhängig von der *PDC*- und *ADH*-Expression nicht bei Normoxie, sondern erst unter stark Bedingungen gemessen werden (Geigenberger 2003, Yang et al. 2011). Darüber hinaus ist unklar, wie dieser Übergang von oxidativer Phosphorylierung und Fermentation reguliert wird.

Eine erhöhte Expression von Fermentationsgenen wurde beispielsweise auch in SUB1 Reis beschrieben, obwohl hier ein reduzierter Energieverbrauch und eine geringere Fermentationsrate in Zusammenhang mit einer *Quiescence*-Strategie entscheidend für die Toleranz im Vergleich zu anderen Varietäten ist (Fukao et al. 2006).

In dieser Arbeit werden erstmals Hinweise dafür präsentiert, dass eine Inaktivierung des *N-end-rule pathway* in *prt6*-Mutanten, anders als durch die verstärkte Expression von Genen für Zuckerabbau und Fermentation zu erwarten wäre, zu einem geringeren Verbrauch von Kohlenhydraten in Rosettenblättern bei kompletter Überflutung führt, was sich in der Mutante *ged1* durch eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit von Dunkelheit bei Überflutung im Vergleich zu einer Luftbehandlung widerspiegelt.

In Bezug auf die vorherrschende Diskussion, ob oder wie die Respiration und der Energiehaushalt bei Hypoxie reguliert werden, liefern diese Ergebnisse dadurch neue Einsichten, dass sich eine Inaktivierung des *N-end rule pathway* offensichtlich auf den Verbrauch von Energieressourcen auswirkt und damit zwangsläufig auch die Respirationsrate beeinflussen muss (unter dem Vorbehalt, dass sich von den gemessenen Stärke und Zuckergehalten auf eine allgemeine Reduktion des Verbrauchs von Energieressourcen schließen lässt). Dies wird im Folgenden näher diskutiert.

4.2 *ged1* besitzt ein nicht-funktionelles *PRT6* Gen

Durch die Kartierung von *ged1* konnte eine Mutation in dem Gen *PRT6* für den verwendeten Selektionsphänotyp (ABA-Sensitivität) verantwortlich gemacht werden. Interessanterweise handelt es sich bei dieser Mutation nicht wie für eine EMS-Behandlung üblich, um einen einzelnen Nukleotidaustausch, sondern einen Austausch eines größeren Chromosomenabschnittes zwischen Chr.3 und Chr.5. Obwohl selten, sind ähnliche Fälle beschrieben worden (Moutschen et al. 1964, Natarajan et al. 1964, Cattanaach et al. 1968, Sega 1984).

Dass das *PRT6* Allel von *ged1* nicht funktionell ist, wurde durch eine Kreuzung zwischen *prt6-1* und *ged1* erwiesen, deren F1 Generation wie die Eltern eine ABA-sensitive Keimlingsetablierung aufweist (Abb.7).

Von dem Austausch von Chromosomenteilen in *ged1* ist auch das Gen *MYB3R3* betroffen. Die Auswirkungen eines Knockouts dieses Transkriptionsfaktors oder seine Funktion sind unbekannt. Die DNA-Bindungsdomäne hat aber hohe Ähnlichkeit zu *MYB3R5*. Es handelt sich daher vermutlich um redundante Gene (Haga et al. 2007).

Das Segregationsverhalten der F2 Generation von *col-0xged1* folgt keinem statistischen Verteilungsmuster und es existieren keine Pflanzen, die in unmittelbarer Umgebung von *PRT6* und *MYB3R3* auf Chr.3 homozygot *ged1* und Chr.5 homozygot Col-0 sind oder umgekehrt. Dies kann mit dem aufgrund des Chromosomenabschnittsaustausches bedingten Fehlen einer unbestimmten Anzahl von Genen in diesem Genotyp erklärt werden.

Den bisherigen Ergebnissen zufolge sollte der DNA-Austausch auf Chr.3 auf eine Region von maximal 500.000 bp begrenzt sein, da ansonsten außerhalb dieser kartierten Region auf Chr.3 keine F2-Pflanzen (*ged1xcol-0*) mit dem Genotyp Chr.3:het/Chr.5:*ged1* existieren dürften, die in der F3 Generation unter Verwendung derselben Kartierungsmarker auf Chr.3 eine normale Segregation und Individuen mit dem Genotyp Chr.3:Col-0/Chr.5:*ged1* hervorbringen. (Wäre nämlich DNA in den Bereichen außerhalb der kartierten Region in *ged1* auf Chr.5 übertragen

worden, wo erwiesenermaßen in dem besagten F2-Individuum keine Col-0 DNA in Umgebung von *PRT6* existiert, dann wäre es nicht möglich, homozygot Col-0 auf Chr.3 zu kartieren.) (Kapitel 3.1.1)

Das Ausmaß des Chromosomenaustausches, in welcher genomischen Umgebung dieser stattgefunden hat oder ob noch weitere Gene in ihrer Funktion beeinträchtigt sind, ist noch ungeklärt und wird im Moment nicht weiter untersucht.

Die Sequenzierung der Gene *ATE1* und *ATE2* zeigte, dass der Ws Ökotyp anders als der Col-0 Ökotyp nur ein funktionelles *ATE* Gen besitzt, nämlich *ATE1*. Anhand einer Analyse der Aufspaltung der ABA-Sensitivität in der F2 Generation einer Kreuzung zwischen Ws und *ate1ate2* wurde dies bestätigt, indem ein Segregationsverhältnis von etwa 3:1 (wildtypisch:sensitiv) beobachtet worden war.

Es existiert in der Literatur bereits eine Charakterisierung der Mutante *dls1*, die in einem Wassilewskija-Hintergrund vorliegt und als *ate1* KO-Mutante identifiziert wurde. Ähnlich wie in dieser Arbeit anhand von *prt6*-Mutanten gezeigt wurde (Abb.19), weist sie eine verzögerte Blattseneszenz auf (Yoshida et al. 2002). Im Ökotyp Col-0 müssen dagegen für einen starken Phänotyp sowohl *ATE1* und als auch *ATE2* ausgeschaltet werden (Graciet et al. 2009, Holman et al. 2009).

4.3 Überlebensexperimente

Die in dieser Arbeit dargestellten Überlebensexperimente wurden in Zusammenarbeit mit Laurentius Voeselek und Rashmi Sasidharan an der Universität Utrecht durchgeführt, d.h. am gleichen Ort und unter exakt gleichen Bedingungen wie die von Vashisht et al. (2011) beschriebenen Überlebensexperimente mit 86 verschiedenen *Arabidopsis thaliana* Ökotypen. Die Daten sollten aus diesem Grund gut miteinander vergleichbar sein.

Vashisht et al. (2011) zufolge liegt die Spannweite der Lt_{50} Werte zwischen intolerantestem (Cvi-0) und tolerantestem Ökotyp (C24) bei Überflutung in Dunkelheit zwischen 4 d und 11,2 d. *Ged1* übertrifft mit einem Lt_{50} von 14,04 d den Rekordhalter C24 um knapp 3 d und ist damit mit Abstand der toleranteste jemals gemessene Genotyp. Auch der Ws Wildtyp hat mit 11,76 d einen vergleichsweise hohen Lt_{50} -Wert. Dieser Ökotyp war nicht Bestandteil der Analyse von Vashisht et al. (2011), aber die genotypisch ähnlichen Ökotypen Ws-0 und Ws-2. Diese sind ebenfalls relativ tolerant, mit Lt_{50} Werten von etwa 8,3 d und 10,3 d. Es handelt sich somit beim Ws Wildtyp unter allen 87 mit derselben Methode analysierten Ökotypen um den Tolerantesten, dessen Lt_{50} Wert von Überflutung in Dunkelheit von der Mutante *ged1* noch um etwa 2 d übertroffen wird. *Prt6-1* gehört mit einem Lt_{50} Wert von 9,98 d zwar zu den

toleranteren Genotypen und ist toleranter als sein Wildtyp Col-0 ($Lt_{50}=6,05$), hat aber einen geringeren Lt_{50} -Wert als beispielsweise der Ws Wildtyp oder Ws-2.

Überflutung unter Lichtzyklen wurde von Vashisht et al. (2011) nur anhand von 8 Ökotypen untersucht. Diese beinhalteten, auf Grundlage der Dunkel+Überflutung Experimente, als intolerant, durchschnittlich tolerant und tolerant klassifizierte Repräsentanten. Für alle Ökotypen wurde bei Überflutung unter Lichtzyklen eine längere Überlebensdauer als in Dunkelheit beobachtet, wobei aber ähnliche Toleranzunterschiede wie zuvor klassifiziert bestanden. Die Überlebensdauer von Licht+Überflutung lag zwischen Lt_{50} Werten von 16 d (Cvi-0) bis 20 d (C24). Ein Vergleich mit unseren Daten zeigt, dass beide Wildtypen innerhalb dieses Bereiches liegen. *Prt6-1* übertrifft aber mit 22.16 d den Lt_{50} Wert des tolerantesten Ökotyps um 2 d, *ged1* mit 26,34 d sogar um 6 Tage. Damit hat *ged1* einen mehr als 7 d höheren Lt_{50} Wert als sein Wildtyp und ist auch bei dieser Stressbehandlung der toleranteste jemals gemessene Genotyp.

Ein wichtiger Aspekt an diesen Überflutungsexperimenten, da er Schlussfolgerungen über Toleranzfaktoren ermöglicht, ist der Vergleich zwischen Dunkel+Überflutung und Dunkel+Luft. Dieser Vergleich wird durch die Berechnung eines sogenannten *hazard ratio* veranschaulicht, das ein Maß für den Unterschied der Sterbenswahrscheinlichkeiten zwischen den beiden Behandlungen darstellt (Vashisht et al. 2011). Ein positives *hazard ratio* ist gleichbedeutend mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zu einem bestimmten Zeitpunkt bei Überflutung zu sterben als in der Luft, ein negatives *hazard ratio* bedeutet das Gegenteil. Vashisht et al. (2011) beobachteten bei 8 von 86 Ökotypen negative *hazard ratios*. Darunter befinden sich die Ökotypen Ws-0 und Ws-2, aber nicht Col-0.

Abb.12 und Tab.2 zeigen, dass es beim Ws Wildtyp zwischen Dunkel+Luft und Dunkel+Überflutung keinen bedeutenden Unterschied der Überlebenswahrscheinlichkeiten gibt. *Ged1* ist aber einer der wenigen Genotypen, die einen höheren Lt_{50} Wert bei Dunkel+Überflutung aufweisen. Im Gegensatz dazu haben sowohl *prt6-1* als auch Col-0 positive *hazard ratios*.

Unter der Annahme, dass die Dunkel+Luft Behandlung in allen Genotypen durch Verhungern, also einem Fehlen von Energie für überlebenswichtige Prozesse zum Tod führt, muss geschlussfolgert werden, dass, wenn ein negatives *hazard ratio* besteht, i) ein verringerter Energieverbrauch bei Überflutung stattfindet und ii) die Todesursache bei Überflutung in Dunkelheit sehr wahrscheinlich ebenfalls Energiemangel ist. Bei einem positiven *hazard ratio* bestehen die beiden Möglichkeiten, dass i) Energiereserven durch Fermentation ineffizient genutzt werden und ein daraus frühzeitig entstehender

Energiemangel eher zum Tod führt oder ii) eine andere Todesursache gemessen wird. Diese Fragestellungen werden im nächsten Kapitel auf Grundlage von Stärke und Zuckermessungen diskutiert.

Es existieren bis heute drei Publikationen, in denen Hypoxie-Überlebensexperimente von *prt6*-Mutanten beschrieben werden (Gibbs et al. 2011, Licausi et al. 2011, Weits et al. 2014). Gibbs et al. 2011 begasten 7 d alte Keimlinge von *prt6-1* und einer *ate1late2* Mutante für 9 h oder 12 h mit Argon. Hierbei wurde in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen festgestellt, dass die Mutanten im Vergleich zum Col-0 Wildtyp tolerant gegen diese Stressbehandlungen sind.

Unsere Überflutungsexperimente stehen aber in Widerspruch zu den Überflutungsexperimenten von Licausi et al. (2011) und Weits et al. (2014), die eine Intoleranz von *prt6*-Mutanten nach 3,5 d kompletter Überflutung in Dunkelheit beobachteten. Hierbei wurden 5 Wochen alte, auf Erde angezogene *prt6* T-DNA Insertionslinien in Ws bzw. Col-0 Hintergründen (*prt6-6* bzw. *prt6-2*, siehe Tab.4) in scheinbarer Ähnlichkeit zu unseren Experimenten, einer Überflutungsbehandlung mit anschließender zweiwöchiger Erholungsphase ausgesetzt. Gleichzeitig führte diese Behandlung dazu, dass auch ein bestimmter, aber geringerer Anteil der Wildtyppflanzen starb. So wurde beispielsweise in einem weiteren derartigen Experiment von Licausi et al. (2011) die Toleranz einer Rap2.12 Überexpressionslinie im Vergleich zum Col-0 Wildtyp ebenfalls nach 3,5 d festgestellt. Die Darstellung der Daten in diesen Publikationen ist allerdings teilweise fehlerhaft und bei bloßer Betrachtung der Abbildungen kaum zu verstehen. Nach persönlicher Kommunikation wurde aber bestätigt, dass tatsächlich eine Intoleranz der *prt6*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp festgestellt worden war.

Des Weiteren unterscheidet sich die absolute Überlebensdauer der Genotypen zwischen unseren und deren Experimenten erheblich voneinander. Es wurde daher eine Analyse von möglichen Ursachen für diese Unterschiede durchgeführt, indem die Experimente an der Universität Bayreuth unabhängig unter verschiedenen Behandlungsbedingungen wiederholt wurden (unabhängig bedeutet, dass Faktoren wie die Zusammensetzung der Erde, Lichtbedingungen, Aufzucht der Pflanzen nach Bayreuther Standardbedingungen durchgeführt wurden und somit anders waren). Dies führte zu der Erkenntnis, dass die Luftfeuchtigkeit während der Erholungsphase der ausschlaggebende Faktor für einen vielfachen Unterschied in der Überlebensdauer sein kann. So starben in unseren Versuchen bei 25%iger Luftfeuchtigkeit (das ist die unkontrollierte Luftfeuchtigkeit in unserer

Lichtkammer) nach 5 d fast alle untersuchten Genotypen, wenige Wildtypen überlebten entsprechend den Experimenten von Licausi et al. (2011) (Abb.13). Bei einer Erhöhung der Luftfeuchtigkeit durch die Abdeckung der Pflanzen mit einer durchsichtigen Haube während der Erholungsphase überlebten alle Pflanzen. Tatsächlich wurden die Überlebensexperimente in Utrecht bei einer Luftfeuchtigkeit von 70% durchgeführt, während die Luftfeuchtigkeit von Licausi et al. (2011) bzw. Weits et al. (2014) nicht beachtet wurde bzw. wahrscheinlich sehr gering war (persönliche Mitteilung F. Licausi).

Es wurde schon vorher beschrieben, dass eine Gemeinsamkeit zwischen Überflutung und Trockenheitsstress darin besteht, dass durch die entstehende Anoxie im Boden bei Überflutung die Funktionalität der Wurzel und damit die Wasseraufnahme beeinträchtigt sind. Beispielsweise führt in Reis eine Überexpression von SUB1A dazu, dass die Austrocknungssymptome der Blätter nach kompletter Überflutung verringert werden und die Pflanzen toleranter gegenüber Trockenheit sind. Dafür wird eine erhöhte ABA-Sensitivität verantwortlich gemacht, die zu einer stärkeren Expression bestimmter Toleranz verleihender Gene bei Trockenheitsstress, ABA-Behandlung oder nach Überflutung führt (Fukao et al. 2011).

Eine erhöhte ABA-Sensitivität ist zumindest bei der Keimung und Keimlingsetablierung auch in *prt6-1* und *ged1* evident, führt aber wie beschrieben nicht zu einer erhöhten Toleranz gegen Wassermangel nach Überflutung (Abb.4B, Abb.7, Abb.13, Choy et al. 2008, Holman et al. 2009).

Gibbs et al. 2014 berichten, dass eine Behandlung mit SNAP (ein NO-Donor) bei *prt6-1* nicht, wie dies beim Wildtyp der Fall ist, zu einem Verschluss der Stomata führt. Die Quadrupelmutante *prt6rap2.12rap2.2rap2.3* (ein *Knockout* von *PRT6* und drei ERF-VII Transkriptionsfaktoren) verhält sich wie der Wildtyp, was darauf hindeutet, dass für die SNAP-Insensitivität ERFVII-Transkriptionsfaktoren verantwortlich sind. Daher wäre es möglich, dass die Ursache für die beobachtete Intoleranz von *prt6*-Mutanten gegen Austrocknung nach Überflutung mit einer Beeinträchtigung des Stomataverschlusses, verursacht durch die Aktivität von ERF-VII Transkriptionsfaktoren, in Verbindung steht.

Licausi et al. (2011) beobachteten in ihren Überlebensexperimenten eine Intoleranz von RAP2.12 Überexpressionslinien, wenn der N-terminus gentechnisch modifiziert worden war, um eine Regulation durch den *N-end-rule pathway* zu verhindern. Überexpressionslinien mit intaktem N-Terminus waren dagegen toleranter als der Wildtyp. Dies ist ein zusätzlicher Hinweis darauf, dass ERF-VII Transkriptionsfaktoren für eine geringere Trockenheitstoleranz verantwortlich sind, aber gleichzeitig die Überflutungstoleranz positiv beeinflussen können.

Auf der anderen Seite wurde für HRE2, einem weiteren Mitglied der ERF-VII Transkriptionsfaktoren, eine Funktion bei der Toleranz gegen osmotischen Stress beschrieben. Der Transkriptlevel von *HRE2* wird durch ABA, NaCl, Mannitol, Hypoxie und MV (Methylviologen) hochreguliert. Eine Überexpression von HRE2 verleiht Toleranz und ein Knockdown Intoleranz gegen diese Stressfaktoren (Park et al. 2011).

Es ist daher letztendlich noch unklar inwiefern der *N-end-rule pathway* die Regulation des Wasserhaushaltes beeinflusst und inwiefern beispielsweise Unterschiede in der Stomataöffnung zu Toleranzunterschieden in Überflutungsexperimenten beitragen. (weitere Diskussion siehe Ende Kapitel 4.4).

Neben den bereits beschriebenen Hypoxie-Überlebensexperimenten existiert in der Literatur noch eine Vielzahl weiterer methodisch unterschiedlicher Hypoxie-Überlebensexperimente mit *Arabidopsis thaliana* (z.B. Ellis et al. 1999, Hunt et al. 2002, Ismond et al. 2003, Loreti et al. 2005, Banti et al. 2008, Banti et al. 2010, Vashisht et al. 2011, Licausi et al. 2010, Licausi et al. 2011, Gibbs et al. 2011, Lee et al. 2011, Park et al. 2011, Luhua et al. 2013, Mithran et al. 2014, Weits et al. 2014). Wie bereits aufgezeigt sind auch hier die genauen Todesursachen und damit die gemessenen Toleranzfaktoren oft unklar bzw. unterschiedlich.

Beispielsweise kommen andere Toleranzfaktoren zum Tragen, wenn in Überlebensexperimenten ein Überschuss an Zuckern supplementiert wird. Die Überlebensexperimente von Gibbs et al. (2011), Luhua et al. (2013) und Licausi et al. (2010) wurden mit 1% Saccharose im Medium durchgeführt. Von Loreti et al. (2005) und Banti et al. (2008) wurde aufgezeigt, dass eine ähnliche Hypoxiebehandlung mit 3% Saccharose zu einer vielfachen Verlängerung der Überlebensdauer im Vergleich zu einer Supplementation mit 1% Saccharose führt. Dies deutet darauf hin, dass auch in diesen Experimenten Energiemangel einen wichtigen Faktor für das Überleben darstellt.

Dennoch wird der Tod durch Energiemangel künstlich hinausgezögert, so dass Faktoren wie z.B. ROS oder die Fermentationsrate etc. eine wichtigere Rolle spielen könnten. Hierbei werden dann Genotypen als tolerant klassifiziert, bei denen unter anderen Bedingungen möglicherweise andere Ergebnisse erzielt würden. Es stellt sich also, vor allem in Bezug auf eine mögliche Anwendbarkeit der Forschungsergebnisse auf Nutzpflanzen die Frage nach der Hierarchie der Toleranzfaktoren und unter welchen Bedingungen diese sich verändert.

4.4 *prt6*-Mutanten verbrauchen bei Überflutung weniger Kohlenhydrate als die Wildtypen

Anhand von Untersuchungen der Gattungen *Oryza* und *Rumex* wurden erstmals die sogenannten *Escape*- und *Quiescence*-Strategien beschrieben. Dabei handelt es sich um eine Verstärkung bzw. Verringerung des hormongesteuerten Längenwachstums, was einen Einfluss auf den Energieverbrauch und das Ausmaß der Energieressourcenverwendung durch Fermentation hat. Dies kann je nach Situation Vor- oder Nachteile für das Überleben von Überflutung haben (Fukao et al. 2006, Xu et al. 2006, van Veen et al. 2013, Akman et al. 2014).

Vashisht et al. (2011) beobachteten eine negative Korrelation der Toleranz von Überflutung in Dunkelheit mit der Elongation der Petiole (aber keine Korrelation der Toleranz mit anfänglichem Kohlenhydratgehalt, dem Sauerstoffgehalt von Wurzel und Petiole im Verlauf der Überflutungsbehandlung oder mit der Porosität der Petiole).

Zusätzlich wurde in einigen Ökotypen ein negatives *hazard ratio* festgestellt, so dass ein reduziertes Wachstum bei Überflutung vermutet werden kann. Aufgrund dieser Beobachtungen wird *Arabidopsis thaliana* von Bailey-Serres et al. (2012a) als Spezies mit einer *Quiescence*-Strategie kategorisiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Stärke und Zuckergehalte in Rosettenblättern von 5 Wochen alten auf Erde angezogenen Pflanzen nach 8 h und 24 h Dunkel+Überflutung bzw. Dunkel+Luft untersucht, um festzustellen, inwiefern sich ein geringeres Wachstum u.U. in einem geringeren Kohlenhydratverbrauch widerspiegelt und ob dadurch Rückschlüsse auf Toleranzunterschiede gezogen werden können. Die Experimente wurden am Ende eines Lichtzyklus gestartet, um einen maximalen Kohlenhydratgehalt zu gewährleisten und möglichst die Respirationrate durch eine frühe Hungerstressantwort nicht zu beeinflussen.

Alle Genotypen zeigten am Ende des Lichtzyklus einen ähnlichen Kohlenhydratgehalt, auch nach 8 h war kein bedeutender Unterschied im Kohlenhydratgehalt ersichtlich, weder im Vergleich zwischen Dunkel+Luft und Dunkel+Überflutung, noch im Vergleich der Genotypen untereinander.

Interessanterweise wurden aber nach 24 h einige signifikante Unterschiede festgestellt. Zunächst zeigt die Darstellung der Gesamtheit der gemessenen Kohlenhydrate (Abb.14), dass nach 24 h der Gesamtkohlenhydratgehalt bei Überflutung im Vergleich zu Luft in allen Genotypen mindestens 1,5 fach erhöht war. Aufgrund großer Standardabweichungen insbesondere zwischen den biologischen Wiederholungen, sind aber im Fall der Wildtypen viele spezifische Kohlenhydratgehalte im Vergleich von Überflutung und Luft statistisch

nicht signifikant verschieden. Nur Saccharosegehalte sind bei Überflutung in allen Genotypen signifikant erhöht.

Von besonderer Bedeutung ist die Messung der Stärkegehalte, da diese am ehesten auf einen geringeren Energieverbrauch in Rosettenblättern bezogen werden können. Es konnten signifikant erhöhte Stärkegehalte nach Überflutung im Vergleich zur Luftbehandlung in den *prt6*-Mutanten festgestellt werden. Dieser Unterschied betrug das 6-fache (*prt6-1*) bzw. 10-fache (*ged1*). Bei den Wildtypen wurde dagegen kein signifikanter Unterschied festgestellt.

Der Stärkeverbrauch ist normalerweise so reguliert, dass am Ende des antizipierten Nachtzyklus fast alle Stärkereserven verbraucht sind (Lu et al. 2005, Pokhilko et al. 2014). Offensichtlich kam es aber in den *prt6*-Mutanten im Verlauf der Überflutungsbehandlung zwischen 8 h und 24 h zu einer Reduktion des Stärkeverbrauchs in den Rosettenblättern. Zusätzlich waren auch alle anderen gemessenen Zucker signifikant erhöht (mit Ausnahme eines nicht signifikanten Unterschieds der Glukosegehalte in *prt6-1*).

Zusammen ist dies ein klarer Hinweis auf eine stärkere überflutungsspezifische Verringerung des Kohlenhydratverbrauchs in *prt6*-Mutanten und liefert eine Erklärung für das negative *hazard ratio* von *ged1*.

Andererseits wurde bei keinem Genotyp ein durch die Überflutung verursachter Nachteil in der Menge der Kohlenhydratressourcen der Rosettenblätter nach 24 h beobachtet. Das bedeutet, dass die Energieverfügbarkeit, zumindest aber ein ineffizienter Verbrauch von Kohlenhydratreserven durch Fermentation, bei denjenigen Genotypen mit einem positiven *hazard ratio* nicht die Todesursache sein kann.

Beispielsweise wird Energiemangel als Todesursache von *prt6-1* in Frage gestellt, da auch hier nach 24 h Überflutung viel mehr Stärkereserven übrig sind als bei Luftbehandlung oder dem Wildtyp, aber ein positives *hazard ratio* festgestellt wurde. Außerdem ist *prt6-1* intoleranter als der Ws Ökotyp, obwohl nach 24 h Überflutung der Kohlenhydratgehalt von *prt6-1* relativ zum Ws Wildtyp etwa das Doppelte betrug.

Das widerspricht der durch die negative Korrelation von Toleranz und Petiolenelongation begründete Vermutung (Vashisht et al. 2011), dass eine sich durch geringeres Wachstum ausdrückende *Quiescence*-Antwort ursächlich für Toleranzunterschiede zwischen verschiedenen Ökotypen wäre. Vielmehr scheinen der Col-0 und der Ws Ökotyp, vor allem aber *prt6-1* und *ged1* unterschiedlichen Todesursachen bei Überflutung in Dunkelheit zu erliegen.

Zwar konnte ein Knockout von *PRT6* in beiden Ökotypen mit einem verringerten Kohlenhydratverbrauch und höherer Toleranz gegen Überflutung in Verbindung gebracht

werden, dennoch spielen langfristig anscheinend andere, unbekannte Faktoren eine Rolle beim Überleben.

Dies offenbart eine ernstzunehmende Problematik für Überlebensexperimente, nämlich, dass der ökotypische Hintergrund von transgenen Pflanzen einen Einfluss auf die Resultate haben kann, wie beispielsweise bei den methodisch identischen Überlebensexperimenten von Lee et al. (2011), die Knockout und Überexpressionslinien von Genen unbekannter Funktion in Col-0 Hintergründen analysierten. Um die Ausgangslage bzw. Aussagekraft derartiger Experimente zu verbessern wäre zunächst z.B. ein QTL-Mapping sinnvoll.

Von Ellis et al. (1999) wurden mit *Arabidopsis thaliana* Überlebensexperimente durchgeführt, die zeigen, dass eine Hypoxievorbehandlung bei 5% Sauerstoff in Dunkelheit im Vergleich zu einer Luftbehandlung einen positiven Effekt auf die Überlebensdauer einer darauffolgenden Hypoxiebehandlung bei 0,1% Sauerstoff hat. Diese Experimente wurden mit dem C24 Ökotyp durchgeführt, der in den Experimenten von Vashisht et al. (2011) das zweitgrößte negative *hazard ratio* aufweist. Unseren Daten zufolge könnte dabei ein geringerer Zuckerverbrauch während der Hypoxievorbehandlung im Vergleich zur Luftvorbehandlung eine wichtige Rolle spielen.

Abgesehen davon ist es fragwürdig, ob die überirdischen Pflanzenteile der untersuchten *Arabidopsis thaliana* Ökotypen in den Überflutungsexperimenten tatsächlich so niedrigen Sauerstoffpartialdrücken ausgesetzt waren, dass dadurch eine maximale Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase beeinflusst wäre.

Lee et al. (2011) haben unter ähnlichen Bedingungen der Überflutungsexperimente von Vashisht et al. (2011) die Sauerstoffgehalte von Col-0 bei Überflutung in Dunkelheit mit Mikroelektroden in Wurzel und Petiole gemessen (sowie im Wasser in der Nähe der Petiole und im Wasser der Erde). Diesen Experimenten zufolge verringert sich der Sauerstoffgehalt in der Petiole bei Überflutung in Dunkelheit innerhalb von 3 h von 16.5 kPa (bei Dunkelheit+Luft) auf 6-7.4 kPa und bleibt dann bis zum Ende der Messung für weitere 12 h konstant. Wie in Kapitel 1.1 beschrieben, sollte eine annähernd maximale Respiration aber bereits bei 1 kPa möglich sein (Armstrong et al. 2014). Darüber hinaus ist zu erwarten, dass sich die Respirationsrate bzw. der Sauerstoffverbrauch im Verlauf der Stressbehandlung aufgrund fehlender Energieressourcen sowieso stark verringert und somit eine Sauerstofflimitation der COX sehr unwahrscheinlich wird.

Es ist bei diesen Mikroelektroden-Messungen aber unklar wie sich Diffusionsbarrieren auf die Sauerstoffkonzentration in den Mitochondrien auswirken und es muss vor allem berücksichtigt werden, dass die von Lee et al. (2011) zur Messung verwendeten Pflanzen,

anders als bei unseren Kohlenhydratmessungen, über einen Nachtzyklus hinaus in Dunkelheit gehalten worden waren und sich somit die Respiration durch den dadurch induzierten Hungerstress wahrscheinlich bereits verringert hatte.

Normalerweise ist der Stärkeverbrauch so reguliert, dass die Stärke am Ende der antizipierten Nacht fast vollständig verbraucht wird. (Lu et al. 2005, Pokhilko et al. 2014).

Nach 24 h Dunkel+Luft haben wir in Übereinstimmung mit dieser Regulation auch sehr niedrige Stärkewerte gemessen, nämlich etwa 0,6% des Stärkegehaltes vom Start der Stressbehandlung (am Ende eines Lichtzyklus). Bei Überflutung war in den *prt6*-Mutanten aber noch etwa 5% der Stärke übrig, während kein signifikanter Unterschied zur Dunkel+Luft Behandlung in den Wildtypen festgestellt werden konnte.

Es wäre theoretisch möglich, dass bei den Kohlenhydratmessungen in allen Genotypen dadurch im Trend etwas höher Werte bei Überflutung festgestellt wurden, dass die Respirationsrate durch Sauerstoffmangel etwas eingeschränkt war. Das Fehlen von Unterschieden nach 8 h könnte in diesem Fall auf Gaseinschlüsse in den Blättern und/oder leicht geringer werdende Sauerstoffkonzentrationen im Wasser zurückgeführt werden.

Wie in Kapitel 1.2 beschrieben gibt es Unklarheiten darüber, ob bei Hypoxie eine Regulation der Respiration stattfindet, die unabhängig von einer Sauerstofflimitation der Cytochrom-c-Oxidase wäre (Zitate siehe Einleitung). Auch mögliche Regulationsmechanismen sind weitgehend unbekannt.

Eine zentrale Schlussfolgerung aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist, dass der signifikant geringere Kohlenhydratverbrauch von *prt6*-Mutanten bei Überflutung nicht alleine auf eine Sauerstofflimitation der COX zurückgeführt werden kann, da sonst auch in den Wildtypen eine ähnliche Antwort zu erwarten gewesen wäre. Unter Einbeziehung des negativen *hazard ratio* von *ged1* ist dies ein indirekter Hinweis auf eine Regulation von Respiration und Energieverbrauch durch den *N-end-rule pathway*. Dies muss durch Respirationmessungen bestätigt werden.

Es bleibt zu untersuchen, ob dieser Phänotyp der *prt6*-Mutanten durch ERF-VII Transkriptionsfaktoren vermittelt wird. Erste Experimente mit einer RAP2.12 Überexpressionslinie deuten darauf hin, dass die Überexpression sowohl ein ABA-hypersensitives Anhalten der Keimlingsentwicklung, als auch ein längeres Überleben von Dunkelheit im Keimlingsstadium vermittelt (Kapitel 3.2.1).

Eine kürzlich erschienene Publikation von Seok et al. (2014) zeigt ein Überflutungsexperiment (komplette Überflutung in Dunkelheit mit 4 Wochen alten Pflanzen), in dem HRE1 Überexpressionslinien nach 10 Tagen toleranter als der Col-0 Wildtyp sind. Die

Überlebensdauer der Pflanzen ist den Überlebensexperimenten dieser Arbeit ähnlich und lässt daher die Messung ähnlicher Todesursachen vermuten (zumindest unabhängig von geringer Luftfeuchtigkeit). HRE1 ist also in irgendeiner Weise an der Verwirklichung Toleranz verleihender Anpassungen beteiligt. Welche, könnte hier beispielsweise durch die Überexpression in einem anderen Ökotyp (Ws) untersucht werden.

SUB1A ist ein ERF-VII Transkriptionsfaktor aus Reis, dessen Halbwertszeit nicht durch den *N-end-rule pathway* reguliert ist, der aber verantwortlich für eine *Quiescence*-Strategie in bestimmten Reisvarietäten ist. SUB1A verleiht auch Toleranz gegenüber Dunkelheit in der Luft und verursacht einen geringeren Stärke und Zuckerverbrauch im Verlauf einer Dunkelheits-Behandlung (Fukao et al. 2011). Es wurde in dieser Arbeit zwar eine Toleranz von *prt6*-Mutanten in Dunkelheit+Luft-Überlebensexperimenten beschrieben, dies konnte aber nicht wie im SUB1A-Reis mit einem veränderten Kohlenhydratmetabolismus in Verbindung gebracht werden. Die angeführten Beispiele deuten aber darauf hin, dass ERF-VII Transkriptionsfaktoren möglicherweise an der Regulation des Energiehaushaltes beteiligt sind.

Eine weitere Fragestellung, die sich aus der Beobachtung von höheren Kohlenhydratgehalten in Rosettenblättern von *prt6*-Mutanten bei Überflutung ergibt, ist, welche Bedeutung dies für die Kohlenhydratverfügbarkeit in der Wurzel hat. Die Wurzel ist in der Erde einer Umgebung mit rasch abnehmenden Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt. Innerhalb von 24 h entsteht im Wasser der Erde Anoxie. Eine Sauerstoffmessung von Lee et al. (2011) zeigte in der Wurzel innerhalb von 2h bei Überflutung eine Abnahme des Sauerstoffpartialdruckes von etwa 5 kPa auf < 0,1 kPa. Dieser Partialdruck blieb über 13 h bis zum Ende der Messung konstant niedrig. Damit ist die Respiration in der Wurzel im Gegensatz zum Spross sehr wahrscheinlich stark eingeschränkt, umso stärker je weiter das Gewebe von überirdischen Pflanzenteilen entfernt ist.

Zudem deutet die Unfähigkeit der Pflanzen sich bei niedriger Luftfeuchtigkeit nach mehr als 5 d Überflutung in Dunkelheit zu erholen darauf hin, dass die Funktion der Wurzel nach dieser Zeit stark eingeschränkt ist.

Die Menge an Zuckern, die zur Wurzel transportiert wird, könnte sich in Wildtypen und *prt6*-Mutanten unterscheiden. Es wäre also neben den bereits diskutierten möglichen Unterschieden in der Reaktion auf eine geringe Wasserverfügbarkeit auch denkbar, dass die höhere Toleranz der Wildtypen in den Experimenten von Licausi et al. (2011) auf einen durch die Zuckerverfügbarkeit bedingten späteren Tod der Wurzel zurückgeführt werden kann.

4.5 Primärmetabolismus bei Anoxie

Eine Begasung mit Stickstoff führte in allen Genotypen zu einer starken Abnahme der Saccharosegehalte auf nahezu nicht mehr messbare Werte. Der Stärkegehalt war dagegen im Vergleich zur Luftbehandlung erhöht und Glukosegehalte betragen ein Vielfaches der Luftbehandlung. Dies deutet darauf hin, dass Stärke und Glukose bei Anoxie in *Arabidopsis* nicht ausreichend für fermentativen Metabolismus bzw. Substratkettenphosphorylierung verfügbar gemacht werden können. Ein Pasteur-Effekt ist nur in Bezug auf den Saccharoseverbrauch erkennbar.

Möglicherweise steht nicht genug ATP für den ersten energieaufwändigen Schritt der Einspeisung von Glukose in die Glykolyse durch Hexokinasen zur Verfügung.

Der Saccharoseabbau durch Saccharose-Synthasen und UGPasen (UDP-Glukose Pyrophosphorylase) ermöglicht die Nutzung von PPi an Stelle von ATP und ist zusätzlich Energie-effizienter als der Abbau durch Invertasen und Hexokinasen (1 PPi vs 2 ATP) (Mustroph et al. 2014).

Trotz einer höheren Expression von Enzymen in *prt6*-Mutanten, die an Fermentation und Glykolyse beteiligt sind, konnte kein Vorteil im Verbrauch von Kohlenhydraten in *prt6*-Mutanten festgestellt werden. Es besteht aber ein Ökotyp-spezifischer Unterschied in der Glukoseakkumulation. Diese ist in *Ws* und *ged1* signifikant geringer als in *Col-0* und *prt6-1*.

Es wurde bereits von Loreti et al. (2005) und Banti et al. (2008) festgestellt, dass eine Supplementation von Saccharose, aber nicht von Glukose in Anoxie-Überlebensexperimenten mit *Arabidopsis* Keimlingen zu einer längeren Überlebensdauer führt. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung führt Saccharosesupplementation zu einer etwa 6-fach höheren Ethanolproduktion als bei Glukosesupplementation (Banti et al. 2008). Ähnliche Beobachtung wurden für Wurzeln der Tomate berichtet (Germain et al. 1997).

Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen können Glukose, Fruktose und Saccharose bei Anoxie in Reis, Gerste und Weizen ähnlich effektiv fermentiert werden (Guglieminetti et al. 2000).

4.6 *prt6*-Mutanten sind tolerant gegen verschiedene Arten von Hungerstress

In den vorausgehenden Kapiteln wurde bereits beschrieben, dass 4 Wochen alte *prt6*-Mutanten tolerant gegen Dunkelheit in der Luft und bei Überflutung sind. Dabei konnte die Überflutungstoleranz, aber nicht die Toleranz bei Luftbehandlung mit einem verringerten Stärke- und Zuckerverbrauch in Verbindung gebracht werden.

Ähnliche Toleranzunterschiede wurden beobachtet, wenn Pflanzen ab der Keimung in Dunkelheit gehalten und nach 8 bzw. 10 Tagen in Lichtzyklen überführt worden, oder wenn 7 Tage alte Keimlinge für 9 bzw. 10 Tage verdunkelt wurden (Abb.18, Abb.19).

Die Energieressourcen unterscheiden sich im Vergleich der Experimente: In älteren Pflanzen besteht das Energieresservoir hauptsächlich aus Stärke, während sich *Arabidopsis* Keimlinge zunächst hauptsächlich von Fett- und Proteinreserven ernähren, allerdings ausgehend von diesen Energieressourcen später auch Stärke produzieren (Baud et al. 2002).

Holman et al. (2009) haben in *prt6* Keimlingen einen langsameren Verbrauch von Fettreserven festgestellt, der von einem langsameren Wurzelwachstum begleitet ist. Die Unterschiede im Wurzelwachstum konnten aber durch Saccharose Supplementation komplementiert werden. Außerdem scheint die Kapazität der beta-Oxidation nicht gestört zu sein, da kein Unterschied zum Wildtyp in der beta-Oxidation von 2,4-DB festgestellt wurde (Holman et al. 2009).

Es ist daher zu vermuten, dass das längere Überleben von *prt6*-Mutanten im Keimlingstadium mit einem langsameren Verbrauch von Fettreserven und einem dadurch langsameren Wachstum in Verbindung steht.

Interessanterweise konnten im Gegensatz zu *prt6-4* in Doppelknockout Mutanten von *prt6-4 abi3* und *prt6-4 abi5* keine übrig gebliebenen Ölkörper nach 5 d mehr entdeckt werden, was darauf hindeutet, dass ABA-Signalwege an dieser Regulation beteiligt sind. Später wurde für RAP2.12, RAP2.2 und RAP2.3 eine Aktivierung des *ABI5* Promotors berichtet (Gibbs et al. 2014). Dies konnte in dieser Arbeit bei einer Überexpression dieser Transkriptionsfaktoren in Protoplasten nicht bestätigt werden, wobei aber die verwendete Methode (semiquantitative RT-PCR) ungenau ist und nur eine Feststellung großer Unterschiede ermöglicht (Abb.23B).

Darüber hinaus ist weder aus den *Microarray*-Daten von *prt6-1* und *ate1ate2* (Gibbs et al. 2011), noch aus den *Microarray*-Daten von Rap2.12 Überexpressionslinien (Licausi et al. 2011) eine differentielle Regulation von ABI3/4/5 ersichtlich.

Sie sind aber im *Microarray* von *ged-1* herunterreguliert (SLR < -1, adj.P-Value > 0,05), was möglicherweise ausschlaggebend oder symptomatisch für die gegensätzliche Transkriptregulation vieler Gene relativ zu dem *Microarray* von Nishimura et al. 2007 ist, in dem keimende Samen für 2 d mit ABA behandelt worden waren.

Interessanterweise wurde ABI4 auch mit einer Herunterregulation von LHCB1 und RBCS in Verbindung gebracht (Koussevitzky et al. 2007). Diese Gene sind in *ged1* leicht hoch reguliert, was Grundlage für die Entdeckung der Mutante von Choy et al. (2008) war.

Somit spricht einiges dafür, dass an der Hungerstresstoleranz von *prt6*-Mutanten und der reduzierten Mobilisierung von Fettreserven im Keimlingstadium eine Interaktion mit ABA-Signalwegen beteiligt sein könnte.

Die Funktion von ABI3, ABI4 und ABI5 ist aber außerhalb des Samen- und frühen Keimlingsstadiums weitgehend unbekannt, da diese Transkriptionsfaktoren bisher hauptsächlich in Bezug auf Samen und Keimlingsstadien untersucht wurden und Samen-spezifische Gene regulieren (Soderman et al. 2000, Koussevitzky et al. 2007, Holman et al. 2009). Es ist daher noch unklar, ob die Hungerstresstoleranz in den Überlebensexperimenten im Keimlingsstadium und die Toleranz in späteren Entwicklungsstadien oder bei Überflutung auf gemeinsamen Regulationsmechanismen beruhen.

4.7 Mögliche Interaktionen zwischen Hypoxie, N-end-rule pathway, ABA-Signalwegen und der Anpassung an Energiemangel

Das Genom von *Arabidopsis thaliana* kodiert 38 *Sucrose non-fermenting-1 (SNF1)-related protein kinases* (SnRKs). Diese können in die drei Unterfamilien SnRK1, SnRK2 und SnRK3 unterteilt werden. Die Unterfamilie SnRK2 ist an ABA-Signalwegen beteiligt: ABA bindet an Mitglieder der PYR/PYL/RCAR ABA-Rezeptorenfamilie, die daraufhin die Aktivität von Protein Phosphorylase 2 C (PP2C) Proteinen verringert. Diese inaktivieren SnRK2 durch Dephosphorylierung. Eine Inaktivierung von PP2C in Anwesenheit von ABA führt zu einer stärkeren Aktivität von SnRK2 und damit durch Phosphorylierung von Zielproteinen zu einer Antwort auf ABA-Signale (Umezawa et al. 2010).

SnRK1 ist an der Regulation des Metabolismus bei Energiemangel und in verschiedenen Stresssituationen beteiligt. SnRK1.1 aktiviert beispielsweise die Expression von Genen, die an Katabolismus beteiligt sind (z.B. Stärke-, Saccharose-, Aminosäure-, Lipid- und Proteinabbau, Autophagie) und verringert die Expression von Genen, die an der Ribosomensynthese und Anabolismus beteiligt sind (Baena-Gonzalez et al. 2007).

Eine Verbindung zu ABA-Signalwegen besteht darin, dass einige PP2C Proteine neben der Aktivität von SnRK2 auch die Aktivität von SnRK1 regulieren können (Rodrigues et al. 2013).

Interessanterweise zeigt der *ged1* Microarray neben einer Herunterregulation vieler ABA-responsiver Gene, einschließlich der PP2C kodierenden Gene *HAI2* und *HAI3*, eine signifikante Hochregulation von *SnRK1.2* und *DIN6*. *DIN6* wird durch SnRK1 reguliert und ist als Marker für Hungerstress bekannt (Baena-Gonzalez 2007, Paparelli et al. 2013).

Zusätzlich ist das längere Vorhandensein von Fettkörpern in *prt6* Mutanten während der Keimlingsentwicklung in den Doppelknockoutmutanten *abi3prt6-4* und *abi5prt6-4* nicht beobachtbar (Holman et al. 2009).

Ellis et al. (1999) zeigten, dass eine Vorbehandlung mit ABA sich in einem Überlebensexperiment, ähnlich wie eine Vorbehandlung mit moderater Hypoxie, positiv auf das Überleben von *Arabidopsis* Wurzeln einer darauffolgenden Behandlung mit 0,1% O₂ auswirkt.

Des Weiteren wurde der ERF VII Transkriptionsfaktor HRE2 mit der Toleranz gegenüber osmotischem Stress in Verbindung gebracht (Park et al. 2011) und auch eine Überexpression des ERF VII Transkriptionsfaktors SUB1A führt in Reis unter bestimmten Bedingungen zu einer höheren Expression von ABA- bzw. Trockenheits-responsiven Genen (Fukao et al. 2011).

Eine ABA-8'Hydroxylase (At5g45340), ein Enzym, das am Abbau von ABA beteiligt ist zählt zu den *Core49* Hypoxie-responsiver Genen, d.h. es wird bei Hypoxie in verschiedenen Zelltypen verstärkt translatiert (Mustroph et al. 2009).

Dieses Gen ist *Microarray*-Daten zufolge in *prt6-1* und *ate1ate2* bereits bei Normoxie signifikant hochreguliert (Gibbs et al. 2011), aber nicht in *ged1* (Choy et al. 2008). In *ged1* wurde außerdem kein veränderter ABA-Gehalt in 7 d alten Keimlingen festgestellt (Choy et al. 2008).

ABA-Gehalte sind bei kompletter Überflutung in der gesamten Pflanze reduziert, stattdessen führt Staunässe (partielle Überflutung) zu vielfach höheren ABA-Gehalten im Spross (Huynh et al. 2005).

Bei einem Übergang von kompletter Überflutung zu einer Wiederbelüftung des Sprosses kann es zu Trockenheitsstress bzw. einer Austrocknung des Sprosses kommen, wenn die Wasseraufnahme über die Wurzel beeinträchtigt ist und viele durch ABA regulierte Anpassungsmechanismen an Trockenheit, z.B. Stomataverschluss, zu spät, nämlich erst nach der Produktion von ABA, einsetzen. Diese Problematik wird beispielsweise durch die Überlebensexperimente bei einer Erholung von Überflutung in Dunkelheit unter unterschiedlichen Luftfechtigkeiten verdeutlicht (Abb.13).

Aufgrund der angeführten Hinweise auf eine Interaktion zwischen Hypoxie, N-end-rule pathway und ABA-Signalwegen wurde die Transkriptakkumulation verschiedener ABA-responsiver Gene unter verschiedenen Bedingungen und in verschiedenen Genotypen

untersucht. Dabei führt Überflutung generell zu einer Verringerung der Transkriptmengen im Vergleich zur Luftbehandlung (Abb.17). Die Datenlage ist aber bezüglich der Unterschiede zwischen *prt6*-Mutanten und Wildtypen unklar, da bisher in manchen Wiederholungen der Experimente ein erhöhtes Transkriptlevel in den *prt6*-Mutanten festgestellt wurde, in anderen wiederum kein Unterschied feststellbar war (Daten nicht gezeigt). Dies ist möglicherweise auch methodischen Beschränkungen zuzuschreiben (es können mit semiquantitativer RT-PCR nur große Unterschiede mit Sicherheit detektiert werden).

Weil die Herstellung stabiler Überexpressionslinien ein langwieriger Prozess ist, wurde ein Protoplastensystem verwendet um die Auswirkung der Expression von ERF-VII Transkriptionsfaktoren sowie ABR1 auf den Transkriptlevel ABA-responsiver Gene bei unterschiedlichen ABA-Konzentrationen zu untersuchen.

Auch hier konnten zwischen den verschiedenen überexprimierten Genen keine eindeutigen Unterschiede festgestellt werden. Die untersuchten ABA-responsiven Gene wurden aber erwartungsgemäß durch die ABA-Behandlung hochreguliert. Außerdem konnte die Funktionalität der Versuchsdurchführung durch die erwartete erhöhte Expression Hypoxie-responsiver Gene bei Überexpression von RAP2.12, RAP2.2 und RAP2.3 bestätigt werden. Seltsamerweise führte die Überexpression von HRE1 nicht zu einer erhöhten Expression von beispielsweise *ADH* und *PDC1*, obwohl dies mehrfach in der Literatur beschrieben wurde (Licausi et al. 2010, Yang et al. 2011). Diese Beobachtung stimmt jedoch überein mit einer geringen Aktivierbarkeit von Hypoxie-responsiven Promotoren (*LBD41*, *PDC1*) durch HRE1 oder HRE2 (Philipp Gasch, unveröffentlicht).

4.8 ABR1

Der *Microarray* von *ged1* zeigte eine Herunterregulation vieler ABA-responsiver Gene (Abb.3B, Choy et al. 2008), daher wurden Gene, deren vorhergesagte Proteinsequenzen mit Methionin und Cystein beginnen, nach Annotation durchsucht, die eine Verbindung zu ABA-Signalwegen erkennen ließen. Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass die Regulation ABA-responsiver Gene nicht in den *Microarray*-Daten von *prt6-1* oder *ate1ate2* ersichtlich ist (Gibbs et al. 2011) und in dieser Arbeit mit semiquantitativer RT-PCR die *Microarray*-Daten von *ged1* bezüglich ABA-responsiver Gene nicht bestätigt werden konnten (Kapitel 3.1.2).

Es wurde der Transkriptionsfaktor ABR1 entdeckt, der in einer Publikation von Pandey et al. (2005) als ein Repressor von ABA-Signalwegen beschrieben wurde. Ob *ABR1* tatsächlich durch den N-end-rule pathway reguliert wird, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen (siehe Ausblick), da beispielsweise viele Proteine bekannt sind (SUB1, SNORKEL, Kapitel.3,

Abb.2a), die zwar mit MC beginnen, aber nicht durch den N-end-rule pathway reguliert werden. Zumindest wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals gezeigt, dass der Transkriptlevel von ABR1 durch Hypoxiestress hochreguliert wird (Abb.25). Dies war bisher unbekannt, da *ABR1* nicht standardmäßig auf *Microarray*-Chips (Affymetrix) repräsentiert ist.

Die Publikation von Pandey et al. (2005) schreibt ABR1 eine Funktion als Repressor von ABA-Signalwegen zu und zeigt eine Regulation des Transkriptlevels von *ABR1* durch ABA- oder Salzstressbehandlung. Grundlage der Befunde dieser Publikation war die Untersuchung von zwei T-DNA Insertionslinien, *abr1-1* und *abr1-2*, die in allen in diesem Zusammenhang dargestellten Experimenten die gleichen Phänotypen zeigten.

Die T-DNA Insertionslinie *abr1-2* wurde bestellt, genotypisiert (Daten nicht gezeigt) und durch RT-PCR Analysen sichergestellt, dass in den Nachkommen der verwendeten Linie keine mRNA von ABR1 vorhanden bzw. detektierbar war (Abb.26).

Eine Wiederholung der von Pandey et al. (2005) beschriebenen Experimente widersprach den publizierten Ergebnissen, indem bei ABA-Behandlung bezüglich des Wurzellängenwachstums, der Keimungsetablierung und des Transkriptlevels ABA-responsiver Gene kein Unterschied zum Wildtyp erkennbar war (Kapitel 3.2.2). Zusätzlich zeigten auch Überexpressionslinien in den gleichen Experimenten keine Anzeichen einer einer zu den anderen Genotypen unterschiedlichen Reaktion auf ABA.

Überexpressionslinien zeigten aber eindeutige Phänotypen: insgesamt 8 verschiedene Linien fielen durch eine vermehrte Ausbildung von Wurzelhaaren im Vergleich zum Wildtyp auf. Überexpressionslinien, mit vermehrter Wurzelhaarbildung zeigten höhere *ABR1*-Transkriptlevels als Linien, die diesen Phänotyp nicht oder weniger stark zeigten. Außerdem waren diese 8 Linien kleiner als die Wildtypen und lieferten nur einen sehr geringen Samenertrag.

4.9 LBD41

LBD41 ist einer von drei Transkriptionsfaktoren, die zu den *core49* Hypoxie-responsiver Gene gehören und wird bei Hypoxie in verschiedenen Zelltypen verstärkt und aktiv translatiert wird (Mustroph et al. 2009). Die Transkription von LBD41 wird durch RAP2.2, RAP2.3 und RAP2.12 reguliert und ist damit abhängig von deren Regulation über den *N-end-rule pathway* (Klecker et al. 2014, Philipp Gasch unveröffentlicht, Abb.23A).

Durch die Herstellung von Überexpressionslinien und der Untersuchung einer T-DNA Insertionslinie wurde versucht auf eine Funktion von LBD41 zu schließen. Dabei sind aber keine Phänotypen aufgefallen.

Im Verlauf dieser Arbeit ist eine Publikation von Luhua et al. (2013) erschienen, in der die auch hier verwendete *lbd41* T-DNA-Insertionslinie (neben vielen anderen Genen unbekannter Funktion) auf die Toleranz in verschiedenen Stressbehandlungen getestet wurde. In dieser Publikation konnte weder bei Hitze, oxidativem Stress, osmotischem Stress, Salzstress, ABA-Behandlung oder Hypoxiestress ein Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden.

Es wurde daher ein *SAAB-assay* durchgeführt, um auf mögliche Zielpromotoren von LBD41 zu schließen. Dieser ergab aber keine eindeutige Konsensussequenz, obwohl ein bestimmtes Muster festgestellt wurde, nämlich eine Anhäufung von dTs, nachdem alle Sequenzen basierend auf den Primerbindestellen in 5`-3` Richtung ausgerichtet worden waren (Tab.3).

Dass keine Sequenz das reverse Komplement zeigt (d.h. viele dAs statt dTs in gleicher Ausrichtung) ist sehr unwahrscheinlich und deutet unter der Voraussetzung, dass die Ausgangsbedingungen auf Zufall basierten (d.h. die bestellten SAAB-Oligonukleotide zufallsverteilt waren), darauf hin, dass die Primersequenzen bei der Selektion eine Rolle gespielt haben.

LBD41 besitzt eine vorhergesagte EAR-Domäne (Mitsuda et al. 2009) und ist daher ein Repressor der Transkription. Außerdem besitzt LBD41 eine SUMO (small ubiquitin-like modifier)-Bindestelle (Elrouby et al. 2010) und interagiert mit TOPLESS, einem Co-Repressor der Transkription (Causier et al. 2012).

4.10 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals, dass eine Inaktivierung des *N-end-rule pathways* bei Überflutung eine Herunterregulation des Kohlenhydratverbrauchs bewirkt. Zusammen mit den Überlebensexperimenten, die für einige Genotypen, u.a. *ged1* ein negatives *hazard ratio* belegen, deutet dies indirekt auf eine Herunterregulation von Respiration und Wachstum hin. Dies muss durch direkte Messungen der Respirationsrate von *prt6*-Mutanten und Wildtypen bestätigt werden. Experimente hierzu befinden sich zurzeit in Arbeit.

Kohlenhydratverbrauch und Respiration sollten außerdem unter kontrollierteren Bedingungen untersucht und verglichen werden, z.B. durch Begasung der Pflanzen mit Gasgemischen, die unterschiedliche Sauerstoffpartialdrücke aufweisen. In diesem Zusammenhang kann die Auswirkung von überflutungsspezifischen Faktoren auf die Respirationsrate, die unabhängig von Hypoxie sind, beispielsweise durch das bei Überflutung akkumulierende Ethylen, untersucht werden.

Die Durchführung von Staunässe-Überlebensexperimenten (partielle Überflutung) und ein Vergleich mit dem Überleben bei kompletter Überflutung könnte aufklären, inwiefern die bei kompletter Überflutung beobachteten Toleranzunterschiede zwischen verschiedenen Genotypen auch bei partieller Überflutung auftreten und ob diese möglicherweise alleine auf eine Toleranz gegenüber einer Einschränkung der Wurzelfunktion in einem bei Überflutung schnell anoxisch werdenden Boden zurückgeführt werden können.

Die Regulation von Stärke- und Zuckermetabolismus sowie Respiration sollten außerdem bei Überflutung unter Lichtzyklen untersucht werden. Überflutung verursacht eine progressive Verringerung der Stärkeproduktion während der Lichtphasen (Fukao et al. 2006). Ein plötzlicher Wechsel von Belichtung zu Dunkelheit kann zu einer plötzlichen starken Abnahme der Sauerstoffverfügbarkeit führen (Lee et al. 2011). Darüber hinaus müssen die Auswirkungen einer beständig höheren Respirationsrate aufgrund der höheren Verfügbarkeit von Energiereserven unter Lichtzyklen in Betracht gezogen werden.

Es sollte untersucht werden, ob *prt6*-Mutanten auch unter Lichtzyklen eine vom Wildtyp abweichende Regulation des Energiehaushaltes aufweisen und inwiefern dies einen Faktor für die in den Überlebensexperimenten bei Überflutung unter Lichtzyklen erwiesene höhere Toleranz von *prt6*-Mutanten darstellt.

Die Gene, die direkt oder indirekt über den N-end-rule pathway reguliert werden und zu dem veränderten Energiehaushalt beitragen, könnten durch eine Analyse von transgenen Pflanzen eingegrenzt bzw. identifiziert werden (es sind keine Kandidaten aufgrund von Transkriptom-Daten offensichtlich). Möglicherweise einige der Gene mit unbekannter Funktion (Lee et al. 2011).

Hierfür muss zunächst überprüft werden, ob bzw. welche ERF-VII Transkriptionsfaktoren an der Regulation des Kohlenhydratverbrauchs bei Überflutung beteiligt sind.

Mit der Herstellung von ERF-VII Überexpressionslinien wurde bereits begonnen (mit modifiziertem N-terminus), die beispielsweise auf Stärkegehalte nach Überflutung in Dunkelheit getestet werden können.

Zusätzlich existieren (in der Literatur) bereits *prt6rap2.12rap2.2rap2.3* und *prt6hre1hre2* Mutanten (Gibbs et al. 2014), die zusätzlich untersucht werden könnten.

Ein QTL-Mapping von Ökotypen mit negativem und positivem *hazard ratio* wäre geeignet, um Faktoren zu identifizieren, die ein positives *hazard ratio* verursachen bzw. ein negatives *hazard ratio* erlauben. Die tatsächlichen Faktoren, die bei Überexpression bestimmter Gene Toleranz verleihen, könnten durch einen Vergleich verschiedener ökotypischer Hintergründe,

z.B. Col-0 und Ws eingegrenzt werden, da hier bereits dargelegt wurde, dass diese Ökotypen unterschiedlichen Todesursachen erliegen.

In Bezug auf ABR1 stellt diese Arbeit eine vorherige Publikation von Pandey et al. (2005) in Frage, da die darin präsentierten Versuche nicht mit gleichem Ergebnis wiederholt werden konnten. Da somit die Funktion von ABR1 wieder unklar ist, wäre es am einfachsten einen *Microarray* mit den bereits hergestellten und bestätigten Überexpressionslinien durchzuführen, um mögliche Ansatzpunkte für eine weitere Charakterisierung dieses Transkriptionsfaktors zu erhalten.

Außerdem muss bestätigt werden ob ABR1 über den N-end-rule pathway reguliert wird. In diesem Zusammenhang bestehen mehrere Möglichkeiten, beispielsweise die Methode von Gibbs et al. (2011) mit transient transformierten Kaninchen-Retikulozytenlysaten. Es wurde bereits damit begonnen eine andere Methode auf den Weg zu bringen: ABR1 wird mit natürlichem N-Terminus (MC) oder modifiziertem N-Terminus (MA) und mit einem C-terminalem Tag versehen in einem *prt6-1* Hintergrund überexprimiert (Judith Bäumler).

Homozygote bestätigte Überexpressionslinien werden dann mit dem Wildtyp (bzw. wieder mit *prt6-1* zur Kontrolle) gekreuzt und dann durch Westernblot der Unterschied in der Menge des transgenen Proteins bestimmt. Die Doppelmutante *prt6abr1-1* wurde bereits hergestellt und kann, am besten nach der Durchführung der oben erwähnten Experimente, weiter untersucht werden.

5 Literaturverzeichnis

- Ahmed F, Rafii MY, Ismail MR, Juraimi AS, Rahim HA, Asfaliza R, Latif MA (2013) Waterlogging tolerance of crops: breeding, mechanism of tolerance, molecular approaches, and future prospects. *BioMed Res Int* 2013 (Article ID: 963525)
- Akman, M; Bhikharie, A; Mustroph, A; Sasidharan, R (2014): Extreme flooding tolerance in *Rorippa*. *Plant Signal Behav* 9(1), e27847
- Armstrong W, Strange ME, Cringle S, Beckett PM (1994) Microelectrode and modelling study of oxygen distribution in roots. *Ann Bot* 74:287–299
- Armstrong J, Armstrong W (2005a) Rice: sulphide-induced barriers to root radial oxygen loss, Fe²⁺ and water uptake, and lateral root emergence. *Ann Bot* 96:625–638
- Armstrong W, Beckett PM (2011a) Experimental and modelling data contradict the idea of respiratory down-regulation in plant tissues at an internal [O₂] substantially above the critical oxygen pressure for cytochrome oxidase. *New Phytol* 190:431–441
- Armstrong W, Beckett PM (2011b) The respiratory down-regulation debate. *New Phytol* 190:276–278
- Armstrong W, Armstrong J (2014) Plant internal oxygen transport (diffusion and convection) and measuring and modelling oxygen gradients. In: van Dongen JT, Licausi F (eds) *Low oxygen stress in plants*. Springer, Heidelberg
- Baena-Gonza´lez E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* 448:938–942
- Bailey-Serres J, Fukao T, Gibbs DJ, Holdsworth MJ, Lee SC, Licausi F, Perata P, Voesenek LACJ, van Dongen JT (2012a) Making sense of low oxygen sensing. *Trends Plant Sci* 17: 129–138
- Bailey-Serres J, Lee SC, Brinton E. (2012b) Waterproofing crops: Effective flooding survival strategies. *Plant Physiol* 160: 1698-1709
- Banti V, Mafessoni F, Loreti E, Alpi A, Perata P (2010) The heat-inducible transcription factor HsfA2 enhances anoxia tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 152: 1471-1483
- Banti V, Loreti E, Novi G, Santaniello A, Alpi A, Perata P (2008) Heat acclimation and cross-tolerance against anoxia in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 31: 1029-1037

- Baud S, Boutin JP, Miquel M, Lepiniec L, Rochat C (2002) An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiol Biochem*, 40: 151–160
- Barding G.A. Jr., Béni S., Fukao T., Bailey-Serres J. & Larive C.K. (2013) Comparison of GC-MS and NMR for metabolite profiling of rice subjected to submergence stress. *Journal of Proteome Research* 12, 898–909
- Borisjuk L, Rolletschek H (2009) The oxygen status of the developing seed. *New Phytol* 182 (1):17–30
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- Branco-Price C, Kaiser KA, Jang CJH, Larive CK, Bailey-Serres J (2008) Selective mRNA translation coordinates energetic and metabolic adjustments to cellular oxygen deprivation and reoxygenation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 56: 743–755
- Cattanach BM, Pollard CE, Isaacson JH (1968) Ethyl methanesulfonate-induced chromosome breakage in the mouse. *Mutat Res.* 6: 297-307
- Causier B, Ashworth M, Guo W, Davies B (2012) The TOPLESS interactome: A framework for gene repression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 158(1):423–438
- Choy MK, Sullivan JA, Theobald JC, Davies WJ, Gray JC (2008) An *Arabidopsis* mutant able to green after extended dark periods shows decreased transcripts of seed protein genes and altered sensitivity to abscisic acid. *J Exp Bot* 59: 3869-3884
- Colmer TD, Greenway H. (2011) Ion transport in seminal and adventitious roots of cereals during O₂ deficiency. *J Exp Bot* 62:39–57
- Dar M., de Janvry A, Emerick K, Raitzer D, Sadoulet E (2013) Floodtolerant rice reduces yield variability and raises expected yield, differentially benefitting socially disadvantaged groups. *Scientific Reports* 3, Article number 3315
- Davies DD (1980) Anaerobic metabolism and the production of organic acids. In: Davies DD (ed) *The biochemistry of plants*, Vol 2. Academic, New York, p 581–611
- Ellis MH, Dennis ES, Peacock WJ (1999) *Arabidopsis* roots and shoots have different mechanisms for hypoxic stress tolerance. *Plant Physiol.* 119: 57-64

- Elrouby, N, Coupland, G (2010) Proteome-wide screens for small ubiquitin-like modifier (SUMO) substrates identify *Arabidopsis* proteins implicated in diverse biological processes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 17415–17420
- Fan T.W.N., Higashi R.M., Frenkiel T.A. & Lane A.M. (1997) Anaerobic nitrate and ammonium metabolism in flood-tolerant rice coleoptiles. *Journal of Experimental Botany* 48, 1655–1666
- Fukao T, Xu K, Ronald PC, Bailey-Serres J (2006) A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice. *Plant Cell*. 18: 2021-2034
- Fukao T, Bailey-Serres J (2008) Submergence tolerance conferred by Sub1A is mediated by SLR1 and SLRL1 restriction of gibberellin responses in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:16814–16819
- Fukao T, Yeung E, Bailey-Serres J (2012) The submergence tolerance gene SUB1A delays leaf senescence under prolonged darkness through hormonal regulation in rice. *Plant Physiol* 160:1795–1807
- Fukuda R, Zhang H, Kim J, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL (2007) HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* 129:111–122
- Gajdanowicz P, Michard E, Sandmann M, Rocha M, Corrêa LGG, Ramírez-Aguilar SJ, Gomez-Porras JL, González W, Thibaud JB, van Dongen JT, et al. (2011) Potassium (K⁺) gradients serve as a mobile energy source in plant vascular tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 864–869
- Garzón M, Eifler K, Faust A, Scheel H, Hofmann K, Koncz C, Yephremov A, Bachmair A (2007) PRT6/At5g02310 encodes an *Arabidopsis* ubiquitin ligase of the N-end rule pathway with arginine specificity and is not the CER3 locus. *FEBS Lett.* 581: 3189-3196
- Geigenberger P, Fernie AR, Gibon Y, Christ M, Stitt M (2000) Metabolic activity decreases as an adaptive response to low internal oxygen in growing potato tubers. *Biol Chem.* 381: 723-740
- Geigenberger P (2003) Regulation of sucrose to starch conversion in growing potato tubers. *J Exp Bot.* 54: 457-465

- Germain V, Ricard B, Raymond P, Saglio PH (1997) The role of sugars, hexokinase, and sucrose synthase in the determination of hypoxically induced tolerance to anoxia in tomato roots. *Plant Physiol.* 114: 167-175
- Gibbs DJ, Lee SC, Isa NM, Gramuglia S, Fukao T, Bassel GW, Correia CS, Corbineau F, Theodoulou FL, Bailey-Serres J, Holdsworth MJ (2011) Homeostatic response to hypoxia is regulated by the N-end rule pathway in plants. *Nature* 479: 415–418
- Gibbs DJ, Isa NM, Movahedi M, Lozano-Juste J, Mendiondo GM, Berckhan S, Marín-de la Rosa N, Vicente Conde J, Sousa Correia C, Pearce SP, Bassel GW, Hamali B, Talloji P, Tomé DF, Coego A, Beynon J, Alabadí D, Bachmair A, León J, Gray JE, Theodoulou FL, Holdsworth MJ (2014) Nitric oxide sensing in plants is mediated by proteolytic control of group VII ERF transcription factors. *Mol Cell.* 53: 369-379
- Gibbs J, Turner DW, Armstrong W, Darwent MJ, Greenway H (1998) Response to oxygen deficiency in maize roots I. Development of O₂-deficiency in the stele reduces radial solute transport to the xylem. *Funct Plant Biol* 25:745–758
- Goda H, Sasaki E, Akiyama K, Maruyama-Nakashita A, Nakabayashi K, Li W, Ogawa M, Yamauchi Y, Preston J, Aoki K, Kiba T, Takatsuto S, Fujioka S, Asami T, Nakano T, Kato H, Mizuno T, Sakakibara H, Yamaguchi S, Nambara E, Kamiya Y, Takahashi H, Hirai MY, Sakurai T, Shinozaki K, Saito K, Yoshida S, Shimada Y (2008) The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design, data evaluation, model data analysis and data access. *Plant J.* 55: 526-542
- Graciet E, Walter F, Maoléidigh DO, Pollmann S, Meyerowitz EM, Varshavsky A, Wellmer F (2009) The N-end rule pathway controls multiple functions during *Arabidopsis* shoot and leaf development. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 13618–13623
- Graciet E, Wellmer F (2010) The plant N-end rule pathway: structure and functions. *Trends Plant Sci* 15: 447–453
- Gray JC, Sullivan JA, Wang J-H, Jerome CA, MacLean D (2003) Coordination of plastid and nuclear gene expression. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 358: 135–144
- Gupta KJ, Zabalza A, van Dongen JT (2009) Regulation of respiration when the oxygen availability changes. *Physiol Plant.* 137: 383-391
- Haga N, Kato K, Murase M, Araki S, Kubo M, Demura T, Suzuki K, Muller I, Voss U, Jurgens G, Ito M (2007) R1R2R3-Myb proteins positively regulate cytokinesis

- through activation of KNOLLE transcription in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 134: 1101–1110
- Hattori Y, Nagai K, Furukawa S, Song XJ, Kawano R, et al. (2009) The ethylene response factors SNORKEL1 and SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water. *Nature* 460: 1026–1030
- Ho QT, Verboven P, Verlinden BE, Herremans E, Wevers M, Carmeliet J, Nicolai BM (2011) A three-dimensional multiscale model for gas exchange in fruit. *Plant Physiol* 155:1158–1168
- Holman TJ, Jones PD, Russell L, Medhurst A, Ubeda Tomás S, Talloji P, Marquez J, Schmutts H, Tung SA, Taylor I, Footitt S, Bachmair A, Theodoulou FL, Holdsworth MJ (2009) The N-end rule pathway promotes seed germination and establishment through removal of ABA sensitivity in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 4549–4554
- Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann P (2008) Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv Bioinformatics* 2008: 420747
- Hu RG, Sheng J, Qi X, Xu Z, Takahashi TT, Varshavsky A (2005) The N-end rule pathway as a nitric oxide sensor controlling the levels of multiple regulators. *Nature* 437(7061):981–986
- Hunt PW, Klok EJ, Trevaskis B, Watts RA, Ellis MH, Peacock WJ, Dennis ES (2002) Increased level of hemoglobin 1 enhances survival of hypoxic stress and promotes early growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:17197-17202
- Huynh, L.N., VanToai, T., Streeter, J. and Banowetz, G. (2005) Regulation of flooding tolerance of SAG12:ipt *Arabidopsis* plants by cytokinin. *J. Exp. Bot.* 56:1397–1407
- Ishizawa (2014) Intracellular pH Regulation of Plant Cells Under Anaerobic Conditions. In: Dongen JT, Licausi F (eds) *Low oxygen stress in plants*. Springer, New York
- Ismond KP, Dolferus R, de Pauw M, Dennis ES, Good AG (2003) Enhanced low oxygen survival in *Arabidopsis* through increased metabolic flux in the fermentative pathway. *Plant Physiol* 132:1292-1302
- Kim TH, Hauser F, Ha T, Xue S, Böhmer M, Nishimura N, Munemasa S, Hubbard K, Peine N, Lee BH, Lee S, Robert N, Parker JE, Schroeder JI (2011) Chemical genetics

- reveals negative regulation of abscisic acid signaling by a plant immune response pathway. *Curr Biol.* 21: 990-997
- Kimmerer TW, Stringer MA (1988) Alcohol dehydrogenase and ethanol in the stems of trees: evidence for anaerobic metabolism in the vascular cambium. *Plant Physiol* 87:693–697
- Klecker, M; Gasch, P; Peisker, H; Dörmann, P; Schlicke, H; Grimm, B; Muströph, A (2014) A shoot-specific hypoxic response of *Arabidopsis thaliana* sheds light on the role of the phosphate-responsive transcription factor PHR1. *Plant Physiol* 165:774-790
- Kreuzwieser J., Hauberg J., Howell K.A., Carroll A., Rennenberg H., Millar A.H. & Whelan J. (2009) Differential response of gray poplar leaves and roots underpins stress adaptation during hypoxia. *Plant Physiol* 149,461–473
- Koussevitzky S., Nott A., Mockler T.C., Hong F., Sachetto-Martins G., Surpin M., Lim J., Mittler R., Chory J (2007) Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science* 316:715–719
- Laisk A, Oja V, Eichelmann H (2007) Kinetics of leaf oxygen uptake represent in planta activities of respiratory electron transport and terminal oxidases. *Physiologia Plantarum* 131: 1–9
- Lee SC, Muströph A, Sasidharan R, Vashisht D, Pedersen O, Oosumi T, Voesenek LA, Bailey-Serres J (2011) Molecular characterization of the submergence response of the *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *New Phytol* 190: 457-471
- Lee TH, Tang H, Wang X, Paterson AH (2012) PGDD: a database of gene and genome duplication in plants. *Nucleic Acids Res* 41: D1152-8
- Licausi F, Kosmacz M, Weits DA, Giuntoli B, Giorgi FM, Voesenek LACJ, Perata P, van Dongen JT (2011) Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. *Nature* 479: 419–422
- Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF (1995) Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J* 8:457-463
- Loreti E, Poggi A, Novi G, Alpi A, Perata P (2005) A genome-wide analysis of the effects of sucrose on gene expression in *Arabidopsis* seedlings under anoxia. *Plant Physiol* 137: 1130-1138

- Lu Y, Gehan JP, and Sharkey TD (2005). Daylength and circadian effects on starch degradation and maltose metabolism. *Plant Physiol* 138, 2280–2291
- Luhua S, Hegie A, Suzuki N, Shulaev E, Luo X, Cenariu D, Ma V, Kao S, Lim J, Gunay MB, Oosumi T, Lee SC, Harper J, Cushman J, Gollery M, Girke T, Bailey-Serres J, Stevenson RA, Zhu JK, Mittler R (2013) Linking genes of unknown function with abiotic stress responses by high-throughput phenotype screening,” *Physiol Plant* 148: 322–333
- Mao G, Seebeck T, Schrenker D, Yu O (2013) CYP709B3, a cytochrome P450 monooxygenase gene involved in salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* 2013, **13**:169
- Menegus F, Cattaruzza L, Chersi A, Fronza G (1989) Differences in the anaerobic lactate-succinate production and in the changes of cell sap pH for plants with high and low resistance to anoxia. *Plant Physiol* 90:29–32
- Millar AH, Bergersen FJ, Day DA (1994) Oxygen affinity of terminal oxidases in soybean mitochondria. *Plant Physiol Biochem* 32:847–85
- Mithran M, Paparelli E, Novi G, Perata P, Loreti E (2014) Analysis of the role of the pyruvate decarboxylase gene family in *Arabidopsis thaliana* under low-oxygen conditions. *Plant Biol* 16:28-34
- Mitsuda N, Ohme-Takagi M (2009) Functional analysis of transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 50:1232-1248
- Moutschen J, Moës A, Gilot J (1964) Some meiotic consequences of ethyl methane sulphonate and the interaction of copper or zinc. *Experientia.* 20:494-495
- Mühlenbock P, Plaszczyca M, Mellerowicz E, Karpinski S (2007) Lysigenous aerenchyma formation in *Arabidopsis* is controlled by LESION SIMULATING DISEASE1. *Plant Cell* 19: 3819–3830
- Mustroph A, Zanetti ME, Jang CJH, Holtan HE, Repetti PP, Galbraith DW, Girke T, Bailey-Serres J (2009) Profiling transcriptomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 18843–18848
- Mustroph A, Lee SC, Oosumi T, Zanetti ME, Yang H, Ma K, Yaghoubi-Masihi A, Fukao T, Bailey-Serres J (2010) Cross-kingdom comparison of transcriptomic adjustments to

- low oxygen stress highlights conserved and plant-specific responses. *Plant Physiol* 152:1484–1500
- Mustroph A, Hess N, Sasidharan R (2014) Hypoxic energy metabolism and PPI as an alternative energy currency. In: Dongen JT, Licausi F (eds) *Low oxygen stress in plants*. Springer, New York
- Nakamura T, Yamamoto R, Hiraga S, Nakayama N, Okazaki K, Takahashi H, Komatsu S (2012) Evaluation of metabolite alteration under flooding stress in soybeans. *Japan Agricultural Research Quarterly* 46:237–248
- Narsai R, Rocha M, Geigenberger P, Whelan J & van Dongen JT (2011) Comparative analysis between plant species of transcriptional and metabolic responses to hypoxia. *The New Phytologist* 190:472–487
- Natarajan AT, Upadhyya MD (1964) Localized chromosome breakage induced by ethyl-methane-sulfonate and hydroxylamine in *Vicia faba*. *Chromosoma* 15: 156–169
- Nishimura N, Yoshida T, Kitahata N, Asami T, Shinozaki K, Hirayama T. (2007) ABA-Hypersensitive Germination1 encodes a protein phosphatase 2C, an essential component of abscisic acid signaling in *Arabidopsis* seed. *Plant J* 50:935-49
- Paepke C, Ramírez-Aguilar S, Antonio C (2014) Oxygen consumption during hypoxic conditions. In: van Dongen JT, Licausi F (eds) *Low oxygen stress in plants*. Springer, Heidelberg
- Pandey GK, Grant JJ, Cheong YH, Kim BG, Li L, Luan S (2005) ABR1, an APETALA2-domain transcription factor that functions as a repressor of ABA response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139:1185–1193
- Paparelli E, Parlanti S, Gonzali S, Novi G, Mariotti L, Ceccarelli N, van Dongen JT, Kölling K, Zeeman SC, Perata P (2013) Nighttime sugar starvation orchestrates gibberellin biosynthesis and plant growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 25:3760–3769
- Park HY, Seok HY, Woo DH, Lee SY, Tarte VN, Lee EH, Lee CH, Moon YH (2011). AtERF71/HRE2 transcription factor mediates osmotic stress response as well as hypoxia response in *Arabidopsis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 414: 135–141
- Pokhilko A, Flis A, Sulpice R, Stitt M, Ebenhöf O (2014) Adjustment of carbon fluxes to light conditions regulates the daily turnover of starch in plants: a computational model *Mol. BioSyst.* 10:613-627

- Rahman M, Grover A, Peacock WJ, Dennis ES, Ellis MH (2001) Effects of manipulation of pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase levels on the submergence tolerance of rice. *Aust J Plant Physiol* 28: 1231-1241
- Rocha M, Licausi F, Araújo WL, Nunes-Nesi A, Sodek L, Fernie AR and van Dongen JT (2010a) Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* 152, 1501–1513
- Rodrigues A., Adamo M., Crozet P., Margalha L., Confraria A., Martinho C., Elias A, Rabissi A, Lumbreras V, González-Guzmán M, Antoni R, Rodriguez PL and Baena-González E (2013). ABI1 and PP2CA phosphatases are negative regulators of Snf1-related protein kinase1 signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25 3871–3884
- Sasidharan R, Mustroph A (2011) Plant oxygen sensing is mediated by the N-end rule pathway: a milestone in plant anaerobiosis. *Plant Cell* 23:4173–4183
- Shabala S (2011). Physiological and cellular aspects of phytotoxicity tolerance in plants: the role of membrane transporters and implications for crop breeding for waterlogging tolerance. *New Phytol.* 190, 289–298
- Shiono K, Ogawa S, Yamazaki S, Isoda H, Fujimura T, Nakazono M, Colmer TD (2011) Contrasting dynamics of radial O₂-loss barrier induction and aerenchyma formation in rice roots of two lengths. *Ann Bot* 107:89–99
- Sega GA (1984) A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. *Mutat Res.* 134: 113-142
- Shiao TL, Ellis MH, Dolferus R, Dennis ES, Doran PM (2002) Overexpression of alcohol dehydrogenase or pyruvate decarboxylase improves growth of hairy roots at reduced oxygen concentrations. *Biotechnol Bioeng* 15: 455-461
- Söderman E., Brocard I., Lynch T., Finkelstein R. Regulation and function of the *Arabidopsis ABA-insensitive4 (ABI4)* gene in seed and ABA response signaling networks. *Plant Physiol.* 124:1752–1765
- Sorenson R, Bailey-Serres J (2014) Selective mRNA translation tailors low oxygen energetics. In: van Dongen JT, Licausi F (eds) *Low-oxygen stress in plants*. Springer, Heidelberg

- Steffens B, Sauter M (2009) Epidermal cell death in rice is confined to cells with a distinct molecular identity and is mediated by ethylene and H₂O₂ through an autoamplified signal pathway. *Plant Cell* 21:184–196
- Seok HY, Tarte VN, Lee SY, Park HY, Moon YH (2014) *Arabidopsis* HRE1 α , a splicing variant of AtERF73/HRE1, functions as a nuclear transcription activator in hypoxia response and root development. *Plant Cell Rep.* 33(6):837-847
- Susek RE, Ausubel FM, Chory J (1993) Signal transduction mutants of *Arabidopsis* uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development. *Cell* 74: 787–799
- Tadege M, Braendle R, Kuhlemeier C (1998) Anoxia tolerance in tobacco roots: effects of overexpression of pyruvate decarboxylase. *Plant J* 14: 327-335
- Tadege M, Dupuis II, Kuhlemeier C (1999) Ethanol fermentation: new functions for an old pathway. *Trends Plant Sci* 4:320–325
- Tasaki T, Sriram SM, Park KS, Kwon YT (2012) The N-end rule pathway. *Annu Rev Biochem* 81: 261–289
- Umezawa T., Nakashima K., Miyakawa T., Kuromori T., Tanokura M., Shinozaki K., et al. (2010). Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. *Plant Cell Physiol.* 51 1821–1839
- Vashisht D, Hesselink A, Pierik R, Ammerlaan JMH, Bailey-Serres J, Visser EJW, Pedersen O, van Zanten M, Vreugdenhil D, Jamar DCL, et al (2011) Natural variation of submergence tolerance among *Arabidopsis thaliana* accessions. *New Phytol* 190: 299–310
- van Dongen JT, Schurr U, Pfister M, Geigenberger P (2003) Phloem metabolism and function have to cope with low internal oxygen. *Plant Physiol* 131:1529–1543
- van Dongen JT, Fröhlich A, Ramírez-Aguilar SJ, Schauer N, Fernie AR, Erban A, Kopka J, Clark J, Langer A, Geigenberger P (2009) Transcript and metabolite profiling of the adaptive response to mild decreases in oxygen concentration in the roots of *Arabidopsis* plants. *Ann Bot.* 103: 269-280
- van Veen H, Mustroph A, Barding GA, Vergeer-van Eijk M, Welschen-Evertman RA, Pedersen O, Visser EJ, Larive CK, Pierik R, Bailey-Serres J, Voeselek LA, Sasidharan R (2013) Two *Rumex* species from contrasting hydrological niches

regulate flooding tolerance through distinct mechanisms. *Plant Cell* [Epub ahead of print].

- Weits DA, Giuntoli B, Kosmacz M, Parlanti S, Hubberten HM, Riegler H, Hoefgen R, Perata P, van Dongen JT, Licausi F (2014) Plant cysteine oxidases control the oxygen-dependent branch of the N-end-rule pathway. *Nat Commun.* 5: 3425
- Wheaton WW, Chandel NS (2011) Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *Am J Physiol Cell Physiol.* 300: C385-93
- Xu K, Xu X, Fukao T, Canlas P, Maghirang-Rodriguez R, Heuer S, Ismail AM, Bailey-Serres J, Ronald PC, Mackill DJ (2006) Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature* 442:705–708
- Yang CY, Hsu FC, Li JP, Wang NN, Shih MC (2011) The AP2/ERF transcription factor AtERF73/HRE1 modulates ethylene responses during hypoxia in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 156:202–212
- Yoshida S, Ito M, Callis J, Nishida I, Watanabe A (2002) A delayed leaf senescence mutant is defective in arginyl-tRNA:protein arginyltransferase, a component of the N-end rule pathway in *Arabidopsis*. *Plant J* 32: 129-137
- Zabalza A, van Dongen JT, Froehlich A, Oliver SN, Faix B, Gupta KJ, Schmäzlin E, Igal M, Orcaray L, Royuela M, Geigenberger P (2009) Regulation of respiration and fermentation to control the plant internal oxygen concentration. *Plant Physiol* 149: 1087-1098

6 Anhang

6.1 Übersicht über *prt6*-Mutanten

Tabelle 4: Auflistung und Benennung von *prt6*-Mutanten, die in der Literatur beschrieben sind

Name der Linie	ID der Linie	Ökotyp	Typ der Mutation	Ort der Mutation (bp vom Startcodon)	Referenz
<i>prt6-1</i>	SAIL 1278_H11	Col-0	T-DNA insertion	ca. 2.360	Garzon et al. 2007, Graciet et al. 2009, Gibbs et al. 2011
<i>prt6-2</i>	GK270G04	Col-0	T-DNA insertion	ca. 7.940	Garzon et al. 2007, Graciet et al. 2009
<i>prt6-4</i>	fn10	Ler	Fast neutron mutation	ca. 4.860	Holman et al. 2009
<i>prt6-5</i>	SALK_051088	Col-0	T-DNA insertion	ca. 2.550	Graciet et al. 2009, Gibbs et al. 2011 Weits et al. 2014
<i>prt6-6</i>	FLAG_443C12	WS	T-DNA insertion	ca. 2.930	Licausi et al. 2011
<i>prt6-7</i>	<i>ged1</i>	WS	EMS mutation	4.442	Diese Arbeit

part of PRT6	1	CTACTTCTGATGAGAAGCGCAAGGCTAAAGCTAAAGAGAGGCAGGCTGCTATTATGGTAA	60
TAIL2A_fw	1	-----AAGGAGTGCTATAATGGGTA	20
TAIL2B_fw	1	-----AGAAGAGGGCATTATGGTA	20
part of MYB3R3	1	-----	1
Clustal Consensus	1		1
part of PRT6	61	GATCCTTTTATTTCAAATCTAGTGCAAAAAGTTGACATGGAACCGGTAGCCATTGATGTC	120
TAIL2A_fw	21	GATCCTTTTATTTCAA-TCTAGTGCAAAAAGTTGACATGGAACCGGTAGCCATTGATGTC	79
TAIL2B_fw	21	GGTCCTTTTATTTCAA-TCTAGTGCAAAAAGTTGACATGGAACCGGTAGCCATTGATGTC	79
part of MYB3R3	1	-----	1
Clustal Consensus	1		1
part of PRT6	121	TGATCATGCACTTGAACATATGATGGCTGCTGTTTCGCTCCCTGAC-TTGTCTGGGTCTG	179
TAIL2A_fw	80	TGATCATGCACTTGAACATATGATGGCTGCTGTTTCGCTCCCTGAC-TTGTCTGGGTCTG	138
TAIL2B_fw	80	TGATCATGCACTTGAACATATGATGGCTGCTGTTTCGCTCCCTGAC-TTGTCTGGGTCTG	138
part of MYB3R3	1	-----TGATATTAACAAGGA--TG	17
Clustal Consensus	1	*** ** * ** **	10
part of PRT6	180	CATGCTCCCTGTTAATGTATCTCCTTGTTGATAAGCATCAACAAGGAGCATGCAGAACGT	239
TAIL2A_fw	139	CATGCTCCCTGTTAATGTATCTCCTTGTTGATAAGCATCAACAAGGAGCATGCAGAACGT	198
TAIL2B_fw	139	CATGCTCCCTGTTAATGTATCTCCTTGTTGATAAGCATCAACAAGGAGCATGCAGAACGT	198
part of MYB3R3	18	CTTGACCACAGAGGAAGAAGTAGCTCTC-ATGAATGCTCATCGAAGCCACGGA-AACAA	75
Clustal Consensus	11	* *	30
part of PRT6	240	AGACATAGTTACCTCTGTGGTAATAGAAGATTTTTGTATAAGACTGTCTAAATTGTTTTT	299
TAIL2A_fw	199	AGACATAGTTACCTCTGTGGTAATAGAAGATTTTTGT-----TTTTTACTTTTCTTG	250
TAIL2B_fw	199	AGACATAGTTACCTCTGTGGTAATAGAAGATTTTTGT-----TTTTTACTTTTCTTG	250
part of MYB3R3	76	ATGGGCTGAAATTGCTAAGGTCTTACCCGGCAGGTA-----TTTTTACTTTTCTTG	126
Clustal Consensus	31	* *	51
part of PRT6	300	ATGCTCATTATTCAAGTTGTTATCTGTAGTTAGAATTAA----TAAGTTCCAGGATATGG	355
TAIL2A_fw	251	GCATGCGTCATTGGAGTTGAGACTTTAGAGAAGGGTTAGCTTCTGGGTTTAAATGAAGGTT	310
TAIL2B_fw	251	GCATGCGTCATTGGAGTTGAGACTTTAGAGAAGGGTTAGCTTCTGGGTTTAAATGAAGGTT	310
part of MYB3R3	127	GCATGCGTCATTGGAGTTGAGACTTTAGAGAAGGGTTAGCTTCTGGGTTTAAATGAAGGTT	186
Clustal Consensus	51	* *	75
part of PRT6	356	TAGTTATGCTTATATAT-AACTTGCATGCAGGCAAAAATGAAAGCTGAACA-----	405
TAIL2A_fw	311	TTACTAAAACACTTGCGTGAACAACACGGCGCTATACACAAGGACTAAAATAACTG	366
TAIL2B_fw	311	TTACTAAAACACTTGCGTGAACAACACGGCGCTATACACAAGGACTAAAATAACTG	365
part of MYB3R3	187	TTACTAAAACACTTGCGTGAACAACACGGCGCTATACACAAGGACTAAAATAACTG	241
Clustal Consensus	76	* *	88

Abb.41: Vergleich der Tail-PCR von *ged1* gDNA mit der Sequenz von *PRT6* und *MYB3R3*. Ähnliche Sequenzen sind grau unterlegt, der Ort des DNA-Austausches ist gelb unterlegt. Die Tail-PCR und Sequenzierung wurden von der 5` Seite der angegebenen Sequenz durchgeführt.

Col-0 ATE2 gene 1 GCTACCCAAGTTACTTCTCCTCAGATAGAAATGAAGGTGAAGAAAGCCTTATGTGCTACAACA 60
WS-0_SALK 1 GCTACCCAAGTTACTTCTCCTCAGATAGAAATGAAGGTGAAGAAAGCCTTGTGCTACAACA 60
WS-2_SALK 1 GCTACCCAAGTTACTTCTCCTCAGATAGAAATGAAGGTGAAGAAAGCCTTGTGCTACAACA 60
N1603_WS-0 1 GCTACCCAAGTTACTTCTCCTCAGATAGAAATGAAGGTGAAGAAAGCCTTGTGCTACAACA 60
N28825_WS-0 1 GCTACCCAAGTTACTTCTCCTCAGATAGAAATGAAGGTGAAGAAAGCCTTGTGCTACAACA 60
N76303_WS-0 1 GCTACCCAAGTTACTTCTCCTCAGATAGAAATGAAGGTGAAGAAAGCCTTGTGCTACAACA 60
N28827_WS-2 1 GCTACCCAAGTTACTTCTCCTCAGATAGAAATGAAGGTGAAGAAAGCCTTGTGCTACAACA 60
N28828_WS-2 1 GCTACCCAAGTTACTTCTCCTCAGATAGAAATGAAGGTGAAGAAAGCCTTGTGCTACAACA 60
ged_ate2_fw2 1 GCTACCCAAGTTACTTCTCCTCAGATAGAAATGAAGGTGAAGAAAGCCTTGTGCTACAACA 60
WS_ate2_fw2 1 GCTACCCAAGTTACTTCTCCTCAGATAGAAATGAAGGTGAAGAAAGCCTTGTGCTACAACA 60

Col-0 ATE2 gene 61 ATAAAGTCTTCTTCGAACAAGCTTCATGCAAGAAAGCGGAAGCTGGAGATGCACTTAAAA 120
WS-0_SALK 61 ATAAAGTCTTCTTCGAACAAGCTTCATGCAAGAAAGCGGAAGCTGGAGATGCACTTAAAA 120
WS-2_SALK 61 ATAAAGTCTTCTTCGAACAAGCTTCATGCAAGAAAGCGGAAGCTGGAGATGCACTTAAAA 120
N1603_WS-0 61 ATAAAGTCTTCTTCGAACAAGCTTCATGCAAGAAAGCGGAAGCTGGAGATGCACTTAAAA 120
N28825_WS-0 61 ATAAAGTCTTCTTCGAACAAGCTTCATGCAAGAAAGCGGAAGCTGGAGATGCACTTAAAA 120
N76303_WS-0 61 ATAAAGTCTTCTTCGAACAAGCTTCATGCAAGAAAGCGGAAGCTGGAGATGCACTTAAAA 120
N28827_WS-2 61 ATAAAGTCTTCTTCGAACAAGCTTCATGCAAGAAAGCGGAAGCTGGAGATGCACTTAAAA 120
N28828_WS-2 61 ATAAAGTCTTCTTCGAACAAGCTTCATGCAAGAAAGCGGAAGCTGGAGATGCACTTAAAA 120
ged_ate2_fw2 61 ATAAAGTCTTCTTCGAACAAGCTTCATGCAAGAAAGCGGAAGCTGGAGATGCACTTAAAA 120
WS_ate2_fw2 61 ATAAAGTCTTCTTCGAACAAGCTTCATGCAAGAAAGCGGAAGCTGGAGATGCACTTAAAA 120

Col-0 ATE2 gene 121 AGGTC-GAGTTTTGAACCAGAGGAATATGAATTATACAAACGGTATCAAAATGAAAGTGCA 179
WS-0_SALK 121 AGGTC-GAGTTTTGATCCAGGGGAATATGAATTATACAAACGGTATCAGATAAAAAGTGCA 179
WS-2_SALK 121 AGGTCGAGTTTTGATCCAGGGGAATATGAATTATACAAACGGTATCAGATGAAAGTGCA 180
N1603_WS-0 121 AGGTC-GAGTTTTGATCCAGGGGAATATGAATTATACAAACGGTATCAGATAAAAAGTGCA 179
N28825_WS-0 121 AGGTC-GAGTTTTGATCCAGGGGAATATGAATTATACAAACGGTATCAGATAAAAAGTGCA 179
N76303_WS-0 121 AGGTC-GAGTTTTGATCCAGGGGAATATGAATTATACAAACGGTATCAGATAAAAAGTGCA 179
N28827_WS-2 121 AGGTCGAGTTTTGATCCAGGGGAATATGAATTATACAAACGGTATCAGATAAAAAGTGCA 180
N28828_WS-2 121 AGGTCGAGTTTTGATCCAGGGGAATATGAATTATACAAACGGTATCAGATAAAAAGTGCA 180
ged_ate2_fw2 121 AGGTCGAGTTTTGATCCAGGGGAATATGAATTATACAAACGGTATCAGATAAAAAGTGCA 180
WS_ate2_fw2 121 AGGTCGAGTTTTGATCCAGGGGAATATGAATTATACAAACGGTATCAGATAAAAAGTGCA 180

Col-0 ATE2 gene 180 TAATGATAAGCCGGAGAGCATCTCAGAAACTTCATACAAAACGGTTTTTGGTAGACACTCC 239
WS-0_SALK 180 TAATGATAAGCCGGAGAGTATCTCAGAAACTTCATACAAAAGGTTTTTGGTAGACACTCC 239
WS-2_SALK 181 TAATGATAAGCCGGAGAGTATCTCAGAAACTTCATACAAAAGGTTTTTGGTAGACACTCC 240
N1603_WS-0 180 TAATGATAAGCCGGAGAGTATCTCAGAAACTTCATACAAAAGGTTTTTGGTAGACACTCC 239
N28825_WS-0 180 TAATGATAAGCCGGAGAGTATCTCAGAAACTTCATACAAAAGGTTTTTGGTAGACACTCC 239
N76303_WS-0 180 TAATGATAAGCCGGAGAGTATCTCAGAAACTTCATACAAAAGGTTTTTGGTAGACACTCC 239
N28827_WS-2 181 TAATGATAAGCCGGAGAGTATCTCAGAAACTTCATACAAAAGGTTTTTGGTAGACACTCC 240
N28828_WS-2 181 TAATGATAAGCCGGAGAGTATCTCAGAAACTTCATACAAAAGGTTTTTGGTAGACACTCC 240
ged_ate2_fw2 181 TAATGATAAGCCGGAGAGTATCTCAGAAACTTCATACAAAAGGTTTTTGGTAGACACTCC 240
WS_ate2_fw2 181 TAATGATAAGCCGGAGAGTATCTCAGAAACTTCATACAAAAGGTTTTTGGTAGACACTCC 240

Col-0 ATE2 gene 240 GCTCATTGAAGTTCCTTCTTCAGGTCATGATGATGAAGAAAAGTTCCCTCTTGTGGCTT 299
WS-0_SALK 240 GCTCATTGAAGTTCCTTCTTCAGGTCATGATGATGAAGAAAAGTTCCCTCTTGTGGCTT 299
WS-2_SALK 241 GCTCATTGAAGTTCCTTCTTCAGGTCATGATGATGAAGAAAAGTTCCCTCTTGTGGCTT 300
N1603_WS-0 240 GCTCATTGAAGTTCCTTCTTCAGGTCATGATGATGAAGAAAAGTTCCCTCTTGTGGCTT 299
N28825_WS-0 240 GCTCATTGAAGTTCCTTCTTCAGGTCATGATGATGAAGAAAAGTTCCCTCTTGTGGCTT 299
N76303_WS-0 240 GCTCATTGAAGTTCCTTCTTCAGGTCATGATGATGAAGAAAAGTTCCCTCTTGTGGCTT 299
N28827_WS-2 241 GCTCATTGAAGTTCCTTCTTCAGGTCATGATGATGAAGAAAAGTTCCCTCTTGTGGCTT 300
N28828_WS-2 241 GCTCATTGAAGTTCCTTCTTCAGGTCATGATGATGAAGAAAAGTTCCCTCTTGTGGCTT 300
ged_ate2_fw2 241 GCTCATTGAAGTTCCTTCTTCAGGTCATGATGATGAAGAAAAGTTCCCTCTTGTGGCTT 300
WS_ate2_fw2 241 GCTCATTGAAGTTCCTTCTTCAGGTCATGATGATGAAGAAAAGTTCCCTCTTGTGGCTT 300

Col-0 ATE2 gene 300 TGG-TTCTTTCCATCAACAATACCGAGTTGATGACCGTCTAATTGCTGTGGGGTGATTG 358
WS-0_SALK 300 TGG-TTCTTTCCATCAACAATACCGAGTTGATGACCGTCTAATTGCTGTGGGGTGATTG 358
WS-2_SALK 301 TGG-TTCTTTCCATCAACAATACCGAGTTGATGACCGTCTAATTGCTGTGGGGTGATTG 359
N1603_WS-0 300 TGG-TTCTTTCCATCAACAATACCGAGTTGATGACCGTCTAATTGCTGTGGGGTGATTG 358
N28825_WS-0 300 TGG-TTCTTTCCATCAACAATACCGAGTTGATGACCGTCTAATTGCTGTGGGGTGATTG 358
N76303_WS-0 300 GGGTTTCTTTCCATCAACAATACCGAGTTGATGACCGTCTAATTGCTGTGGGGTGATTG 359
N28827_WS-2 300 -GG-TTCTTTCCATCAACAATACCGAGTTGATGACCGTCTAATTGCTGTGGGGTGATTG 358
N28828_WS-2 301 GGGTTTCTTTCCATCAACAATACCGAGTTGATGACCGTCTAATTGCTGTGGGGTGATTG 360
ged_ate2_fw2 301 TGG-TTCTTTCCATCAACAATACCGAGTTGATGACCGTCTAATTGCTGTGGGGTGATTG 359
WS_ate2_fw2 301 TGG-TTCTTTCCATCAACAATACCGAGTTGATGACCGTCTAATTGCTGTGGGGTGATTG 359

Col-0 ATE2 gene 359 ATATTCTTCCTAAATGTTTGTCTAGTAAATACCTGTTCTGGGATCCGGATTTCCGCATCCT 418
WS-0_SALK 359 ACATTCTTCCTAAATGTTTGTCTAGTAAATACCTGTTCTGGGATCCGGATTTCCGCATCCT 418
WS-2_SALK 360 ACATTCTTCCTAAATGTTTGTCTAGTAAATACCTGTTCTGGGATCCGGATTTCCGCATCCT 419
N1603_WS-0 359 ACATTCTTCCTAAATGTTTGTCTAGTAAATACCTGTTCTGGGATCCGGATTTCCGCATCCT 418
N28825_WS-0 359 ACATTCTTCCTAAATGTTTGTCTAGTAAATACCTGTTCTGGGATCCGGATTTCCGCATCCT 418
N76303_WS-0 360 ACATTCTTCCTAAATGTTTGTCTAGTAAATACCTGTTCTGGGATCCGGATTTCCGCATCCT 419
N28827_WS-2 359 ACATTCTTCCTAAATGTTTGTCTAGTAAATACCTGTTCTGGGATCCGGATTTCCGCATCCT 418
N28828_WS-2 361 ACATTCTTCCTAAATGTTTGTCTAGTAAATACCTGTTCTGGGATCCGGATTTCCGCATCCT 420
ged_ate2_fw2 360 ACATTCTTCCTAAATGTTTGTCTAGTAAATACCTGTTCTGGGATCCGGATTTCCGCATCCT 419
WS_ate2_fw2 360 ACATTCTTCCTAAATGTTTGTCTAGTAAATACCTGTTCTGGGATCCGGATTTCCGCATCCT 419

Col-0 <i>ATE2</i> gene	419	<u>TGTCCTTGAAACTACTCAGCCCTGCAAGAAATCGATTGGGTAAAAACAGAACCAAGCTC</u>	478
WS-0_SALK	419	<u>TGTCCTTGAAACTACTCAGCCCTGCAAGAAATCGATTGGGTAAAAACAGAACCAAGCTC</u>	478
WS-2_SALK	420	<u>TGTCCTTGAAACTACTCAGCCCTGCAAGAAATCGATTGGGTAAAAACAGAACCAAGCTC</u>	479
N1603_WS-0	419	<u>TGTCCTTGAAACTACTCAGCCCTGCAAGAAATCGATTGGGTAAAAACAGAACCAAGCTC</u>	478
N28825_WS-0	419	<u>TGTCCTTGAAACTACTCAGCCCTGCAAGAAATCGATTGGGTAAAAACAGAACCAAGCTC</u>	478
N76303_WS-0	420	<u>TGTCCTTGAAACTACTCAGCCCTGCAAGAAATCGATTGGGTAAAAACAGAACCAAGCTC</u>	479
N28827_WS-2	419	<u>TGTCCTTGAAACTACTCAGCCCTGCAAGAAATCGATTGGGTAAAAACAGAACCAAGCTC</u>	478
N28828_WS-2	421	<u>TGTCCTTGAAACTACTCAGCCCTGCAAGAAATCGATTGGGTAAAAACAGAACCAAGCTC</u>	480
ged_ate2_fw2	420	<u>TGTCCTTGAAACTACTCAGCCCTGCAAGAAATCGATTGGGTAAAAACAGAACCAAGCTC</u>	479
WS_ate2_fw2	420	<u>TGTCCTTGAAACTACTCAGCCCTGCAAGAAATCGATTGGGTAAAAACAGAACCAAGCTC</u>	479
Col-0 <i>ATE2</i> gene	479	<u>ATTGCTCTACTCTTGAGTATTACTATCTTGGCTATTACATACATTCCCTGTAACAAGATGA</u>	538
WS-0_SALK	479	<u>ATTGCTCTACTCTTGAGTATTACTATCTTGGCTATTACATACATTCCCTGTAACAAGATGA</u>	538
WS-2_SALK	480	<u>ATTGCTCTACTCTTGAGTATTACTATCTTGGCTATTACATACATTCCCTGTAACAAGATGA</u>	539
N1603_WS-0	479	<u>ATTGCTCTACTCTTGAGTATTACTATCTTGGCTATTACATACATTCCCTGTAACAAGATGA</u>	538
N28825_WS-0	479	<u>ATTGCTCTACTCTTGAGTATTACTATCTTGGCTATTACATACATTCCCTGTAACAAGATGA</u>	538
N76303_WS-0	480	<u>ATTGCTCTACTCTTGAGTATTACTATCTTGGCTATTACATACATTCCCTGTAACAAGATGA</u>	539
N28827_WS-2	479	<u>ATTGCTCTACTCTTGAGTATTACTATCTTGGCTATTACATACATTCCCTGTAACAAGATGA</u>	538
N28828_WS-2	481	<u>ATTGCTCTACTCTTGAGTATTACTATCTTGGCTATTACATACATTCCCTGTAACAAGATGA</u>	540
ged_ate2_fw2	480	<u>ATTGCTCTACTCTTGAGTATTACTATCTTGGCTATTACATACATTCCCTGTAACAAGATGA</u>	539
WS_ate2_fw2	480	<u>ATTGCTCTACTCTTGAGTATTACTATCTTGGCTATTACATACATTCCCTGTAACAAGATGA</u>	539
Col-0 <i>ATE2</i> gene	539	<u>GATATAAAGCAGCCTATCGTCCGCTGAGCTTCTATGCCCTCTCCGGTACCAGTAAGTTC</u>	598
WS-0_SALK	539	<u>GATATAAAGCAGCCTATCGCCCGTCTGAGCTTCTATGCCCTCTCCGGTACCAGtaagttc</u>	598
WS-2_SALK	540	<u>GATATAAAGCAGCCTATCGCCCGTCTGAGCTTCTATGCCCTCTCCGGTACCAGtaagttc</u>	599
N1603_WS-0	539	<u>GATATAAAGCAGCCTATCGCCCGTCTGAGCTTCTATGCCCTCTCCGGTACCAGTAAGTTC</u>	598
N28825_WS-0	539	<u>GATATAAAGCAGCCTATCGCCCGTCTGAGCTTCTATGCCCTCTCCGGTACCAGTAAGTTC</u>	598
N76303_WS-0	540	<u>GATATAAAGCAGCCTATCGCCCGTCTGAGCTTCTATGCCCTCTCCGGTACCAGTAAGTTC</u>	599
N28827_WS-2	539	<u>GATATAAAGCAGCCTATCGCCCGTCTGAGCTTCTATGCCCTCTCCGGTACCAGTAAGTTC</u>	598
N28828_WS-2	541	<u>GATATAAAGCAGCCTATCGCCCGTCTGAGCTTCTATGCCCTCTCCGGTACCAGTAAGTTC</u>	600
ged_ate2_fw2	540	<u>GATATAAAGCAGCCTATCGCCCGTCTGAGCTTCTATGCCCTCTCCGGTACCAGTAAGTTC</u>	599
WS_ate2_fw2	540	<u>GATATAAAGCAGCCTATCGCCCGTCTGAGCTTCTATGCCCTCTCCGGTACCAGTAAGTTC</u>	599
Col-0 <i>ATE2</i> gene	599	<u>CTTAAACCACAAAACCTAAGATCAAATCTTGTTAGTTGTGGAGAGCATATAACTGATTCT</u>	658
WS-0_SALK	599	<u>cttaaaccacaaaactaagatcaaattcttgttagttgtggagagcatataactgattcc</u>	658
WS-2_SALK	600	<u>cttaaaccacaaaactaagatcaaattcttgttagttgtggagagcatataactgattcc</u>	659
N1603_WS-0	599	<u>CTTAAACCACAAAACCTAAGATCAAATCTTGTTAGTTGTGGAGAGCATATAACTGATTCC</u>	658
N28825_WS-0	599	<u>CTTAAACCACAAAACCTAAGATCAAATCTTGTTAGTTGTGGAGAGCATATAACTGATTCC</u>	658
N76303_WS-0	600	<u>CTTAAACCACAAAACCTAAGATCAAATCTTGTTAGTTGTGGAGAGCATATAACTGATTCC</u>	659
N28827_WS-2	599	<u>CTTAAACCACAAAACCTAAGATCAAATCTTGTTAGTTGTGGAGAGCATATAACTGATTCC</u>	658
N28828_WS-2	601	<u>CTTAAACCACAAAACCTAAGATCAAATCTTGTTAGTTGTGGAGAGCATATAACTGATTCC</u>	660
ged_ate2_fw2	600	<u>CTTAAACCACAAAACCTAAGATCAAATCTTGTTAGTTGTGGAGAGCATATAACTGATTCC</u>	659
WS_ate2_fw2	600	<u>CTTAAACCACAAAACCTAAGATCAAATCTTGTTAGTTGTGGAGAGCATATAACTGATTCC</u>	659
Col-0 <i>ATE2</i> gene	659	<u>CTTGATTTTGTCTCAGATGGGTTCCATTGCAAGTAGCCAAGCCTCTGCTTGATAAAAA</u>	718
WS-0_SALK	659	<u>cttगतttttgttctcagatgggttccattgcaagtagccaagcctctgcttgataaaaa</u>	718
WS-2_SALK	660	<u>cttगतttttgttctcagatgggttccattgcaagtagccaagcctctgcttgataaaaa</u>	719
N1603_WS-0	659	<u>CTTGATTTTGTCTCAGATGGGTTCCATTGCAAGTAGCCAAGCCTCTGCTTGATAAAAA</u>	718
N28825_WS-0	659	<u>CTTGATTTTGTCTCAGATGGGTTCCATTGCAAGTAGCCAAGCCTCTGCTTGATAAAAA</u>	718
N76303_WS-0	660	<u>CTTGATTTTGTCTCAGATGGGTTCCATTGCAAGTAGCCAAGCCTCTGCTTGATAAAAA</u>	719
N28827_WS-2	659	<u>CTTGATTTTGTCTCAGATGGGTTCCATTGCAAGTAGCCAAGCCTCTGCTTGATAAAAA</u>	718
N28828_WS-2	661	<u>CTTGATTTTGTCTCAGATGGGTTCCATTGCAAGTAGCCAAGCCTCTGCTTGATAAAAA</u>	720
ged_ate2_fw2	660	<u>CTTGATTTTGTCTCAGATGGGTTCCATTGCAAGTAGCCAAGCCTCTGCTTGATAAAAA</u>	719
WS_ate2_fw2	660	<u>CTTGATTTTGTCTCAGATGGGTTCCATTGCAAGTAGCCAAGCCTCTGCTTGATAAAAA</u>	719
Col-0 <i>ATE2</i> gene	719	<u>GCCTTATTCGGTCTTGTCGAATATCACTAAGGTTTCTTCATCATCATCATCACCTCAAGC</u>	778
WS-0_SALK	719	<u>GCCTTATTCGGTCTTGTCGAATATCACTAAGGTTTCTTCATCATCATCATCACCTCAAGC</u>	778
WS-2_SALK	720	<u>GCCTTATTCGGTCTTGTCGAATATCACTAAGGTTTCTTCATCATCATCATCACCTCAAGC</u>	779
N1603_WS-0	719	<u>GCCTTATTCGGTCTTGTCGAATATCACTAAGGTTTCTTCATCATCATCATCACCTCAAGC</u>	778
N28825_WS-0	719	<u>GCCTTATTCGGTCTTGTCGAATATCACTAAGGTTTCTTCATCATCATCATCACCTCAAGC</u>	778
N76303_WS-0	720	<u>GCCTTATTCGGTCTTGTCGAATATCACTAAGGTTTCTTCATCATCATCATCACCTCAAGC</u>	779
N28827_WS-2	719	<u>GCCTTATTCGGTCTTGTCGAATATCACTAAGGTTTCTTCATCATCATCATCACCTCAAGC</u>	778
N28828_WS-2	721	<u>GCCTTATTCGGTCTTGTCGAATATCACTAAGGTTTCTTCATCATCATCATCACCTCAAGC</u>	780
ged_ate2_fw2	720	<u>GCCTTATTCGGTCTTGTCGAATATCACTAAGGTTTCTTCATCATCATCATCACCTCAAGC</u>	779
WS_ate2_fw2	720	<u>GCCTTATTCGGTCTTGTCGAATATCACTAAGGTTTCTTCATCATCATCATCACCTCAAGC</u>	779

Abb.42: Vergleich von Sequenzierungen des *ATE2* Gens von Col-0, verschiedenen bei NASC bestellten Wildtyplinien des Ökotyps Ws-0 bzw. Ws-2 (N1603-N28828) sowie von *ged1* und dem zugehörigen Wildtyp Ws mit der auf (<http://signal.salk.edu/atg1001/3.0/gebrowser.php>) verfügbaren Genomsequenz von Ws-0 und Ws-2 (WS-0_SALK, WS-2_SALK)

```

Col-0_ATE2_cds 1 GTTGGAGAGTTTACTGGTTTTTCTGTTAAGGTCTCCAAGGGTCATATCAACTTCCTTTCA 60
WS-0_ATE2_prot 1 GTGGGAGAGTTTACTGGTTTTTCTGTTAAGGTCTCCAAGGGTCATATCAACTTCCTTTCA 60
WS-2_ATE2_prot 1 GTGGGAGAGTTTACTGGTTTTTCTGTTAAGGTCTCCAAGGGTCATATCAACTTCCTTTCA 60
ged1_cds_ATE2 1 GTGGGAGAGTTTACTGGTTTTTCTGTTAAGGTCTCCAAGGGTCATATCAACTTCCTTTCA 60
WS_cds_ATE2 1 GTGGGAGAGTTTACTGGTTTTTCTGTTAAGGTCTCCAAGGGTCATATCAACTTCCTTTCA 60

Col-0_ATE2_cds 61 GCTACCCAAGTTACTTCCTCAGATAGAAATGAAGGTGAAGAAAGCCTATGTGCTACAACA 120
WS-0_ATE2_prot 61 GCTACCCAAGTTACTTCCTCAGATAGAAATGAAGGTGAAGAAAGCCTTTGTGCTACAACA 120
WS-2_ATE2_prot 61 GCTACCCAAGTTACTTCCTCAGATAGAAATGAAGGTGAAGAAAGCCTTTGTGCTACAACA 120
ged1_cds_ATE2 61 GCTACCCAAGTTACTTCCTCAGATAGAAATGAAGGTGAAGAAAGCCTTTGTGCTACAACA 120
WS_cds_ATE2 61 GCTACCCAAGTTACTTCCTCAGATAGAAATGAAGGTGAAGAAAGCCTTTGTGCTACAACA 120

Col-0_ATE2_cds 121 ATAAAGTCTTCTTCGAACAAGCTTCATGCAAGAAAGCGGAAGCTGGAGATGCACCTTAAAA 180
WS-0_ATE2_prot 121 ATAAAGTCTTCTTCGAACAAGCTTCATGCAAGAAAGCGGAAGCTGGAGATGCACCTTAAAA 180
WS-2_ATE2_prot 121 ATAAAGTCTTCTTCGAACAAGCTTCATGCAAGAAAGCGGAAGCTGGAGATGCACCTTAAAA 180
ged1_cds_ATE2 121 ATAAAGTCTTCTTCGAACAAGCTTCATGCAAGAAAGCGGAAGCTGGAGATGCACCTTAAAA 180
WS_cds_ATE2 121 ATAAAGTCTTCTTCGAACAAGCTTCATGCAAGAAAGCGGAAGCTGGAGATGCACCTTAAAA 180

Col-0_ATE2_cds 181 AGGTC-GAGTTTTGAACCAGGAATATGAATTATACAAACGGTATCAAATGAAAGTGCA 239
WS-0_ATE2_prot 181 AGGTC-GAGTTTTGATCCAGGGGAATATGAATTATACAAACGGTATCAGATAAAAGTGCA 239
WS-2_ATE2_prot 181 AGGTCGAGTTTTGATCCAGGGGAATATGAATTATACAAACGGTATCAGATGAAAGTGCA 240
ged1_cds_ATE2 181 AGGTCGAGTTTTGATCCAGGGGAATATGAATTATACAAACGGTATCAGATAAAAGTGCA 240
WS_cds_ATE2 181 AGGTCGAGTTTTGATCCAGGGGAATATGAATTATACAAACGGTATCAGATAAAAGTGCA 240

Col-0_ATE2_cds 240 TAATGATAAGCCGGAGAGCATCTCAGAACTTCATACAAAAGGTTTTGGTAGACTCC 299
WS-0_ATE2_prot 240 TAATGATAAGCCGGAGAGTATCTCAGAACTTCATACAAAAGGTTTTGGTAGACTCC 299
WS-2_ATE2_prot 241 TAATGATAAGCCGGAGAGTATCTCAGAACTTCATACAAAAGGTTTTGGTAGACTCC 300
ged1_cds_ATE2 241 TAATGATAAGCCGGAGAGTATCTCAGAACTTCATACAAAAGGTTTTGGTAGACTCC 300
WS_cds_ATE2 241 TAATGATAAGCCGGAGAGTATCTCAGAACTTCATACAAAAGGTTTTGGTAGACTCC 300

Col-0_ATE2_cds 300 GCTCAGTGAAGTTCTTCTTCAGGTTATGATGATGAAGAAAAGATTCTCTTTGTGGCTT 359
WS-0_ATE2_prot 300 GCTCATTGAAGTTCTTCTTCAGGTCATGATGATGAAGAAAAGTTCTCTCTTGTGGCTT 359
WS-2_ATE2_prot 301 GCTCATTGAAGTTCTTCTTCAGGTCATGATGATGAAGAAAAGTTCTCTCTTGTGGCTT 360
ged1_cds_ATE2 301 GCTCATTGAAGTTCTTCTTCAGGTCATGATGATGAAGAAAAGTTCTCTCTTGTGGCTT 360
WS_cds_ATE2 301 GCTCATTGAAGTTCTTCTTCAGGTCATGATGATGAAGAAAAGTTCTCTCTTGTGGCTT 360

Col-0_ATE2_cds 360 TGGTCTTTCCATCAACAATACCGAGTTGATGACCGTCTAATTGCTGTTGGGGTGATTGA 419
WS-0_ATE2_prot 360 TGGTCTTTCCATCAACAATACCGAGTTGATGACCGTCTAATTGCTGTTGGGGTGATTGA 419
WS-2_ATE2_prot 361 TGGTCTTTCCATCAACAATACCGAGTTGATGACCGTCTAATTGCTGTTGGGGTGATTGA 420
ged1_cds_ATE2 361 TGGTCTTTCCATCAACAATACCGAGTTGATGACCGTCTAATTGCTGTTGGGGTGATTGA 420
WS_cds_ATE2 361 TGGTCTTTCCATCAACAATACCGAGTTGATGACCGTCTAATTGCTGTTGGGGTGATTGA 420

Col-0_ATE2_cds 420 TATTCTTCCTAAATGTTTGTCTAGTAAATACCTGTTCTGGGATCCGGATTTCGCATCCTT 479
WS-0_ATE2_prot 420 CATTCCTTCCTAAATGTTTGTCTAGTAAATACCTGTTCTGGGATCCGGATTTCGCATCCTT 479
WS-2_ATE2_prot 421 CATTCCTTCCTAAATGTTTGTCTAGTAAATACCTGTTCTGGGATCCGGATTTCGCATCCTT 480
ged1_cds_ATE2 421 CATTCCTTCCTAAATGTTTGTCTAGTAAATACCTGTTCTGGGATCCGGATTTCGCATCCTT 480
WS_cds_ATE2 421 CATTCCTTCCTAAATGTTTGTCTAGTAAATACCTGTTCTGGGATCCGGATTTCGCATCCTT 480

Col-0_ATE2_cds 480 GTCTCTTGAAACTACTCAGCCCTGCAAGAAATCGATTGGGTAAAACAGAACCAAGCTCA 539
WS-0_ATE2_prot 480 GTCTCTTGAAACTACTCAGCCCTGCAAGAAATCGATTGGGTAAAACAGAACCAAGCTCA 539
WS-2_ATE2_prot 481 GTCTCTTGAAACTACTCAGCCCTGCAAGAAATCGATTGGGTAAAACAGAACCAAGCTCA 540
ged1_cds_ATE2 481 GTCTCTTGAAACTACTCAGCCCTGCAAGAAATCGATTGGGTAAAACAGAACCAAGCTCA 540
WS_cds_ATE2 481 GTCTCTTGAAACTACTCAGCCCTGCAAGAAATCGATTGGGTAAAACAGAACCAAGCTCA 540

Col-0_ATE2_cds 540 TTGCTCTACTCTTGAGTATTACTATCTTGGCTATTACATACATTCTGTAAACAAGATGAG 599
WS-0_ATE2_prot 540 TTGCTCTACTCTTGAGTATTACTATCTTGGCTATTACATACATTCTGTAAACAAGATGAG 599
WS-2_ATE2_prot 541 TTGCTCTACTCTTGAGTATTACTATCTTGGCTATTACATACATTCTGTAAACAAGATGAG 600
ged1_cds_ATE2 541 TTGCTCTACTCTTGAGTATTACTATCTTGGCTATTACATACATTCTGTAAACAAGATGAG 600
WS_cds_ATE2 541 TTGCTCTACTCTTGAGTATTACTATCTTGGCTATTACATACATTCTGTAAACAAGATGAG 600

Col-0_ATE2_cds 600 ATATAAAGCAGCCTATCGTCCGCTGAGCTTCTATGCCCTCTCCGGTACCAATGGGTTC 659
WS-0_ATE2_prot 600 ATATAAAGCAGCCTATCGCCCGCTGAGCTTCTATGCCCTCTCCGGTACCAATGGGTTC 659
WS-2_ATE2_prot 601 ATATAAAGCAGCCTATCGCCCGCTGAGCTTCTATGCCCTCTCCGGTACCAATGGGTTC 660
ged1_cds_ATE2 601 ATATAAAGCAGCCTATCGCCCGCTGAGCTTCTATGCCCTCTCCGGTACCAATGGGTTC 660
WS_cds_ATE2 601 ATATAAAGCAGCCTATCGCCCGCTGAGCTTCTATGCCCTCTCCGGTACCAATGGGTTC 660

Col-0_ATE2_cds 660 ATTCGAAGTAGCC 672
WS-0_ATE2_prot 660 ATTCGAAGTAGCC 672
WS-2_ATE2_prot 661 ATTCGAAGTAGCC 673
ged1_cds_ATE2 661 ATTCGAAGTAGCC 673
WS_cds_ATE2 661 ATTCGAAGTAGCC 673

```

Abb.43: cDNA-Sequenzen von Col-0, *ged1* und Ws im Vergleich zu den aus Genomdaten abgeleiteten Transkriptsequenzen von Ws-0 und Ws2.

6.3 Zuckergehalte

Tab.5: Zuckergehalte aus den Abbildungen 14 und 15 mit Standardabweichung [$\mu\text{mol}\cdot\text{gFW}^{-1}$]

	Ende	8h Luft	8h	24 h Luft	24 h	8h Luft (N₂)	8h N₂
	Lichtzyklus						
	Col-0	Col-0	Col-0	Col-0	Col-0	Col-0	Col-0
Glukose	1.60 ± 0.42	0.42 ± 0.15	0.75 ± 0.41	0.41 ± 0.18	0.31 ± 0.14	0.59 ± 0.20	6.03 ± 0.62
Fruktose	0.25 ± 0.05	0.12 ± 0.03	0.22 ± 0.17	0.05 ± 0.03	0.17 ± 0.11	0.16 ± 0.07	0.06 ± 0.02
Saccharose	1.67 ± 0.47	1.05 ± 0.16	1.48 ± 0.48	0.22 ± 0.07	0.41 ± 0.15	1.17 ± 0.25	0.01 ± 0.02
Stärke	37.99 ± 6.31	10.56 ± 3.42	11.42 ± 3.69	0.17 ± 0.15	0.55 ± 0.41	12.13 ± 4.02	21.16 ± 2.85
	<i>prt6-1</i>	<i>prt6-1</i>	<i>prt6-1</i>	<i>prt6-1</i>	<i>prt6-1</i>	<i>prt6-1</i>	<i>prt6-1</i>
Glukose	1.90 ± 0.76	0.91 ± 0.22	0.90 ± 0.52	0.32 ± 0.17	0.50 ± 0.28	0.71 ± 0.18	6.35 ± 1.65
Fruktose	0.57 ± 0.22	0.19 ± 0.05	0.40 ± 0.13	0.06 ± 0.04	0.50 ± 0.28	0.16 ± 0.07	0.08 ± 0.09
Saccharose	2.21 ± 0.84	1.42 ± 0.34	1.77 ± 0.29	0.21 ± 0.06	0.78 ± 0.36	1.25 ± 0.22	0.04 ± 0.05
Stärke	40.13 ± 4.04	14.42 ± 3.22	13.47 ± 2.09	0.30 ± 0.20	1.72 ± 1.05	13.26 ± 1.45	24.59 ± 3.55
	Ws	Ws	Ws	Ws	Ws	Ws	Ws
Glukose	1.76 ± 0.72	0.53 ± 0.12	0.74 ± 0.34	0.48 ± 0.21	0.59 ± 0.21	0.84 ± 0.49	4.57 ± 0.56
Fruktose	0.51 ± 0.26	0.19 ± 0.17	0.33 ± 0.15	0.03 ± 0.03	0.29 ± 0.20	0.18 ± 0.08	0.12 ± 0.09
Saccharose	2.07 ± 0.71	1.28 ± 0.16	1.55 ± 0.16	0.20 ± 0.08	0.57 ± 0.27	1.38 ± 0.24	0.04 ± 0.06
Stärke	36.58 ± 9.45	14.87 ± 1.89	14.26 ± 2.34	0.26 ± 0.16	0.73 ± 0.64	16.41 ± 2.76	26.18 ± 5.67
	<i>ged1</i>	<i>ged1</i>	<i>ged1</i>	<i>ged1</i>	<i>ged1</i>	<i>ged1</i>	<i>ged1</i>
Glukose	2.23 ± 0.47	0.78 ± 0.20	0.79 ± 0.25	0.44 ± 0.19	0.76 ± 0.28	0.88 ± 0.36	4.53 ± 1.02
Fruktose	0.83 ± 0.34	0.24 ± 0.10	0.53 ± 0.15	0.04 ± 0.03	0.49 ± 0.32	0.28 ± 0.15	0.49 ± 0.31
Saccharose	2.69 ± 0.69	1.59 ± 0.27	1.71 ± 0.62	0.19 ± 0.09	0.74 ± 0.26	1.67 ± 0.26	0.15 ± 0.16
Stärke	36.26 ± 5.90	15.05 ± 3.12	12.75 ± 2.65	0.18 ± 0.12	1.83 ± 1.00	18.45 ± 5.46	27.03 ± 8.14

6.4 Primer

Tab.6: Liste verwendeter Primer

Mapping		NGA707_1	CTCTCTGCCTCTCGCTGG
Chr.1		NGA707_2	TGAATGCGTCCAGTGAGAAG
NF21M12 fw.	TTACTTTTTGCCTCTTGTCATTG	Chr.4	
NF21M12 rev.	GGCTTTCTCGAAATCTGTCC	chr4_931395_fw	CGATCCGAGAGCATCGCTCACG
CIW 12 fw	AGGTTTTATTGCTTTTACACA	chr4_931395_rev	GCGAATCGGGGAAGCACCGAA
CIW 12 rev	CTTTCAAAAGCACATCACACA	NGA 8 fw.	TGGCTTTCGTTTATAAACATCC
CIW 1 fw	ACATTTTCTCAATCCTTACTC	NGA 8 rev.	GAGGGCAAATCTTTATTTTCGG
CIW 1 rev	GAGAGCTTCTTTATTTGTGAT	MW-CIW 7 fw.	AATTTGGAGATTAGCTGGAAT
NGA 280 fw	GGCTCCATAAAAAGTGCACC	MW-CIW 7 rev.	CCATGTTGATGATAAGCACAA
NGA 280 rev	CTGATCTCACGGACAATAGTGC	NGA 1107 fw	CGACGAATCGACAGAATTAGG
ATPase fw	GTTCACAGAGAGACTCATAACCA	NGA 1107 rev	GCGAAAAACAAAAAATCCA
ATPase rev	CTGGGAACGGTTCGATTCGAGC	Chr.5	
Chr.2		chr5_anfangcolfw	TGCATAAGTTCTTCGACTAACTTG
RG(A,Caps, RsaI)_1	TTCGATTCAGTTCGGTTTAG	chr5_anfangcolrev	GAAACAAAGGACTTCATAACCCGG
RG(A,Caps, RsaI)_2	GTTTAAGCAAGCGAGTATGC	chr5_anfanggedfw	TGCATAAGTGCTTCGACTAACTTA
THY fw	AACCGCCATTTTCATTTCTATC	chr5_anfanggedrev	GAAACAAAGGACTTCATAACCCGA
THY rev	GGCGACCTTGGACCTGTATACG	chr5_43kbcolfw	TAAATCGAGTGAGAGGGTCT
ER fw	GAGTTTATTCTGTGCCAAGTCCCTG	chr5_43kbcolrev	TACTTTAGTAGATTCCGGTTTTTC
ER rev	CTAATGTAGTATCTGCGAGGTAATC	chr5_43kbgedfw	TACTTGATCACGATCTTTGAC
NGA 168 fw.	GAGGACATGTATAGGAGCCTCG	chr5_43kbgedrev	TAGTAGATTCGTAGATTATACTTG
NGA 168 rev.	TCGTCTACTGCACTGCCG	chr5_145kb_col_fw	GTCCTAGCCTGTAAGCCACTTG
Chr.3		chr5_145kb_ged_fw	CCCTAGCCTATAAGCCACCCG
NGA 172 fw.	CATCCGAATGCCATTGTTC	chr5_145kb_rev	TCGTTCTGTGTGTTGGTGAAT
NGA 172 rev.	AGCTGCTTCCTTATAGCGTCC	chr5_256kb_col_fw	GCTGGTATACGTTTCCATATCTcAG
1512305_fw	TCTCTTGAAGCTTTCCTCTCACTG	chr5_256kb_ged_fw	GCTGGTATACGTTTCCATGTCTcAT
1512305_rev	TTGCGATCAAGAACTCGCTTC	chr5_256kb_rev	GACGATCGCTACATGGTGA
2124195_fw	ATGAATTGACTTTACCTGAGCAAG	chr5_392kb_col_fw	CGTAAACCCGTGATTTCCACC
2124195_rev	GAGGGAGGATAGAATCGGCG	chr5_392kb_ged_fw	TGTAAACCCGTGATTTCTTACA
2696040fw	AGTGTAACTAAACACCAACGGTTT	chr5_392kb_rev	ATCTCCATAGTTGTAGCTTGTAGC
2696040rev	TTGCAAAACGGAACCTGAAGT	prt6_r_mismcolfw	GTCTTACATTAACGATCTGCGTGC
2844170fw	TATTCGCGTGTCCAACGAG	prt6_r_mismgedfw	GTCTTACATTAACGATCTGCGCCA
2844170rev	AGTTGTAGAAAATCGGGCAACGA	prt6_r_mismrev	TCCATTTTCGGACATCGAAGTGA
chr3_2854kbfw	GGAGACACGATTACTCAGCATCTA	prt6_l_mismcolfw	GATCACTCCCTGAAACCAACAAGAC
chr3_2854kbrev	ACAATCATCTGCGTTTTAGGGTT	prt6_l_mismgedfw	GATCACTCACTGAAACTACAAGAT
chr3_ds8_col_fw	ATGCTCTGACATTTTAAATGGCGC	prt6_l_mismrev	TATGCCTCGAACAGAAGGCG
chr3_ds8_ged_fw	ATGCTCTGACATTTTAAATGGCGG	CTR1.2_fw	CCACTGTTTCTCTCTCTAG
chr3_ds8_rev	ATCAGAGCCAAAGCGGTGAA	CTR1.2_rev	TATCAACAGAAACGCACCCGAG
myb_r_miscolfw	GGTTACCACCACCAACAAGAAC	NGA158_fw	ACCTGAACCATCCTCCGTC
myb_r_misgedfw	GGTTACCACCACCAACAAGAGT	NGA158_rev	TCATTTTGCCGACTTAGC
myb_r_misrev	GCAATGGCTCTGGGTTAGGC	NGA249_fw	GGATCCCTAACTGTAATAATCCC
Fw2956918chr3col	TCTTCTAGCTTGAGCCGTAGG	NGA249_rev	TACCGTCAATTTATCATCGCC
Fw2956918chr3ws	TCTTCTAGCTTGAGCCGTAGC	CA72fw	CCCAGTCAACCACGACCAC
rev2956918chr3	CCTTTGGTGGCCTGAGGCAGA	CA72rev	AATCCCAGTAACCAACACACA
3134690fw	TGCTCCACGCATGAACAATCT	nga139_fw	GGTTTCGTTTCACTATCCAGG
3134690rev	ACGGTTTGATATGAGGACCGGA	nga139_rev	AGAGTACCAGATCCGATGG
3367416_fw	TTGAGTTGCCCTGTCTCAGAT	SO191fw	CTCCACCAATCATGCAAAATG
3367416_rev	ACTTGTCATTCGGGTAACCA	SO191rev	TGATGTTGATGGAGATGGTCA
nga162fw	CTCTGCTCACTTTTCTCTCTGG	CIW9fw	CAGACGTATCAAATGACAAATG
nga162rev	CATGCAATTTGCATCTGAGG	CIW9rev	GACTACTGCTCAAATATTCCGG
CIW11 fw	CCCCGAGTTGAGGTATT	LFY3fw	GACGGCGCTAGAAGATTC
CIW11 rev	GAAGAAATTCCTAAAGCATTC	LFY3rev	TAACCTATCGGGCTTCTGC

Klonierung/Sequenzierung		PRT6_3b_fw	TTCTCGAATTAGCTGGTCTGG
attB1_fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	PRT6_3b_rev	TTAGCTTTAGCTTTCGCTTC
attB2_rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	PRT6_fw3c	CGCAAGGCTAAAGCTAAAGAG
pDONR_fw	AGTCTTCCGACTGAGCCTTTC	PRT6_rev3c	CCATGTGGAACCTCAAGGTAG
pDONR_rev	CTGCCAGGAAACAGCTATGAC	PRT6_fw3d	GTCCTGGATTGGAATCTGCT
ABR1_GW_Cterm_fw	AAAAAGCAGGCTATATGTGTGTCTTAAAGTGCC	PRT6_rev3d	GGGCCTCTATCCACAAAATC
ABR1_GW_Cterm_rev	AGAAAGCTGGGTTGGAGGATGGACTATTATTGTAG	PRT6_fw3n	AGTTTTGGTCCAGGAAATGCT
pJET1_fw	TGTCCCAATTAGTAGCATCACG	PRT6_rev3n	TTGCAGCATGAGAGGAGAACT
pJET1_rev	TTCTGTCTCAGTTTCTCGAAG	PRT6_fw6	AGGCAAAAATGAAAGCTGAAC
LBD41fw_mitStart	AAAAAGCAGGCTTAATGCGGATGAGCTGTAATG	PRT6_fw4	TGTCCACAATCCGAAAAGAAG
LBD41rev_short_ohneStop	AGAAAGCTGGGTTCTCACAGCCGAGGCGAGA	PRT6_rev4	GCATACCTGAACAAGCGAGAC
LBD41rev_short_mitStop	AGAAAGCTGGGTTACTTCACAGCCGAGGCGAG	PRT6_fw5	CTTTTCAGGCACAACAGGTTTC
LBD41rev_ohneStop	AGAAAGCTGGGTTGAGCATAAGCTCAGCTTAC	PRT6_rev5	TCAACCAAAGTGACAGAATCA
SAIL_LB3	GAATTTACATAACCAATCTCGATACAC	PRT6_ds2_fw	TGCAATGCAACATCACGCC
LBb1(T3)	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	PRT6_ds2_rev	GGAACCTCAGGGATACGCTGC
		PRT6_ds1_fw	TGGTCGGTCTACTCTTGGCA
Sequenzierung ATE1/2		PRT6_ds1_rev	CACAAGGTCACAAACCAAC
ATE1_fw1	TGCCAATTGCATAACAGTCAG	PRT6_us1_fw	ACCACAATTGGAGCCGTCTT
ATE1_fw2s	GGGCCATATCAATTTCTTTC	PRT6_us1_rev	GTCTGTATCGCCAAGTCTCT
ATE1_rev1	ACGTACCAAAGATTGACAAAAAC	PRT6_us2_fw	ACCTTAGCAATTTCCGCCCA
ATE1_rev2s	TGCCTGATGTTTTCTGAATC	PRT6_us2_rev	AAGAGTGCCGTTTGAGGTTG
ATE2_fw1	ACTTCGTGTCGTTCAATTTGG		
ATE2_fw2s	TCACCAGAGGCTGTTTCTGAG	RT-PCR	
ATE2_rev1	CTCTCTGTTTTACGCGGTTTG	LEA_fw	ACAAGCAAAACGCGAGCTAC
ATE2_rev2s	CTCCGGCTTATCATTATGCAC	LEA_rev	CTTTTGTTCATGCCGTCTT
		RAB18_fw	GAGGAGGAGGATACGGAAGT
Sequenzierung MYB3R3		RAB18_rev	GCTTTTCTTGTATCTTGCCA
MYB3R3_fw	CTTGACCACAGAGGAAGAAG	RD29A_fw	CGGAGATTGCTGAGTCTTTTG
MYB3R3_rev	TAGGCAACTGAGGAGAACGAG	RD29A_rev	GGTCTCTCCAGCTCAGTCT
MYB3R3_fw2	GGGACCTTGACACATGAGG	HAI2_fw	TTTCTCGAACAAGATGGCACT
MYB3R3_rev_vorne	AACTACCAGCACTGCCTTCAG	HAI2_rev	TTCTGCACTACGTCCATAGC
MYB3R3_ds4_fw	GAGGCTATGCAATCGCAGACT	TSPO_fw	AGGAAAACGCGATCAAAGAG
MYB3R3_ds4_rev	ATCATAAGGGCGTATTCCGGG	TSPO_rev	CACGGCTTTACCAGATTACCA
MYB3R3_ds3_fw	TCTTTCCACTTCTCGCACG	HAD_fw	CTATTGACGTTTTGTTCTGTC
MYB3R3_ds3_rev	ATGAGGCAAAGCAAATCGAG	HAD_rev	GCATCCCAATACTTTTGCTG
MYB3R3_ds2_fw	TCTGGTCCGCGCTCATAGT	ABI5_fw	AGCTCCGCTTTGTAGGAAGAC
MYB3R3_ds2_rev	CGGACCGACACATTTGTIT	ABI5_rev	AGCCCTCCCATATCTACTCCA
MYB3R3_ds1_fw	TTGTTTTGCGGATTAGTTG	ABR1fw	TGAAGGTAGCGGAGAAGGGA
MYB3R3_ds1_revB	TCTTCTCTGTGGTCCAAGC	ABR1rev	TCAAGCAGGTCTTATGGGC
MYB3R3_us1_fw	CCAACGTTATCATCGTCTGCT	ABI3fw	AATCGGAGAACCTGTGCCG
MYB3R3_us1_rev	TGATTGCTCTCTCCGTCTGC	ABI3rev	GGCCAAAACCTGTAGCGCAT
MYB3R3_us2_fw	TATCAAGCCTGAACCCTGC	ABI4fw	GTCACGTGCTCAGCTCAACT
MYB3R3_us2_rev	TGTGAGAGTAGCACCAGGGA	ABI4rev	CCCACCGAACCAGCTAGAGA
		ADH_fw	ATGTCTACCACCGACAGATT
Sequenzierung PRT6		ADH_rev	GGTGTGATCCTGAGAAGAT
PRT6_fw7	ACGCCCTATTGGACTTTGTCT	PDC_fw	CTTAGTGCTTCCAAAACGGTG
PRT6_rev7	TTCCACTAGGCCACGTTTAGA	PDC_rev	CTTTCGAGAAGGCATCATCG
PRT6_fw1	TAGTGTCTCTGAGCGTTGTG	LBD41_fw	GCAAGCTAACGCAACTGTCTT
PRT6_rev1	TCTTCTTGGCGTTTCTATCA	LBD41_rev	ACGCCGATCCTTCTTCTTCA
PRT6_fw2	AAGTTGGAACGGTTGTGTGAG	Tub_ATH_fw	CTCAAGAGGTTCTCAGCAGTA
PRT6_rev2	AGGTCACGGGGTAAAGATTTG	Tub_ATH_rev	TCACCTTCTCATCCGAGTT
PRT6_fw3	CAGGAAATGCTTGGTCTTCTG	EF1alpha_Ute_fw	TGAGCAGCTCTTCTTGTCTCA
PRT6_rev3	CCCATCGTAGACCTTCTC	EF1alpha_Ute_rev	GGTGGTGGCATCCATCTTGTACA

rd22fw	CGACGTAGGAGTCGGTAAAGG
rd22rev	CGTTCTTCTTAGCCACCTCAGT
rd29bfw	CCGTGAGAGGTGGTGTAACG
rd29brev	CAGCTTCTCCACCTTTATGCG
270_fw	TCTACAAGCAAAGCATGGACA
270_rev	TTGAGCTGTTGGGGTCCTAAT
RAP212_fw	TCTTCGATTTTGACGCTGAGT
RAP212_rev	TTGGCTTCCTCAAAGAACAGA
RAP22_fw	CCGCGTCACTAACGAGTTTAT
RAP22_rev	CTCCACTGGGTTTTCTCTTC
Rap23_fw	AAGAGGAGGCAGTGAAGAAGG
Rap23_rev	ATCATAATCCGGCTCAAATCC
Tail PCR	
PRT6_3b_fw	TTCTCGAATTAGCTGGTCTGG
PRT6_fw3c	CGCAAGGCTAAAGCTAAAGAG
PRT6_fw3d	GTCCTGGATTGGAAATCTGCT
PRT6_rev3	CCCATCGCTAGACCTCTTCTC
PRT6_rev3d	GGGCCTCTATCCACAAAACCTC
PRT6_rev3n	TTGCAGCATGAGAGGAGAACT
TAILAD1	NGTCGASWGANAWGAA
TAILAD2	TGWGNAGSANCASAGA
TAILAD3	AGWGNAGWANCAWAGG
TAILAD4	STTGNTASTNCTNTGC
TAILAD5	NTCGASTWTSGWGTT
TAILAD6	WGTGNAGWANCANAGA

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Angelika Mustroph für die Ermöglichung und hervorragende Betreuung dieser Doktorarbeit.

Prof. Dr. Laurentius A.C.J. Voeselek und Dr. Rashmi Sasidharan danke ich für ihren Beitrag zu den Überlebensexperimenten, ohne die die Entwicklung von weiteren Forschungsansätzen nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke allen, die mit mir zusammengearbeitet und somit zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere Judith Bäumler, Philipp Gasch, Tim Grimmelsmann, Lukas Häfner, Anna Hoffmann, Gabriele Magris, Pia Schuster, Fabian Zech.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Lehrstuhls Pflanzenphysiologie (und Pflanzengenetik) für die enge Zusammenarbeit, vielfältige Unterstützung und eine schöne Zeit bedanken.

(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen

(§ 5 Nr. 4 PromO)

Hiermit erkläre ich, dass keine Tatsachen vorliegen, die mich nach den gesetzlichen Bestimmungen über die Führung akademischer Grade zur Führung eines Doktorgrades unwürdig erscheinen lassen.

(§ 8 S. 2 Nr. 5 PromO)

Hiermit erkläre ich mich damit einverstanden, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung hinsichtlich der eigenständigen Anfertigung der Dissertation unterzogen werden kann.

(§ 8 S. 2 Nr. 7 PromO)

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

(§ 8 S. 2 Nr. 8 PromO)

Ich habe die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades anderweitig eingereicht und habe auch nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden.

(§ 8 S. 2 Nr. 9 PromO)

Hiermit erkläre ich, dass ich keine Hilfe von gewerbliche Promotionsberatern bzw. -vermittlern in Anspruch genommen habe und auch künftig nicht nehmen werde.

Bayreuth, den 26.01.2015

.....
Ort, Datum, Unterschrift